

# Regulation der IL-6-induzierten Jak/STAT Signaltransduktion

Reduktion der SOCS3 Expression durch Glukokortikoide

und

Systembiologische Analyse der Funktion von SHP2

## **Dissertation**

zur Erlangung des akademischen Grades

**doctor rerum naturalium**

**(Dr. rer. nat.)**

genehmigt durch die Fakultät für Naturwissenschaften

der Otto-von-Guericke Universität Magdeburg

von Dipl.-Biologin Anna Dittrich

geb. am 22.01.1983 in Duisburg

Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Fred Schaper  
Prof. Dr. rer. nat. Gerhard Müller-Newen

eingereicht am: 28.11.2011

verteidigt am: 28.02.2012

---

## Veröffentlichungen

wesentliche Teile der vorliegenden Arbeit wurden veröffentlicht:

**Dittrich, A.\***, Khouri, C.\*, Sackett, S.D., Ehlting, C., Böhmer, O., Albrecht, U., Bode, J.G., Trautwein, C., and Schaper, F. (2012) Glucocorticoids increase interleukin-6 dependent gene induction by interfering with the expression of the SOCS3 feedback inhibitor, *Hepatology* 55, 256-266.

Quaiser, T., **Dittrich, A.**, Schaper, F., and Mönnigmann, M. (2011) A simple work flow for biologically inspired model reduction - application to early JAK-STAT signaling, *BMC Syst. Biol.* 5, 30.

**Dittrich, A.\***, Quaiser, T.\*, Khouri, C., Schwache, D., Mönnigmann, M., and Schaper, F. (2011) Model driven refinement of the function of SHP2 in IL-6-induced signal transduction, [zur Publikation eingereicht]

\* gleichberechtigte Erstautoren

### Weitere Veröffentlichungen:

Khouri, C., **Dittrich, A.**, Sackett, S. D., Denecke, B., Trautwein, C., and Schaper, F. (2011) Glucagon counteracts interleukin-6-dependent gene expression by redundant action of Epac and PKA, *Biol. Chem.* 392, 1123-1134.

**Dittrich, A.**, Siewert, E., and Schaper, F. (2011) Determination of protein turnover rates using a radioactive pulse chase approach, *Protocols in JAK-STAT Signalling, Humana Press Methods in Molecular Biology* [zur Publikation akzeptiert]

### Review:

Eulenfeld, R., **Dittrich, A.**, Khouri, C., Müller, P.J., Mütze, B., Wolf, A., and Schaper, F. (2011) Interleukin-6 signalling: more than Jaks and Stats, *Eur. J. Cell. Biol.* [zur Publikation akzeptiert]

## Inhaltsverzeichnis

Veröffentlichungen.....	i
Inhaltsverzeichnis.....	ii
1. Einleitung.....	1
1.1. Zytokine.....	1
1.2. Interleukin-6.....	1
1.2.1. Akut-Phase Reaktion .....	2
1.2.2. IL-6-induzierte Jak/STAT Signaltransduktion.....	2
1.3. Negativregulation der IL-6 Signaltransduktion .....	4
1.3.1. SHP2 .....	4
1.3.2. SOCS3 .....	6
1.4. Glukokortikoide.....	8
1.4.1. Physiologische Funktionen der Glukokortikoide.....	8
1.4.2. Synthetische Glukokortikoide .....	8
1.4.3. Glukokortikoid-induzierte Signaltransduktion .....	9
1.5. Interaktion zwischen Glukokortikoiden und Zytokinen.....	11
1.6. Systembiologie.....	14
1.7. Differentialgleichungsmodelle.....	15
1.7.1. Parameterschätzung .....	17
1.7.2. Analyse der Parametergüte durch $\chi^2$ – Tests.....	17
1.7.3. Identifizierbarkeitsanalyse .....	17
1.8. Systembiologische Analyse der Regulation des Jak/STAT Signalweges.....	19
2. Ziele der Arbeit.....	21
3. Material und Methoden.....	22
3.1. Chemikalien.....	22
3.2. Inhibitoren .....	22
3.3. Zytokine.....	22
3.4. Antikörper .....	22
3.5. Plasmide.....	24
3.6. Primer.....	26
3.7. Prokaryontische Zellen.....	26
3.7.1. Kulturbedingungen für prokaryontische Zellen .....	26
3.7.2. Herstellung kompetenter Bakterien .....	27
3.7.3. Transformation und Aufreinigung von Plasmiden .....	27
3.7.4. Quantitative Bestimmung von Nukleinsäuren .....	27
3.8. Eukaryontische Zellen und <i>in vivo</i> Versuche.....	28
3.8.1. Kulturbedingungen für eukaryontische Zelllinien.....	30
3.8.2. Stimulationsbedingungen .....	30

---

3.8.3.	Bestimmung des Zellvolumens .....	30
3.8.4.	Retrovirale Transduktion eukaryontischer Zellen .....	31
3.8.5.	Isolation und Kultivierung primärer muriner Hepatozyten.....	31
3.8.6.	Isolation der Leber und des Serums aus Mäusen .....	31
3.9.	Klonierung .....	32
3.9.1.	PCR .....	32
3.9.2.	Agarose-Gelelektrophorese .....	32
3.9.3.	Restriktionsverdau .....	33
3.9.4.	Ligation von DNA Fragmenten .....	33
3.9.5.	Ligation von PCR Produkten in pCR8/GW/TOPO .....	34
3.9.6.	Sequenzierung.....	34
3.10.	Proteinchemische und immunologische Methoden.....	34
3.10.1.	Zelllysate.....	34
3.10.2.	Immunpräzipitation von Proteinen aus Zelllysaten .....	35
3.10.3.	Quantifizierung von intrazellulären Proteinen.....	35
3.10.4.	Zellfraktionierung.....	36
3.10.5.	Proteinbestimmung nach Bradford.....	37
3.10.6.	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page).....	37
3.10.7.	Western Blot .....	38
3.10.8.	Detektion von Proteinen mittels Immundetektion.....	39
3.10.9.	Intrazelluläre Durchflusszytometrie.....	40
3.10.10.	Kopplung von Primärantikörpern mit Phycoerithrin .....	40
3.10.11.	Extrazelluläre Durchflusszytometrie.....	41
3.10.12.	ELISA .....	41
3.10.13.	Konfokale Mikroskopie .....	42
3.11.	Molekular- und zellbiologische Methoden .....	43
3.11.1.	Reportergen-Assay.....	43
3.11.2.	Liposomale Transfektion mit Lipofectamine 2000.....	43
3.11.3.	Lyse der transfizierten Zellen .....	44
3.11.4.	Luziferase Assay .....	44
3.11.5.	RT-qPCR.....	45
3.11.5.1.	RNA Isolation.....	45
3.11.5.2.	Reverse-Transkriptase PCR .....	45
3.11.5.3.	Real-time PCR.....	45
3.11.6.	Transfektion von siRNA .....	46
3.12.	Statistische Analyse.....	46
3.13.	Mathematische Modellierung .....	46
4.	Ergebnisse .....	47

4.1.	Regulation der IL-6-induzierten Signaltransduktion durch Glukokortikoide .....	47
4.1.1.	Glukokortikoide erhöhen die IL-6-induzierte Expression von Akut-Phase Genen .....	47
4.1.2.	Glukokortikoide erhöhen die späte IL-6-induzierte STAT3 Phosphorylierung .....	48
4.1.3.	Glukokortikoide reduzieren die IL-6 induzierte SOCS3 Expression .....	50
4.1.4.	Glukokortikoide beeinflussen die Kerntranslokation von STAT3 nicht .....	52
4.1.5.	Glukokortikoide beeinflussen die Synthese der SOCS3 mRNA nicht .....	53
4.1.6.	Glukokortikoide reduzieren die Stabilität des SOCS3 Proteins nicht .....	54
4.1.7.	Glukokortikoide verstärken die Expression von Akut-Phase Genen transkriptionsabhängig .....	56
4.1.8.	Die Akut-Phase Reaktion wird durch die Reduktion der SOCS3 Expression verstärkt... ..	58
4.1.9.	Glukokortikoide verstärken die Akut-Phase Gen Expression <i>in vivo</i> .....	61
4.1.10.	Glukokortikoide verstärken die Expression IL-6-induzierter Akut-Phase Gene global ..	63
4.1.11.	Zusammenfassung: Regulation der IL-6-induzierten Signaltransduktion durch Glukokortikoide .....	64
4.2.	Systembiologische Analyse der Funktion von SHP2 im IL-6-induzierten Jak/STAT- Signalweg .....	66
4.2.1.	Etablierung eines standardisierten Zellsystems - HEK-gp80 Zellen .....	66
4.2.2.	Etablierung von standardisierten experimentellen Bedingungen .....	68
4.2.3.	Beschreibung des Ausgangsmodells $M^0$ .....	70
4.2.4.	Experimentelle Validierung der Modellierungsannahmen .....	73
4.2.4.1.	Die Konzentration von gp130, Jak1, STAT3 und SHP2 ist konstant .....	73
4.2.4.2.	Die Phosphorylierung von Jak1 dient als Indikator für die Aktivierung des Rezeptorkomplexes .....	75
4.2.4.3.	IL-6 induziert in 15 min keine Synthese von SOCS3 .....	77
4.2.5.	Quantifizierung der Startwerte .....	77
4.2.5.1.	Quantifizierung der Oberflächenexpression von gp130 .....	78
4.2.5.2.	Quantifizierung von STAT3, (p)STAT3, SHP2 und (p)SHP2 .....	80
4.2.6.	Experimentsatz I .....	82
4.2.6.1.	Analyse der Dynamik der Bindung von IL-6 an den Rezeptorkomplex .....	83
4.2.6.2.	Analyse der Dynamik der Phosphorylierung von Jak1, STAT3 und SHP2 .....	84
4.2.7.	Analyse der Phosphorylierung von SHP2 und STAT3 in Einzelzellen .....	87
4.2.8.	Zusammensetzung der Modellausgänge .....	88
4.2.9.	Modellmodifikation: $M^0$ bis $M^4$ .....	90
4.2.9.1.	$M^0 \rightarrow M^1$ .....	91
4.2.9.2.	$M^1 \rightarrow M^2$ .....	93
4.2.9.3.	$M^2 \rightarrow M^3$ .....	94
4.2.9.4.	$M^3 \rightarrow M^4$ .....	96
4.2.10.	Computergestütztes, optimales experimentelles Design .....	97
4.2.11.	Experimente basierend auf OED .....	98

---

4.2.12. $M^4 \rightarrow M^5$ .....	101
4.2.13. Modellmodifikation: $M^5$ bis $M^8$ .....	102
4.2.13.1. $M^5 \rightarrow M^6$ .....	103
4.2.13.2. $M^6 \rightarrow M^7$ .....	103
4.2.13.3. $M^7 \rightarrow M^8$ .....	104
4.2.14. Validierung von $M^8$ .....	106
4.2.15. SHP2 ist ein basaler Repressor der IL-6-induzierten Signaltransduktion .....	108
4.2.16. Zusammenfassung: Systembiologische Analyse der Funktion von SHP2 im IL-6-induzierten Jak/STAT-Signalweg .....	109
5. Diskussion .....	111
5.1. Regulation der IL-6-induzierten Signaltransduktion .....	111
5.2. Reduktion der SOCS3 Expression durch Glukokortikoide .....	111
5.2.1. Globale Verstärkung der Akut-Phase Reaktion durch Glukokortikoide .....	111
5.2.2. Physiologische Konsequenzen einer verstärkten Akut-Phase Reaktion .....	114
5.2.3. Physiologische Konsequenzen der Reduktion von SOCS3 .....	115
5.2.4. Einfluss von SOCS3 auf die Leberentwicklung und Regeneration .....	116
5.2.5. Die transaktivierende Funktion von Dexamethason ist essentiell für die Verstärkung der Akut-Phase Reaktion .....	117
5.2.6. Einfluss von Dexamethason auf die SOCS3 Synthese und Degradation .....	117
5.2.7. Induziert Dexamethason die Expression von miRNAs? .....	119
5.3. Systembiologische Analyse der Funktion von SHP2 .....	121
5.3.1. Etablierung standardisierter experimenteller Bedingungen .....	121
5.3.2. Die Stöchiometrie des Jak/STAT Signalweges .....	121
5.3.3. Die Dynamik der Aktivierung des Jak/STAT Signalweges .....	122
5.3.4. Die Assoziation von IL-6 mit gp80 ist essentiell für die frühe Signaltransduktion .....	125
5.3.5. Die Dimerisierung von STAT3 ist essentiell für die frühe Signaltransduktion .....	126
5.3.6. Die Phosphorylierung von SHP2 ist nichtlinear .....	127
5.3.7. SHP2 ist kein früher <i>feedback</i> Inhibitor .....	128
5.3.8. SHP2 ist ein basaler Repressor .....	131
6. Ausblick .....	133
6.1. Welche pathophysiologischen Konsequenzen hat die durch Glukokortikoide verstärkte Akut-Phase Protein Expression? .....	133
6.2. Reguliert Dexamethason auch die nicht hepatische SOCS3 Expression ? .....	133
6.3. Induzieren Glukokortikoide die Expression von miRNA gegen SOCS3? .....	134
6.4. Wie unterscheidet sich die Dynamik der IL-6-induzierten Signaltransduktion in verschiedenen Zelltypen? .....	134
6.5. Welchen Einfluss hat SHP2 auf die späte IL-6-induzierte Signaltransduktion? .....	135
6.6. Welchen Einfluss hat Y759 in gp130 auf die IL-6-induzierte Signaltransduktion? .....	135
6.7. Ist SHP2 in allen Zellen ein basaler Repressor und welche Kinasen sind basal aktiv? .....	135

7. Zusammenfassung.....	136
8. Summary .....	137
9. Anhang.....	I
Mathematische Repräsentation der identifizierbarkeitsbasierten Modellmodifikation .....	I
Abkürzungsverzeichnis .....	VIII
Literaturverzeichnis .....	XI
Lebenslauf .....	XXV
Erklärung .....	XXVI
Danksagung .....	XXVII

---

## 1. Einleitung

### 1.1. Zytokine

Zytokine sind kleine, meist sezernierte Peptide, die zur Kommunikation in vielzelligen Organismen beitragen. Im Gegensatz zu klassischen Hormonen werden sie nicht von spezialisierten Drüsenzellen ausgeschüttet, sondern von verschiedensten Zelltypen in nahezu allen Geweben produziert. Ursprünglich wurden den Zytokinen rein immunmodulatorische Funktionen zugeschrieben. Inzwischen ist bekannt, dass sie weitere essentielle Aufgaben erfüllen. Sie steuern die angeborene Immunantwort, indem sie Entzündungen koordinieren, Phagozyten aktivieren und die Synthese von Akut-Phase-Proteinen in der Leber auslösen. Neben der Differenzierung und Aktivierung von T- und B-Zellen in der adaptiven Immunantwort steuern Zytokine in der Hämatopoese die Reifung weiterer Blutzellen. Des Weiteren besitzen sie eine Funktion im embryonalen und neuronalen Wachstum und der Fertilitätsentwicklung.

Das breite Wirkungsspektrum der Zytokine ist bereits ein Indiz für die Notwendigkeit einer starken Kontrolle ihrer Aktivierung. Diese wird über ein Gegenspiel von pro- und anti-inflammatorischen Zytokinen und ein komplexes System aus konstitutiven und *feedback* Inhibitoren ermöglicht. Eine Dysregulation im Zytokinsystem kann chronisch entzündliche Krankheiten und das Wachstum von Tumorzellen auslösen.

Zytokine aktivieren Zellen, indem sie an spezifische Rezeptoren binden und intrazelluläre Signalkaskaden auslösen, die eine veränderte Transkription von Zielgenen bewirken. Hierbei kann ein Zytokin verschiedene pleiotrope Antworten auslösen und unterschiedliche Zytokine redundante Wirkungen zeigen. Die Aktivierung der Zellen kann sowohl autokrin als auch parakrin und endokrin erfolgen.

Die Klassifizierung von Zytokinen kann aufgrund ihrer biologischen Funktion, der Nutzung spezifischer Oberflächenrezeptoren oder ihrer dreidimensionalen Struktur erfolgen.

### 1.2. Interleukin-6

Interleukin-6 (IL-6) ist ein pleiotropes Zytokin, das vor der einheitlichen Nomenklatur unter anderem unter den Namen *B-cell differentiation/stimulatory factor (1)*, *hybridoma growth factor*, *interferon  $\beta$ -2 (2)* und 26kDA-Protein (3) geführt wurde. Es gehört strukturell zur Familie der Vier-Helix-Bündel-Zytokine (4) und ist namensgebend für die Familie der IL-6-Typ Zytokine.

Im Zuge einer Entzündung kann es von Makrophagen, Monozyten, Kupffer-Zellen, Neutrophilen, Mastzellen, Osteoblasten und Epithelzellen gebildet werden. Sein Wirkungsspektrum umfasst sowohl pro- als auch anti-inflammatorische Eigenschaften (siehe (5) zur Übersicht). Es konnten Zusammenhänge zwischen der Expression von IL-6 und Krankheiten wie akuter Sepsis, rheumatoider Arthritis,



Multipler Sklerose, Morbus Crohn, bestimmten Krebserkrankungen (z.B. dem multiplen Myelom) und Autoimmunkrankheiten bestimmt werden. So bekommen IL-6 transgene Mäuse u.a. Plasmazytome (6), während IL-6 *knockout* Tiere seltener experimentelle autoimmune Enzephalitis (7) und Kollagen-induzierte Arthritis (8) entwickeln und niedrigere Serumkonzentrationen von Akut-Phase Proteinen zeigen (9).

### 1.2.1. Akut-Phase Reaktion

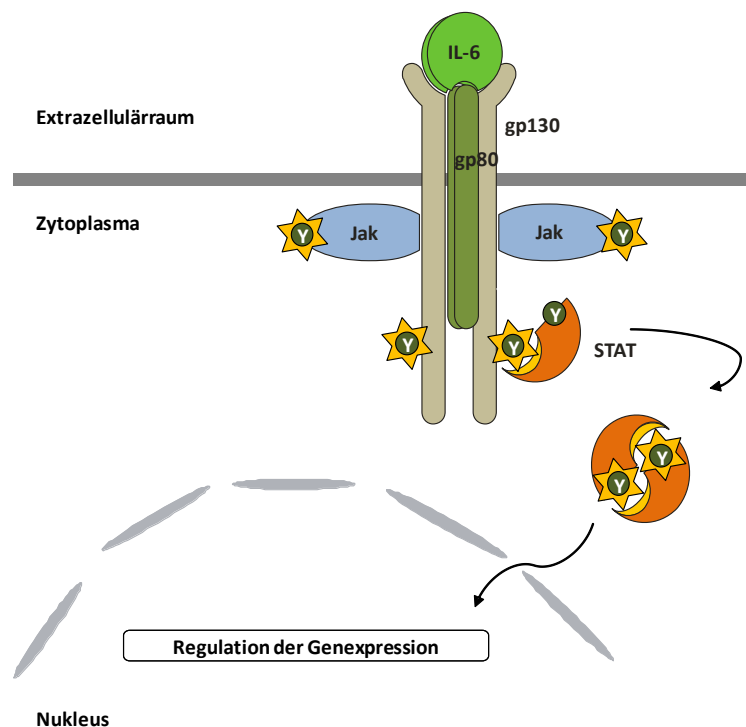
Die Akut-Phase Reaktion ist als Bestandteil des angeborenen Immunsystems eine schnelle Antwort des Körpers auf eindringende Mikroorganismen oder Verletzungen (10). Um die Homöostase des Körpers wiederherzustellen umfasst die systemische Akut-Phase Reaktion u.a. die Entwicklung von Fieber, die Vermehrung von Granulozyten, die Verstärkung der Glukoneogenese und des Protein Katabolismus, sowie die Erhöhung des Plasmaspiegels von Akut-Phase Proteinen. Akut-Phase Proteine werden nahezu ausschließlich in der Leber produziert und erreichen über den Blutkreislauf ihre Wirkorte. Dort wirken sie u.a. blutstillend (z.B. Fibrinogen, Plasma-Fibronektin), mikrobizid und opsonierend (z.B. C-reaktives Protein), sowie antithrombotisch (saures  $\alpha$ 1-Glykoprotein) und antiproteolytisch (z.B.  $\alpha$ 2-Makroglobulin,  $\alpha$ 1-Antichymotrypsin, Serin Protease Inhibitor 2.3). Weiterhin induzieren Akut-Phase Proteine die Leukozyten Adhäsion am Verletzungsort (z.B. Serum Amyloid A) und beeinflussen den Hämoglobinspiegel im Blut (z.B. Haptoglobin). Zusammenfassend ermöglichen Akut-Phase Proteine die Isolation von Entzündungsherden, die Markierung und Schwächung von Erregern und die Aktivierung der Gewebereparatur (siehe (11) zur Übersicht).

Die Synthese der Akut-Phase Proteine wird primär durch  $\gamma$ - von Zellen des angeborenen Immunsystems sezerniertes  $\gamma$ -IL-6 und IL-1 induziert (siehe (12) zur Übersicht). Die Analyse der Promotoren von u.a.  $\alpha$ 2-Makroglobulin (13) und  $\gamma$ -Fibrinogen (14) zeigte, dass die IL-6-induzierte Aktivierung des Transkriptionsfaktors *signal transducer and activator of transcription 3* (STAT3) essentiell für die Synthese dieser Proteine ist (15).

### 1.2.2. IL-6-induzierte Jak/STAT Signaltransduktion

IL-6 induziert die Aktivierung des Jak/STAT Signalweges (Abb. 1.1), der MAPK-Kaskade und der PI3K-Kaskade (siehe (16) zur Übersicht). Die Bindung von IL-6 an gp80 (auch IL-6R $\alpha$ , CD126) ermöglicht die Assoziation des Zytokins mit der IL-6-Rezeptoruntereinheit gp130 (17). Im Gegensatz zu gp130, welches ubiquitär exprimiert wird (18), ist die Expression von gp80 auf wenige Zelltypen wie Hepatozyten, intestinale Epithelzellen (19), endokrine Drüsen (20) und Leukozyten beschränkt. Zusätzlich kann gp80 auch in löslicher Form vorkommen (21, 22) und als Agonist die IL-6-induzierte Signaltransduktion in Zellen auslösen, die kein gp80 exprimieren (siehe (23) zur Übersicht). Während gp130 die Aktivierung der intrazellulären Signaltransduktion vermittelt (24), besitzt gp80 keine bekannte signal-

übermittelnde Funktion (17). Im Gegensatz zu Rezeptortyrosinkinasen besitzt gp130 jedoch keine eigene katalytische Aktivität. Um eine Signalweiterleitung zu ermöglichen ist gp130 zyttoplasmatisch mit Mitgliedern der Janus-Kinasen (Jak) assoziiert (25). Für die IL-6-induzierte Signaltransduktion ist Jak1 essentiell (26). Die Zytokin-induzierte Rezeptorassemblierung bringt Jak in räumliche Nähe zueinander und löst ihre Aktivierung und darauf folgende Autophosphorylierung aus. Aktivierte Jak phosphorylieren nun Tyrosylreste in den zytoplasmatischen Domänen von gp130. Die phosphorylierten Tyrosylreste dienen als Bindungsstellen für Moleküle, die SH2 (*src-homology region*)-Domänen beinhalten. Zu diesen gehört die Gruppe der STAT Faktoren. Durch IL-6 wird primär STAT3 an den Rezeptor rekrutiert, in geringerem Maße jedoch auch STAT1 (27). STAT3 kann an die phosphorylierten, membrandistalen Tyrosine 767, 814, 905, 915 von gp130 binden, wobei die zwei letztgenannten Tyrosine auch von STAT1 gebunden werden (28). Gebundene STAT3 werden durch Jak an Y705 phosphoryliert (Y701 bei STAT1) (29). Dies ermöglicht die Dimerisierung der STAT Faktoren über eine intermolekulare Interaktion zwischen den SH2-Domänen und dem phosphoryliertem Y705/701 (30). Phosphorylierte, dimerisierte STAT-Faktoren translozieren in den Zellkern und wirken dort als Transkriptionsfaktoren (31, 32). Die klassische Sicht zytoplasmatischer, monomerer, unphosphorylierter STAT-Faktoren ist durch die Entdeckung unphosphorylierter STAT Dimere erweitert worden (33-35).



**Abb. 1.1 Die IL-6-induzierte Jak/STAT Signaltransduktion.** Die Assoziation des Rezeptorkomplexes aus IL-6, gp80 und gp130 bewirkt die Aktivierung von Jak, welche Tyrosylreste in gp130 phosphoryliert. Im Folgenden werden Transkriptionsfaktoren der STAT Familie rekrutiert und durch Jak phosphoryliert. Diese Aktivierung induziert die Dimerisierung der STAT Faktoren und ihre Translokation in den Nukleus sowie die Expression IL-6-abhängiger Gene. Sterne repräsentieren eine Phosphorylierung des hinterlegten Tyrosylrestes.

### 1.3. Negativregulation der IL-6 Signaltransduktion

Die IL-6-induzierte Signaltransduktion kann, wenn sie dauerhaft aktiviert wird, chronische Entzündungen und Tumorwachstum auslösen. Daher wird sie unter physiologischen Bedingungen durch komplexe Regulationsmechanismen kontrolliert. Zu den Inhibitoren der IL-6-induzierten Signaltransduktion gehören die nukleäre Phosphatase TC-PTP (36), *protein inhibitors of activated STATs* (PIAS) (37) sowie die zytoplasmatische *SH2 domain containing phosphatase* (SHP2) und die Mitglieder der *suppressor of cytokine signaling* (SOCS) Familie (38). Zusätzlich gibt es erste Hinweise für eine miRNA abhängige Regulation der Jak/STAT Signaltransduktion (39).

#### 1.3.1. SHP2

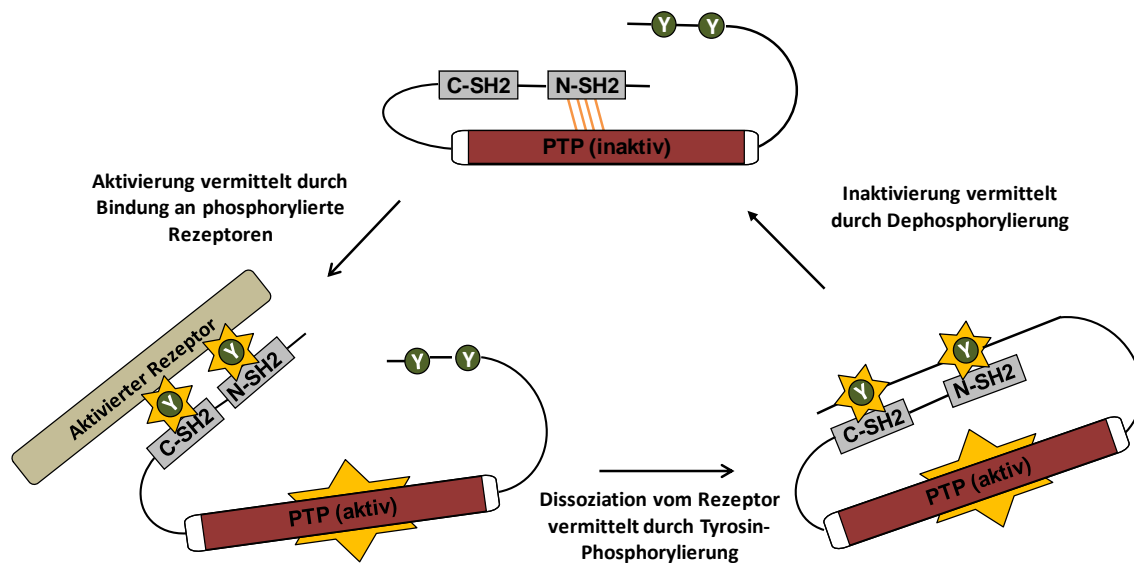
SHP2 ist eine ubiquitär und konstitutiv exprimierte Proteintyrosinphosphatase (PTP). Sie besitzt eine duale Funktion in der IL-6-induzierten Signaltransduktion. So ist ihre Expression auf der einen Seite essentiell für die IL-6-induzierte Aktivierung der MAPK Kaskade, auf der anderen Seite wirkt sie negativ auf die Jak/STAT Signaltransduktion (40, 41).

SHP2 besitzt zwei SH2 Domänen (N-SH2 und C-SH2), eine katalytische PTP Domäne und zwei konservierte, phosphorylierbare Tyrosine (Y542, Y580) in der C-terminalen Region (Abb. 1.2).



**Abb. 1.2 Domänenstruktur von SHP2** SHP2 setzt sich aus zwei SH2 Domänen, einer PTP Domäne und einer C-terminalen Region, die zwei konservierte, phosphorylierbare Tyrosine beinhaltet, zusammen.

Im inaktiven Zustand blockiert die N-SH2 sterisch das katalytische Zentrum der Phosphatase. Interagieren die zwei SH2 Domänen mit phosphorylierten Tyrosylresten in einem anderen Molekül, z.B. pY759 in gp130 (42, 43), oder mit den beiden phosphorylierten Tyrosinen 542 und 580 verändert SHP2 ihre Konformation und geht in einen aktiven Zustand über (44-46) (Abb. 1.3). Der Mechanismus der SHP2 Aktivierung durch Aufklappen wird durch die Kristallstruktur des Proteins gestützt (47). Zusätzlich wurde kürzlich am Beispiel der zu SHP2 homologen Phosphatase SHP1 beschrieben, dass die aktive Konformation durch molekulare Interaktionen zwischen den zwei SH2 Domänen und der katalytischen Domäne stabilisiert wird (48).



**Abb. 1.3 Aktivierung von SHP2** Die Phosphatasefunktion von SHP2 wird durch die Interaktion der N-SH2 Domäne mit der PTP-Domäne inhibiert. Die Interaktion der SH2 Domänen mit phosphorylierten Tyrosylresten in aktivierten Rezeptoren bzw. den phosphorylierten Tyrosylresten in der C-terminalen Region von SHP2 aktiviert die Phosphatasefunktion. Sterne repräsentieren eine Phosphorylierung des hinterlegten Tyrosylrestes bzw. eine aktive PTP.

Die IL-6-induzierte Phosphorylierung von gp130 an Y759 (Y757 in der Maus) ermöglicht die Rekrutierung von SHP2 an den aktivierten Rezeptorkomplex (42) und somit das Aufklappen und die Aktivierung der Phosphatase. Die Rekrutierung von SHP2 an gp130 resultiert innerhalb von Minuten in einer Phosphorylierung von SHP2 an Y542 und Y580 (49). Dies könnte durch die intramolekulare Interaktion der phosphorylierten Tyrosylreste mit den zwei SH2 Domänen eine Ablösung der SHP2 vom Rezeptor induzieren. Barua *et al.* beschreiben diese konkurrierenden inter- und intramolekularen Bindungen zwischen den zwei SH2 Domänen, den phosphorylierten Tyrosylresten in SHP2 sowie einem phosphorylierten Rezeptordimer in einem kinetischen Modell (50). Die Analyse dieses Modells ergibt schon für dieses isolierte System mehr als 1000 mögliche Interaktionskombinationen. In der Zelle wird die Anzahl der möglichen Interaktionen zwischen SHP2 und dem IL-6-induzierten Jak/STAT Signalweg weiter gesteigert. So konnte *in vivo* gezeigt werden, dass SHP2 an Jak1 (51) und STAT3 (52) bindet, womit diese Moleküle als Substrat für SHP2 in Frage kommen. Zusätzlich kann SHP2 die beiden konservierten Tyrosylreste in ihrer C-terminalen Region dephosphorylieren (43).

Die genaue Funktion von SHP2 in der Regulation der Jak/STAT Signaltransduktion ist noch unbekannt. Qualitative Studien zeigen, dass SHP2 die IL-6-induzierte Phosphorylierung und Aktivierung von gp130, Jak1 und STAT3 reduziert (40, 43). Des Weiteren inhibieren die Chemotherapeutika Sorafenib (53, 54) und Arctigenin (55) durch die Aktivierung von SHP2 die Phosphorylierung von STAT3. In Patienten mit u.a. juvenilen myelomonozytären Leukämien (JML) werden aktivierende Mutationen im SHP2 kodierenden Gen (PTPN11) beobachtet. Diese Mutationen werden mit einer reduzierten STAT3

Phosphorylierung assoziiert (56). Im Gegensatz dazu zeigte eine rein theoretische Analyse der Jak/STAT Signaltransduktion, dass SHP2 nicht signifikant zur Regulation der Dynamik der Jak/STAT Signaltransduktion beiträgt (57). Daher ist es notwendig die Funktion von SHP2 mit einer Kombination aus quantitativen, experimentell generierten Daten und theoretischen Methoden in einem systembiologischen Ansatz zu untersuchen.

### 1.3.2. SOCS3

SOCS Proteine agieren in als klassische *feedback* Inhibitoren (58). Ihre Synthese wird durch die Zytokine ausgelöst, deren Signaltransduktion sie später hemmen. Bis heute sind acht Mitglieder der SOCS Familie bekannt, CIS (*cytokine-inducible SH2-domain containing protein*) und SOCS 1-7 (59). Nach Stimulation mit IL-6 wird primär die Synthese von SOCS3 induziert (60, 61). SOCS Proteine bestehen aus einer N-terminalen *kinase inhibitory region* (KIR), gefolgt von einer SH2-Domäne und einer C-terminalen SOCS Box (Abb. 1.4). Die SOCS Box kann mit einem Komplex aus Elongin B, Elongin C, Cullin, RBX2 (Ring-box 2) und einer E2-Ligase interagieren (62) und so die Ubiquitin-abhängige Degradation von anderen Proteinen und SOCS3 selbst auslösen (63, 64). Mittels ihrer SH2 Domäne binden SOCS Proteine an Motive um phosphorylierte Tyrosylreste. SOCS3 bindet genau wie SHP2 an das phosphorylierte Y759 des gp130 (65, 66). Die Funktion von SOCS3 ist jedoch unabhängig von SHP2. Während die Phosphatase SHP2 bereits phosphorylierte Substrate dephosphoryliert, inhibiert SOCS3 durch seine KIR die Kinasefunktion von Jak1. Diese Inhibition unterdrückt die Phosphorylierung von Jak1 Substraten. Die KIR von SOCS3 dient dabei als Pseudosubstrat für Jak1 (67).



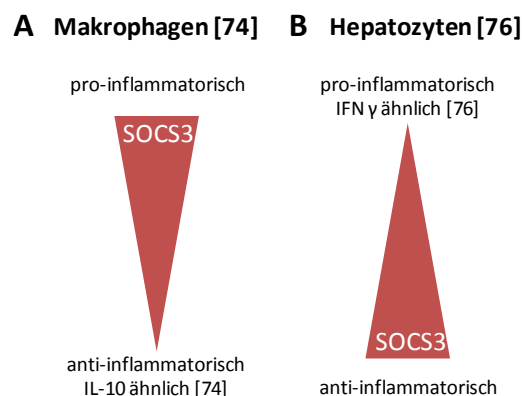
**Abb. 1.4 Domänenstruktur von SOCS3** SOCS3 setzt sich aus einer KIR, einer SH2 Domäne und einer SOCS Box zusammen.

Die Konzentration von SOCS3 in der Zelle wird auf verschiedenen Ebenen reguliert. Die Aktivität des SOCS3 Promotors kann NF- $\kappa$ B-abhängig gesteigert werden und zu einer erhöhten Expression des SOCS3 Proteins führen (68). Die Stabilität der SOCS3 mRNA wird durch Aktivierung der MKK6/p38MAPK/MK2 Kaskade z.B. durch TNF- $\alpha$  verstärkt (69). Weiterhin wird die Proteinstabilität von SOCS3 durch seine Ubiquitin-Ligase Funktion beeinflusst. So konnte gezeigt werden, dass eine mit der Bindung an Elongin-C konkurrierende Tyrosinphosphorylierung in SOCS3 die Halblebenszeit des Proteins reduziert (70). Zusätzlich konnte eine natürlich vorkommende verkürzte SOCS3 Isoform isoliert werden, in der das für die Autoubiquitinierung notwendige K6 fehlt. Durch die fehlende Autoubiquitinierung wird die Halblebenszeit dieser SOCS3 Mutante deutlich verlängert (71).

Die Komplexität der Regulation der IL-6-induzierten Signaltransduktion durch SOCS3 wird dadurch erhöht, dass SOCS3 nicht nur durch IL-6, sondern auch durch andere Stimuli wie bakterielles Lipopolysaccharid (LPS) (72) oder IL-10 (73) induziert wird. Der IL-6-induzierte Jak/STAT Signalweg kann so durch diese anderen Stimuli inhibiert werden.

Interessanterweise scheint SOCS3 eine bedeutende Funktion in der Regulation der pro- und anti-inflammatorischen Wirkungen von IL-6 zuzukommen (Abb. 1.5). In SOCS3 defizienten Makrophagen induziert IL-6 eine kontinuierliche STAT3 Phosphorylierung. Die Dynamik dieser Phosphorylierung ähnelt dem Verlauf der durch das anti-inflammatorische Zytokin IL-10 induzierten STAT3 Phosphorylierung (74, 75). In SOCS3 defizienten Hepatozyten wird jedoch neben der deutlich verstärkten STAT3 Phosphorylierung auch eine erhöhte L-6-induzierte Phosphorylierung von STAT1 beobachtet. Die Aktivierung von STAT1 bewirkt eine pro-inflammatorische zelluläre Antwort (76). Zusätzlich zeigen erste auf SOCS basierende Ansätze zur Therapie entzündlicher Krankheiten, dass mit rekombinantem SOCS3 behandelte Mäuse nach LPS Injektion vor einer tödlichen Sepsis geschützt sind (77, 78). Die Expression von SOCS3 wirkt also sowohl in Hepatozyten, als auch in *in vivo* Versuchen anti-inflammatorisch.

Die Regulation der IL-6-induzierten Signaltransduktion durch SOCS3 kann somit in verschiedenen Zelltypen in einer eher anti- oder eher pro-inflammatorische Zellantwort resultieren. Weiterhin ist die Dynamik der IL-6-induzierten STAT3 Phosphorylierung und die komplexe Regulation durch SOCS3 stark Zelltyp-spezifisch und u.a. abhängig von der Anwesenheit von Kostimulantien.



**Abb. 1.5 Die Reduktion der SOCS3 Expression wirkt in verschiedenen Zellen pro- oder anti-inflammatorisch. A) In Makrophagen resultiert ein SOCS3 *knockout* in einer anti-inflammatorischen Antwort. B) In Hepatozyten resultiert ein SOCS3 *knockout* in einer pro-inflammatorischen Antwort.**

## **1.4. Glukokortikoide**

Glukokortikoide wurden in der Mitte des letzten Jahrhunderts entdeckt (79, 80). Heute gehören synthetische Derivate der Glukokortikoide, trotz ihrer zahlreichen Nebenwirkungen, zu den wichtigsten Medikamenten gegen entzündliche Krankheiten (siehe (81) zur Übersicht).

### **1.4.1. Physiologische Funktionen der Glukokortikoide**

Glukokortikoide, wie das endogene Kortisol, gehören zu den Steroidhormonen, die sich von Cholesterin ableiten. Ihre Synthese findet in der Nebenniere statt (82), wobei die Synthese durch Ausschüttung des adrenokortikotropen Hormons aus dem Hypophysenvorderlappen ausgelöst wird (83). Die Ruhesekretion findet vor allem morgens statt (siehe (84) zur Übersicht). Ein starker Anstieg der Inkretion erfolgt in physischen und psychischen Stresssituationen. Der Abbau der sezernierten Glukokortikoide findet in der Leber statt, die Ausscheidung erfolgt renal (siehe (85) zur Übersicht).

Die Bezeichnung Glukokortikoid leitet sich von seinen metabolischen Effekten ab. Neben der Stimulation der Glukoneogenese und der Lipolyse, kommt es zur Inhibition der Zucker- und Fettspeicherung sowie der Unterdrückung inflammatorischer Prozesse. Die Sekretion von Glukokortikoiden versetzt den Körper folglich in einen physiologischen Alarmzustand.

### **1.4.2. Synthetische Glukokortikoide**

Die entzündungshemmende Wirkung der Glukokortikoide findet eine breite Anwendung in der Therapie entzündlicher Erkrankungen, wie Asthma, atopischer Dermatitis, rheumatoider Arthritis, Colitis ulcerosa oder Morbus Crohn sowie in der Chemotherapie, z.B. bei Leukämien, und zur Vermeidung von Transplantatabstoßungen. In der Geburtshilfe fördern Glukokortikoide eine schnelle Ausbildung der fetalen Lunge bei drohenden Frühgeburten. Synthetische Glukokortikoide unterscheiden sich durch chemische Modifikationen von Kortisol. Dexamethason (Dex) wurde durch 9 $\alpha$ -Fluorierung, 1-Dehydrierung und 16 $\alpha$ -Methylierung modifiziert (Abb. 1.6). Diese Modifikationen verlängern die Halbwertszeit des Medikamentes und somit seine pharmakologische Wirkungsdauer. Weiterhin verstärken sie die anti-inflammatorische Wirkung des synthetischen Glukokortikoids.

Bei chronischer Behandlung mit Glukokortikoiden treten starke Nebenwirkungen auf, die in ihrer Symptomatik der endogenen Kortisol-Überproduktion, gekennzeichnet durch das *Cushing*-Syndrom, entsprechen. Die Patienten zeigen unter anderem eine verstärkte Infektionsanfälligkeit, Wundheilungsstörungen, eine Abnahme der Skelettmuskulatur (Myopathie), Osteoporose, Hautatrophien, Ödeme und Stimmungsschwankungen (siehe (86) zur Übersicht).

Um die Nebenwirkungen von synthetischen Glukokortikoiden und ihre physiologische Rolle zu verstehen, ist eine vollständige Aufklärung ihrer molekularen Funktionen notwendig.

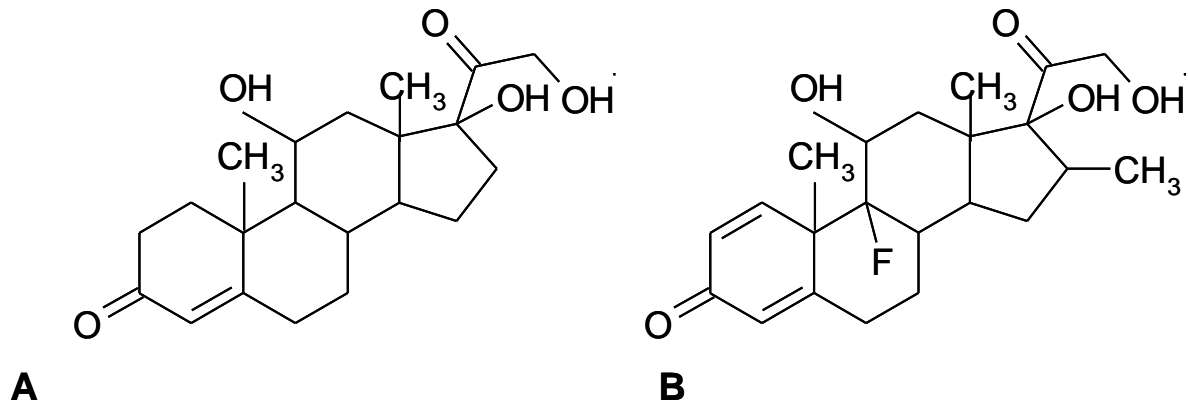


Abb. 1.6 Strukturformeln von (A) Kortisol und (B) dem synthetischen Glukokortikoid Dexamethason

### 1.4.3. Glukokortikoid-induzierte Signaltransduktion

Glukokortikoide diffundieren aufgrund ihrer hydrophoben Eigenschaften durch die Zellmembran und binden im Zytosol an ihren spezifischen Rezeptor. Zusätzlich wird die Assoziation der Glukokortikoid Rezeptoren mit Lipid Rafts diskutiert (87). Putative Membran gebundene G-Protein gekoppelte Glukokortikoid Rezeptoren werden mit schnellen, nicht transkriptionsabhängigen Stressantworten in Neuronen in Verbindung gebracht (88).

Der zytoplasmatische Glukokortikoid Rezeptor  $\alpha$  (GR) gehört zur Familie der nukleären Rezeptoren. Er besteht aus einer N-terminalen Transaktivierungsdomäne, gefolgt von einer DNA-Bindungsdomäne, einer *hinge* Region und einer C-terminalen Ligandenbindungsdomäne (Abb. 1.7). Die Transaktivierungsdomäne vermittelt die Interaktion des aktivierten Glukokortikoid Rezeptors mit Transkriptionsinitiatoren. Über die DNA-Bindungsdomäne bindet der GR an *glucocorticoid-response-elements* (GRE) in den Promotoren seiner Zielgene. Die *hinge* Region ermöglicht die zur Dimerisierung erforderliche Flexibilität des Rezeptors. Die Liganden-Bindungs-Domäne umfasst zusätzlich eine Liganden-abhängige Transaktivierungsdomäne und Sequenzen, die die Dimerisierung des Rezeptors, die Kerntranslokation und die Interaktion mit *Heat shock* Proteinen (hsp) vermitteln (89, 90).



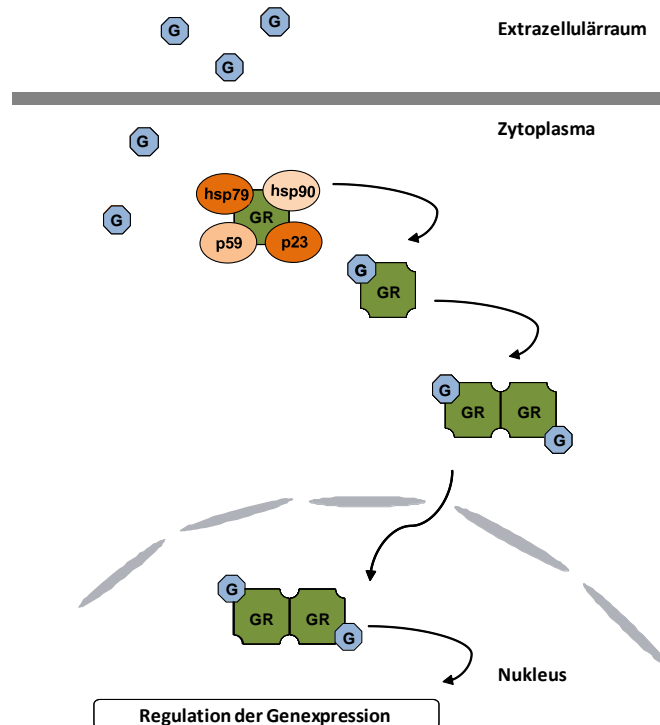
Abb. 1.7 Domänenstruktur des Glukokortikoid Rezeptors Der Glukokortikoid Rezeptor setzt sich aus einer Transaktivierungsdomäne, einer DNA-Bindungsdomäne (DNA BD) und einer Ligandenbindungsdomäne zusammen.

In Abwesenheit eines Stimulus ist der GR im Zytosol mit hsp70, hsp90, Immunophilin p59 und p23 komplexiert (91). Bindet ein Ligand an den Rezeptor, löst sich der Komplex und durch Konformationsänderungen wird das Kernlokalisierungssignal freigelegt. Es kommt zur Rezeptorhomodimerisie-



rung und Translokation der Rezeptordimere in den Nukleus (92, 93) (Abb. 1.8). Dort bindet der Komplex an palindromische GRE (94). Die Bindung an die DNA löst eine allosterisch induzierte Konformationsänderung des Rezeptorkomplexes aus, die eine Rekrutierung des basalen Transkriptionsapparats zur Folge hat (95). Die Aktivierung der Transkription durch Bindung des GR an GRE wird als Transaktivierung bezeichnet. Sie führt u.a. zur Synthese von metabolischen Zielgenen (z.B. (96, 97)). Da eine verstärkte Expression dieser Zielgene, genau wie die endogene Kortisol-Überproduktion (Cushing Syndrom), zur Entwicklung von Ödemen, Myopathien und Osteoporose führt, wird die durch Glukokortikoide vermittelte Transaktivierung allgemein mit den Nebenwirkungen synthetischer Glukokortikoide assoziiert.

Neben der Bindung an transkriptionsaktivierende GREs kann auch eine Bindung des GRs an negative GRE erfolgen, die eine Repression der Transkription bestimmter Gene zur Folge hat (z.B. (98-100)). So zeigen *Microarray* Daten von humanen Monozyten, dass die Stimulation mit dem synthetischen Glukokortikoid Fluticason die Synthese von 102 Genen induziert und von 45 Genen reprimiert (101). Zusätzlich regulieren Glukokortikoide und andere Steroidhormone die Expression und Reifung von miRNAs sowohl positiv (102) als auch negativ (103). Diese komplexe molekulare Antwort auf Glukokortikoide wird durch die Interaktion mit anderen Signaltransduktionswegen verstärkt.



**Abb. 1.8 Die Glukokortikoid-induzierte Signaltransduktion** Glukokortikoide (G) diffundieren aufgrund ihrer hydrophoben Eigenschaften durch die Zellmembran. Im Zytoplasma binden sie an spezifische Glukokortikoid Rezeptoren. Nach der Liganden-induzierten Dimerisierung translozieren die Rezeptordimere in den Zellkern und beeinflussen dort die Transkription von Zielgenen.

---

## 1.5. Interaktion zwischen Glukokortikoiden und Zytokinen

Aktivierete GR können neben der Bindung an GRE auch an andere Transkriptionsfaktoren binden und deren transkriptionelle Aktivität reduzieren. Im Gegensatz zur Transaktivierung wird dieser Prozess Transrepression genannt. Durch Transrepression wird die Expression von Zielgenen proinflammatorischer Zytokine reprimiert. Daher wird die Transrepression mit der starken antiinflammatorischen Wirkung der Glukokortikoide assoziiert. So führt die Interaktion des Glukokortikoid Rezeptors mit NF- $\kappa$ B z.B. zur Reduktion der Expression von IL-8 (104) und NO-Synthase (NOS) (105). Der GR kann neben NF- $\kappa$ B auch mit c-Jun und c-Fos, den Untereinheiten von Ap-1 interagieren und so z.B. die Synthese von Kollagenase verringern (106).

Die Transkription NF- $\kappa$ B-abhängiger Gene kann zusätzlich durch die verstärkte Expression des inhibierenden Proteins I $\kappa$ B (*Inhibitor of  $\kappa$ B*) durch Glukokortikoide reduziert werden. Durch diesen Mechanismus wird z. B. die Synthese von IL-6 verringert (107).

Neben diesen transkriptionellen Effekten sind posttranskriptionelle Wirkungen von Glukokortikoiden beschrieben. Die durch Glukokortikoide induzierte MAPK Phosphatase MKP-1 dephosphoryliert p38 und verringert so die mRNA stabilisierende Wirkung dieser MAPK (108). Weiterhin wurde gezeigt, dass der GR direkt mit der für die Chemokine CCL2 und CCL7 kodierenden mRNA interagieren kann. Diese Interaktion führt zur Degradation der mRNA (109).

Während die bisher genannten Beispiele die Transkription von Genen verringern, induziert die Bindung des monomeren aktivierten GR an phosphorylierte STAT5 Dimere z.B. eine verstärkte Synthese des Milchproteins  $\beta$ -Casein (110).

In den 80er und 90er Jahren des letzten Jahrhunderts wurde der Einfluss von Glukokortikoiden auf die IL-6-induzierte STAT3-abhängige Expression der Akut-Phase Proteine erstmals beschrieben. Baumann *et al.* zeigten in H-35 Ratten Hepatom Zellen, dass Dexamethason die hepatische IL-6-induzierte Expression von  $\alpha$ 1-Antichymotrypsin,  $\gamma$ -Fibrinogen und  $\alpha$ 2-Makroglobulin verstärkt (111). Tabelle 1.1 fasst die Ergebnisse weiterer Studien zusammen, die einen verstärkenden Effekt der Glukokortikoide auf die IL-6-induzierte Akut-Phase Antwort beschreiben. Es wird deutlich, dass der Effekt weder auf einzelne Akut-Phase Gene noch auf einen Organismus beschränkt ist. Für einzelne Akut-Phase Proteine wurde der Mechanismus der Glukokortikoid-induzierten Verstärkung aufgeklärt. Simar-Blanchet *et al.* konnten im Serin Protease Inhibitor 2.3 Promotor sowohl STAT3 responsive Elemente als auch GRE nachweisen (112). Ebenso fanden sich GRE im humanen Serum Amyloid A Promotor (113). Die Verstärkung der Expression von murinem Metallothionein (114, 115) sowie Ratten  $\alpha$ 2-Makroglobulin (116) und Haptoglobin (117) benötigt hingegen eine direkte Interaktion des GR mit STAT3. Für die Verstärkung der  $\gamma$ -Fibrinogen Expression ist wiederum eine *de novo* Proteinsyn-

these (118) essentiell, da es zu einer Glukokortikoid vermittelten Induktion der gp80 Expression kommt (119, 120).

**Tab. 1.1 Zusammenfassung der in der Literatur beschriebenen Verstärkung der Akut-Phase Reaktion durch Glukokortikoide.**

n.b. nicht beschrieben

Akut-Phase Protein	Zelltyp	Organismus	Stimulus	Mechanismus	Quelle
$\alpha$ 1-Antichymotrypsin, $\gamma$ -Fibrinogen, $\alpha$ 2-Makroglobulin	H-35	Ratte	IL-6 +Dex	n.b.	(111)
Plasma-Fibronektin	Hepatozyten	Huhn	IL-6 + Dex	n.b.	(121)
C-reaktives Protein	HepG2	Mensch	IL-6 +Dex	n.b.	(122)
Serum Amyloid A, C-reaktives Protein	Hep3B	Mensch	IL-6 + Dex	n.b.	(123)
$\gamma$ -Fibrinogen	HepG2	Mensch	IL-6 + Dex	Induktion von gp80	(119)
$\alpha$ 1-Mikroglobulin	Hepatozyten	Ratte	IL-6 + Dex	n.b.	(124)
Serin Protease Inhibitor 2.3	Hepatozyten	Ratte	IL-6 + Dex	Transaktivierung	(112)
$\gamma$ -Fibrinogen	HepG2	Mensch	IL-6 + Dex	Induktion von gp80	(120)
Metallothionein	<i>in vivo</i>	Ratte	IL-6 + Dex	n.b.	(125)
Metallothionein	H4IIEC3	Ratte	IL-6 + RU486	Interaktion von STAT3 und GR	(114)
$\alpha$ 2-Makroglobulin	MCF-7	Maus	IL-6 + Dex	n.b.	(126)
Metallothionein	<i>in vivo</i>	Maus	Stress, RU486, IL-6 <i>k.o.</i>	Transaktivierung notwendig	(115)
$\gamma$ -Fibrinogen	A549	Mensch	IL-6 + Dex	<i>de novo</i> Protein- synthese	(118)
	HepG2	Mensch	IL-6 + Dex	<i>de novo</i> Protein- synthese	

Serum Amyloid A	HASMC	Mensch	Dex, nicht IL-6	n.b.	(127)
Serum Amyloid A 1	HepG2	Mensch	IL-6 + Dex	Transaktivierung	(113)
Serum Amyloid A 1	HepG2	Mensch	IL-6 + Dex	n.b.	(128)
	KB	Mensch	Dex, nicht IL-6	n.b.	
$\alpha$ 2-Makroglobulin	H-35	Ratte	IL-6 + Dex	Interaktion von STAT3 und GR	(116)
Haptoglobin	in vivo	Ratte	Terpentin	Interaktion von STAT3 und GR	(117)

Neben des Einflusses von Glukokortikoiden auf die hepatische Akut-Phase Synthese wurde auch die nicht hepatische Synthese von  $\alpha$ 2-Makroglobulin,  $\gamma$ -Fibrinogen und Serum Amyloid A untersucht. Während in MCF-7 (Mammakarzinom) und A549 Zellen (Lungen Epithel Karzinom) die Regulation der Akut-Phase Gen Expression analog zu Hepatozyten durch IL-6 und Dexamethason maximiert wird (118, 126), reagieren HASMC (*human aortic smooth muscle cells*) und KB Zellen (humane Epithelzellen) nur auf das Glukokortikoid nicht jedoch auf IL-6 (127, 128). Interessanterweise liegen so in verschiedenen Geweben unterschiedliche Regulationsmechanismen vor, die noch nicht aufgeklärt worden sind.

Ergänzend zur Verstärkung der Expression von nicht hepatischen Akut-Phase Genen wurden auch weitere Leber-unabhängige Interaktionen zwischen Glukokortikoiden und IL-6 beschrieben. Kinter *et al.* zeigen das IL-6 und Dexamethason synergistisch die HIV (*human immunodeficiency virus*) Synthese in latent infizierten monozytären Zellen induzieren (129). In bronchialen H441 Zellen bewirken IL-6 und Dexamethason in Kombination eine maximale Expression von *surfactant protein b* (SPB), das für eine vollständige Lungenreifung in der Embryonalentwicklung notwendig ist. Dexamethason erhöht in diesen Zellen die Expression der IL-6 Rezeptor Untereinheit gp80 (130).

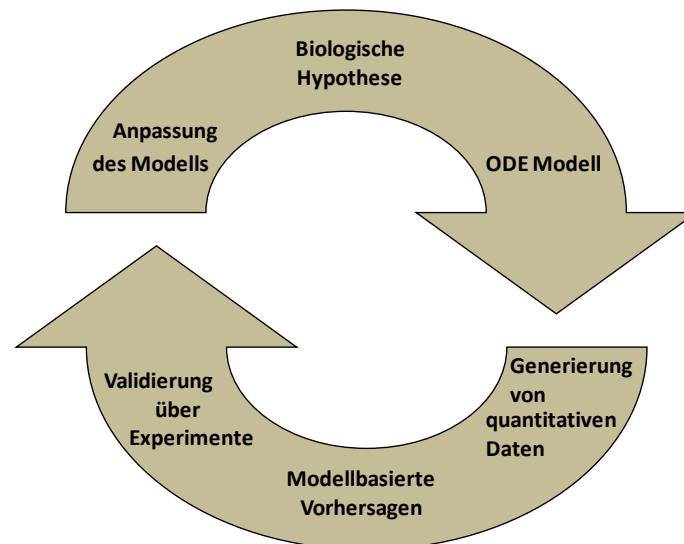
Eine weitere Ebene der Komplexität der Glukokortikoid Wirkung wird durch die Interaktion mit den *feedback* Inhibitoren der SOCS Familie erzeugt. Paul *et al.* zeigen das Dexamethason die Expression IL-6-induzierter SOCS3 mRNA in Ratten Hepatozyten reduziert (131). Die Kostimulation von primären murinen Makrophagen mit LPS und Dexamethason induziert eine starke Expression von SOCS1, welche wiederum zu einer reduzierten STAT1 Antwort durch die LPS-induzierte IFN $\alpha$ / $\beta$  Produktion führt (132). IFN $\gamma$ -induziertes SOCS1 wiederum bindet mit seiner SH2-Domäne an den aktivierten Glukokortikoid Rezeptor. Diese Interaktion resultiert in einer Anreicherung von SOCS1 im Nukleus und der

Reduktion der Expression von Glukokortikoid Zielgenen. Der Einfluss dieses Effektes auf IFN $\gamma$  – Zielgene ist jedoch noch nicht untersucht (133).

Zusammenfassend ist die Interaktion zwischen Zytokin- und Glukokortikoid- Signaltransduktion komplex und weder auf bestimmte Zellpopulationen noch auf bestimmte Ebenen der Signaltransduktion beschränkt. Die Verstärkung der Akut-Phase Gen Expression durch Glukokortikoide wird durch verschiedene genspezifische Mechanismen beschrieben und ist global noch nicht verstanden.

## 1.6. Systembiologie

Während die klassische Analyse von zellulären Prozessen die Aufklärung der Struktur eines Systems zum Ziel hat, bestrebt die Systembiologie die Dynamik hinter der Struktur zu erfassen (134, 135). So sollen z.B. nicht nur die Bestandteile eines Signaltransduktionsweges und deren Interaktionen untersucht werden, sondern auch wie sich das System als Antwort auf verschiedene Stimuli oder über einen längeren Zeitraum verhält und welche Eigenschaften des Systems essentiell für diese Antworten sind. Um ein komplexes biologisches System in dieser Tiefe zu verstehen, ist es notwendig mathematische Modelle zu etablieren, die basierend auf dynamischen, experimentell generierten Daten die Abbildung und Analyse der nichtlinearen zellulären Prozesse erlauben. Die Aufstellung dieser Modelle erfolgt entweder basierend auf großen durch Hochdurchsatzmethoden erhobenen Datensätzen als *Top-down* Ansatz oder basierend auf bereits bekannten Systemstrukturen, z.B. Signaltransduktionswegen als *Bottom-up* Ansatz (siehe (136) zur Übersicht). Die Generierung eines aussagekräftigen mathematischen Modells im *Bottom-up* Ansatz erfordert einen iterativen Zyklus aus Hypothesen-getriebener Modellformulierung, Generierung quantitativer kinetischer biologischer Daten, Daten-getriebener Modellanpassung, modellbasierter Vorhersagen und experimenteller Validierung dieser Vorhersagen (134) (Abb.1.9). Die wiederholte Anpassung des Modells an biologische Daten ermöglicht somit die Formulierung neuer biologischer Hypothesen und resultiert idealerweise in einem prädiktiven mathematischen Modell. Die mathematische Analyse dieses Modells kann z.B. aufzeigen welche Moleküle essentiell für die Dynamik des untersuchten Systems sind oder welche Moleküle redundante Funktionen innehaben. Neben der Relevanz für die Grundlagenforschung helfen die Modelle somit auch potentielle Angriffspunkte für therapeutische Strategien aufzuzeigen.



**Abb. 1.9** Generierung eines mathematischen Modells im Bottom-up Ansatz

Die Wahl der Modellierungsmethode hängt u.a. von der Qualität der experimentell generierten Daten und der Größe des zu untersuchenden Systems ab. Sehr große Systeme, über die nur qualitative Daten zur Verfügung stehen, werden mit qualitativen Modellen, wie z.B. Booleschen Netzwerken, beschrieben (siehe (137) zur Übersicht). Diese Modelle ermöglichen z.B. den *Crosstalk* zwischen zwei Signalwegen zu untersuchen, erlauben aber keine Aussagen über die Veränderung der Konzentration eines Moleküls über die Zeit zu treffen. Große Systeme, über die sowohl qualitative als auch einige quantitative Daten vorliegen, können z.B. mit stochastischen Petri Netzen abgebildet werden (siehe (138) zur Übersicht). Kleine Systeme, zu denen zeitlich hochaufgelöste qualitative Daten vorliegen, werden mit gewöhnlichen Differentialgleichungen (*Ordinary differential equations*, ODEs) beschrieben.

Da die IL-6-induzierte Jak/STAT Signaltransduktion biochemisch bereits ausführlich charakterisiert wurde, wird in dieser Arbeit ein *Bottom-up* Ansatz gewählt. Durch eine Fokussierung auf die ersten 15 min des Signalweges wird die Größe des Modells reduziert und so die Modellierung über gewöhnliche Differentialgleichungen ermöglicht.

## 1.7. Differentialgleichungsmodelle

Differentialgleichungsmodelle basieren auf dem Massenwirkungsgesetz. Damit eine Reaktion stattfindet, müssen die beteiligten Moleküle kollidieren. Die Reaktionsrate ist hierbei proportional zur Wahrscheinlichkeit dieser Kollision, welche wiederum proportional zur Konzentration der beteiligten Moleküle ist. Die Reaktion zweier Edukte  $A$  und  $B$  zu Produkt  $C$  hängt demnach von der Konzentration der Reaktanden ( $A, B$ ) und dem kinetischen Parameter  $kf1$  ab (siehe Formel 1.1). Die Rückreaktion des Produktes  $C$  in die Edukte  $A$  und  $B$  hängt dagegen von der Konzentration von  $C$  und dem Parameter  $kb1$  ab.



Die Veränderung einer Spezies  $x_1$  (z.B.  $A, B$  oder  $C$ ) über die Zeit lässt sich allgemein durch folgende Differentialgleichung

$$\frac{d[x_1]}{dt} = \sum v \text{ Produktion} - \sum v \text{ Abbau} \quad 1.2$$

beschreiben. Die Konzentration von Spezies  $x_1$  wird durch die Summe der Reaktionen die  $x_1$  produzieren ( $v$  Produktion) erhöht und durch die Summe der Reaktionen die  $x_1$  abbauen ( $v$  Abbau) reduziert. Das Beispiel in Formel 1.1 wird demnach durch folgendes Gleichungssystem beschrieben:

$$\frac{d[A]}{dt} = +vf - vb$$

$$\frac{d[B]}{dt} = +vf - vb$$

$$\frac{d[C]}{dt} = +vb - vf$$

$$vf = k_{f1}[A][B]$$

$$vb = k_{b1}[C]$$

wobei  $[A]$ ,  $[B]$  und  $[C]$  den Konzentrationen der beteiligten Moleküle und  $vf$  und  $vb$  den Reaktionsraten entsprechen. Die Reaktionsraten  $vf$  und  $vb$  setzen sich wiederum aus den kinetischen Parametern ( $k_{f1}, k_{b1}$ ) und den Konzentrationen der an der Reaktion beteiligten Spezies zusammen.

Verallgemeinert können die zuvor dargestellten Modelle wie folgt beschrieben werden:

$$\dot{x}(t) = f(x(t), p, u(t)), x(0) = x_0 \quad 1.3$$

$$y(t) = h(x(t), p, u(t)) \quad 1.4$$

wobei gilt  $x \in \mathbb{R}^{n_x}$ ,  $p \in \mathbb{R}^{n_p}$ ,  $u \in \mathbb{R}^{n_u}$  und  $y \in \mathbb{R}^{n_y}$ ,  $x$  beschreibt die Zustandsgrößen,  $p$  die Parameter,  $u$  die Eingänge und  $y$  die Ausgänge des Reaktionssystems. Übertragen auf die Modellierung eines Signaltransduktionsweges entspricht  $x$  den Konzentrationen der beteiligten Moleküle,  $p$  den Ratenkonstanten,  $u$  dem Verlauf einer Stimulation über die Zeit und  $y$  ist das Modelläquivalent der Messdaten, z.B. dem Phosphorylierungsgrad einer Spezies zu einem bestimmten Zeitpunkt.

### 1.7.1. Parameterschätzung

Damit ein Differentialgleichungsmodell experimentell generierte Daten beschreiben kann, müssen die unbekannt Parameter bestimmt werden. Diese Parameter können jedoch häufig experimentell nicht direkt gemessen werden. Daher verwendet man numerische Methoden der Parameterschätzung, um Parameterwerte zu finden mit denen das Modell die Daten am besten wiedergibt. In dieser Arbeit wurde die Maximum-Likelihood-Methode zur Parameterschätzung verwendet. Hierzu wird der Satz von Parametern bestimmt, der die Differenz zwischen Messdaten und Modellausgängen minimiert. Nach erfolgreicher Parameterschätzung werden die erhaltenen Parameter bezüglich ihrer Verlässlichkeit analysiert.

### 1.7.2. Analyse der Parametergüte durch $\chi^2$ – Tests

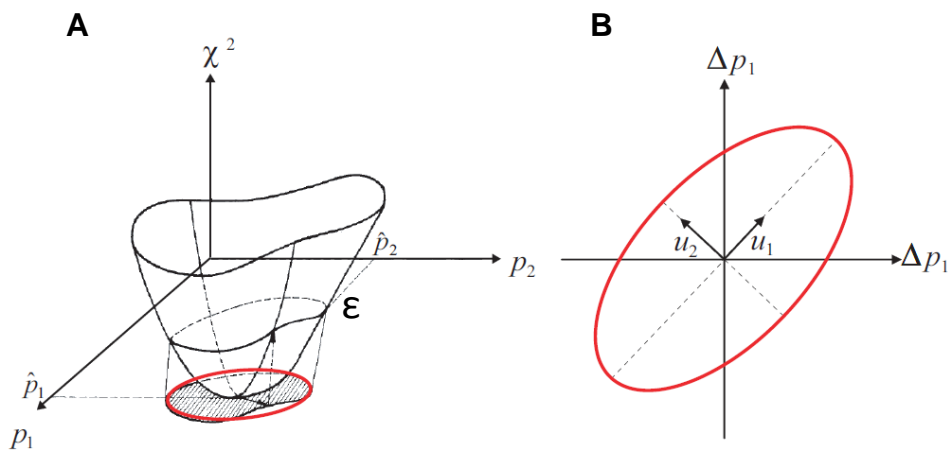
Zunächst wird bestimmt ob das Modell mit dem geschätzten Parametersatz die experimentell generierten Daten adäquat wiedergeben kann. Die Abweichung zwischen den Modellausgängen und den experimentell generierten Daten wird durch den  $\chi^2$  Wert quantifiziert. Er entspricht der quadrierten Summe der Abweichungen zwischen den Daten und den Modellausgängen. Wenn die Ausgänge eines Modells die Daten ausreichend gut beschreiben, sollte der  $\chi^2$  Wert dem normalverteilten Messrauschen entsprechen und ungefähr mit den Freiheitsgraden ( $\nu$ ) des Modells übereinstimmen. Die Freiheitsgrade des Modells entsprechen  $\nu = n_{\text{Datenpunkte}} - n_{\text{Parameter}}$ , wobei  $n_{\text{Datenpunkte}}$  der Anzahl der Datenpunkte, z.B. der Anzahl der untersuchten Zeitpunkte, entspricht und  $n_{\text{Parameter}}$  der Anzahl der Modellparameter. Die Güte des  $\chi^2$  Wertes eines Modells kann mit einem statistischen Test geprüft werden. Getestet wird die Nullhypothese  $H_0: \chi^2(\hat{p}) = \nu$ , dass  $\chi^2(\hat{p})$  einer  $\chi^2$  Verteilung mit  $\nu$ -Freiheitsgraden entspricht, gegen die alternative Hypothese  $H_A: \chi^2(\hat{p}) \neq \nu$ . Ist der über einen  $\chi^2$ -Test erlangte p-Wert kleiner als ein zuvor definiertes Signifikanzniveau, so wird die Nullhypothese abgelehnt. Das bedeutet, dass die Güte des  $\chi^2$  Wertes nicht ausreichend ist und die experimentell generierten Daten durch das Modell nicht adäquat wiedergegeben werden. In diesem Fall ist davon auszugehen, dass Modellfehler vorliegen Um diese Modellfehler zu beheben, ist es notwendig die Struktur des Modells zu verändern.

### 1.7.3. Identifizierbarkeitsanalyse

Auch wenn ein Modell mit einem bestimmten Parametersatz die experimentellen Daten statistisch signifikant wiedergibt, kann dieser Parametersatz nicht identifizierbare Parameter beinhalten. Nicht identifizierbare Parameter entstehen, wenn die Parameterschätzung kein eindeutiges Ergebnis liefert d.h. das ein Modell die Daten mit unterschiedlichen Parametersätzen gleich gut abbildet bzw. unterschiedliche Parametersätze in dem gleichen  $\chi^2$  Wert resultieren. Zum Auffinden nicht identifizierbarer Parameter wurden in dieser Arbeit Identifizierbarkeitstests mit der Eigenwertmethode durchge-



führt (139). Exemplarisch lässt sich dieser Ansatz für zwei Parameter visualisieren. Abbildung 1.10 A zeigt den Raum aller  $\chi^2$  Werte für ein Modell mit zwei Parametern  $p_1$  und  $p_2$ . Dabei ist der  $\chi^2$  Wert auf der z-Achse, und die beiden Parameter auf der x- bzw. y-Achse aufgetragen. Nimmt man an, dass alle Parameterwerte für  $p_1$  und  $p_2$ , mit einem  $\chi^2$ -Wert kleiner als  $\epsilon$  die Daten signifikant abbilden, dann sind alle Parameterkombinationen in der schraffierten Fläche akzeptabel. Die schraffierte Fläche kann mit einem Ellipsoid approximiert werden (Abb. 1.10 B). Dieses Ellipsoid wird mit zwei Achsen beschrieben, deren Richtungen den Eigenvektoren  $u_1$  und  $u_2$  entsprechen. Diese Eigenvektoren werden im Rahmen der Identifizierbarkeitsanalyse bestimmt. Ein nicht identifizierbarer Parameter, wird durch eine lange Achse repräsentiert. Das bedeutet, dass viele Parameterwerte in einem  $\chi^2$ -Wert kleiner als  $\epsilon$  resultieren. Die Länge der Achsen ist proportional zu  $1/\sqrt{\lambda_i}$ , wobei  $\lambda_i$  dem Eigenwert von  $u_i$  entspricht. Demnach gilt, je kleiner der Eigenwert  $\lambda_i$  ist, desto länger ist die Achse  $u_1$  und desto schlechter ist der Parameter identifizierbar. Um ein identifizierbares Modell zu erhalten, wird das Modell im Anschluss an die Analyse der Eigenwerte mit der identifizierbarkeitsbasierte Modellmodifikation an die experimentell generierten Daten angepasst. Zunächst wird hierzu aus den nicht identifizierbaren Parametern eine Rangfolge entsprechend ihrer Eigenwerte erstellt (139). Anschließend werden die Teile des Modells modifiziert, welche die am wenigsten identifizierbaren Parameter enthalten. In einem iterativen Prozess wird nun das Modell so lange modifiziert, bis alle Parameter eindeutig bestimmbar und somit identifizierbar sind.



**Abb. 1.10 Visualisierung der Eigenwert-basierten Identifizierbarkeitsanalyse an Hand von zwei Parametern.** **A)** Dreidimensionale Abbildung des Parameterraums. Der  $\chi^2$  Wert ist auf der z-Achse, und die beiden Parameter  $p_1$  und  $p_2$  auf der x- bzw. y-Achse aufgetragen. Hier wird angenommen, dass alle Kombinationen aus  $p_1$  und  $p_2$ , die in einem  $\chi^2$  Wert kleiner als  $\epsilon$  resultieren sind statistisch signifikant sind. Dieser Unterraum signifikanter Parameter wird durch die grau schraffierte Fläche markiert. Diese Fläche kann mathematisch mit einem Ellipsoid (in Rot) approximiert werden. **B)** Projektion des Ellipsoids auf die xy Ebene. Ein nicht identifizierbarer Parameter führt zu einer langen Achse  $u_i$ . Abbildung A) verändert aus (140), zur Verfügung gestellt von Tom Quaiser.

## 1.8. Systembiologische Analyse der Regulation des Jak/STAT Signalweges

Die Regulation des Jak/STAT Signaltransduktionsweges wurde bereits mit verschiedenen mathematischen Modellen untersucht. Yamada *et al.* (57) zeigen an einem sehr großen Differentialgleichungsmodell des IFN $\gamma$ -induzierten Jak/STAT Signalweges, dass SOCS1 und nukleäre Phosphatasen ausschlaggebend für eine Inaktivierung der Signaltransduktion sind. Eine erweiterte Analyse des Modells von Yamada *et al.* unterteilte das Modell in fünf Module. Das SOCS Modul erwies sich als essentiell für die Modellstruktur (141). Ein ähnliches Ergebnis ergab die Sensitivitätsanalyse eines auf (57) basierenden Modells für die IL-6-induzierte Aktivierung von STAT3. Neben der Rekrutierung von STAT3 an den aktivierten Rezeptor, sind der *feedback* durch SOCS3 und die nukleäre Dephosphorylierung von STAT3 die sensitivsten Parameter des Modells (142). Singh *et al.* nutzten das in (57) vorgestellte Modell, um die IL-6-induzierte Jak/STAT Signaltransduktion und die MAPK Kaskade gemeinsam zu analysieren. *In silico knockdown* Experimente zeigten, dass sowohl SOCS3 als auch SHP2 negative Regulatoren des Jak/STAT Weges sind. Die bis hier präsentierten mathematischen Modelle weisen auf entscheidende Funktionen des *feedback* Inhibitors SOCS3 und eine nicht weiter definierte negative Funktion von SHP2 hin. Es ist jedoch zu beachten, dass diese Modelle zu großen Teilen auf (57) basieren und dieses Modell selbst bei Bereitstellung optimaler Daten nicht identifizierbar ist (139).

Basierend auf experimentell generierten Daten aus murinen Hepatozyten und Makrophagen konnten Wormald *et al.* ein Modell für die Inhibition der IL-6-induzierten Signaltransduktion durch SOCS3 entwickeln, welches in einer biphasischen Phosphorylierung von STAT3 und einer Desensibilisierung der Zellen gegen einen weiteren Stimulus resultiert (143). Die Funktion von SHP2 wurde in diesem Modell nicht untersucht. Fischer *et al.* zeigen jedoch biochemisch, dass diese Desensibilisierung unabhängig von der Expression von SHP2 ist (60). An einem einfachen Modell konnte weiterhin gezeigt werden, dass das Zeitintervall bis zur maximalen Phosphorylierung von STAT3 durch IL-6 in murinen Hepatozyten nicht durch die Stärke des Modelleingangs, sondern durch die Stärke der Regulation bzw. Degradation der beteiligten Proteine bestimmt wird (144). Diese Beispiele zeigen, dass besonders kleine datenbasierte ODE Modelle wertvolle Hinweise auf dynamische Regulationsprozesse liefern können.

Bachmann *et al.* untersuchen in einem auf komplexen Daten basierten Modell der Erythropoietin (Epo)-induzierten Aktivierung von Jak2 und STAT5 in erythropoietischen Vorläuferzellen den Einfluss verschiedener Regulatoren (145). Sie zeigen auf, dass multiple Regulationsmechanismen notwendig sind, damit die Zellen auf stark variierende Ligandenkonzentrationen antworten können. So ist bei niedrigen Ligandenkonzentrationen CIS entscheidend für die *feedback* Regulation, während bei hohen Epo Konzentrationen SOCS3 wichtig wird. SHP1 wird in diesem Modell durch phosphory-

lierte Jak1 aktiviert und kann diese anschließend dephosphorylieren. Diese Funktion scheint unabhängig von der Konzentration des Stimulus zu sein.

Zusammenfassend zeigen diese Analysen die Bedeutung des negativen *feedbacks* durch Mitglieder der SOCS Familie für die Dynamik der Jak/STAT Signaltransduktion auf. Es wurde jedoch noch nicht im Detail untersucht, ob bereits vor der Expression der SOCS Proteine eine Regulation der IL-6-induzierten Jak/STAT Signaltransduktion, z.B. durch konstitutiv exprimierte Phosphatasen wie SHP2, stattfindet.

---

## 2. Ziele der Arbeit

IL-6 ist ein wichtiger Mediator der Entzündungsreaktion und induziert u.a. die Expression von Akut-Phase Proteinen in der Leber. Eine unkontrollierte verstärkte Aktivierung der IL-6-induzierten Jak/STAT Signaltransduktion wird jedoch mit chronisch inflammatorischen und proliferativen Krankheiten assoziiert. Daher ist die Beschränkung der Signaltransduktion durch *feedback* Inhibitoren, wie SOCS3, und Phosphatasen, wie SHP2, essentiell für die Homöostase des Körpers.

Synthetische Glukokortikoide gehören zu den am häufigsten verschriebenen Medikamenten gegen inflammatorische Erkrankungen. Schon in den 80er Jahren des letzten Jahrhunderts konnte gezeigt werden, dass Dexamethason die Expression von IL-6-induzierten Akut-Phase Proteinen verstärkt (111). Ziel des ersten Themenkomplexes dieser Arbeit war, die molekularen Grundlagen dieser Glukokortikoid vermittelten Steigerung der Akut-Phase Protein Expression *in vitro* und *in vivo* aufzuklären.

Während die Wirkungsweise von klassischen feedback Inhibitoren, wie SOCS3, im IL-6 Signalweg gut beschrieben ist, ist die genaue Funktion der Phosphatase SHP2 in diesem Signalweg noch nicht definiert. Ziel des zweiten Themenkomplexes dieser Arbeit war daher, die Etablierung eines identifizierbaren mathematischen Modells der frühen, SOCS3-unabhängigen Regulation des IL-6-induzierten Jak/STAT Signalweges durch SHP2. Basierend auf diesem Modell sollten neue Aussagen über die Negativregulation der IL-6 Signaltransduktion getroffen werden.

### 3. Material und Methoden

#### 3.1. Chemikalien

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

#### 3.2. Inhibitoren

Actinomycin D (Calbiochem)

Doxycyclin (Sigma)

Cycloheximid (Sigma)

MG-132 (Calbiochem)

RU-486 (Sigma)

ZK-216348 (zur Verfügung gestellt von Corporate Research Business Area Dermatology, Schering AG)

#### 3.3. Zytokine

Zytokin	Beschreibung
hu IL-6	rekombinantes humanes IL-6, nach der Methode von Arcone (146) in <i>E.coli</i> exprimiert
mu IL-6	rekombinantes murines IL-6 (Peprotech)
Epo	rekombinantes humanes Erythropoietin (zur Verfügung gestellt von Roche Diagnostic)
OSM	rekombinantes murines Onkostatin M (R&D Technologies)

#### 3.4. Antikörper

Antikörper	Ursprung	Anwendung	Beschreibung
GAPDH (6C5)	mu	WB	monoklonaler Antikörper gegen GAPDH (Santa Cruz Technologies)
gp80 (BR6)	mu	FACS	polyklonaler Antikörper gegen gp80

			(Höltzel)
gp130 (BR3)	mu	FACS	polyklonaler Antikörper gegen gp130 (Höltzel)
GR (M20)	rb	MK	polyklonaler Antikörper gegen den Glukokortikoid Rezeptor (Santa Cruz Technologies)
HSP70	mu	WB	monoklonaler Antikörper gegen HSP70 (Stressmarq)
JAK1(p)	rb	WB	polyklonaler Antikörper gegen die phosphorylierten Tyrosine 1022 und 1023 von Jak1 (New England Biolabs)
Lamin A/C	mu	WB	monoklonaler Antikörper gegen Lamin A/C (BD Biosciences)
SHP2 (C18)	rb	WB	polyklonaler Antikörper gegen ein Epitop im C-Terminus von SHP2 (Santa Cruz Technologies)
SHP2 (N16)	rb	WB,IP	polyklonaler Antikörper gegen ein Epitop im N-Terminus von SHP2 (Santa Cruz Technologies)
SHP2(p)Y542	rb	WB, IP	polyklonaler Antikörper gegen das phosphorylierte Tyrosin 542 von SHP2 (New England Biolabs )
SOCS3 (M-20)	go	WB	polyklonaler Antikörper gegen SOCS3 (Santa Cruz Technology)
STAT3 (C-20)	rb	WB, IP	polyklonaler Antikörper gegen unphosphoryliertes STAT3 (Santa Cruz Technologies)
STAT3(p)Y705	rb	WB, IP	monoklonaler Antikörper gegen das phosphorylierte Tyrosin 705 von STAT3 (New England Biolabs )
Tubulin	mu	WB	monoklonaler Antikörper gegen Tubulin (Sigma-Aldrich)
(p)Y (PY99)	mu	WB	monoklonaler Antikörper gegen phosphorylierte Tyrosylreste (Santa Cruz Technologies)

Maus-HRP	rb	WB	polyklonales Antiserum gegen konstante Anteile von Maus-Immunglobulin, konjugiert mit Meerrettichperoxidase (DAKO)
Kaninchen-HRP	go	WB	polyklonales Antiserum gegen konstante Anteile von Kaninchen-Immunglobulin, konjugiert mit Meerrettichperoxidase (DAKO)
Ziege-HRP	rb	WB	polyklonales Antiserum gegen konstante Anteile von Ziegen-Immunglobulin, konjugiert mit Meerrettichperoxidase (DAKO)
Maus-PE	go	FACS	polyklonales F(ab') <sub>2</sub> Fragment gegen konstante Anteile von Maus-Immunglobulin, konjugiert mit Phycoerythrin (Dianova)
Kaninchen-Cy2	dk	MK	polyklonaler Antikörper gegen den konstanten Bereich von Kaninchen-Immunglobulins (Ig), konjugiert mit Cy2 (Jackson Immunolab)

### 3.5. Plasmide

Plasmid	Beschreibung
pCH110 lacZ	Reporterplasmid, welches das Beta-Galactosidase Gen trägt, Ampicillin Resistenz (Pharmacia)
pGL3 $\alpha$ 2M (-215)	Reporterplasmid, welches den Promoterbereich -215 bis +8 des $\alpha$ 2-Macroglobulin Gens, fusioniert mit der kodierenden Sequenz der Leuchtkäfer-Luziferase, trägt, Ampicillin Resistenz
pGL3 Basic-SOCS (-511/+929)	Reporterplasmid, welches den Promoterbereich -511 bis +929 des SOCS3 Gens, fusioniert mit der kodierenden Sequenz der Leuchtkäfer-Luziferase trägt, Ampicillin Resistenz (bereitgestellt von J. Bode)
pGL2 Basic-FGG	Reporterplasmid, welches den Promoterbereich ab -1359 des $\gamma$ -Fibrinogen Gens, fusioniert mit der kodierenden Sequenz der Leuchtkäfer-Luziferase, trägt, Ampicillin Resistenz (bereitgestellt von J. Bode)
pcDNA5/FRT/TO STAT3 $\alpha$ -CFP	Eukaryontischer Expressionsvektor zur Expression von STAT3-CFP, Ampicillin Resistenz (bereitgestellt von G. Müller-Newen)

---

pTETsplice-HASOCS3human	Eukaryontischer Expressionsvektor, der die Expression von humanem SOCS3 unter Doxycyclin Kontrolle in einem <i>Tet-off</i> - System ermöglicht, Ampicillin Resistenz (bereitgestellt von J.Bode)
pRcCMV-EG(YYYYYY)	Eukaryontischer Expressionsvektor zur Expression eines chimären Rezeptors aus dem extrazellulären Anteil des Epo-Rezeptors und dem intrazellulären Anteil von Wildtyp gp130 (6Y), Ampicillin Resistenz
pRcCMV-EG(FYFFFF)	Eukaryontischer Expressionsvektor zur Expression eines chimären Rezeptors aus dem extrazellulären Anteil des Epo-Rezeptors und dem intrazellulären Anteil von gp130 (Y683,767,814,905,915F), Ampicillin Resistenz
pRcCMV-EG(YFYFFF)	Vektor, zur Expression eines chimären Rezeptors aus dem extrazellulären Anteil des Epo-Rezeptors und dem intrazellulären Anteil von gp130 (Y759F) in eukaryontischen Zellen, Ampicillin Resistenz
pCR8/GW/TOPO	Subklonierungsvektor, der die Übertragung beliebiger DNA in andere Gateway Vektoren ermöglicht, Spectinomycin Resistenz (Invitrogen)
pCDNA3 gp80	Eukaryontischer Expressionsvektor, der als Template zur Amplifikation von humanem gp80 diente, Ampicillin Resistenz
pCR8/GW/TOPO gp80	Subklonierungsvektor, der die Übertragung der humanen gp80 cDNA in andere Gateway Vektoren ermöglicht, Spectinomycin Resistenz
pQCXIP	Vektor zur Expression von Proteinen nach retroviraler Transduktion, Puromycin Resistenz (BD Biosciences)
pQCXIP_GW C.1	Vektor zur Expression von Proteinen nach retroviraler Transduktion, die eingefügte Gateway C.1 Kasette ermöglicht die Übertragung von cDNA aus anderen Gateway Vektoren, Puromycin Resistenz
pQCXIP_GW C.1_gp80	Vektor zur Expression von humanem gp80 nach retroviraler Transduktion, Puromycin Resistenz
pVPack-Ampho	Vektor zur Expression des viralen Hüllproteins env in eukaryontischen Verpackungszelllinien, Ampicillin Resistenz (Stratagene)
pVPack-GP	Vektor zur Expression der viralen Proteine gag und pol in eukaryontischen Verpackungszelllinien, Ampicillin Resistenz
pSuperSHP2	Vektor, zur Expression einer siRNA gegen SHP2 , Ampicillin Resistenz



### 3.6. Primer

Primer	Sequenz	Beschreibung
AnDgp80for	5' GCC ACC ATG CTG GCC GTC 3'	Forward Primer zur Amplifikation des humanen gp80
AnDgp80rev	5' CTA TCT GGG GAA GAA GTA GTC TGT ATT 3'	Reverse Primer zur Amplifikation des humanen gp80
pQXCIP_Seq	5' ACG CCA TCC ACG CTG TTT TGA CCT 3'	Sequenzierprimer, zur Sequenzierung von pQXCIP ausgehend von Position 2164

### 3.7. Prokaryontische Zellen

#### Bakterienstämme

Bakterienstamm	Beschreibung
BD3.1	<i>E.coli</i> Stamm zur Amplifikation der Gateway Zielvektoren mittels Negativselektion
DH5 $\alpha$	<i>E.coli</i> Stamm zur Amplifikation von Vektoren
Top10	<i>E.coli</i> Stamm zur Amplifikation der TOPO Vektoren

#### Nährmedien und Lösungen für die Kultivierung von Bakterien

LB Medium (Roth)

Agar Agar (Roth)

Ampicillin (Roth)

Kanamycin (Serva)

Spectinomycin (Serva)

#### 3.7.1. Kulturbedingungen für prokaryontische Zellen

Stammkulturen der rekombinanten Bakterien wurden zur längerfristigen Lagerung mit 30 % Glycerin versetzt und bei -80°C gelagert. Die Kultivierung der Bakterien erfolgte in LB-Medium unter Zugabe des entsprechenden Antibiotikums (100 mg/ml) in einem Schüttelkolben bei 37°C mit 200 Upm. Zur

Vereinzelung wurden die Bakterien auf Petrischalen mit durch Zugabe von 1,5 % Agar Agar verdicktem LB Medium ausgestrichen.

### 3.7.2. Herstellung kompetenter Bakterien

500 ml LB Medium wurden mit 100  $\mu$ l *E.coli* Bakterien aus einer  $\bar{u}$ .N. Vorkultur angeimpft, bis zu einer  $OD_{550nm}$  von 0,6 auf einem Schüttler bei 37°C kultiviert und anschließend zentrifugiert (15 min, 4°C, 6000 Upm, Rotor: JA-10). Das Pellet wurde in 50 ml kaltem Kompetenzmedium resuspendiert und zu 100  $\mu$ l Aliquots in Kompetenzmedium in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung der kompetenten Bakterien erfolgte bei -80°C.

#### Kompetenzmedium

10 %	Polyethylenglycol 3350
5 %	DMSO
100 mM	MgCl <sub>2</sub>
in LB Medium (gefiltrert: 0,22 $\mu$ m)	

### 3.7.3. Transformation und Aufreinigung von Plasmiden

Je 50  $\mu$ l kompetente *E.coli*/Plasmid wurden auf Eis aufgetaut und mit je 1  $\mu$ l des zu transformierenden Plasmids versetzt. Nach 20 min Inkubation auf Eis erfolgte ein Hitzeschock (40 s, 42°C) und eine anschließende erneute Kühlung auf Eis für 2 min. Die Bakterien wurden dann mit 250  $\mu$ l LB Medium versetzt, für 45 min bei 37°C inkubiert und folgend auf eine LB-Platte mit entsprechendem Selektionsantibiotikum ausplattiert. Von den gewachsenen Kolonien wurden Flüssigkulturen in LB Medium mit Selektionsantibiotikum angeimpft. Mit Hilfe von Maxi-Plasmid-Präparationskits wurden Bakterien aus einer 500 ml Übernacht-Schüttel-Kultur nach Angaben des Herstellers (Qiagen) aufgearbeitet. Wenn nur kleine Mengen DNA benötigt wurden, wurde ein Mini-Plasmid-Präparationskit (Qiagen) aus 4 ml Schüttelkulturen nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die so erhaltene hoch reine Plasmid-DNA wurde in Wasser eluiert und bei -20°C gelagert.

### 3.7.4. Quantitative Bestimmung von Nukleinsäuren

Die Bestimmung der DNA bzw. RNA Konzentration der Proben erfolgte photometrisch am Nanodrop (NanoDrop) über die Absorption bei 260 nm. Die Reinheit der präparierten Nukleinsäure wurde mit Hilfe der Absorption bei 280 nm ermittelt. Der Quotient der Absorptionen 260 nm/280 nm sollte hierbei zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

### 3.8. Eukaryontische Zellen und *in vivo* Versuche

#### Zelllinien

Zelllinie	Beschreibung	Kulturbedingungen
HepG2	Adhärenz wachsende, humane Hepatom Zelllinie	DMEM F12 (10 % FKS, 1 % Penicillin/Streptomycin)
HEK293	Adhärenz wachsende, humane epitheliale Nieren Zelllinie	DMEM (10 % FKS, 1 % Penicillin/Streptomycin)
HEK293T	Adhärenz wachsende, humane, epitheliale Nieren Zelllinie, die das <i>SV40 large T</i> Antigen exprimiert	DMEM (10 % FKS, 1 % Penicillin/Streptomycin)
HEK-gp80	HEK293, die nach retroviraler Transduktion gp80 stabil exprimieren	DMEM (10 % FKS, 1 % Penicillin/Streptomycin, 2 µg/ml Puromycin)
MEF <sup>fl/fl</sup> <sub>SOCS3</sub>	Adhärenz wachsende, embryonale, murine Fibroblasten Zelllinie von homozygoten Mäusen, in denen das SOCS3 Gen zwischen lox-Sequenzen liegt	DMEM (10 % FKS, 1 % Penicillin/Streptomycin)
MEF <sup>-/-</sup> <sub>SOCS3</sub>	Adhärenz wachsende, embryonale, murine Fibroblasten Zelllinie von homozygoten SOCS3-defizienten Mäusen	DMEM (10 % FKS, 1 % Penicillin/Streptomycin)
BaF/3	in Suspension wachsende, murine Pro-B-Zelllinie	RPMI (10 % FKS; 1 % Penicillin/Streptomycin, 10 % IL-3 haltiges konditioniertes Medium (PBV Überstand))

#### Primäre Zellen

Zelllinie	Beschreibung	Kulturbedingungen
Primäre murine Hepatozyten	Murine Hepatozyten aus Wildtyp und gp130 Y757F hepa Mäusen (freundlicherweise isoliert von S. Sauer-Lehnen und C.G. Tag)	siehe Kapitel 3.8.5

---

**Nährmedien und Lösungen für die Zellkultur**

Collagen I (Sigma)

Dexamethason (Sigma)

DMEM Flüssigmedium mit 4,5 g Glucose/l (Invitrogen)

DMEM Flüssigmedium mit 4,5 g Glucose/l ohne Phenolrot (Invitrogen)

DMEM F12 Flüssigmedium (Invitrogen)

DMSO (Merck)

FKS (Seromed)

L-Glutamin (Sigma)

Liberase (Roche)

Penicillin/ Streptomycin (Gibco)

Puromycin (PAA)

RPMI Flüssigmedium (Invitrogen)

Trypsin (0,05 %)/ EDTA (0,02 %)-Lösung (Biochrom)

Williams E Medium (Invitrogen)

**PBS**

200 mM	NaCl
2,5 mM	KCl
8,0 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
1,5 mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
pH 7,4	

**Lösung B**

0,15 M	NaCl
6 mM	KCl
5 mM	Glucose
20 mM	Hepes
20 mM	NaHCO <sub>3</sub>
1mM	EDTA
pH 7,4	

**Lösung C**

0,15 M	NaCl
6 mM	KCl
5 mM	Glucose
20 mM	Hepes
20 mM	NaHCO <sub>3</sub>
2 mM	CaCl <sub>2</sub>
40 mg/l	Liberase
pH 7,4	

#### **Attachment Medium**

Williams E Medium, 10 % FKS, 100 nM Dexamethason, 2 mM L-Glutamin, 1 % Penicillin/Streptomycin

#### **Pre-Starvation Medium**

Williams E Medium, 100 nM Dexamethason, 2 mM L-Glutamin, 1 % Penicillin/Streptomycin

#### **Starvation Medium**

Williams E Medium, 2 mM L-Glutamin, 1 % Penicillin/Streptomycin

### **3.8.1. Kulturbedingungen für eukaryontische Zelllinien**

Die Zellen wurden bei 37°C in einer wassergesättigten Atmosphäre mit 5% CO<sub>2</sub> (HepG2) bzw. 10 % CO<sub>2</sub> (HEK293, MEF, Ba/F3) kultiviert. Die Weiterkultivierung der Zellen erfolgte durch Ablösen der Zellen von einer konfluent bewachsenen Petrischale mit Trypsin/EDTA und Aussähen in frischem Medium. Um die beim Wachstum von HepG2 gebildeten Zellkonglomerate zu lösen, wurden die abgelösten Zellen mehrfach in eine Spritze mit einer 0,9 mm x 40 mm Kanüle aufgezogen. Ba/F3 Zellen wurden zunächst zentrifugiert (5 min, 4°C, 1000 Upm, Rotor: SX4750A) und dann in frischem Medium resuspendiert. Die Zellen wurden vor jedem Experiment mit einem CASY Zellzähler (Roche) gezählt und zu je 7x10<sup>5</sup> Zellen/6 cm bzw. 1,2 x 10<sup>6</sup> Zellen/10 cm Zellkulturschale ausgesät. Bei einer quantitativen Auswertung der Daten wurde die Anzahl der Zellen zum Zeitpunkt des Experimentes durch Zählen der Zellen auf einer Kontrollplatte bestimmt.

Zur Langzeitaufbewahrung wurden die von der Platte gelösten Zellen mit kaltem 10 % DMSO-haltigem Serum versetzt, in Kryoröhrchen aliquotiert und zur langsamen Abkühlung zunächst für 24 h bei -80°C gelagert. Die dauerhafte Lagerung erfolgte bei -150°C. Zum Auftauen wurden die Zellen auf 37°C erwärmt und das DMSO-haltige Medium mit 10 ml kaltem Medium verdünnt. Im Folgenden wurden die Zellen zentrifugiert (5 min, 4°C 1000 Upm, Rotor: SX4750A). Die Zellen wurden in neuem warmen Medium aufgenommen und in eine Petrischale ausgesät.

### **3.8.2. Stimulationsbedingungen**

HepG2 Zellen wurden vor der Stimulation über Nacht in DMEM F12 ohne Phenolrot gehungert (147). HEK Zellen wurden 2 h in DMEM gehungert. Die Stimulation erfolgte, wenn nicht anders angegeben mit folgenden Konzentrationen: IL-6 (200 U/ml), Dexamethason (1 µM, Sigma), Epo (7 U/ml).

### **3.8.3. Bestimmung des Zellvolumens**

Die Bestimmung des Zellvolumens erfolgte in einer Annäherung über das Volumen trypsinierter abgerundeter Zellen. Hierzu wurden HEK-gp80 Zellen mit Trypsin/EDTA von der Zellkulturschale gelöst

und sofort im CASY Zellzähler gemessen. Der Mittelwert der Durchmesser der Zellen diente als Grundlage für die Berechnung des Volumens.

#### **3.8.4. Retrovirale Transduktion eukaryontischer Zellen**

Die retrovirale Transduktion wurde eingesetzt, um HEK293 Zellen zu erzeugen, die stabil gp80 exprimieren. Zunächst wurden HEK293T Zellen auf Collagen I beschichtete Zellkulturflaschen ausgesät und mit dem viralen Expressionsvektor pQCXIP\_GW C.1\_gp80 sowie den Verpackungsvektoren pVPack-GP und pVPack Ampho (beide Stratagene) mittels Lipofectamin2000 transfiziert (siehe Kapitel 3.11.2). Zur Induktion der Virusproduktion wurden einen Tag nach der Transfektion die Kulturbedingungen geändert und die Zellen in DMEM (5 % FKS, 32 C) kultiviert. Nach 48 h wurde der virushaltige Überstand abgenommen und filtriert (0,45 µm, *low binding filter*, Renner), um HEK293T Zellen vom Virus zu trennen. Der filtrierte Überstand wurde mit 8 µl/ml Polybrene (Millipore) versetzt und auf HEK293 Zellen gegeben. Die Zellen wurden für 24 h bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte ein Mediumwechsel auf Kulturmedium. Die Selektion der infizierten Zellen erfolgte mit Puromycin (2 µg/ml). Überlebende Zellen wurden vereinzelt, um Einzelklone zu erzeugen.

#### **3.8.5. Isolation und Kultivierung primärer muriner Hepatozyten**

Es wurden WT Mäuse und Mäuse, die in der Leber gp130 Y757F exprimieren, eingesetzt. Nach Anästhesie der Maus wurde der Bauchraum geöffnet und die Pfortader freigelegt. Die Leber wurde über die Pfortader zunächst mit Lösung B, dann mit Lösung C gespült. Anschließend wurde die Leber entnommen und bei 4°C von der Gallenblase getrennt. Nach Öffnung der Leberkapsel wurden die Hepatozyten mit einem 100 µM Nylonfilter getrennt, mit DMEM (10 % FKS, 1 % Penicillin/Streptomycin, 4 mM L-Glutamin) gewaschen und zweimal für 4 min zentrifugiert (4°C, 16 g).  $7 \times 10^5$  Zellen wurden auf mit Collagen I beschichtete Zellkulturplatten ausgesät und für vier Stunden in *Attachment* Medium und für weitere 16 h in *Pre-Starvation* Medium kultiviert. Drei Stunden vor der Stimulation erfolgte ein Mediumwechsel zu *Starvation* Medium.

#### **3.8.6. Isolation der Leber und des Serums aus Mäusen**

Die Injektion der Lösungen erfolgte intraperitoneal. Die Mäuse verblieben während der Behandlung in den Käfigen. Nach Ablauf des Experimentes wurde retro-orbitales Blut abgenommen, in einem Probengefäß zur Serumgewinnung (Sarstedt) gesammelt und 30 min bei RT inkubiert. Anschließend wurde das Serum durch Zentrifugation in einer Tischzentrifuge (10 min, Raumtemperatur, 1000 Upm) geklärt und bei -20°C gelagert. Nach der Tötung der Maus durch Luxation der Halswirbelsäule wurde die gesamte Leber isoliert, von der Gallenblase entfernt und unter Berücksichtigung jedes Leberlappens mit einem Skalpell in vier Teile getrennt. Die Gewebeproben wurden sofort in

flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert. Die Injektion und Tötung der Maus erfolgte durch Sara Dutton Sackett, Ph.D. (Innere Medizin III, Universitätsklinik Aachen).

### 3.9. Klonierung

Die im Folgenden beschriebenen Methoden wurden eingesetzt, um einen Vektor zu erzeugen, der die retrovirale Transduktion von humanem gp80 in HEK Zellen ermöglichte.

#### 3.9.1. PCR

Um PCR Produkte nach der Amplifikation im Topo Gateway System einzusetzen, wurden die PCR Reaktionen mit einem Gemisch aus Taq Polymerase (AT Überhänge) und Phusion Polymerase (*Proof-reading*) durchgeführt. PCRs wurden in einem Gradientencycler (Eppendorf) durchgeführt. Die Elongationsphase wurde der Länge der zu amplifizierenden DNA Sequenz angepasst (1 min /1000 bp).

##### PCR Ansatz/Probe

0,3 µl	Taq Polymerase (1 U/µl)
0,3 µl	Phusion Polymerase
2 µl	dNTPs (2 mM)
10 µl	5 x HT Puffer
1 µl	<i>reverse</i> Primer (100 pmol)
1 µl	<i>forward</i> Primer (100 pmol)
2 ng	Template
ad 50 µl	H <sub>2</sub> O

##### PCR Programm

30 s	98°C	
<hr/>		
10 s	98°C	40 x
20 s	64°C	
30 s	72°C	
<hr/>		
10 min	72°C	
	4°C	

Die PCR Produkte wurden anschließend über eine Gelelektrophorese und eine Gelextraktion aufgereinigt.

#### 3.9.2. Agarose-Gelelektrophorese

DNA wurde je nach Länge der Fragmente in 1,5 % - 3 % Agarose Gelen aufgetrennt. Um die Banden sichtbar zu machen, wurden die Gele mit 0,1 µg/ml Ethidiumbromid versetzt. Die Proben wurden mit 6 x DNA-Probenpuffer gemischt und auf das Agarosegel aufgetragen. Die Elektrophorese wurde in

---

Horizontalgelapparaturen mit 1 x TAE Puffer als Laufpuffer durchgeführt. Als Größenstandard dienten 1 kb DNA-Leiter oder 100 bp DNA-Leiter (beides NEB). Die Banden wurden auf einem UV-Tisch sichtbar gemacht. Bei präparativen Gelen wurden anschließend die entsprechenden Banden ausgeschnitten und die DNA mit einem Gel-Extraktions-Kit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers isoliert.

#### **DNA Ladepuffer**

2 mM	EDTA
2,5 mg/ml	Bromphenolblau
80 %	Saccharose
20 mM	Tris/HCl, pH 7,5

#### **TAE-Puffer**

1 mM	EDTA
20 mM	Tris-Acetat, pH 8.0

### **3.9.3. Restriktionsverdau**

Restriktionsverdaue erfolgten, um DNA Fragmente mit bestimmten Überhängen zu erzeugen oder um Zwischenschritte bei Klonierungen zu kontrollieren. Restriktionsenzyme und Puffer wurden nach Angaben des Herstellers (NEB) eingesetzt. Wenn notwendig wurden *sticky ends* nach dem Verdau durch Klenow-Enzym aufgefüllt (30 min, 37°C). Anschließend wurde das Klenow-Enzym für 10 min bei 75°C inaktiviert.

#### **Klenow-Reaktion**

7 µl	DNA
4 µl	dNTPs
0,5 µl	Klenow-Enzym
1,1 µl	NT-10 x Puffer

Nach dem Restriktionsverdau und/oder Klenow Reaktion wurden die Fragmente über eine Agarose-Gelelektrophorese und anschließende Gel-Extraktion aufgereinigt.

### **3.9.4. Ligation von DNA Fragmenten**

Die Ligation von DNA Fragmenten wurde mit T4 Ligase (Promega) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Für *blunt end* Ligationen wurden je 5 U/Reaktion, für *sticky end* Ligationen je 1 U/Reaktion Ligase eingesetzt. *Insert* und Vektor wurden in einem molaren Verhältnis von 3:1 eingesetzt. Die Ligation erfolgte für 1 – 3 h bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Plasmide in kompetente Bakterien transformiert und amplifiziert.



### 3.9.5. Ligation von PCR Produkten in pCR8/GW/TOPO

Die Ligation von Fragmenten mit AT-Überhang in den TOPO Donorvektor pCR8/GW/TOPO erfolgte mit dem TOPO Klonierungskit nach Angaben des Herstellers (Invitrogen). Ausgehend von diesem Vektor erfolgte der Einbau des *Inserts* in Gateway C.1 Kassetten anderer Vektoren mit dem Gateway Clonase II Mix (Invitrogen) nach Angaben des Herstellers.

### 3.9.6. Sequenzierung

Die Sequenzierung der Plasmide erfolgte durch die Firma MWG Biotech.

### 3.10. Proteinchemische und immunologische Methoden

Im Folgenden werden proteinchemische und immunologische Methoden beschrieben.

#### 3.10.1. Zelllysate

Die auf Zellkulturschalen gewachsenen Zellen wurden mit 4°C kaltem PBS gewaschen. Nach Zugabe von kaltem Lysepuffer wurden die Zellen mit einem Schaber von der Kulturschale gelöst und in Eppendorfgefäße überführt. Die Lyse erfolgte für 30 min auf Eis und wurde durch mehrmaliges kräftiges Mischen unterstützt. Nach Ende der Inkubationszeit wurde der Zelldebris für zehn Minuten bei 13.000 Upm in der Tischzentrifuge sedimentiert. Die Überstände wurden entweder sofort für Immunpräzipitationen verwendet oder bei -18°C gelagert. Die Analyse erfolgte nach Aufkochen und Denaturierung der Lysate in Lämmli Probenpuffer für 10 min bei 95°C mittels SDS Gelelektrophorese und Western Blot.

#### Ripa-Lyse-Puffer

50 mM	Tris/HCl pH 7,4
150 mM	NaCl
1 mM	EDTA
0,5 %	Nonidet P-40
15 %	Glycerol

Als Schutz vor Proteasen und Phosphatasen wurden kurz vor Gebrauch folgende Substanzen zum Ripa-Lyse Puffer gegeben.

1 mM	Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>
10 mM	NaF
1 mM	AEBSF (Roth)
5 µg/ml	Aprotinin (Sigma)
5 µg/ml	Leupeptin (Sigma)
3 µg	Pepstatin (Sigma)

**2x Lämmli-Proben-Puffer**

125 mM	Tris/HCl pH 6,8
20 %	Glycerin
10 %	$\beta$ -Mercaptoethanol
4 %	SDS
0,01 %	Bromphenolblau

**3.10.2. Immunpräzipitation von Proteinen aus Zelllysaten**

Um bestimmte Proteine aus Zelllysaten anzureichern, wurde eine Immunpräzipitation durchgeführt. Zelllysate wurden mit 1  $\mu$ g des Erstantikörpers gegen das zu präzipitierende Protein versetzt und über Nacht bei 4°C auf einem Überkopfschüttler inkubiert. Die Isolation der Protein/Antikörper-Komplexe erfolgte mit Protein G-Dynabeads (DynaL Biotech). Pro Probe wurden zunächst 10  $\mu$ l der *beads* aufgenommen und in 1 ml RIPA-Waschpuffer gewaschen. Anschließend wurden die *beads* in 10  $\mu$ l RIPA-Waschpuffer/Probe aufgenommen, zu den Lysaten gegeben und bei 4°C für 4 h auf dem Überkopfschüttler inkubiert. Die Isolation der Protein/Antikörper/*bead*-Komplexe erfolgte mit einem Magnetständer (Invitrogen). Zur Verringerung unspezifischer Bindungen wurden die Komplexe dreimal mit je 1 ml RIPA Waschpuffer gewaschen. Abschließend wurden die Proteine durch 10 min Erhitzen auf 95°C in 2 x Lämmli Probenpuffer von den *beads* abgelöst. Um die Effizienz der Immunpräzipitation zu bestimmen, wurde vor der Behandlung mit dem Antikörper und nach der Inkubation mit den *beads* je eine Probe des Überstandes genommen. Die Analyse der Proben erfolgte mittels SDS-Gelelektrophorese und Western Blot.

**RIPA Waschpuffer**

50 mM	Tris/HCl pH 7,4
100 mM	NaCl
1 mM	EDTA
0,1 %	Igepal
15 %	Glycerol

**3.10.3. Quantifizierung von intrazellulären Proteinen**

Zur Quantifizierung von intrazellulären Proteinen wurden quantitative Western Blots mit Eichproteinen eingesetzt. Als Eichproteine dienten aufgereinigte GST Fusionsproteine (die zwei SH2 Domänen aus SHP2 (As 1-220, bereitgestellt von Dr. rer. nat. Pia Müller) sowie ein Fragment von STAT3 (As 670-770, (Abnova Corporation))). Eine bekannte Anzahl an Zellen wurde lysiert und anschließend eine Immunpräzipitation gegen die zu quantifizierenden Proteine durchgeführt. Für die Quantifizierung der totalen Menge eines Proteins erfolgte hierbei die Präzipitation mit einem Antikörper gegen das unphosphorylierte Protein. Um den Phosphorylierungsgrad eines Proteins zu bestimmen, wurden die Zellen zunächst für 6 min mit IL-6 (200 U/ml) stimuliert und die anschließende Immunpräzipitation

mit Antikörpern gegen phosphorylierte Proteine durchgeführt. Beide Präzipitate wurden anschließend gemeinsam mit einer Verdünnungsreihe unphosphorylierter Eichproteine bekannter Konzentration mittels SDS-Gelelektrophorese und Western Blot analysiert. Die Detektion erfolgte hier mit Antikörpern, die ein Epitop erkennen, das sowohl in den Eichproteinen als auch in den endogenen präzipitierten Proteinen vorkommt. Aus den Verdünnungsreihen der Eichproteine wurde eine Eichreihe erstellt über die die Menge an präzipitiertem endogenem Protein berechnet wurde. Die gewonnenen Werte wurden um die Zellzahl und die Effizienz der Immunpräzipitation korrigiert und auf das Zellvolumen bezogen. Der Phosphorylierungsgrad der einzelnen Proteine nach 6 min Stimulation diente zur Umrechnung der relativen Phosphorylierungskinetiken in absolute Konzentrationen.

### 3.10.4. Zellfraktionierung

Um zytoplasmatische und nukleäre Proteine getrennt zu analysieren, wurde eine Fraktionierung durchgeführt. Alle Schritte erfolgten bei 4°C und mit eiskalten Puffern. Alle Zentrifugationsschritte erfolgten in einer Tischzentrifuge. Die Zugabe aller Phosphatase- und Protease-Inhibitoren erfolgte kurz vor dem Experiment. Die Zellen wurden in 1 ml PBS mit Hilfe eines Zellschabers von der Zellkulturschale gelöst und zentrifugiert (5 min, 500 Upm). Das Zellpellett wurde zur Gewinnung der zytosolischen Fraktion in 500 µl hypotonischem Lysepuffer aufgenommen und 15 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Lysate erneut zentrifugiert (10 min, 14000 Upm). Der Zellüberstand (= zytosolische Fraktion) wurde in einem neuen Reaktionsgefäß aufgenommen. Das Pellet wurde zur Gewinnung der nukleären Fraktion zunächst in 1 ml Kernisolationspuffer aufgenommen und nach 10 min zentrifugiert (10 min, 1000 Upm). Dieser Waschschrift wurde wiederholt. Die Lyse der Kerne erfolgte in 30 µl Kernlyse Puffer für 30 min auf Eis. Anschließend wurde die Kernfraktion zentrifugiert (10 min, 13000 Upm) und der Überstand (= nukleäre Fraktion) bei -20°C gelagert. Die Reinheit der Fraktionen wurde im Folgenden mit Hilfe einer SDS-Gelelektrophorese und anschließendem Western Blot analysiert. Als Kontrollen dienten hierbei Lamin A/C, als Marker für die nukleäre Fraktion, und GAPDH, als Marker für die zytoplasmatische Fraktion.

#### Hypotonischer Lysepuffer

10 mM	Tris/HCl, pH 7,5
10 mM	NaCl
3 mM	MgCl <sub>2</sub>
1 mM	Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>
5 µg/ml	Aprotinin
5 µg/ml	Leupeptin
3 µg/ml	Pepstatin
1 mM	EDTA
1 mM	DTT

**Kernisolationspuffer**

10 mM	Tris/HCl, pH 7,5
10 mM	NaCl
3 mM	MgCl <sub>2</sub>
0,5 %	Igepal
1 mM	Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>
10 mM	NaF
5 µg/ml	Aprotinin
5 µg/ml	Leupeptin
3 µg/ml	Pepstatin
1 mM	EDTA
1 mM	DTT

**Kernlysepuffer**

20 mM	Tris/HCl, pH 7,5
280 mM	NaCl
3 mM	MgCl <sub>2</sub>
2 %	Triton X-100
1 mM	Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>
10 mM	NaF
5 µg/ml	Aprotinin
5 µg/ml	Leupeptin
3 µg/ml	Pepstatin
1 mM	EDTA
1 mM	DTT

**3.10.5. Proteinbestimmung nach Bradford**

Die Bestimmung der Konzentration gelöster Proteine erfolgte mit dem BIO-RAD Protein Assay nach der Methode von Bradford (148). Bei einer Wellenlänge von 595 nm wurde photometrisch zunächst eine Eichgerade mit 0,02-2 µg/µl BSA erstellt. Die Proteinkonzentration eines Zellextraktes wurde durch Zugabe von 3 µl Zellysate zu 1 ml 1 x BIO-RAD Protein Assay Reagenz bestimmt. Hierzu wurde die Extinktion des Messansatzes bei einer Wellenlänge von 595 nm photometrisch gegen reines Reagenz gemessen und die Proteinkonzentration über die Geradengleichung der Eichgeraden bestimmt.

**3.10.6. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)**

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen fand in einer vertikalen Flachgelkammer als diskontinuierliche Elektrophorese nach Lämmli (149) statt. Es wurden 7 % bis 15 % Trenngele in Verbindung mit 3 % Sammelgelen benutzt. Die denaturierten Proben wurden auf das Gel geladen. Zur Größenbestimmung wurde parallel zu den Proben der *Page Ruler Prestained Marker* (Fermentas) aufgetragen. Wenn der Western Blot im Folgenden für die systembiologische Analyse quantifiziert wurde, wurden die Proben randomisiert aufgetragen, das heißt nicht der zeitlichen Abfolge der Stimulation folgend. Dies dient zur Reduktion systematischer Fehler bei der Durchführung der Analyse (150). Um

eine zufällige Reihenfolge der Proben zu gewährleisten, erfolgte die Randomisierung mit dem Programm *Gelinspector* (151). Die Elektrophorese wurde bei RT und einer Stromstärke von 25 mA/Gel bis zur gewünschten Auftrennung der Proteine durchgeführt.

#### **Acrylamidlösung (AppliChem, Darmstadt)**

29 %	Acrylamid
1 %	Bisacrylamid

#### **Trenngel 10 %**

5,9 ml	H <sub>2</sub> O
4,9 ml	Acrylamidlösung
3,8 ml	1,5M Tris/HCl, pH 6,8
75 µl	20 % SDS
15 µl	TEMED
75 µl	APS

#### **Sammelgel**

4 ml	H <sub>2</sub> O
635 µl	Acrylamidlösung
313 µl	2 M Tris/HCl, pH 6,8
25 µl	20 % SDS
5 µl	TEMED
40 µl	APS

#### **SDS-Laufpuffer**

25 mM	Tris-Base
192 mM	Glycin
0,1 %	SDS

### **3.10.7. Western Blot**

Die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine wurden zur Detektion mittels des Western-Blot-*semidry*-Verfahrens auf eine Polyvinylidendifluorid (PVDF)-Membran (Pall Corporation) übertragen. Dazu wurden drei 3 mm dicke Filterpapiere (Whatman GmbH) und die PVDF-Membran auf die Gelgröße zugeschnitten. Die PVDF-Membran wurde für 5 s in 100 % Methanol aktiviert, 5 min gewässert und dann für 15 min in Anoden-Puffer-II äquilibriert. Nach kurzem Tränken der Filterpapiere mit den unten angegebenen Puffern erfolgte der Aufbau des Blots nach folgendem Schema:

1. Anode
2. Filterpapier getränkt in Anoden-Puffer-I
3. Filterpapier getränkt in Anoden-Puffer-II
4. PVDF-Membran, äquilibriert in Anoden-Puffer-II
5. Polyacrylamidgel

6. Filterpapier getränkt in Kathoden-Puffer
7. Kathode

Die oben aufgeführten Komponenten wurden luftblasenfrei aufeinandergelegt. Die Übertragung der Proteine auf die Membran erfolgte bei 1,5 mA/cm<sup>2</sup> für 60 Minuten.

#### **Anodenpuffer I**

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

#### **Anodenpuffer II**

25 mM                   Tris-Base  
20 %                    Methanol  
pH 10,4

#### **Kathodenpuffer**

40 mM                   Aminocaprinsäure  
20 %                    Methanol  
pH 9,4

### **3.10.8. Detektion von Proteinen mittels Immundetektion**

Die auf die PVDF-Membran transferierten Proteine wurden durch eine Immundetektion nachgewiesen. Nach dem Transfer wurden die freien Bindungsstellen der Membran für 30 min mit 10 % BSA-Lösung (Serva) in TBS-N blockiert. Die Membran wurde anschließend über Nacht bei 4°C in einer 1:250 bis 1:1000 Verdünnung des entsprechenden primären Antikörpers in TBS-N auf einem Überkopfschüttler inkubiert. Nach Waschschritten in TBS-N erfolgte die Bindung des mit Meerrettich-Peroxidase-konjugierten sekundären Antikörpers (1:7500 in TBS-N) für 30 min bei Raumtemperatur. Das überschüssige Antiserum wurde durch erneute Waschschrritte entfernt. Die komplexierten Proteine konnten durch eine Reaktion der Peroxidase mit ECL (*enhanced chemiluminescence*) (Millipore Corporation) dargestellt werden. Hierzu wurde die Membran 5 min im Detektionsgemisch inkubiert, luftblasenfrei in Folie verpackt und mit einer CCD Kamera (LAS, Fuji) aufgenommen. Die Auswertung der Signale erfolgte mit der Software MultiGauge (Fuji). Die Antikörper wurden bei Bedarf durch eine 20 min Inkubation der PVDF-Membran in Stripping-Puffer bei 70°C abgelöst, um anschließend weitere Detektionen zu ermöglichen.

#### **TBS-N**

20 mM                    Tris/HCl, pH 7,6  
140 mM                  NaCl  
140 mM                  Nonidet P40  
pH 10,4

### Stripping-Puffer

62,5 mM	Tris/HCl, pH 7,6
2 %	SDS
100 mM	$\beta$ -Mercaptoethanol

### 3.10.9. Intrazelluläre Durchflusszytometrie

Da in der Analyse eines Western Blots keine Unterscheidung zwischen Einzelzellen möglich ist, wurde zur Analyse der Homogenität einer Stimulation die intrazelluläre Durchflusszytometrie eingesetzt. Nach Stimulation der Zellen wurden diese mit PBS/EDTA von den Zellkulturschalen abgelöst und sofort mit Paraformaldehyd (2 %) für 30 min bei 37°C fixiert. Um die Bildung von Zellklumpen beim Fixierungsschritt zu vermeiden, wurden die Zellen bei der Zugabe des Paraformaldehyds kräftig gemischt. Nach der Fixierung wurde das Paraformaldehyd durch zweimaliges Waschen der Zellen in 4 ml FACS Puffer und anschließendes Zentrifugieren (5 min, 4°C, 1000 Upm, Rotor: SX4750A) entfernt. Anschließend erfolgte die Permeabilisierung mit 1 ml 90 % Methanol bei -20°C für 30 min. Nach einem Waschschrift mit PBS wurden die Zellen für eine Stunde auf Eis mit den entsprechenden Primärantikörpern (1:100 in FACS Puffer) inkubiert. Nach erneutem Waschen und Zentrifugieren wurden die Zellen mit PE-markierten Zweitantikörpern (1:1000 in FACS Puffer) gefärbt und nach einem letzten Waschschrift in 400  $\mu$ l FACS Puffer aufgenommen. Die Analyse der Proben erfolgte am FACS Canto II (BD Biosciences). Die Daten wurden mit der Software FlowJo (Treestar) ausgewertet.

### PBS/EDTA

10 mM in PBS	EDTA
-----------------	------

### FACS-Puffer

5 %	FKS
0,1 % in PBS	$\text{NaN}_3$

### 3.10.10. Kopplung von Primärantikörpern mit Phycoerithrin

Zur Quantifizierung von gp130 mittels extrazellulärer Durchflusszytometrie wurde 1  $\mu$ g Anti-gp130 Antikörper mit R-Phycoerithrin (RPE) gekoppelt. Zunächst wurde der Antikörper mit DTT reduziert. Die freien Sulfhydryl-Gruppen können anschließend kovalent mit aktivierten Maleinimid-Gruppen am Farbstoff reagieren. Die Kopplung erfolgte nach Angaben des Herstellers mit dem *Phycolink R-Phycoerythrin Conjugation Kit* (Prozyme). Anschließend wurden die gekoppelten Antikörper von freiem RPE durch Größenausschlusschromatographie getrennt. Dies erfolgte nach Angaben des Herstellers mit dem *PhycoLink Conjugate Purification Kit* (Prozyme). Um das genaue Verhältnis von Antikörper-

pern zu PE zu bestimmen, wurden die gekoppelten Antikörper photometrisch bei einer Wellenlänge von 280 nm (Absorptionsmaximum von Proteinen) und 566 nm (Absorptionsmaximum von RPE) analysiert. Die Auswertung der Konjugate erfolgte über das Lambert-Beersche Gesetz.

### 3.10.11. Extrazelluläre Durchflusszytometrie

Die Oberflächenexpression von Rezeptoruntereinheiten wurde mittels extrazellulärer Durchflusszytometrie bestimmt. Hierzu wurden die Zellen zunächst mit PBS/EDTA von der Zellkulturschale gelöst und anschließend in 4 ml FACS Puffer gewaschen und zentrifugiert (5 min, 4°C, 1000 Upm, Rotor: SX4750A). Anschließend wurden die Zellen mit dem PE-gekoppelten Erstantikörper (1:10 in FACS Puffer) für 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Waschschrift mit FACS Puffer wurden die Zellen in 400 µl FACS Puffer aufgenommen und am FACS Canto II analysiert. Um das Signal der PE-gekoppelten Antikörper zu quantifizieren, wurden mit den gleichen Lasereinstellungen QuantiBRITE *beads* (BD Biosciences) analysiert. Diese bestehen aus vier *bead* Populationen mit bekannter Anzahl gebundener PE-Moleküle. Über eine Eichgerade aus den mit den *beads* ermittelten Signalen konnten die PE-Signale der gefärbten Zellen in Moleküle/Zelle umgerechnet werden.

### 3.10.12. ELISA

ELISAs (*enzyme-linked-immunosorbent assays*) wurden eingesetzt, um die Konzentration von Akut-Phase Proteinen im Serum der Maus zu bestimmen, um Pulsstimulationen mit IL-6 zu kontrollieren und um die Bindung von IL-6 an die Zelloberfläche zu analysieren.

Zur Analyse der Akut-Phase Proteine im Serum wurde dieses 1:100 verdünnt und nach Angaben des Herstellers mit dem  $\gamma$ -Fibrinogen (Dunn Labortechnik) bzw. Serum Amyloid A (Dunn Labortechnik) ELISA analysiert. Hierzu wurden bereits mit *Capture*-Antikörper beschichtete Mikrotiterplatten eingesetzt. Die Detektion der gebundenen Akut-Phase Proteine erfolgte mit HRP-gekoppelten Zweitantikörpern. Das Enzym HRP setzt das Substrat Tetramethylbenzidin um. Nach Abstoppen der Reaktion mit 1 M Schwefelsäure entsteht ein gelbes Produkt. Die Extinktion dieses Produktes wurde bei 450 nm mit einem Mikroplatten Photometer (Tecan) gemessen.

Um die Effizienz des Mediumwechsels bei einer pulsförmigen Stimulation zu bestimmen wurden Zellen mit IL-6 stimuliert. Nach 6 min wurde das Medium gewechselt und die Überstände wurden mit Hilfe eines IL-6 ELISAs (BD Biosciences) nach Angaben des Herstellers analysiert. Zunächst wurde hierzu eine Mikrotiterplatte mit *Capture*-Antikörper (1:250, in *CoatingBuffer*) über Nacht bei 4°C beschichtet. Nach dreimaligem Waschen mit TBS-N erfolgte die Absättigung unspezifischer Bindungsstellen mit *Assay Diluent* für 2 h bei Raumtemperatur. Anschließend wurden je 100 µl der zuvor 1:50 in Medium verdünnten Zellüberstände sowie IL-6 Referenzen (4,7 pg/ml bis 300 pg/ml) in Triplikaten auf die Platte aufgetragen und für eine Stunde bei RT inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit



TBSN wurden 100 µl/well einer Mischung aus biotinyliertem Detektionsantikörper (1:250) und Streptavidin-HRP (1:250) in *Assay diluent* auf die Proben gegeben. Auf fünfmaliges Waschen mit TBSN folgte die Zugabe von 100 µl TMB *Substrate Reagent* (BD Biosciences)/well und eine 30 minütige Inkubation bei Raumtemperatur. Nach Zugabe von 50 µl 1 M Schwefelsäure wurde die Absorption bei 450 nm in einem Mikroplatten Photometer (Tecan) bestimmt. Die Werte wurden mit der Extinktion von *Assay Diluent* korrigiert.

Die Bindung von IL-6 an die extrazellulären Rezeptoren wurde ebenfalls mit Hilfe eines IL-6 ELISAs (BD Biosciences) durchgeführt. Die Zellen wurden mit IL-6 stimuliert und anschließend in eiskaltem PBS von der Zellkulturschale gelöst. Um unspezifisch bindendes IL-6 auszuwaschen, wurden die Zellen zunächst in 4 ml PBS gewaschen und dann abzentrifugiert (5 min, 4°C, 1000 Upm, Rotor: SX4750A). Die Zellpellets, die das an die Zelloberfläche gebundene IL-6 beinhalten, wurden in 400 µl RIPA Lysepuffer lysiert und nach einer 30 minütigen Lyse auf Eis in einer Tischzentrifuge zentrifugiert (15 min, 4°C, 13000 Upm). Die Überstände wurden unverdünnt in den IL-6 ELISA eingesetzt und wie oben beschrieben analysiert. Die Absorption wurde um die Absorption einer zellfreien, mit IL-6 stimulierten Zellkulturplatte korrigiert, um ein Binden von IL-6 an das Plastik auszugleichen. Um die Menge an IL-6 auf die Anzahl der Zellen zu relativieren, wurde vor Beginn des Experimentes die Anzahl der Zellen auf einer Schale mit einem CASY Zellzähler (Roche) bestimmt.

### **Coating Buffer**

0,1 mM                    Natriumcarbonat, pH 9,5

### **Assay Diluent**

10%                    FKS  
in PBS

### **3.10.13. Konfokale Mikroskopie**

Konfokale Mikroskopie wurde eingesetzt, um die Kerntranslokation von STAT3 und dem Glukokortikoid Rezeptor zu untersuchen. Für die Detektion von STAT3 wurden hierzu HepG2 Zellen mit einem Expressionsplasmid für STAT3-CFP transfiziert. Die Detektion des Glukokortikoid Rezeptors erfolgte immunochemisch. HepG2 Zellen wurden auf mit Poly-L-Lysin beschichtete 18 mm Deckgläschen ausgesät. Wenn nötig wurden die Zellen am nächsten Tag mit Lipofectamin 2000 transfiziert (siehe Kapitel 3.10.2) und 24 h später stimuliert. Zur Fixierung wurden die Zellen 2 x mit PBS ++ gewaschen und anschließend in 500 µl Paraformaldehyd (2,5 %) für 20 min bei RT im Dunklen inkubiert. Nach einem weiteren Waschschrift mit PBS ++ wurden die Zellen in 1 ml NH<sub>4</sub>Cl (50 mM in PBS) gequench (5 min, RT, dunkel). Abschließend wurden die Deckgläschen in PBS getaucht und mit Immunomount auf Objektträgern fixiert. Zur immunochemischen Detektion wurden die Zellen zunächst mit 90 % Methanol für 15 min permeabilisiert und anschließend mit dem Erstantikörper inkubiert (1:1000 in PBS ++,

30 min, RT). Nach einem Waschschrift wurden der Glukokortikoid Rezeptor mit einem Cy-2 gekoppelten Zweitantikörper gefärbt (1:1000 in PBS ++, 30 min, RT, Dunkel) und anschließend auf Objektträgern fixiert. Die Analyse erfolgte an einem konfokalen Laser Scanning Mikroskop (Zeiss LSM510, Zeiss).

#### **PBS ++**

1 mM            MgCl  
0,1 mM        CaCl  
in PBS

### **3.11. Molekular- und zellbiologische Methoden**

Im Folgenden werden molekular- und zellbiologische Methoden beschrieben.

#### **3.11.1. Reporteragen-Assay**

Zur Analyse der Aktivität von Promotoren wurden Reporteragen-Assays eingesetzt. Ein Reporteragen-Konstrukt enthält neben einer Promotorsequenz das kodierende Gen für ein Reporterenzym. Das Reporteragen-Konstrukt wurde transient transfiziert. Über die Messung der Reporterenzym-Aktivität kann dann die Aktivität des Promoters bestimmt werden. Die Genauigkeit, der in Reporteragensystemen gemessenen Aktivitäten, wird durch verschiedene Faktoren bestimmt. Deshalb wird neben dem Reporteragen-Konstrukt ein Kontrollreporteragen-Konstrukt transfiziert, das eine konstitutive Expression von  $\beta$ -Galactosidase bewirkt. Die Aktivität des Reporteragens wird anschließend auf die Aktivität der  $\beta$ -Galactosidase normiert.

#### **3.11.2. Liposomale Transfektion mit Lipofectamine 2000**

Aufgereinigte Plasmide wurden mittels liposomaler Transfektion in die Zielzellen übertragen. Als liposomales Reagenz wurde Lipofectamine 2000 (Invitrogen) benutzt.

Die Zellen wurden einen Tag vor der Transfektion auf 10 cm-Schalen vereinzelt. Die Transfektion erfolgte nach ca. 12-stündiger Inkubation in DMEM (10 % FKS). Je 1  $\mu$ g der Plasmide wurde in 480  $\mu$ l Opti-MEM I aufgenommen. In einem zweiten Eppendorfgefäß wurde im Verhältnis 2:1 (m:V) der eingesetzten Plasmidmenge Lipofectamine 2000 in 20  $\mu$ l Opti-MEM I gelöst. Nach 5-minütiger Inkubation bei RT wurden die Ansätze gemischt und weitere 20 min unter gleichen Bedingungen inkubiert. Der Transfektionsansatz wurde dann auf die Zellen pipettiert. Nach der Transfektion wurden die Zellen für sechs Stunden bei 37°C in einer wassergesättigten Atmosphäre mit 5 % CO<sub>2</sub> in Opti-MEM I kultiviert. Nach dieser Zeit wurden die Zellen auf 6-well-Platten verteilt und über Nacht in DMEM + 10 % FKS unter oben beschriebenen Bedingungen kultiviert. Vor der Stimulation wurden die Zellen für sechs Stunden in DMEM ohne FKS gehungert. Um intraexperimentelle Schwankungen zu erkennen, wurde jede Stimulation im Triplikatausgeführt.

### 3.11.3. Lyse der transfizierten Zellen

Nach der Stimulation wurde das Kulturmedium entfernt und die Zellen mit kaltem PBS gewaschen. Die Lyse erfolgte pro Schale mit 200 µl Extraktionspuffer. Nach 10-minütiger Lagerung auf Eis wurde der Zelldebris für 5 min bei 13.000 Upm in der Tischzentrifuge abzentrifugiert. Der Überstand wurde sofort für die Bestimmung der Luziferase-Aktivität verwendet.

#### Extraktionspuffer

5 mM	Tris/HCl, pH 7,8
0,4 mM	EDTA
2 %	Glycerin
0,2 %	Triton X-100
0,2 %	DTT

### 3.11.4. Luziferase Assay

Die Luziferase Aktivität der Zelllysate wurde mit dem Luziferase Kit der Firma Promega nach Herstellervorschriften durchgeführt. Die Luziferase des Leuchtkäfers *Photinus pyralis* (Firefly Luciferase) oxidiert ihr Substrat Luziferin zu Oxyluziferin. Das bei dieser Reaktion emittierte Licht wird als Maß für die Aktivität des untersuchten Promotors bestimmt.

Je 10 µl des Zellextraktes wurden in eine Vertiefung einer Mikrotiter-Platte pipettiert. Direkt vor der Messung am Luminometer Microlumat 96 P (EG&G Berthold) wurden 50 µl Luziferase-Substrat (Promega) hinzugegeben.

Die erhaltenen Werte wurden zur Korrektur schwankender Transfektionseffizienzen durch die Werte für die Transfektionseffizienz dividiert, die im Anschluss an die Lumineszenz bestimmt wurde. Hierzu wurden 500 µl β-Galactosidase Puffer, 100 µl ONPG (1 mg/ml o-Nitrophenylgalactosid) und 100 µl des Zelllysates gemischt und bei 37°C für 1 h inkubiert. Nach Bildung des gelben Produktes wurde die Reaktion mit 250 µl Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> gestoppt. Die Intensität der Färbung wurde am Photometer bei 420 nm bestimmt.

#### β-Galactosidase-Puffer

60 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
40 mM	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
1 mM	KCl
1 mM	Triton X-100
0,2 %	MgCl <sub>2</sub>
3,86 ml/l	β-Mercaptoethanol

### 3.11.5. RT-qPCR

Mittels RT-qPCR wurde die Expression von IL-6 Zielgenen untersucht.

#### 3.11.5.1. RNA Isolation

Die RNA der Zellen aus homogenisierten Zelllysaten wurde an eine Silikat-Gel-Membran gebunden und durch mehrmaliges Waschen von Verunreinigungen befreit. Zur Elution der RNA dienten 30 µl RNase-freies Wasser. Es wurde nach den Vorgaben des RNeasy Kits (QIAGEN) verfahren.

#### 3.11.5.2. Reverse-Transkriptase PCR

Die reverse Transkriptase PCR erfolgte mit dem Omniscript-Kit (QIAGEN). Als *Primer* wurden *Random Primer* (Promega) eingesetzt. In 100 µl PCR Gefäßen wurden zunächst je 500 ng RNA in 10 µl RNase freiem Wasser vorgelegt und für 10 min bei 65°C denaturiert. Anschließend erfolgte die Zugabe des Reaktionsansatzes nach Angaben des Herstellers. Die Umschreibung erfolgte bei 37°C für eine Stunde. Die cDNA wurde bis zur Verwertung bei -20°C gelagert.

#### 3.11.5.3. Real-time PCR

Die cDNA wurde mit *Taqman gene expression assays* (Applied Biosystems) und dem *qPCR Mastermix* der Firma Eurogentec (Darmstadt) amplifiziert. Die PCR Reaktion wurde in einem finalen Volumen von 10 µl, das sich aus 8 µl Reaktionsgemisch und 2 µl cDNA zusammensetzt, durchgeführt. Die Reaktionsansätze wurden mit einem Qiagility Roboter (Qiagen) in Duplikaten pipettiert. Die PCR erfolgte auf einem RotorgeneQ (Qiagen). Die Auswertung der Daten erfolgte nach Pfaffl (152).

#### ***Taqman gene expression assay***

Hs00241037_m1	humanes $\gamma$ -Fibrinogen
Hs99999909_m1	humane HPRT
Mm00513575_m1	murines $\gamma$ -Fibrinogen
Mm00656927_g1	murines Serum Amyloid A
Mm01545399_m1	murine HPRT

#### **Reaktionsansatz**

2 µl	cDNA (1:60 verdünnt in H <sub>2</sub> O)
2 µl	qPCR Mastermix
1 µl	<i>Taqman gene expression assay</i>
3 µl	H <sub>2</sub> O

#### **PCR-Programm**

15 min	94°C	
15 s	94°C	40 x
60 s	60°C	

### 3.11.6. Transfektion von siRNA

Die Transfektion von pSuper Plasmiden zur Expression von siRNA erfolgte wie in Kapitel 3.11.2 beschrieben mit Lipofectamine 2000. Um die *knockdown* Effizienz zu verstärken erfolgte 24 h nach der ersten Transfektion eine zweite Transfektion unter gleichen Bedingungen. Die Analyse der Zellen erfolgte 72 h nach der ersten Transfektion.

### 3.12. Statistische Analyse

Ergebnisse unabhängiger Experimente werden als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung dargestellt. Die statistische Analyse erfolgte abhängig von der Struktur des Datensatzes mit gepaarten oder ungepaarten einseitigen T-Tests mit den folgenden Signifikanzniveaus: \*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$ . Für ungepaarte Stichproben wurde die Varianzgleichheit mit einem Levene Test geprüft.

### 3.13. Mathematische Modellierung

Zur mathematischen Modellierung der frühen IL-6-induzierten Signaltransduktion wurden Modelle eingesetzt, die auf gewöhnlichen Differentialgleichungen (*Ordinary differential equations, ODE*) basieren. Alle Modelle wurden in *Systems Biology Markup Language (SBML)* (153) implementiert. Die Modellierung und Modellanalyse erfolgte durch Tom Quaiser (Lehrstuhl für Regelungstechnik und Systemtheorie, Ruhr-Universität Bochum).

---

## 4. Ergebnisse

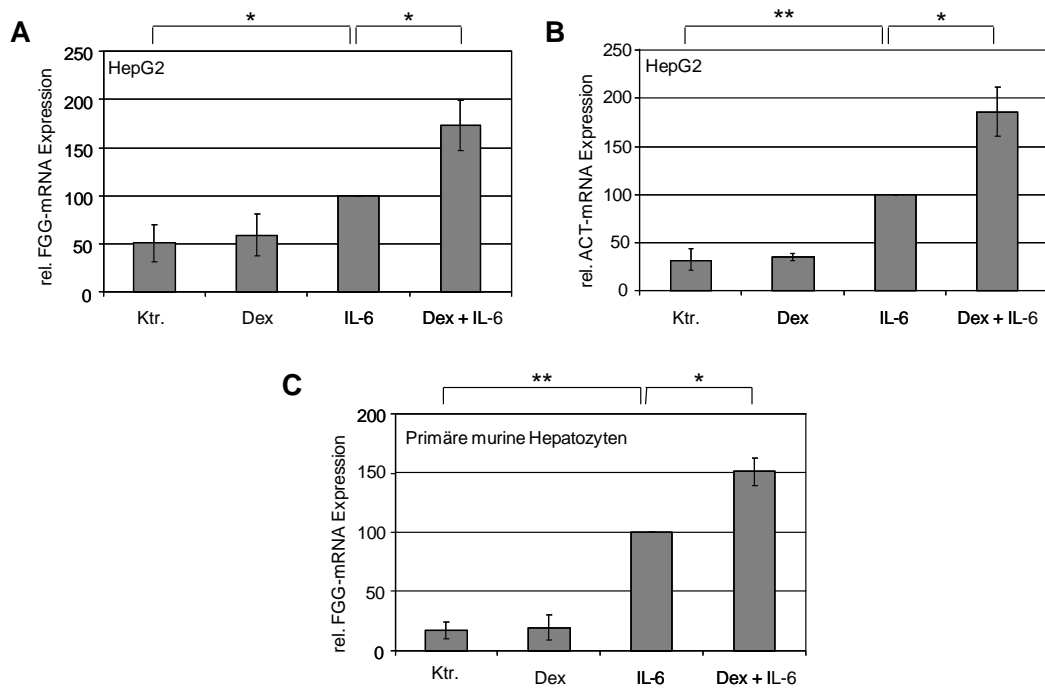
### 4.1. Regulation der IL-6-induzierten Signaltransduktion durch Glukokortikoide

Die Bearbeitung des Themenkomplexes „Regulation der IL-6-induzierten Signaltransduktion durch Glukokortikoide“ (154) erfolgte in gleichberechtigter Kooperation mit Diplom-Biologin Christina Khouri MBA, Institut für Biochemie und Molekularbiologie, RWTH Aachen.

#### 4.1.1. Glukokortikoide erhöhen die IL-6-induzierte Expression von Akut-Phase Genen

IL-6 induziert in der Leber durch transkriptionelle Aktivierung die Synthese von Akut-Phase Proteinen. Um zu untersuchen, ob das synthetische Glukokortikoid Dexamethason einen Einfluss auf diese IL-6 Zielgene hat, wurden HepG2 Zellen für 4 h mit IL-6 (200 U/ml)  $\pm$  Dexamethason (1  $\mu$ M) stimuliert und die Expression der endogenen mRNA von  $\gamma$ -Fibrinogen (FGG) und Antichymotrypsin (ACT) mittels RT-qPCR analysiert. Abbildung 4.1 zeigt, dass Dexamethason allein keine Transkription der FGG (Abb. 4.1 A) und ACT (Abb. 4.1 B) mRNA auslöst. Die Stimulation mit IL-6 induziert eine signifikante Expression der mRNA beider Gene, die durch die zusätzliche Stimulation mit Dexamethason deutlich verstärkt wird. Abbildung 4.1 C zeigt, dass dieser Effekt nicht auf humane Hepatomzellen beschränkt ist. Primäre murine Hepatozyten aus WT Mäusen exprimieren nach Stimulation mit IL-6, verglichen mit der basalen Expression, mehr FGG mRNA als HepG2 Zellen. Die zusätzliche Stimulation mit Dexamethason erhöht die Expression der FGG mRNA, wie in HepG2 Zellen, zusätzlich, während das Glukokortikoid allein keine Synthese dieser mRNA induziert.

Es wird somit deutlich, dass Glukokortikoide die Konzentration der mRNA der Akut-Phase Gene sowohl in humanen Hepatom Zellen als auch in primären murinen Hepatozyten erhöht.



**Abb. 4.1 Induktion der Akut-Phase Gen mRNA Expression durch IL-6 und Dexamethason (A, B)** HepG2 Zellen wurden für 4 h mit IL-6 (200 U/ml)  $\pm$  Dexamethason (1  $\mu$ M) stimuliert. Die Expression von humaner **(A)** FGG mRNA und **(B)** ACT mRNA wurde mittels quantitativer RT-qPCR analysiert. Als *housekeeping* Gen diente humane HPRT. **(C)** Primäre murine Hepatozyten wurden gehungert und anschließend für 4 h mit IL-6 und Dexamethason stimuliert. Die Expression von muriner FGG mRNA wurde mittels RT-qPCR analysiert. Als *housekeeping* Gen diente murine HPRT. Dargestellt sind Mittelwerte aus  $n = 3$  unabhängigen Experimenten  $\pm$  Standardabweichung. Die mRNA Expression nach Stimulation mit IL-6 wurde auf 100 normiert. Statistik: gepaarter einseitiger T-Test: \*  $p \leq 0,05$ , \*\*  $p \leq 0,01$ . Abbildungen: (154)

#### 4.1.2. Glukokortikoide erhöhen die späte IL-6-induzierte STAT3 Phosphorylierung

IL-6 aktiviert über gp130 sowohl den Jak/STAT als auch den MAPK Signalweg. Um zu untersuchen welcher dieser Signaltransduktionswege die Expression der FGG mRNA induziert, und somit ein potentiell Ziel für die Wechselwirkung mit Glukokortikoiden darstellt, wurde ein FGG Reporter-Assay eingesetzt. HepG2 Zellen wurden mit einem FGG-Promotor-Luziferase Konstrukt und EpoR/gp130 transfiziert. Durch den Einsatz chimärer Rezeptoren ist es möglich transfizierte Zellen über den extrazellulären Teil des Epo Rezeptors mit Epo zu stimulieren, über die intrazellulären Domänen von gp130 jedoch eine gp130-abhängige Signaltransduktion auszulösen (155, 156). Durch Mutationen, die für die IL-6-induzierte Signaltransduktion essentiellen Tyrosine in Phenylalanin, ist eine gezielte Stimulation des Jak/STAT Signalweges oder der MAPK möglich. Während Y759 (Y757 in der Maus) in gp130 die MAPK Kaskade Aktivierung und die Negativregulation durch SOCS3 und SHP2 vermittelt, erfolgt die Aktivierung von STAT3 über Y767, Y814, Y905, Y915 (siehe (16) zur Übersicht). HepG2 Zellen, die den EpoR/gp130 (WT) exprimieren, zeigen nach Stimulation mit Epo eine starke Luziferase Aktivität und somit eine deutliche Aktivierung des FGG Promotors (Abb. 4.2 A). In HepG2 Zellen, die den EpoR/gp130 (Y767, 814, 905, 915F) exprimieren und somit STAT3 nicht aktivieren können, kann

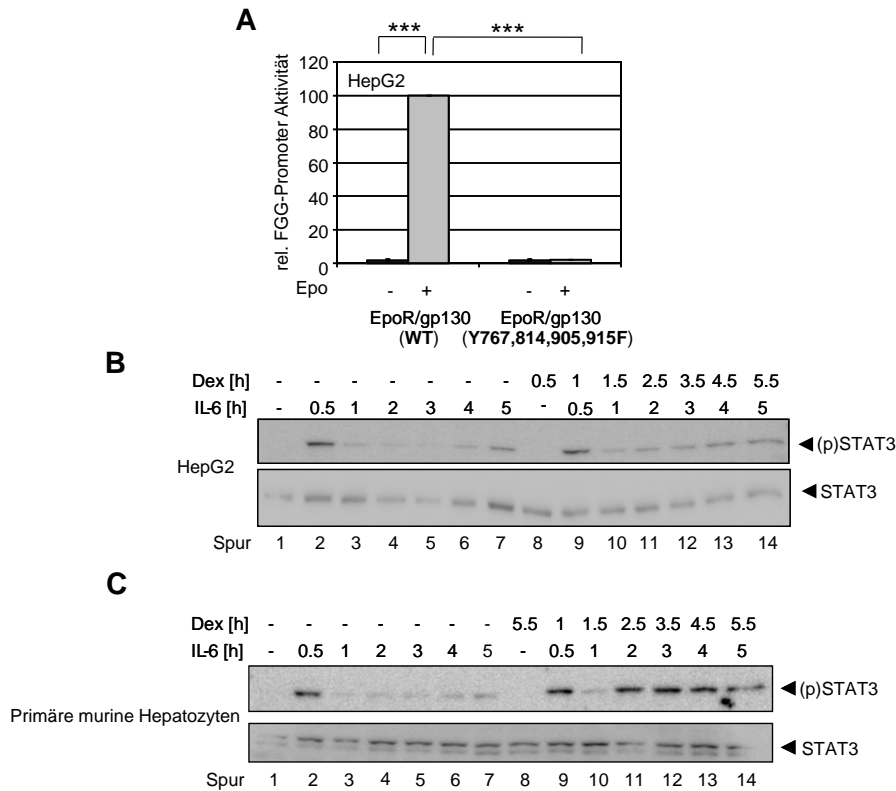
---

keine FGG Promotoraktivität nachgewiesen werden (Abb. 4.2 A). Die Aktivierung von STAT3 ist demnach essentiell für die Aktivierung des FGG Promotors und somit auch für die Expression der FGG mRNA.

Daher wurde untersucht, ob Dexamethason die IL-6-induzierte STAT3 Phosphorylierung in HepG2 Zellen (Abb. 4.2 B) oder in primären murinen Hepatozyten (Abb. 4.2 C) beeinflusst. Beide Zelltypen wurden für die angegebenen Zeiträume mit IL-6  $\pm$  Dexamethason stimuliert und anschließend lysiert. Die Analyse der Lysate erfolgte mittels SDS-Gelelektrophorese, Western Blot und anschließender Immundetektion von phosphoryliertem STAT3 und STAT3. Die Detektion von STAT3 dient als Ladekontrolle. In beiden Zelltypen zeigt sich nach Stimulation mit IL-6 eine transiente Phosphorylierung von STAT3 mit einer maximalen Intensität nach 30 min (jeweils Spur 2-7). Nach 4 Stunden (Spur 6) ist eine wiederkehrende Phosphorylierung der STAT3 Moleküle zu detektieren. Dexamethason allein (Spur 8) löst keine Phosphorylierung von STAT3 aus und beeinflusst das initiale Maximum der Phosphorylierung zum Zeitpunkt  $t = 30$  min nicht. Interessanterweise wird jedoch die späte STAT3 Phosphorylierung (Spur 11-14) sowohl in HepG2 Zellen als auch in primären murinen Hepatozyten deutlich erhöht.

Zusammengefasst verstärken Glukokortikoide die späte IL-6-induzierte Phosphorylierung von STAT3 und die Expression der mRNA des STAT3 Zielgens FGG.

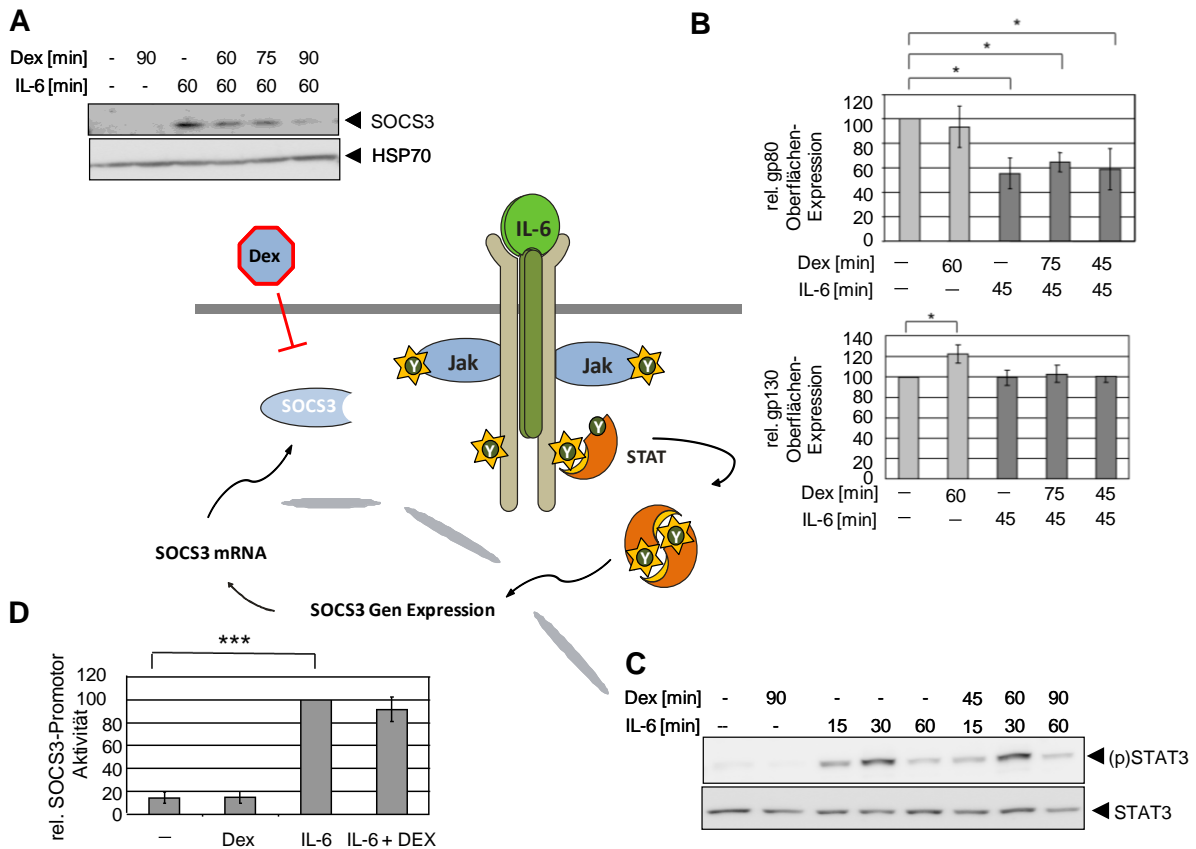




**Abb. 4.2 Dexamethason verstärkt die IL-6-induzierte STAT3 Phosphorylierung (A)** HepG2 Zellen wurden mit einem FGG Reporter- Konstrukt, einem  $\beta$ -Galactosidase Expressionsvektor und chimären EpoR/gp130 Vektoren transfiziert. Fünf Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen mit Epo (7 U/ml) für 4 h stimuliert. Die Luciferase Aktivität wurde über die  $\beta$ -Galactosidase Aktivität normiert. Dargestellt sind Mittelwerte aus n = 3 unabhängigen Experimenten  $\pm$  Standardabweichung. Die maximale Promotor-Aktivität wurde auf 100 normiert. Statistik: gepaarter einseitiger T-Test: \*\*\*  $p \leq 0,001$  **(B)** HepG2 und **(C)** primäre murine Hepatozyten wurden für die angegebenen Zeiträume mit IL-6 (200 U/ml)  $\pm$  Dexamethason (1  $\mu$ M) stimuliert und mittels SDS-Gelelektrophorese, Western Blot und anschließende Immundetektion analysiert. Die Färbung erfolgte mit spezifischen Antikörpern gegen (p)STAT3 und STAT3. Die Färbung von STAT3 dient als Ladekontrolle. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment aus n = 3. Abbildungen: (154)

#### 4.1.3. Glukokortikoide reduzieren die IL-6-induzierte SOCS3 Expression

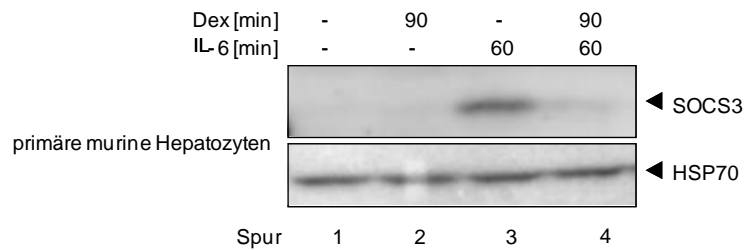
Die IL-6-induzierte Phosphorylierung von STAT3 wird unter anderem durch SOCS3 reguliert. SOCS3 wirkt dabei als klassischer *feedback* Inhibitor, dessen Synthese durch phosphoryliertes STAT3 induziert wird (38, 58, 157). Eine verlängerte STAT3 Phosphorylierung ist daher z.B. durch eine verringerte Expression von SOCS3 erklärbar. In Übereinstimmung mit dieser These konnte ich bereits im Rahmen meiner Diplomarbeit (158) zeigen, dass Dexamethason in HepG2 Zellen die IL-6-induzierte SOCS3 Expression reduziert (Abb. 4.3.A). Da SOCS3 ein frühes Zielgen des IL-6-induzierten Jak/STAT Signalweges ist, wurde in (158) untersucht, ob Dexamethason die ersten Schritte der SOCS3 Synthese beeinflusst. Wie in Abb. 4.3 zusammengefasst ist, reduziert Dexamethason jedoch weder die Expression der IL-6 Rezeptor Untereinheiten gp80 und gp130 (Abb. 4.3 B) noch die frühe Phosphorylierung von STAT3 (Abb. 4.3 C).



**Abb. 4.3 Zusammenfassung der Ergebnisse aus (158)** (A) Dexamethason reduziert die IL-6-induzierte SOCS3 Protein Expression. (B) Dexamethason hat keinen Einfluss auf die Expression von gp80 und gp130. (C) Dexamethason beeinflusst die frühe STAT3 Phosphorylierung nicht. (D) Dexamethason hat keinen Einfluss auf die SOCS3 Promotor Aktivität. Abbildungen: (154)

Um die Ergebnisse aus HepG2 Zellen zu bestätigen, wurden primäre murine Hepatozyten für die angegebenen Zeiträume mit IL-6 ± Dexamethason stimuliert (Abb. 4.4). In unstimulierten Zellen oder mit Dexamethason behandelten Zellen ist kein SOCS3 Protein nachzuweisen (Spur 1 und 2). IL-6 induziert nach 1 h eine deutliche Expression des SOCS3 Proteins (Spur 3). Übereinstimmend mit Abb. 4.3 A wird diese durch eine Prästimulation mit Dexamethason nahezu vollständig unterdrückt (Spur 4). Die Färbung von HSP70 dient als Ladekontrolle.

Sowohl in murinen als auch in humanen Zellen konnte somit gezeigt werden, dass Glukokortikoide die Expression des IL-6-induzierten *feedback* Inhibitors SOCS3 reduzieren. Dieser Effekt wird nicht durch die Reduktion der Expression der IL-6 Rezeptoruntereinheiten gp80 und gp130 oder die Reduktion der frühen STAT3 Phosphorylierung vermittelt.



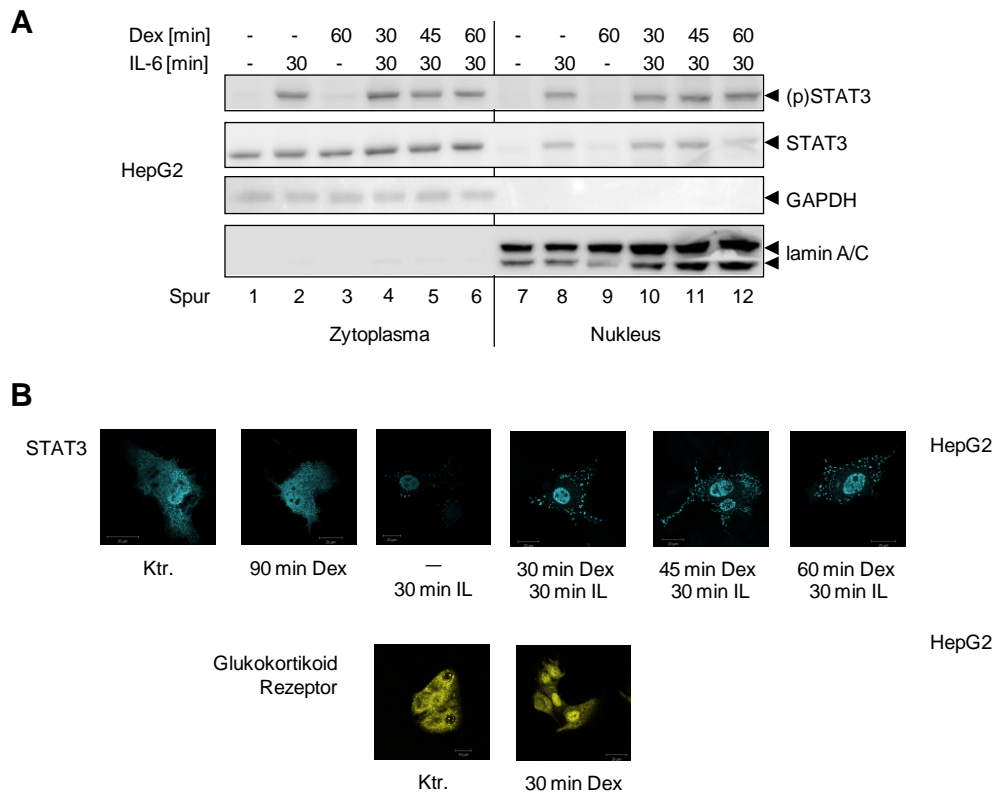
**Abb. 4.4 Dexamethason reduziert die IL-6-induzierte SOCS3 Expression** Primäre murine Hepatozyten wurden für die angegebenen Zeiträume mit IL-6 (200 U/ml) ± Dexamethason (1 µM) stimuliert und mittels SDS-Gelelektrophorese, Western Blot und anschließender Immundetektion analysiert. Die Färbung erfolgte mit spezifischen Antikörpern gegen SOCS3 und HSP70. Die Färbung von HSP70 dient als Ladekontrolle. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment aus n = 3. Abbildung: (154)

#### 4.1.4. Glukokortikoide beeinflussen die Kerntranslokation von STAT3 nicht

Um als Transkriptionsfaktor die Synthese von IL-6 Zielgenen, wie z.B. SOCS3, zu induzieren, müssen aktivierte STAT Moleküle in den Nukleus translozieren. Daher wurde untersucht, ob Dexamethason die Kerntranslokation von STAT3 reduziert. HepG2 Zellen wurden für die angegebenen Zeiträume mit IL-6 ± Dexamethason stimuliert, lysiert und anschließend in eine zytoplasmatische und eine nukleäre Fraktion getrennt (Abb. 4.5 A). Die Analyse der Fraktionen erfolgte mittels Western Blot und Immundetektion. Die Färbung von GAPDH und Lamin A/C dient als Kontrolle für die Reinheit der zytoplasmatischen respektive nukleären Fraktion sowie als Ladekontrolle. In unstimulierten Zellen (Spur 1 und 7) ist kein phosphoryliertes STAT3 nachweisbar, die Gesamtmenge des Proteins befindet sich im Zytoplasma. Eine 30-minütige Stimulation mit IL-6 (Spur 2 und 8) resultiert in der Phosphorylierung und partiellen Kerntranslokation der STAT3 Moleküle. Dexamethason beeinflusst weder allein noch in Kombination mit IL-6 diese Translokation (Spuren 3-6 und 9-12).

Diese Beobachtungen werden durch konfokale Mikroskopie gestützt (Abb. 4.5 B). HepG2 Zellen wurden mit einem Expressionsvektor für STAT3-CFP transfiziert, für die angegebenen Zeiträume mit IL-6 ± Dexamethason stimuliert und anschließend fixiert. Als Kontrolle für die Aktivität des Glukokortikoides wurden HepG2 Zellen für 30 min mit Dexamethason stimuliert und nach dem Fixieren mit einem Antikörper gegen den Glukokortikoid Rezeptor gefärbt. Während der GR in unstimulierten Zellen gleichmäßig in der Zelle verteilt ist, induziert die Stimulation mit Dexamethason die Translokation des GR in den Kern. In unstimulierten sowie mit Dexamethason stimulierten Zellen ist STAT3-CFP gleichmäßig über das Zytoplasma und den Kern verteilt. Eine 30-minütige Stimulation mit IL-6 bewirkt eine deutliche Translokation von STAT3-CFP in den Zellkern, während im Zytoplasma gleichmäßig verteilte, punktförmige STAT3-CFP Aggregate auftreten. Die zusätzliche Stimulation der Zellen mit Dexamethason beeinflusst die Translokation und Aggregation nicht.

Glukokortikoide beeinflussen demnach nicht die Translokation von STAT3 in den Nukleus.



**Abb. 4.5 Glukokortikoide beeinflussen die Kerntranslokation von STAT3 nicht (A)** HepG2 Zellen wurden für die angegebenen Zeitpunkte mit IL-6 (200 U/ml)  $\pm$  Dexamethason (1  $\mu$ M) stimuliert und anschließend fraktioniert. Fraktionen wurden mittels SDS-Elektrophorese, Western Blot und Immundetektion analysiert. Die Färbung erfolgte mit spezifischen Antikörpern gegen (p)STAT3, STAT3, GAPDH und Lamin A/C. GAPDH und Lamin A/C dienen als Kontrollen für die Reinheit der Fraktionen. **(B)** HepG2 Zellen wurden mit einem Expressionsvektor für STAT3-CFP transfiziert, stimuliert und anschließend fixiert. Für die Färbung des Glukokortikoid Rezeptors wurden die Zellen nach der Fixierung mit einem Antikörper gegen den Glukokortikoid Rezeptor gefärbt. Die Zellen wurden in einem konfokalen Laser Scanning Lasermikroskop analysiert. Dargestellt ist je ein repräsentatives Experiment aus  $n = 3$ . Abbildung: (154)

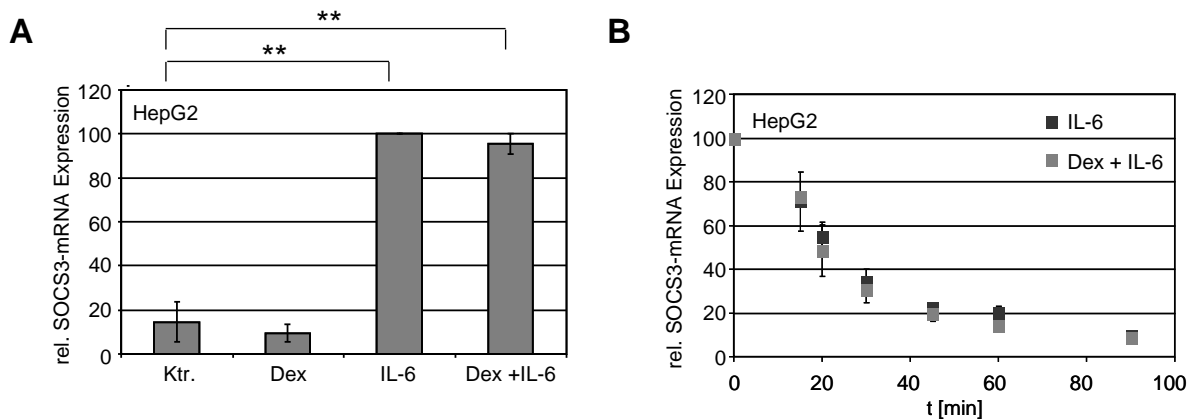
#### 4.1.5. Glukokortikoide beeinflussen die Synthese der SOCS3 mRNA nicht

Nach der Translokation in den Zellkern binden aktivierte Transkriptionsfaktoren, wie phosphoryliertes STAT3, an Promotorelemente ihrer Zielgene und induzieren dort die Transkription. In eigenen Vorarbeiten (158) konnte gezeigt werden, dass Dexamethason die Aktivität des SOCS3 Promotors nicht beeinflusst (Abb. 4.3 D). Um zu untersuchen, ob Dexamethason die Expression der SOCS3 mRNA reduziert, wurden HepG2 Zellen für 1 h mit IL-6  $\pm$  Dexamethason stimuliert und die Expression der SOCS3 mRNA anschließend mittels RT-qPCR analysiert (Abb. 4.6 A). Während IL-6 eine fünffache Induktion der SOCS3 mRNA bewirkt, hat Dexamethason keinen signifikanten Einfluss auf die induzierte oder basale SOCS3 mRNA Konzentration.

Da eine bekannte Funktion der Glukokortikoide die genspezifische Reduktion der mRNA Stabilität (108) ist, wurde zusätzlich untersucht, ob Dexamethason die Halblebenszeit der SOCS3 mRNA beeinflusst. Hierzu wurden HepG2 Zellen zunächst für 30 min mit IL-6  $\pm$  Dexamethason stimuliert. An-

schließlich wurde die Transkription durch Abwaschen des ursprünglichen Stimulus und Inkubation der Zellen mit Actinomycin D unterbrochen. Die Zellen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet und der Abbau der SOCS3 mRNA mittels RT-qPCR bestimmt. Abb. 4.6 B zeigt, dass die Behandlung mit Dexamethason die Halblebenszeit der SOCS3 mRNA, die ca. 30 min beträgt, nicht beeinflusst.

Glukokortikoide reduzieren daher die Konzentration des SOCS3 Proteins nicht durch die Reduktion der Konzentration der SOCS3 mRNA.



**Abb. 4.6 Glukokortikoide beeinflussen die Expression und Stabilität der SOCS3 mRNA nicht (A)** HepG2 Zellen wurden für eine Stunde mit IL-6 (200 U/ml) ± Dexamethason (1 µM) stimuliert. Die Expression von humaner SOCS3 mRNA wurde mittels RT-qPCR analysiert. Als *housekeeping* Gen diente humane HPRT. **(B)** HepG2 Zellen wurden für 30 min mit IL-6 (200 U/ml) ± Dexamethason (1 µM) stimuliert. Anschließend wurde der Stimulus abgewaschen und nach 20-minütiger Behandlung mit Actinomycin D (4 µM) zu den angegebenen Zeiträumen geerntet. Die Expression von humaner SOCS3 mRNA wurde mittels RT-qPCR analysiert. Als *housekeeping* Gen diente humane HPRT. Dargestellt sind Mittelwerte aus n = 3 unabhängigen Experimenten ± Standardabweichung. Die mRNA Expression nach Stimulation mit IL-6 wurde auf 100 normiert. Statistik: gepaarter einseitiger T-Test: \*\* p ≤ 0,01. Abbildung: (154)

#### 4.1.6. Glukokortikoide reduzieren die Stabilität des SOCS3 Proteins nicht

Weil Glukokortikoide die frühen Syntheseschritte des SOCS3 Proteins nicht beeinflussen, wurde untersucht, ob Dexamethason die Degradation des SOCS3 Proteins beeinflusst. Da SOCS3 als Adapter für eine E3 Ubiquitin Ligase dienen (62) und die eigene Ubiquitin-abhängige Degradation induzieren kann (63), wurde zunächst die Glukokortikoid abhängige Reduktion des SOCS3 Proteins bei Inhibition des Proteasoms untersucht. HepG2 Zellen wurden mit IL-6 ± Dexamethason für die angegebenen Zeiträume stimuliert und wenn angegeben mit dem Proteasominhibitor MG-132 (10 µM) vorbehandelt. Da MG-132 die JNK (C-Jun N-terminale Kinase) Phosphatase MKP-1 inhibiert, dient die Färbung phosphorylierter JNK als Kontrolle für die Aktivität von MG-132 (159). Die Färbung von HSP70 dient als Ladungskontrolle. Die Stimulation mit IL-6 bewirkt erwartungsgemäß die Synthese des SOCS3 Proteins, aber keine deutliche Phosphorylierung von JNK (Abb. 4.7 A, Spur 1). Weder Dexamethason noch Dexamethason in Kombination mit MG-132 induzieren SOCS3 (Spur 2 und 3). Die Inhibition des

---

Proteasoms durch MG-132 verstärkt die IL-6-induzierte SOCS3 Expression deutlich. (vergleiche Spur 1 und 4). Dexamethason reduziert die Konzentration des SOCS3 Proteins jedoch auch unter diesen Bedingungen (Spur 5).

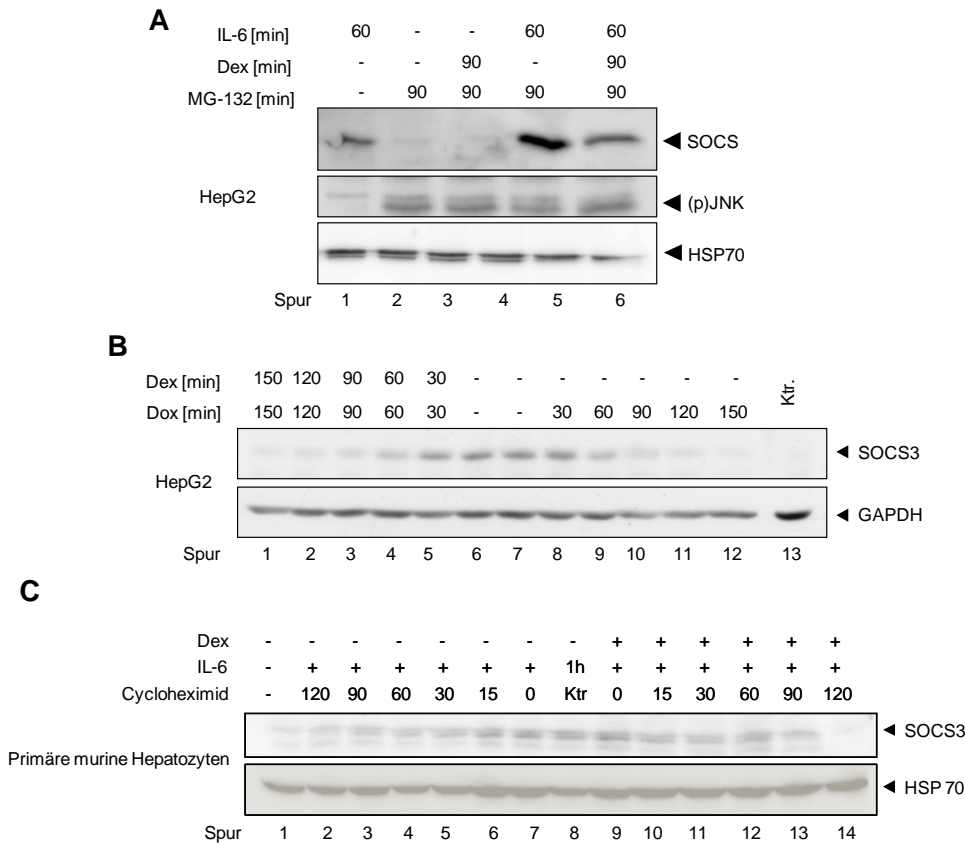
Die Reduktion der Konzentration des SOCS3 Proteins durch Glukokortikoide ist folglich unabhängig von der Aktivität des Proteasoms.

Um Proteasom-unabhängige Degradationsmechanismen auszuschließen, wurden HepG2 Zellen mit einem Tet-off-Expressionsvektor für SOCS3 transfiziert. Dieser Vektor erlaubt die konstitutive Expression exogener Proteine. Bei Zugabe von Doxycyclin (Dox) wird die Transkription dieser Proteine jedoch unterdrückt, so dass ihr Abbau anschließend mittels Western Blots untersucht werden kann (69). Die Färbung von GAPDH dient als Ladungskontrolle. In untransfizierten Kontrollzellen (Abb. 4.7 B, Spur 13) wird SOCS3 nicht gebildet. Die Transfektion des SOCS3 Tet-off-Expressionsvektor resultiert in einer deutlichen Induktion des SOCS3 Proteins (Spur 6 und 7). Nach der Zugabe von Doxycyclin (3 µg/ml) (Spur 8-12) nimmt die SOCS3 Proteinmenge schnell ab. Die zusätzliche Behandlung der Zellen mit Dexamethason reduziert die Halblebenszeit des SOCS3 Proteins von ca. 1 h nicht (Spur 1-5).

Glukokortikoide reduzieren demnach nicht die Halblebenszeit von exogen exprimiertem SOCS3.

Daher wurde mit einem Cycloheximid *Pulse-Chase* Versuch untersucht, ob die Stabilität von endogenem SOCS3 durch Dexamethason verringert wird. Primäre murine Hepatozyten, die in Abwesenheit eines Stimulus kein SOCS3 Protein exprimieren (Abb. 4.7 C, Spur 1), wurden für 1 h mit IL-6 stimuliert, um eine starke Induktion des SOCS3 Proteins zu erreichen (Spur 7). Anschließend wurde die Translation durch Abwaschen des Zytokins und Zugabe von Cycloheximid (50 µg/ml) gestoppt. Die Spuren 2-7 zeigen den Abbau des endogenen SOCS3. Die Halblebenszeit von SOCS3 beträgt in primären murinen Hepatozyten 60 – 90 min. Die Stimulation der Zellen mit Dexamethason reduziert die Halblebenszeit des endogenen IL-6-induzierten SOCS3 Proteins nicht (Spur 9-14).

Zusammengefasst reduzieren Glukokortikoide die Stabilität von exogenem und endogenem SOCS3 Protein nicht.



**Abb. 4.7 Glukokortikoide reduzieren die Stabilität des SOCS3 Proteins nicht (A)** HepG2 Zellen wurden für die angegebenen Zeiträume mit IL-6 (200 U/ml) ± Dexamethason (1 µM) ± MG-132 (10 µM) stimuliert und anschließend lysiert. Die Analyse der Lysate erfolgte mittels SDS-Gelelektrophorese, Western Blot und anschließender Immundetektion. Die Färbung erfolgte mit spezifischen Antikörpern gegen SOCS3, (p)JNK und HSP70. Die Färbung von HSP70 dient als Ladekontrolle. **(B)** HepG2 Zellen wurden mit pTetssplice-HASOCS3human transgenisiert. Die Transkription von SOCS3 wurde mit Doxycyclin (3 µg/ml) gestoppt und die Zellen zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet. Die Analyse der Lysate erfolgte mittels SDS-Gelelektrophorese, Western Blot und anschließender Immundetektion. Die Färbung erfolgte mit spezifischen Antikörpern gegen SOCS3 und GAPDH. Die Färbung von GAPDH dient als Ladekontrolle. Die Abbildung wurde von Dr. rer. nat. Ute Albrecht (Klinik für Gastroenterologie, Hepatologie und Infektiologie, Uniklinik Düsseldorf) zur Verfügung gestellt. **(C)** Primäre murine Hepatozyten wurden für 1 h mit IL-6 stimuliert und anschließend mit Cycloheximid (50 µg/ml) behandelt. Die Zellen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten geerntet. Die Analyse der Lysate erfolgte mittels SDS-Gelelektrophorese, Western Blot und anschließender Immundetektion. Die Färbung erfolgte mit spezifischen Antikörpern gegen SOCS3 und HSP70. Die Färbung von HSP70 dient als Ladekontrolle. Dargestellt ist jeweils ein repräsentatives Experiment aus n = 3. Abbildung B: (154)

#### 4.1.7. Glukokortikoide verstärken die Expression von Akut-Phase Genen transkriptionsabhängig

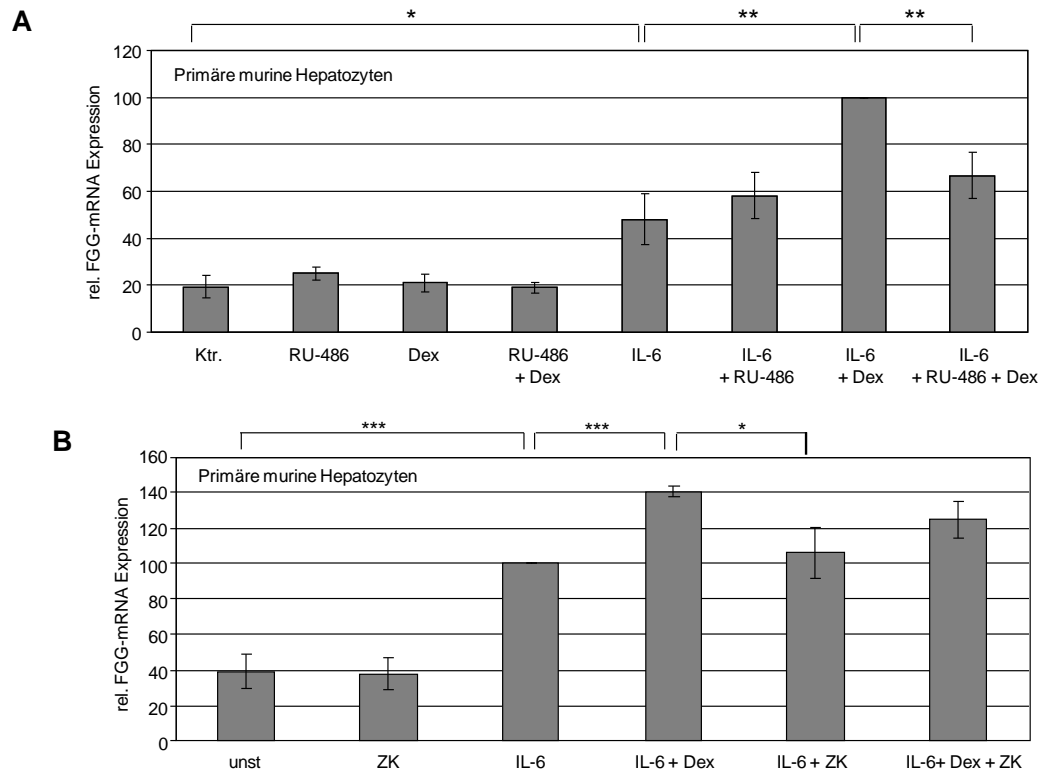
Glukokortikoide können ihre Funktionen, und somit theoretisch auch die Reduktion der SOCS3 Expression und Verstärkung der Akut-Phase Reaktion, durch verschiedene molekulare Mechanismen auslösen. Bindet der aktivierte Glukokortikoid Rezeptor an positive GRE in Zielgenen, so spricht man von einer transkriptionsabhängigen Transaktivierung der Zielgene. Bindet der GR an andere Transkriptionsfaktoren und beeinflusst ihre Aktivität negativ, so spricht man von Transrepression. Zur Differenzierung dieser beiden Mechanismen ist es möglich partielle Glukokortikoid Antagonisten einzu-

---

setzen, die nur eine der beiden Funktionen ausüben. RU-486 (Handelsname Mifepristone) wirkt als kompetitiver Antagonist des GRs und zeigt in Ratten Hepatozyten keine transaktivierende Wirkung (160). ZK-216348 ist ein nichtsteroidaler partieller Antagonist des GRs, der ebenfalls nur transrepressiv wirkt (161). Um zu untersuchen, ob die Verstärkung der FGG mRNA Expression durch Glukokortikoide durch Transaktivierung oder Transrepression ausgelöst wird, wurden primäre murine Hepatozyten mit IL-6  $\pm$  Dexamethason  $\pm$  RU-486 (1  $\mu$ M) (Abb. 4.8 A) bzw. ZK-216348 (1  $\mu$ M) (Abb. 4.8 B) für die angegebenen Zeiträume stimuliert. Nach der Isolation der gesamten RNA erfolgte die Analyse der FGG mRNA Expression mittels RT-qPCR. Beide partiellen Antagonisten induzieren, genau wie Dexamethason, keine Transkription der FGG mRNA. Während Dexamethason jedoch eine signifikante Erhöhung der IL-6-induzierten FGG mRNA auslöst (Abb. 4.8 A: Balken 7, B: Balken 4, siehe Abb. 4.1), verstärken beide Antagonisten die Synthese der FGG mRNA nicht (Abb. 4.8 A: Balken 6, B: Balken 5). Zusätzlich kompetieren die Antagonisten mit Dexamethason um die Bindung des GR, da bei der Stimulation der Zellen mit IL-6, Dexamethason und RU-486 bzw. ZK-216348 der verstärkende Effekt von Dexamethason verloren geht (Abb. 4.8 A: Balken 8, B: Balken 6). Die kompetitive Wirkung von RU-486 ist dabei deutlich stärker als die kompetitive Wirkung von ZK-216348.

Die Verstärkung der Expression der Akut-Phase Gen mRNA durch Glukokortikoiden basiert somit auf der transaktivierenden Funktion der Glukokortikoide. Partielle Antagonisten, die nur transrepressiv wirken, können diesen Effekt nicht auslösen und ihn sogar kompetitiv unterdrücken.





**Abb. 4.8 Glukokortikoide verstärken die FG G mRNA Expression über einen transaktivierenden Mechanismus** Primäre murine Hepatozyten wurden für 4 h mit IL-6 (200 U/ml) ± Dexamethason (1 µM) ± **(A)** RU-486 (1 µM) bzw. **(B)** ZK-216348 (1 µM) stimuliert. Nach Isolation der gesamten RNA wurde die Expression von muriner FG G mRNA mittels RT-qPCR analysiert. Als *housekeeping* Gen diente murine HPRT. Dargestellt sind Mittelwerte aus n = 3 unabhängigen Experimenten ± Standardabweichung. Die mRNA Expression nach Stimulation mit IL-6 wurde auf 100 normiert. Statistik: gepaarter einseitiger T-Test: \* p ≤ 0,05, \*\* p ≤ 0,01, \*\*\* p ≤ 0,001. Abbildung A: (154)

#### 4.1.8. Die Akut Phase-Reaktion wird durch die Reduktion der SOCS3 Expression verstärkt

Es konnte gezeigt werden, dass Glukokortikoide über einen transaktivierenden Mechanismus die Expression IL-6-induzierter Akut-Phase Gen mRNA verstärken und die Expression des *feedback* Inhibitors SOCS3 reduzieren. Um zu untersuchen, ob die Reduktion der Expression des SOCS3 Proteins tatsächlich kausal für die Induktion der Akut-Phase Gene verantwortlich ist, wurden zwei experimentelle Ansätze gewählt. Zum einen erfolgte die Analyse von SOCS3 defizienten MEF Zellen, zum anderen die Untersuchung von primären murinen Hepatozyten, die gp130 Y757F exprimieren und somit keine Rekrutierungsmöglichkeit für SOCS3 in gp130 besitzen.

Da ein kompletter SOCS3 *knockout* (162) bereits in der Embryonalentwicklung letal ist wurden SOCS3 defiziente, murine, embryonale Fibroblasten untersucht. Um festzustellen, ob Dexamethason auch in MEF Zellen die Expression des SOCS3 Proteins reduziert, wurden zunächst WT MEF Zellen mit IL-6 ± Dexamethason stimuliert. Da MEF Zellen kein endogenes gp80 exprimieren, müssen sie mit einer Mischung aus IL-6 und löslichem gp80 stimuliert werden. Abb. 4.9 A zeigt, dass Dexamethason

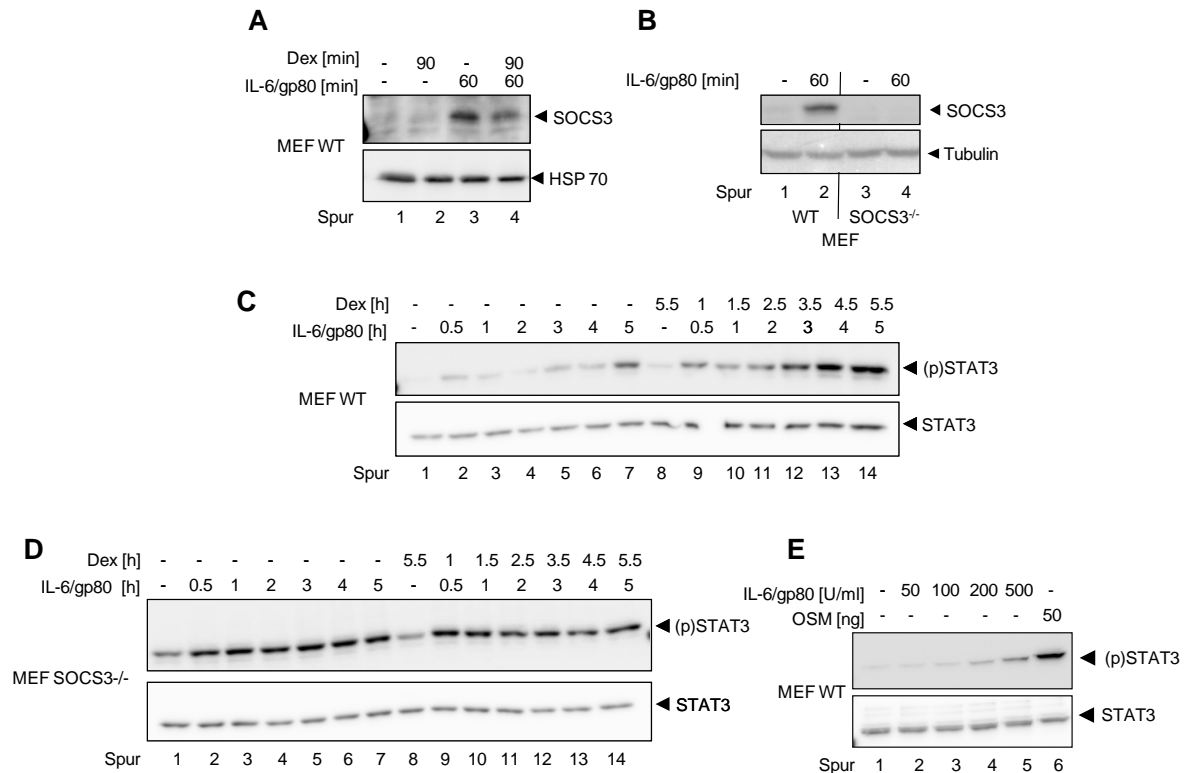
allein zu keiner Synthese des SOCS3 Proteins führt (Spur 2), während IL-6/gp80 eine deutliche Induktion von SOCS3 bewirkt (Spur 3). Übereinstimmend mit den Experimenten in HepG2 Zellen und primären murinen Hepatozyten (siehe Abb. 4.3 A und 4.4) reduziert Dexamethason auch in MEF Zellen die IL-6-induzierte Expression des SOCS3 Proteins. MEF Zellen können daher als Modellsystem für die Untersuchung der Glukokortikoid Effekte eingesetzt werden.

Im Folgenden wurden WT MEFs für bis zu 5 h mit IL-6/gp80  $\pm$  Dexamethason stimuliert (Abb. 4.9 C). IL-6/gp80 induziert eine transiente STAT3 Phosphorylierung mit einem ersten Maximum bei  $t = 30$  min (Spur 2). Nach 3 h steigt die Phosphorylierung erneut an und erreicht nach 5-stündiger Stimulation ein zweites Maximum (Spur 7). Werden die Zellen zusätzlich mit Dexamethason behandelt, ist die STAT3 Phosphorylierung zu jedem Zeitpunkt stärker als in Zellen, die nur mit IL-6/gp80 stimuliert wurden (Spur 9 -15). Die Phosphorylierung ist nicht transient und steigt kontinuierlich an. MEF WT Zellen zeigen somit, genauso wie HepG2 Zellen und primäre murine Hepatozyten, eine durch Glukokortikoide reduzierte SOCS3 Expression und eine deutlich verstärkte, späte IL-6-induzierte STAT3 Phosphorylierung.

Abb. 4.9 B zeigt, dass in SOCS3 defizienten MEF Zellen erwartungsgemäß nach Stimulation mit IL-6/gp80 kein SOCS3 exprimiert wird (Spur 4), während IL-6/gp80 in WT MEFs die Expression von SOCS3 deutlich induziert (Spur 2). Die Färbung von Tubulin dient als Ladungskontrolle.

In SOCS3 defizienten MEF Zellen ist nach Stimulation mit IL-6/gp80 (Abb. 4.9 D, Spur 1-6) eine konstante, starke Phosphorylierung von STAT3 zu erkennen, die nicht transient verläuft. Die zusätzliche Stimulation mit Dexamethason induziert keine verstärkte Phosphorylierung von STAT3 (Abb. 4.9 D, Spur 9-15). Um zu testen, ob die STAT3 Phosphorylierung in SOCS3 defizienten MEF Zellen nach Stimulation mit 200 U/ml IL-6/gp80 bereits maximal ist und so nicht mehr durch Dexamethason verstärkt werden könnte, wurden SOCS3 defiziente MEF Zellen mit ansteigenden Konzentrationen IL-6/gp80 und OSM (50 ng/ml) stimuliert. Abb. 4.9 E zeigt, dass höhere IL-6 Konzentrationen als 200 U/ml (Spur 5) oder andere Stimuli (Spur 6) eine im Vergleich zu Spur 4 deutlich verstärkte STAT3 Phosphorylierung induzieren. Die Phosphorylierung von STAT3 in Abb. 4.9 D ist somit nicht maximal und könnte weiter verstärkt werden. Dies deutet darauf hin, dass die Dexamethason-induzierte Reduktion der SOCS3 Expression in MEF WT Zellen ursächlich für die ansteigende STAT3 Phosphorylierung ist. In SOCS3 defizienten MEF Zellen kann dieser Mechanismus nicht wirken und die STAT3 Phosphorylierung bleibt durch Dexamethason unverändert.

Glukokortikoide verstärken demnach in MEF Zellen die Phosphorylierung von STAT3 durch die Reduktion der Expression des negativen *feedback* Inhibitors SOCS3.

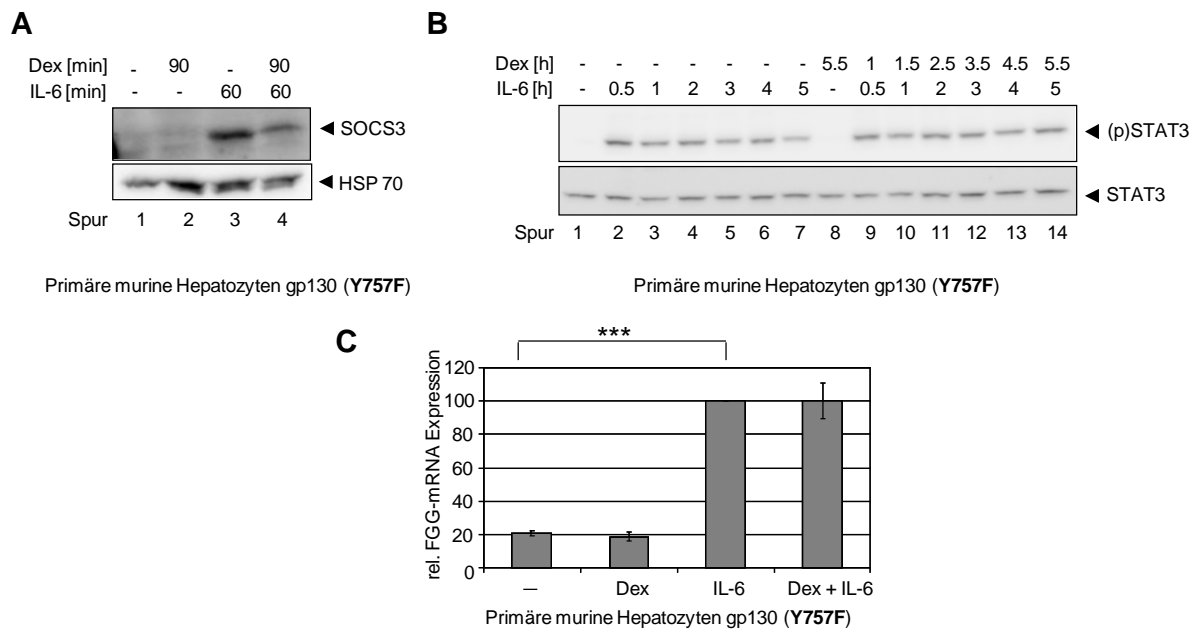


**Abb. 4.9 Glukokortikoide induzieren eine verstärkte STAT3 Phosphorylierung durch Reduktion von SOCS3 in MEF Zellen.** MEF WT Zellen **(A)(B)(C)(D)** und SOCS3 defiziente MEF Zellen **(B)(E)** wurden für die angegebenen Zeiträume mit IL-6 (200 U/ml)/ gp80 (0,5 µg/ml) ± Dexamethason (1 µM) bzw. OSM (50 ng/ml) stimuliert und anschließend lysiert. Die Analyse der Lysate erfolgte mittels SDS-Gelelektrophorese, Western Blot und anschließender Immundetektion. Die Färbung erfolgte mit spezifischen Antikörpern gegen SOCS3, (p)STAT3, HSP70, Tubulin und STAT3. Die Färbung von HSP70, Tubulin bzw. STAT3 dient als Ladekontrolle. Dargestellt ist jeweils ein repräsentatives Experiment aus n = 3. Abbildung: (154)

Um dieses Ergebnis in Hepatozyten zu bestätigen, wurden primäre murine Hepatozyten, die gp130 Y757F exprimieren, analysiert. In diesen Zellen ist die Bindestelle für SOCS3 in gp130 mutiert (60), so dass SOCS3 nicht mehr an den Rezeptor binden und folglich nicht mehr als *feedback* Inhibitor agieren kann. Abb. 4.10 A zeigt, dass Dexamethason auch in diesen Zellen die IL-6-induzierte SOCS3 Expression reduziert (Vergleich Spur 3 und 4). Im Gegensatz zu WT Hepatozyten (siehe Abb. 4.2. C) verstärkt die Kostimulation mit Dexamethason die späte STAT3 Phosphorylierung hier jedoch nicht (Abb. 4.10, vergleiche Spur 2 – 7 und Spur 9 - 14). Auch die IL-6-induzierte Expression von FG mRNA wird in gp130 Y757F Hepatozyten durch Dexamethason nicht erhöht (Abb. 4.10 C, vergleiche mit Abb. 4.1 C für WT Hepatozyten).

Zellen, die durch die Mutation der SOCS3 Bindestelle in gp130 resistent gegen die Wirkung von SOCS3 sind, zeigen demnach zwar eine Reduktion der Expression des SOCS3 Proteins durch Glukokortikoide, aber keine verstärkte IL-6 induzierte Antwort.

Die Ergebnisse aus SOCS3 defizienten MEF Zellen und gp130 Y757F primären murinen Hepatozyten zeigen zusammenfassend, dass die durch Glukokortikoide verstärkte Expression von Akut-Phase Genen kausal in der Reduktion der SOCS3 Proteinkonzentration begründet liegt.



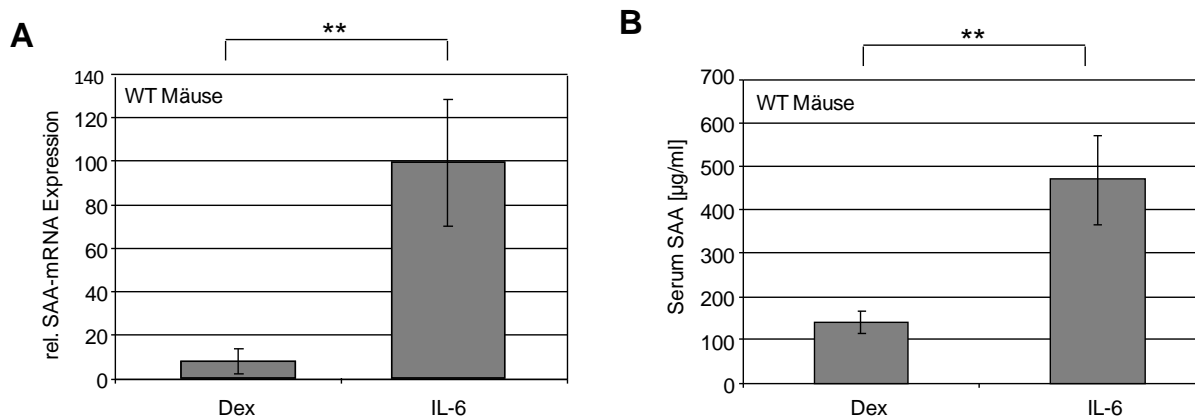
**Abb. 4.10 Glukokortikoide induzieren eine verstärkte STAT3 Phosphorylierung durch Reduktion von SOCS3 in primären murinen Hepatozyten (A)(B)** Y757F gp130 primäre murine Hepatozyten wurden für die angegebenen Zeiträume mit IL-6 (200 U/ml) ± Dexamethason (1 µM) stimuliert und anschließend lysiert. Die Analyse der Lysate erfolgte mittels SDS-Gelelektrophorese, Western Blot und anschließender Immundetektion. Die Färbung erfolgte mit spezifischen Antikörpern gegen SOCS3, (p)STAT3, HSP70 und STAT3. Die Färbung von HSP70 bzw. STAT3 dient als Ladekontrolle. Dargestellt ist jeweils ein repräsentatives Experiment aus n = 3. **(C)** Y757F gp130 primäre murine Hepatozyten wurden für 4 h mit IL-6 ± Dexamethason stimuliert. Die Expression muriner FG mRNA wurde mittels RT-qPCR analysiert. Als *housekeeping* Gen diente murine HPRT. Dargestellt sind Mittelwerte aus n = 3 unabhängigen Experimenten ± Standardabweichung. Die mRNA Expression nach Stimulation mit IL-6 wurde auf 100 normiert. Statistik: gepaarter einseitiger T-Test: \*\*\* p ≤ 0,001. Abbildung: (154)

#### 4.1.9. Glukokortikoide verstärken die Akut-Phase Gen Expression *in vivo*

Die bisher präsentierten Ergebnisse basieren auf Zelllinien oder primären Zellen. Es ist jedoch möglich, dass *in vivo* die Reduktion der SOCS3 Expression und Verstärkung der Akut-Phase Reaktion durch die multiplen Mechanismen der Glukokortikoid Wirkung abgeschwächt oder verdeckt werden. Um den Einfluss von Dexamethason auf die Akut-Phase Reaktion *in vivo* zu untersuchen, wurde zunächst getestet, ob die intraperitoneale Injektion von IL-6 (100 µg/kg) und Dexamethason (4 mg/kg) in Mäusen die Synthese von Akut-Phase Proteinen auslöst. Vier Stunden nach der Injektion wurde die Leber der Mäuse isoliert, von der Gallenblase getrennt und die gesamte RNA aus der Leber isoliert. Mittels RT-qPCR wurde anschließend die Expression der mRNA des Akut-Phase Proteins Serum Amyloid A (SAA) bestimmt. Abb. 4.11 A zeigt, dass Dexamethason allein keine Synthese der SAA mRNA auslöst, während IL-6 eine deutliche Induktion der SAA mRNA bewirkt. Zusätzlich wurde durch Punktion des

retrobulbären Venenplexus Blut gewonnen und die Konzentration des SAA Proteins im Serum mittels eines ELISAs bestimmt. Nach der Injektion von Dexamethason sind geringe basale SAA Konzentrationen von ca. 100 µg/ml Serum nachweisbar. Die Stimulation mit IL-6 erhöht die Konzentration jedoch auf ca. 500 µg/ml Serum (Abb. 4.11 B).

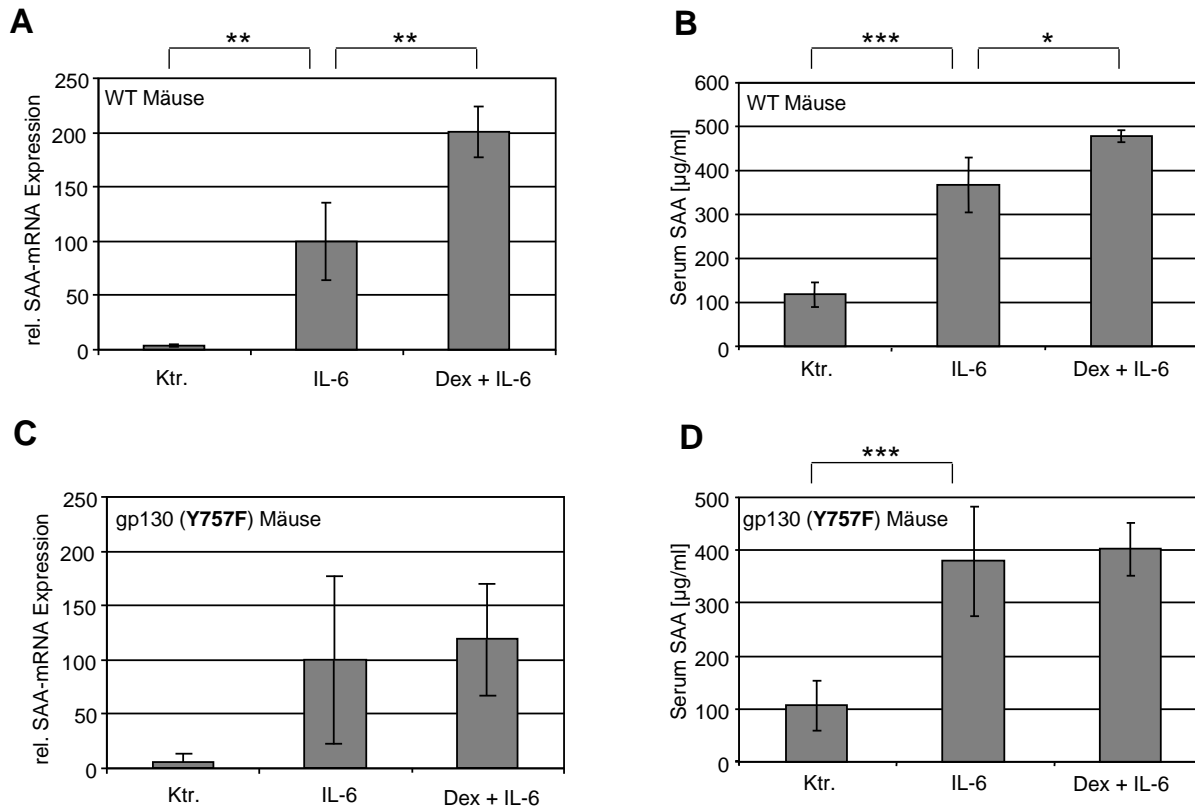
Folglich ist es möglich in Mäusen die Synthese von Akut-Phase Proteinen durch intraperitoneale Injektion von IL-6 zu induzieren, während die Injektion von Dexamethason allein keine Akut-Phase Reaktion auslöst.



**Abb. 4.11 IL-6 induziert die Expression von Akut-Phase Proteinen** WT Mäuse wurden intraperitoneal mit Dexamethason (4 mg/kg) oder IL-6 (100 µg/kg) injiziert **(A)** Aus der gesamten Leber wurde mRNA isoliert. Die Expression von muriner SAA mRNA wurde mittels RT-qPCR analysiert. Als *housekeeping* Gen diente murine HPRT. Dargestellt sind Mittelwerte aus  $n = 3 - 4$  Tieren  $\pm$  Standardabweichung. Die mRNA Expression nach Stimulation mit IL-6 wurde auf 100 normiert. Statistik: ungepaarter einseitiger T-Test: \*\*  $p \leq 0,01$  **(B)** Die Konzentration von SAA im Serum von WT Mäusen wurde mit einem ELISA bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte aus  $n = 3 - 4$  Tieren  $\pm$  Standardabweichung, Statistik: ungepaarter einseitiger T-Test: \*\*  $p \leq 0,01$ . Abbildung: (154)

Im Folgenden wurde WT Mäusen und Mäusen, die in der Leber gp130 Y757F exprimieren, IL-6  $\pm$  Dexamethason injiziert (Abb. 4.12). In WT Mäusen induziert IL-6 eine signifikante Synthese der hepatischen SAA mRNA (Abb. 4.12 A) und des serologischen SAA Proteins (Abb. 4.12 B). Die zusätzliche Injektion von Dexamethason erhöht die Konzentration der SAA mRNA in der Leber und des SAA Proteins im Serum der Mäuse. Mäuse, die in der Leber gp130 Y757F exprimieren, zeigen ebenfalls eine IL-6-abhängige Induktion der SAA mRNA (Abb. 4.12 C) und des SAA Proteins (Abb. 4.12 D). Die zusätzliche Injektion des Glukokortikoids verstärkt die Konzentration der SAA mRNA und des SAA Proteins jedoch nicht.

Diese Daten zeigen, dass Glukokortikoide auch *in vivo durch* die Reduktion der SOCS3 Expression die IL-6-induzierte Akut-Phase Reaktion verstärken. Mäuse, die resistent gegen die Inhibition durch SOCS3 sind, sind ebenfalls resistent gegen die durch Glukokortikoide verstärkte Akut-Phase Reaktion.



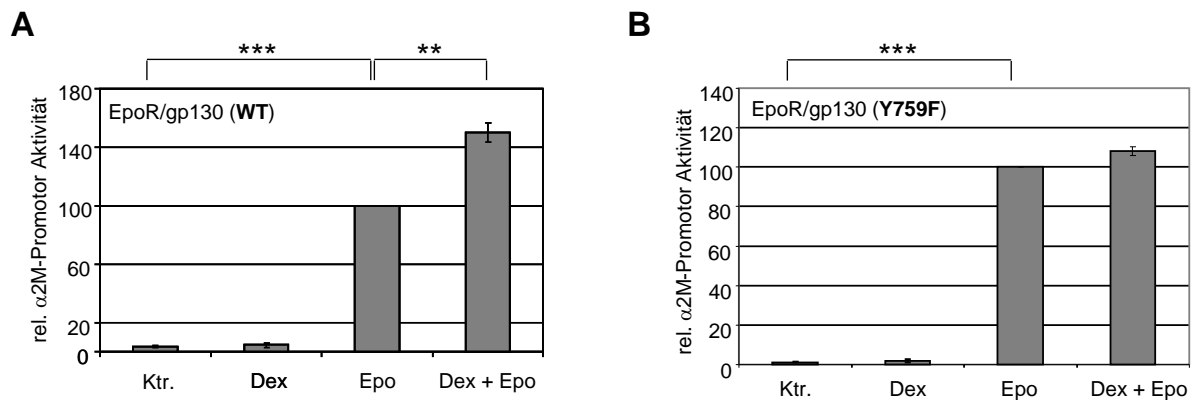
**Abb. 4.12 Dexamethason verstärkt die Akut-Phase SOCS3-abhängig in vivo WT Mäusen (A)(B) oder gp130 (Y757F) Mäusen (C)(D)** wurde intraperitoneal IL-6 (100 µg/kg) ± Dexamethason (4 mg/kg) injiziert. (A)(C) Aus der gesamten Leber wurde mRNA isoliert. Die Expression von muriner SAA mRNA wurde mittels RT-qPCR analysiert. Als *housekeeping* Gen diente murine HPRT. Dargestellt sind Mittelwerte aus  $n = 3 - 4$  Tieren ± Standardabweichung. Statistik: ungepaarter einseitiger T-Test: \*\*  $p \leq 0,01$  (B)(D) Die Konzentration von SAA im Serum wurde mit einem ELISA bestimmt. Dargestellt sind Mittelwerte aus  $n = 3 - 4$  Tieren ± Standardabweichung, Statistik: ungepaarter einseitiger T-Test: \*  $p \leq 0,05$ , \*\*\*  $p \leq 0,001$ . Abbildung: (154)

#### 4.1.10. Glukokortikoide verstärken die Expression IL-6-induzierter Akut-Phase Gene global

Glukokortikoide verstärken die Expression von ACT mRNA (siehe Abb. 4.1 B), FGG mRNA (siehe Abb. 4.1 A und C, 4.10 C) und SAA (siehe Abb. 4.11, 4.12). Durch die Verstärkung der STAT3 Phosphorylierung sollten Glukokortikoide auch die Expression anderer Akut-Phase Gene und STAT3 Zielgene verstärken. In der Literatur wurden jedoch primär promotorspezifische Effekte von Glukokortikoiden auf die Expression von Akut-Phase Proteine beschrieben (116, 126). Lerner *et al.* konnten z.B. zeigen, dass Glukokortikoide die IL-6-induzierte  $\alpha 2$ -Makroglobulin Expression durch Bildung eines Enhanceosomes u.a. aus STAT3 und dem GR verstärken (116). Die Expression des STAT3 Zielgens  $\alpha 2$ -Makroglobulin sollte jedoch ebenfalls durch die Reduktion der SOCS3 Expression reguliert werden. Um dies zu untersuchen, wurde in HepG2 Zellen ein  $\alpha 2$ -Makroglobulin Reporter-Assay in Kombination mit der Expression von EpoR/gp130 Chimären durchgeführt. Werden die Zellen über WT gp130 aktiviert, so wird die IL-6-induzierte  $\alpha 2$ -Makroglobulin-Promotor Aktivität nach Kostimulation mit Dexamethason deutlich verstärkt (Abb. 4.13 A). Werden die Zellen jedoch über den für den SOCS3

*feedback* resistenten chimären Rezeptor EpoR/gp130 Y759F stimuliert, ist die Verstärkung der IL-6-induzierten Promotoraktivität durch Dexamethason nur marginal (Abb. 4.13 B). Dieses Ergebnis zeigt, dass Dexamethason auch die Aktivität des  $\alpha$ 2-Makroglobulin Promotors SOCS3-abhängig reguliert.

Die Verstärkung der IL-6-induzierten Akut-Phase Reaktion durch die Glukokortikoid-abhängige Reduktion der SOCS3 Expression scheint demnach ein neuer globaler Mechanismus für die Regulation der entzündlichen Antwort zu sein.



**Abb. 4.13 Glukokortikoide verstärken die  $\alpha$ 2-Makroglobulin Promotor Aktivität** HepG2 Zellen wurden mit einem  $\alpha$ 2-Macroglobulin Reporter-Assay Konstrukt, einem  $\beta$ -Galactosidase Expressionsvektor und chimären EpoR/gp130 Vektoren für **(A)** gp130 (WT) **(B)** gp130 (Y759F) transfiziert. Fünf Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen mit Epo (7 U/ml) für 4 h stimuliert. Die Luziferase Aktivität wurde über die  $\beta$ -Galactosidase Aktivität normiert. Dargestellt sind Mittelwerte aus n = 3 unabhängigen Experimenten  $\pm$  Standardabweichung. Die maximale Promotor-Aktivität wurde auf 100 normiert. Statistik: gepaarter einseitiger T-Test: \*\*\* p  $\leq$  0,001, \*\* p  $\leq$  0,01. Abbildung: (154)

#### 4.1.11. Zusammenfassung: Regulation der IL-6-induzierten Signaltransduktion durch Glukokortikoide

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde dargestellt, dass Dexamethason die IL-6-induzierte SOCS3 Expression reduziert. Die Analyse des molekularen Mechanismus dieses Effektes zeigte, dass die SOCS3 Expression weder durch eine Glukokortikoid-abhängige Reduktion

- (1) der Expression der Rezeptoruntereinheiten gp80 und gp130,
- (2) der frühen IL-6-induzierten STAT3 Phosphorylierung,
- (3) der STAT3 Kerntranslokation,
- (4) der Aktivierung des SOCS3 Promotors noch durch die
- (5) Veränderung der Halblebenszeit der SOCS3 mRNA oder des SOCS3 Proteins

reduziert wird. Jedoch ist die transkriptionelle Aktivität des Glukokortikoid Rezeptors (Transaktivierung) essentiell für die beobachteten Effekte.

---

Die Reduktion der Expression des negativen *feedback* Inhibitors SOCS3 resultiert in einer verstärkten späten, IL-6-induzierten STAT3 Phosphorylierung und Akut-Phase Reaktion. Dieser Zusammenhang konnte sowohl in der humanen Hepatom Zelllinie HepG2 als auch in primären murinen Hepatozyten und in *vivo* nachgewiesen werden.

Die hier präsentierten Daten stellen einen neuen globalen Mechanismus der Wechselwirkung zwischen anti-inflammatorischen synthetischen Glukokortikoiden und dem im Verlauf einer Entzündung sezernierten IL-6 dar.



## **4.2. Systembiologische Analyse der Funktion von SHP2 im IL-6-induzierten Jak/STAT- Signalweg**

Die Bearbeitung des Themenkomplexes „Systembiologische Analyse der Funktion von SHP2 im IL-6-induzierten Jak/STAT Signalweg“ erfolgte in gleichberechtigter Kooperation mit Dipl. Bioinformatiker Tom Quaiser, Lehrstuhl für Regelungstechnik und Systemtheorie, Ruhr-Universität Bochum. Er führte die mathematische Modellierung und Modellanalyse durch.

Ziel dieses Themenkomplexes war die Identifizierung eines auf Differentialgleichungen basierenden Modells der Regulation der frühen IL-6-induzierten Signaltransduktion durch SHP2. Ausgehend von einem detaillierten Ausgangsmodell  $M^0$  wurde ein iterativer Kreislauf aus der Erhebung experimenteller Daten, identifizierbarkeitsbasierter Modellreduktion und optimalem experimentellem Design durchlaufen (163).

### **4.2.1. Etablierung eines standardisierten Zellsystems - HEK-gp80 Zellen**

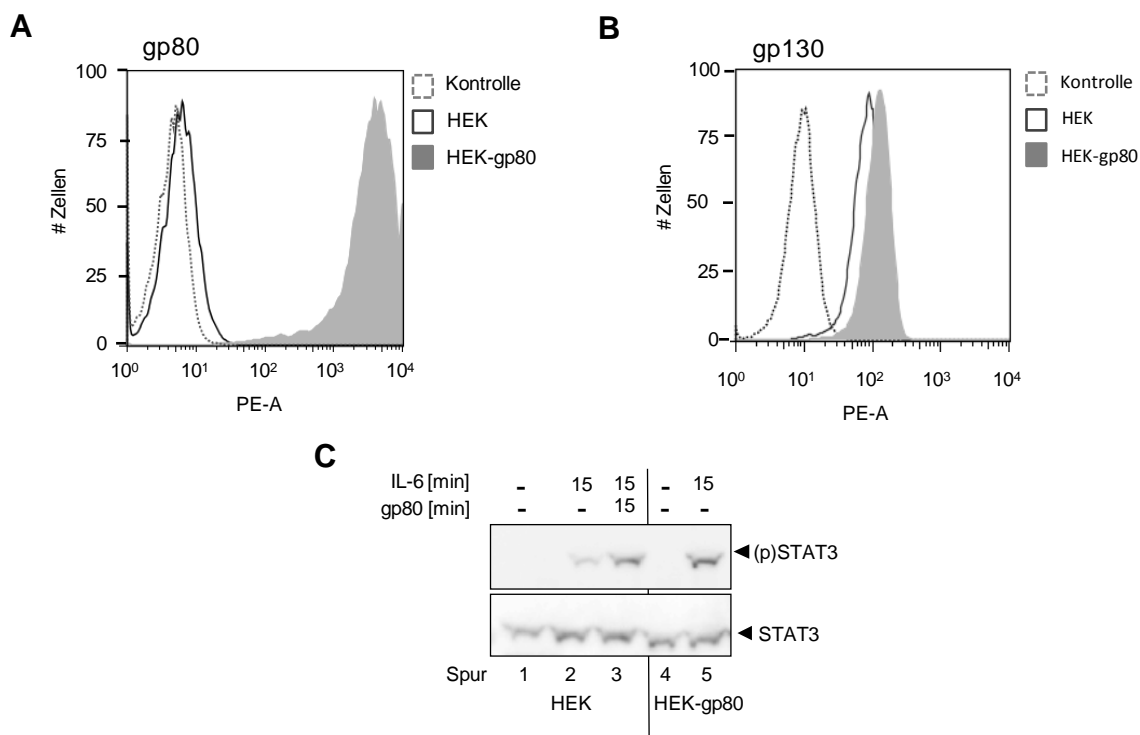
Die Etablierung mathematischer Modelle, basierend auf experimentell generierten Daten, stellt besondere Ansprüche an die Qualität der Daten. Neben der möglichst quantitativen Analyse ist eine geringe Standardabweichung der Daten wichtig. Eine geringe Standardabweichung der Daten kann durch die bewusste Reduktion experimenteller Schwankungen erreicht werden. Dies kann zum einen durch den Einsatz standardisierter Zelllinien, zum anderen durch die Etablierung standardisierter experimenteller Bedingungen erreicht werden.

Der Einsatz einer Zelllinie reduziert experimentelle Schwankungen, da jedes Experiment mit genetisch identischen Zellen durchgeführt wird. Zusätzlich ermöglicht der Einsatz einer Zelllinie im Gegensatz zu primären Zellen die genetische Manipulation der Zellen. Die hier präsentierten Experimente wurden in HEK Zellen durchgeführt. Da HEK Zellen keinen endogenen IL-6 $\alpha$  Rezeptor (gp80) tragen, müssen sie mit einem Komplex aus löslichem gp80 und IL-6 stimuliert werden. Die Stimulation mit einem Gemisch aus zwei Proteinen kann Schwankungen in der Stärke der Stimulation bewirken. Um diese Schwankungen zu vermeiden, wurden mittels retroviraler Transduktion HEK-Zellen generiert, die gp80 stabil exprimieren (HEK-gp80 Zellen). Nach der Transduktion wurden Einzelklone dieser Zellen isoliert und die Oberflächenexpression von gp80 und gp130 mittels FACS Analyse untersucht. Abb. 4.14 A zeigt, dass während HEK Zellen (schwarze Linie) nahezu kein gp80 auf der Oberfläche exprimieren, HEK-gp80 Zellen (graue Fläche) eine deutliche Expression von gp80 zeigen. Die Überexpression von gp80 auf HEK-gp80 Zellen beeinflusst die Oberflächenexpression von gp130 nur marginal (siehe Abb. 4.14 B).

Um den Einfluss der Expression von gp80 auf die IL-6-induzierte Jak/STAT Signaltransduktion zu untersuchen, wurde die IL-6-induzierte Phosphorylierung von STAT3 in HEK und HEK-gp80 Zellen mittels

Western Blot und anschließender Immundetektion untersucht (Abb. 4.14 C). Da die Überexpression von Rezeptoren häufig eine basale Aktivierung der Rezeptoren induziert, wurde zusätzlich die Phosphorylierung von STAT3 in unstimulierten Zellen analysiert. Die Färbung von STAT3 dient als Ladekontrolle und zeigt, dass die exogene Expression von gp80 in HEK-gp80 Zellen die STAT3 Konzentration nicht beeinflusst. HEK Zellen zeigen nach Stimulation mit IL-6 nur eine sehr schwache Phosphorylierung von STAT3 (Abb. 4.14 C, Spur 2). Die Stimulation mit IL-6/gp80 resultiert erwartungsgemäß in einer deutlichen Phosphorylierung von STAT3 (Spur 3). Die Expression von gp80 in HEK-gp80 Zellen induziert keine basale Aktivierung von STAT3 (Spur 4). Sie ermöglicht jedoch eine deutliche Stimulation der Zellen mit IL-6 (Spur 5). Die Stimulation von HEK-gp80 Zellen mit IL-6 und die Stimulation von HEK Zellen mit IL-6/gp80 resultiert in einer vergleichbaren Phosphorylierung von STAT3.

Zusammengefasst hat die Expression von gp80 nur einen geringen Einfluss auf die Oberflächenexpression von gp130 und löst keine basale Aktivierung des JAK/STAT Signalweges aus. Des Weiteren zeigen HEK-gp80 Zellen eine IL-6-abhängige Phosphorylierung von STAT3. HEK-gp80 Zellen können daher als standardisiertes Zellsystem für die Analyse der IL-6-induzierten Jak/STAT Signaltransduktion eingesetzt werden.



**Abb. 4.14 Etablierung von HEK-gp80 Zellen.** (A) HEK und HEK-gp80 Zellen wurden mit spezifischen Antikörpern gegen gp80 (A) und gp130 (B) gefärbt und mittels FACS analysiert. Als Kontrolle dienen ungefärbte Zellen. Dargestellt ist jeweils ein repräsentatives Experiment aus  $n = 3$ . (C) HEK und HEK-gp80 Zellen wurden für die angegebenen Zeiträume mit IL-6 (200 U/ml)  $\pm$  gp80 (1  $\mu$ g/ml) stimuliert und anschließend lysiert. Die Analyse der Lysate erfolgte mittels SDS-Gelelektrophorese, Western Blot und anschließender Immundetektion. Die Färbung erfolgte mit spezifischen Antikörpern gegen (p)STAT3 und STAT3. Die Färbung von STAT3 dient als Ladekontrolle. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment aus  $n = 3$ .

#### 4.2.2. Etablierung von standardisierten experimentellen Bedingungen

Um Schwankungen zwischen verschiedenen Experimenten zu reduzieren, wurden im Folgenden standardisierte experimentelle Bedingungen für die Kultivierung von HEK-gp80 Zellen definiert.

Radtke *et al.* konnten zeigen, dass gp130 Zellstress-abhängig internalisiert wird (164). Die Internalisierung von gp130 resultiert in der Reduktion der Stärke der IL-6-induzierten Signaltransduktion, die Schwankungen zwischen einzelnen Experimenten bewirken kann. Eine mögliche Ursache für Zellstress ist eine zu geringe oder zu hohe Dichte der Zellen auf der Zellkulturplatte. Um experimentelle Bedingungen zu bestimmen, die eine möglichst geringe Internalisierung von gp130 induzieren, wurde die Oberflächenexpression von gp130 bei verschiedenen Zelldichten analysiert.

HEK-gp80 Zellen wurden in verschiedenen Dichten auf 6 cm Zellkulturschalen ausgesät. Die Analyse der gp130 Oberflächenexpression erfolgte nach 48 h mittels FACS (Abb. 4.15 A). Die Oberflächenexpression von gp130 ist bei einer Dichte von  $7 \times 10^5$  Zellen/Schale maximal. Bei größeren Zelldichten von  $5 \times 10^6$  Zellen/Schale nimmt die gp130 Expression drastisch um bis zu 50 % ab.

Die Kultivierung von Zellen in Vollmedium kann durch die im Serum enthaltenen Wachstumsfaktoren eine IL-6-unabhängige Aktivierung der Jak/STAT Signaltransduktion auslösen. Diese Zytokin-unabhängige Aktivierung kann Schwankungen in den experimentell generierten Daten erzeugen. Um diese Schwankungen zu reduzieren müssen die Zellen vor dem Experiment in Hungermedium ohne Serum kultiviert werden. Eine zu lange Kultivierung in Hungermedium kann jedoch Zellstress auslösen. Um eine für HEK-gp80 Zellen optimale Dauer der Kultivierung in Hungermedium zu bestimmen wurde zunächst der Einfluss der Hungerdauer auf die gp130 Expression untersucht. HEK-gp80 Zellen wurden 48 h nach dem Aussäen für die angegebenen Zeiträume in Serum-freiem Medium gehungert (Abb. 4.15 B). Die FACS Analyse der gp130 Expression zeigt, dass bereits ein 2-stündiges Hungern die Rezeptorexpression um 20 % reduziert. Eine längere Hungerdauer führt zu einer verstärkten Reduktion der gp130 Expression.

Zusammengefasst ist die gp130 Expression bei nicht gehungerten Zellen, die in einer Dichte von  $7 \times 10^5$  Zellen/Schale kultiviert werden, maximal.

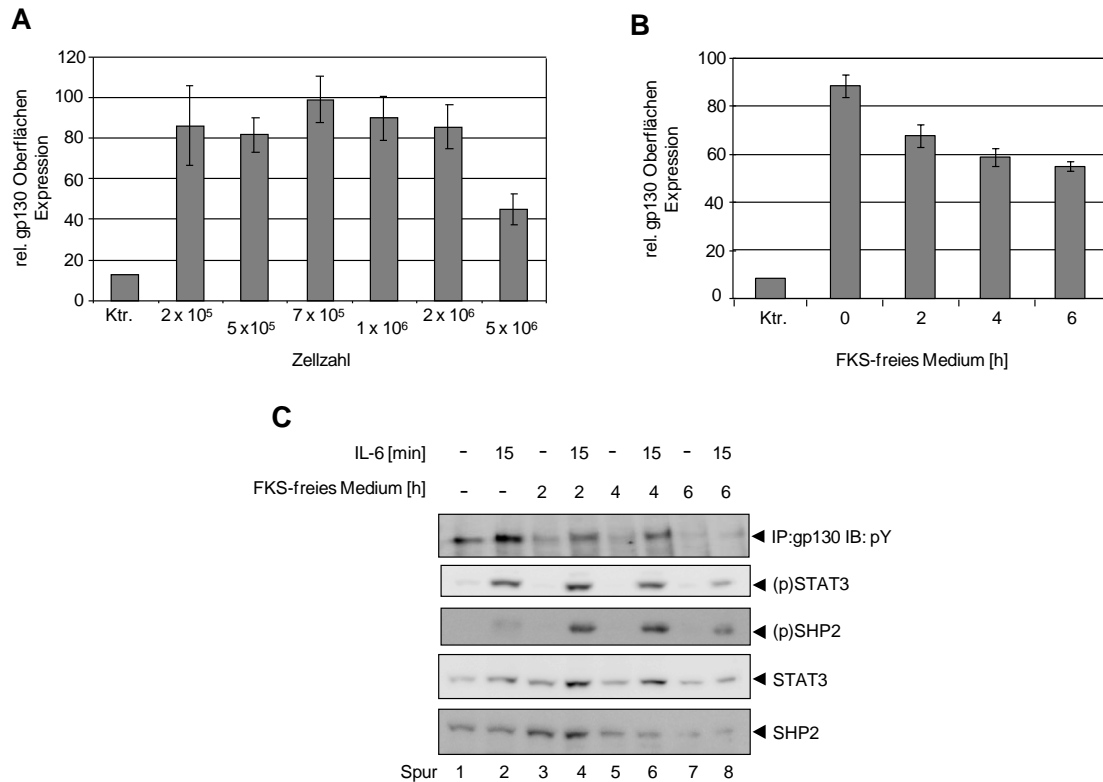
Neben der hohen Rezeptorexpression ist auch eine starke Phosphorylierung der Signalmoleküle essentiell für die Analyse des Jak/STAT Signalweges. Daher wurde untersucht, ob die maximale Expression von gp130 in der maximalen IL-6-induzierten Phosphorylierung von gp130, STAT3 und SHP2 resultiert (Abb. 4.15.C). HEK-gp80 Zellen ( $7 \times 10^5$  Zellen/Schale) wurden für 48 h kultiviert, für die angegebenen Zeiträume in Serum-freiem Medium gehungert und anschließend lysiert. Aus den Lysaten wurde gp130 mit einem spezifischen Antikörper präzipitiert. Nach dem Western Blot erfolgte die Detektion der Phosphorylierung von gp130 mit einem Antikörper gegen phosphorylierte Tyrosylres-

te. Die Detektion der Phosphorylierung von STAT3 und SHP2 erfolgte mit spezifischen Antikörpern gegen die phosphorylierten Moleküle. Die Färbung von STAT3 und SHP2 dient als Ladekontrolle. Zellen, die nicht gehungert wurden, zeigen eine basale Phosphorylierung von gp130 und STAT3 (Abb. 4.15 C, Spur 1). Die Stimulation mit IL-6 resultiert in einer Verstärkung der Phosphorylierung von gp130 und STAT3 (Spur 2). SHP2 ist jedoch weder in unstimulierten noch in mit IL-6 stimulierten Zellen deutlich phosphoryliert. Ein zweistündiges Hungern reduziert die basale Phosphorylierung von gp130 und STAT (Spur 3). Die Stimulation dieser Zellen mit IL-6 induziert eine deutliche Phosphorylierung von gp130, STAT3 und SHP2 (Spur 4). Im Gegensatz dazu reduziert eine auf 4 h bis 6 h verlängerte Hungerdauer die IL-6-induzierte Phosphorylierung von gp130, STAT3, SHP2 (vergleiche Spuren 4, 6 und 8). Diese Beobachtung korreliert mit der reduzierten gp130 Expression unter Hungerbedingungen.

Zusammengefasst wird eine maximale Phosphorylierung von gp130, STAT3 und SHP2, bei möglichst geringer basaler Phosphorylierung nicht bei der maximalen gp130 Expression in ungehungerten Zellen erreicht, sondern nach zweistündigem Hungern der Zellen. Diese Bedingungen wurden daher als Standardbedingungen festgelegt (Tab. 4.1). Die in den folgenden Kapiteln beschriebenen Experimente wurden ausschließlich unter diesen Standardbedingungen durchgeführt.

**Tab. 4.1 Standardisierte experimentelle Bedingungen**

<b>Variable</b>	<b>Optimale Stimulation bei</b>
Zelldichte	$7 \times 10^5$ Zellen/Schale
Hungerdauer	2 h



**Abb. 4.15 Definition von optimalen experimentellen Bedingungen** HEK-gp80 Zellen wurden in der angegebenen Dichte **(A)** 48 h vor dem Experiment ausgesät und für die angegebenen Zeitpunkte **(B)** in Medium ohne FKS gehungert. Die Zellen wurden mit spezifischen Antikörpern gegen gp130 gefärbt und mittels FACS analysiert. Als Kontrolle dienen ungefärbte Zellen. Dargestellt der Mittelwert aus  $n = 3$  Experimenten  $\pm$  Standardabweichung. **(C)**  $7 \times 10^5$  HEK-gp80 Zellen wurden 48 h vor dem Experiment ausgesät und anschließend für die angegebenen Zeiträume in Medium ohne FKS gehungert und mit IL-6 (200 U/ml) für 15 min stimuliert und anschließend lysiert. Die Analyse der Lysate erfolgte mittels SDS-Gelelektrophorese, Western Blot und anschließender Immundetektion. Für die Färbung von gp130 wurde dieses zunächst präzipitiert. Die Färbung erfolgte mit spezifischen Antikörpern gegen (p)STAT3, (p)SHP2, STAT3, SHP2 und (p)Y (für gp130). Die Färbung von STAT3 und SHP2 dient als Ladekontrolle. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment aus  $n = 3$ .

#### 4.2.3. Beschreibung des Ausgangsmodells $M^0$

Im Folgenden wird das Ausgangsmodell  $M^0$  eingeführt. Dieses Modell wurde anschließend systematisch, schrittweise an quantitative, experimentell generierte Daten angepasst. Da große Modelle oft nicht identifizierbar sind (139), wird nur die frühe Aktivierung des Jak/STAT Signalweges innerhalb der ersten 15 min nach Stimulation mit IL-6 abgebildet. Dies ermöglicht zum einen die Vernachlässigung des nukleären *feedbacks* durch SOCS3 und zum anderen die Fokussierung auf die Funktion der Tyrosin-Phosphatase SHP2 in der frühen IL-6-induzierten Signaltransduktion.

Die Modellierung erfolgte mit gewöhnlichen Differentialgleichungen (ODE). Zur besseren Visualisierung sind die Modelle in den folgenden Kapiteln graphisch repräsentiert. Die zugehörigen Differentialgleichungen sind im Anhang abgebildet.

Als Grundlage für die mathematische Modellierung wurden folgende Annahmen getroffen

- (1) Die Zelle entspricht einem gleichmäßig durchmischten Reaktionsgefäß mit einem Kompartiment und
- (2) die Konzentration der einzelnen Reaktanden ist hoch genug, um stochastische Schwankungen auszuschließen.

Abb. 4.16 zeigt die graphische Darstellung des Modells  $M^0$ . Pfeile beschreiben Reaktionen (z.B. Phosphorylierungen) oder die Ausbildung von Komplexen. Rechtecke repräsentieren Proteine respektive Proteinkomplexe. Orange Rechtecke entsprechen IL-6. Grüne Rechtecke entsprechen allen Rezeptoren und Komplexen, die Rezeptoren beinhalten. STAT3 wird durch violette und SHP2 durch rote Rechtecke dargestellt.

Der blau markierte Bereich in Modell  $M_0$  beschreibt folgende Reaktionen (Abb. 4.16, blauer Kreis):

- (1) die Interaktion von IL-6 (IL) mit dem Rezeptor (R) zu ( $R_{IL}$ ),
- (2) die anschließende Aktivierung des Rezeptorkomplexes ( $actR_{IL}$ ),
- (3) die Bindung von STAT3 (STAT) an den aktivierten Rezeptorkomplex ( $actR_{IL\_STAT}$ ),
- (4) die Phosphorylierung von STAT3 ( $actSTAT$ ),
- (5) die Bindung von SHP2 (SHP2) an den aktivierten Rezeptorkomplex ( $actR_{IL\_SHP2}$ ),
- (6) die Inaktivierung des aktivierten Rezeptorkomplexes durch SHP2 ( $R_{IL\_SHP2}$ ),
- (7) die Phosphorylierung von SHP2 durch den aktivierten Rezeptorkomplex ( $pSHP2$ ) und
- (8) die Dephosphorylierung von SHP2 durch aktive SHP2 (SHP2).

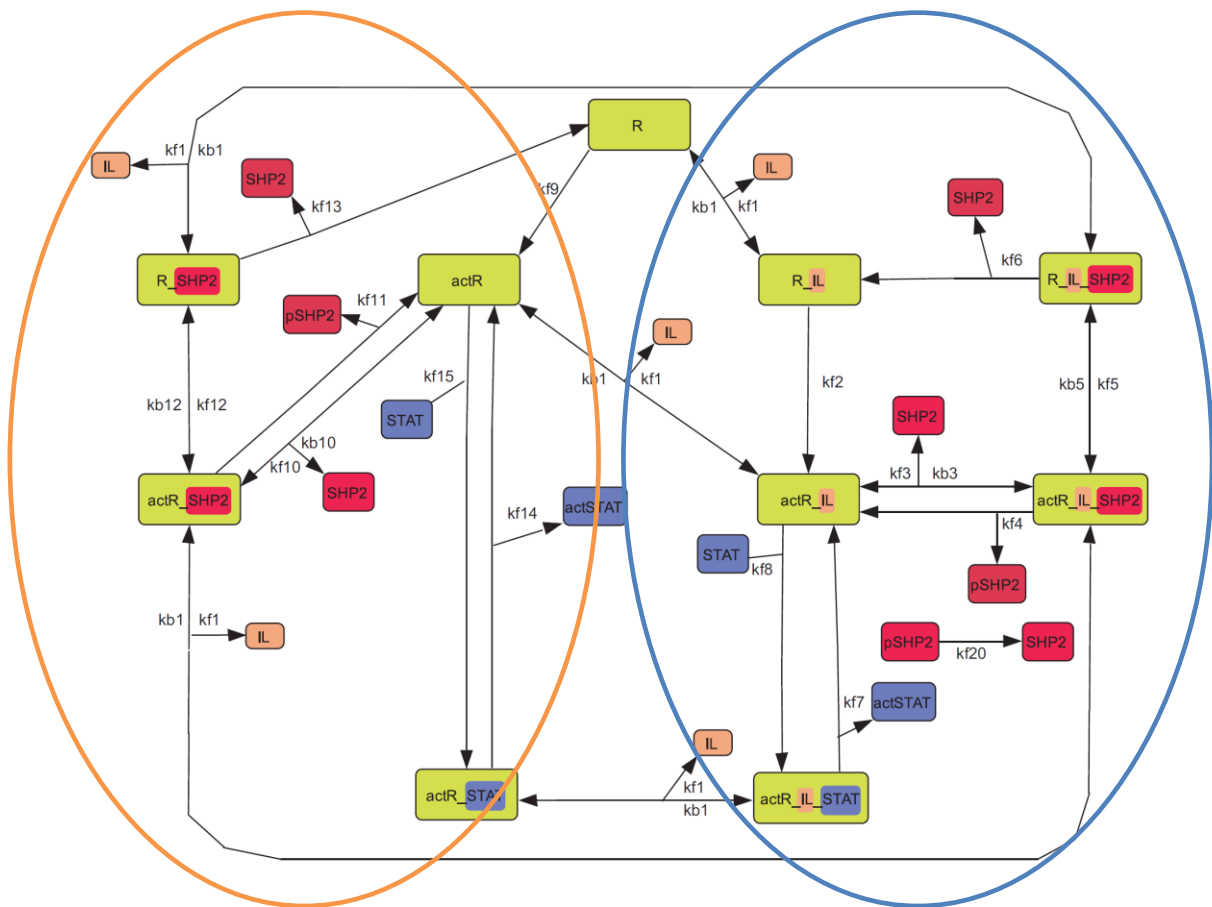
Die Phosphorylierung von SHP2 an Y542 und Y580 bewirkt eine intramolekulare Interaktion der phosphorylierten Tyrosylreste mit den zwei SH2 Domänen in SHP2 (44, 47). Deshalb wird hier postuliert, dass die intramolekulare Interaktion die Bindung phosphorylierter SHP2 ( $pSHP2$ ) an die phosphorylierten Tyrosylreste im aktivierten Rezeptor ( $actR$ ) verhindert und  $pSHP2$  vom Rezeptor dissoziiert.

Die orange markierte Hälfte des Modells beschreibt aktive Rezeptoren, die kein IL-6 binden ( $actR$ ). Diese Spezies kann z.B. durch spontane Aktivierung des Rezeptors oder durch ein Abwaschen von IL-6 bei einer pulsformigen Stimulation entstehen. Genau wie der durch IL-6 aktivierte Rezeptor kann der IL-6 freie aktive Rezeptor STAT3 rekrutieren ( $actR\_STAT3$ ) und phosphorylieren ( $actSTAT$ ). Weiterhin können Komplexe zwischen dem basal aktiven Rezeptor und SHP2 ( $actR\_SHP2$ ) entstehen, die analog zu den in der blauen Hälfte beschriebenen Reaktionen zur Inaktivierung des Rezeptors ( $R\_SHP2$ ) oder

zur Dissoziation von phosphoryliertem SHP2 führen können. IL-6 (IL) kann sowohl an inaktive Rezeptoren (R) als auch an IL-6 freie aktive Rezeptoren (actR) binden.

Um die Komplexität des Modells zu reduzieren, wurden in  $M^0$  einige Modellannahmen getroffen, die im Folgenden beschrieben werden. Die Annahmen (1) bis (3) werden in Kapitel 4.2.4 experimentell validiert.

- (1) Die Konzentration von gp130, Jak1, SHP2 und STAT3 bleibt über den Modellierungszeitraum von 15 Minuten konstant.
- (2) Die Phosphorylierung von Jak1 dient als Indikator für die Aktivierung der Spezies R. Der Rezeptorkomplex R umfasst gp80, gp130 und die mit gp130 assoziierten Januskinasen (25, 165).
- (3) Im Modellierungszeitraum von 15 min kommt es zu keiner Induktion von SOCS3.
- (4) Die Dephosphorylierung von STAT3 in den ersten 15 min nach IL-6 Stimulation wird basierend auf einer modelltheoretische Analyse des Jak/STAT Modells von Yamada (57) vernachlässigt (139). SHP2 wird in  $M^0$  daher nicht als STAT3 Phosphatase abgebildet, obwohl eine Interaktion beider Proteine in der Literatur beschrieben ist (52).
- (5) Die Spezies R und STAT3 werden durch vorgeformte Dimere abgebildet. Diese Annahme reduziert die Anzahl der Reaktionen durch Vernachlässigung der Dimerisierung. Das Vorliegen vorgeformter gp130 (166) und STAT3 Dimere (33, 35) ist in der Literatur belegt.



**Abb. 4.16**  $M^0$  Pfeile beschreiben Reaktionen. Rechtecke entsprechen Proteinen. Die blau umrandete Hälfte beschreibt eine IL-6-abhängige Aktivierung des Jak/STAT Signalweges. Die orange umrandete Hälfte beschreibt die IL-6-freie Aktivierung des Jak/STAT Signalweges. Reproduziert mit Erlaubnis von Tom Quaiser. Abbildung: (167)

#### 4.2.4. Experimentelle Validierung der Modellierungsannahmen

Im Folgenden wird die experimentelle Validierung der Modellannahmen (1) bis (3) beschrieben-

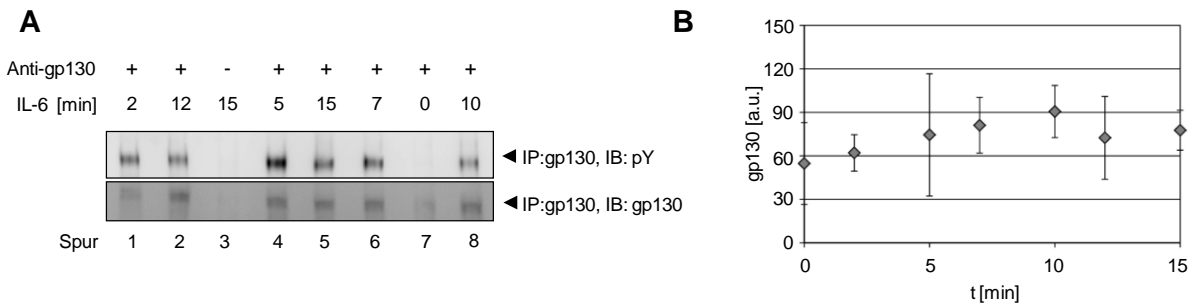
##### 4.2.4.1. Die Konzentration von gp130, Jak1, STAT3 und SHP2 ist konstant

Um zu untersuchen, ob sich die Konzentration von gp130, Jak1, SHP2 und STAT3 in Abhängigkeit von IL-6 verändert, wurden HEK-gp80 Zellen für 15 min kontinuierlich mit IL-6 (200 U/ml) stimuliert und zu den angegebenen Zeitpunkten lysiert.

Zur Untersuchung der Expression der Rezeptoruntereinheit gp130 wurde diese zunächst mittels Immunpräzipitation angereichert und anschließend im Western Blot analysiert. Wie von Schilling *et al.* beschrieben (150), wurden die Proben dabei randomisiert aufgetragen, um systematische Fehler des Western Blots auszuschließen. Die Färbung mit Antikörpern gegen phosphorylierte Tyrosylreste dient als Stimulationskontrolle und zeigt, dass gp130 IL-6-abhängig deutlich phosphoryliert wird (Abb.



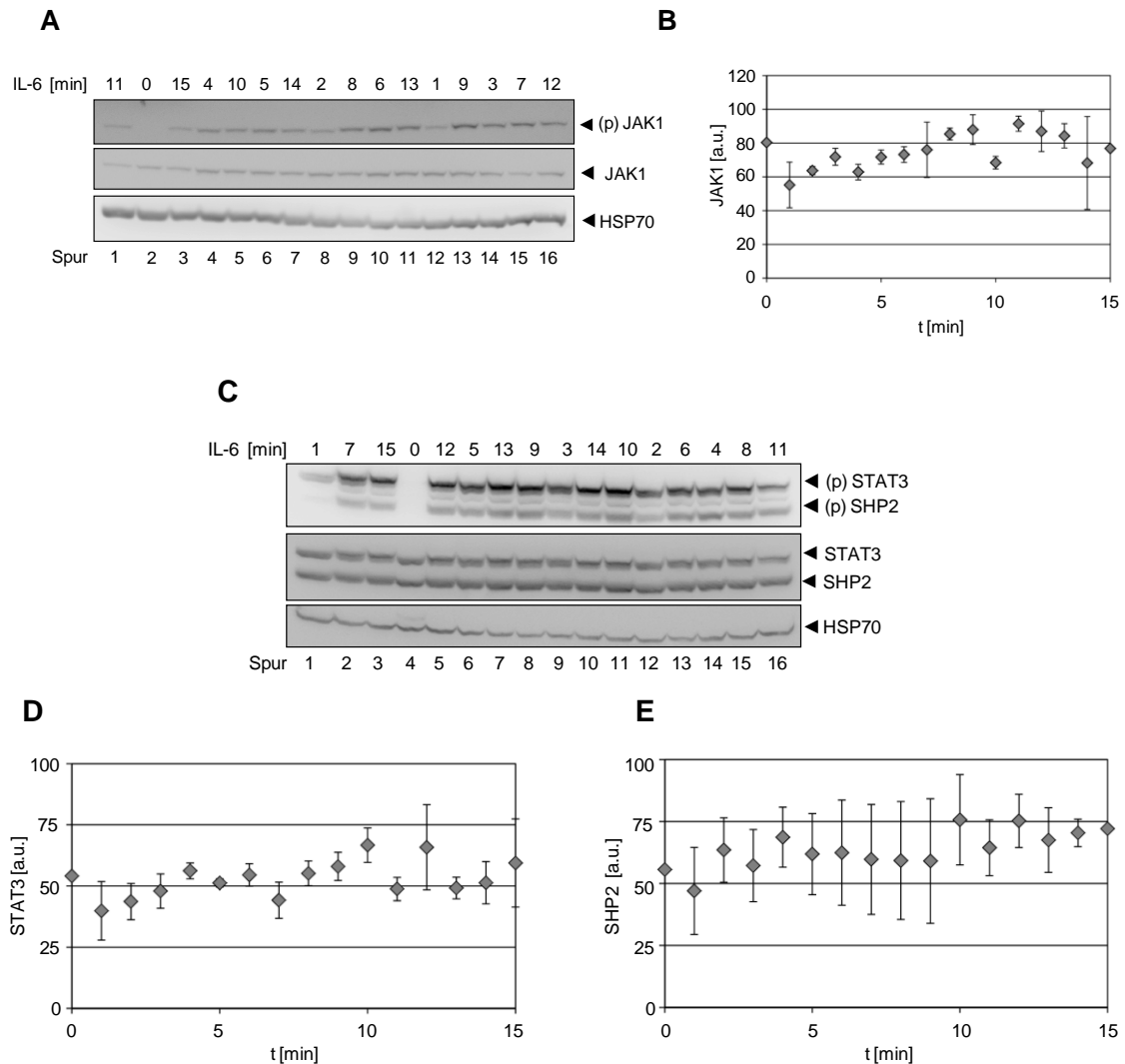
4.17 A, Spur 7 für unstimulierte Zellen). Die Färbung des gesamten gp130 zeigt, dass eine bis zu 15-minütige Stimulation mit IL-6 keinen Einfluss auf die Expression von gp130 hat (Abb. 4.17 B, Quantifizierung). Erwartungsgemäß erfolgt ohne präzipitierende Antikörper keine Detektion von phosphoryliertem oder unphosphoryliertem gp130 (Abb. 4.17 A, Spur 3).



**Abb. 4.17 Die Konzentration von gp130 ist konstant (A)** HEK-gp80 Zellen wurden unter standardisierten Bedingungen kultiviert, gehungert und für die angegebenen Zeiträume mit IL-6 (200 U/ml) stimuliert und anschließend lysiert. Für die Färbung von gp130 wurde dieses zunächst präzipitiert. Die Analyse der Präzipitate erfolgte mittels SDS-Gelelektrophorese, randomisiertem quantitativem Western Blot und anschließender Immunodetektion. Die Färbung erfolgte mit spezifischen Antikörpern gegen (p)Y und gp130. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment aus n = 3 Experimenten. **(B)** Densitometrische Analyse der Expression von gp130: Dargestellt ist der Mittelwert aus n = 3 Experimenten ± Standardabweichung. Abbildung: (167)

Die Analyse der Expression von Jak1, STAT und SHP2 erfolgte im Western Blot. Die Detektion von HSP70 dient als Ladekontrolle, die Detektion von (p)Jak1, (p)STAT3 und (p)SHP2 als Kontrolle für die Stimulation mit IL-6. Abb. 4.18 A zeigt, dass die Stimulation mit IL-6 eine deutliche Phosphorylierung von Jak1 auslöst (Spur 2 für unstimulierte Zellen), die Konzentration von Jak1 jedoch konstant ist (Abb. 4.18 B, Quantifizierung). Auch STAT3 und SHP2, werden in Abhängigkeit von IL-6 phosphoryliert (Abb. 4.18 C, Spur 4 für unstimulierte Zellen), die Menge an STAT3 und SHP2 ist dessen ungeachtet konstant (Abb. 4.18 D und 4.18 E, Quantifizierungen).

Zusammenfassend konnte Modellannahme (1) experimentell bestätigt werden. Es ist somit legitim im Modell weder den Abbau noch die Synthese von gp130, Jak1, STAT3 und SHP2 darzustellen, da ihre Konzentrationen über den Stimulationszeitraum konstant bleiben.



**Abb. 4.18 Die Konzentration von Jak, SHP2 und STAT3 ist konstant.** HEK-gp80 Zellen wurden unter standardisierten Bedingungen kultiviert, gehungert und für die angegebenen Zeiträume mit IL-6 (200 U/ml) stimuliert und anschließend lysiert. Die Analyse der Lysate erfolgte mittels SDS-Gelelektrophorese, randomisiertem quantitativem Western Blot und anschließender Immundetektion. Die Färbung erfolgte mit spezifischen Antikörpern gegen (p)JAK, JAK und HSP70 (**A**) bzw. (p)STAT3, (p)SHP2, STAT3, SHP2 und HSP70 (**C**). Die Färbung von HSP70 dient als Ladekontrolle. Dargestellt ist je ein repräsentatives Experiment aus  $n = 3$ . Densitometrische Analysen von JAK1 (**B**), STAT3 (**D**), SHP2 (**E**). Dargestellt ist der Mittelwert aus  $n = 3$  Experimenten  $\pm$  Standardabweichung. Abbildung: (167)

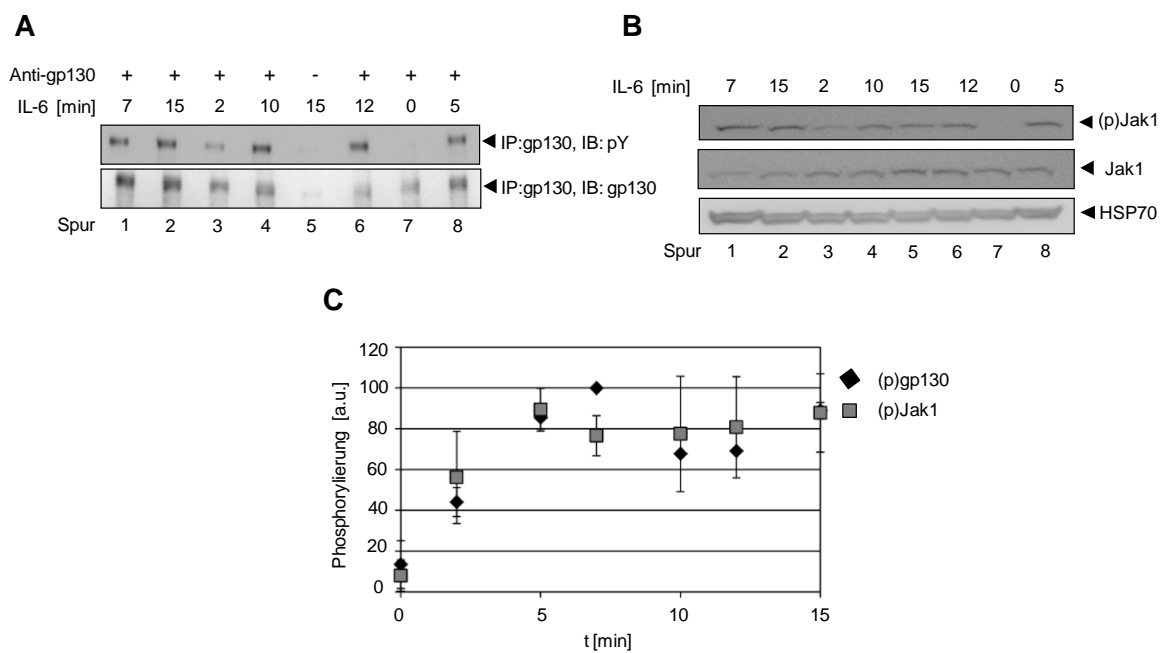
#### 4.2.4.2. Die Phosphorylierung von Jak1 dient als Indikator für die Aktivierung des Rezeptorkomplexes

Die Bindung von IL-6 an gp80 und die anschließende Assemblierung des Rezeptorkomplexes aus IL-6, gp80 und gp130 induziert die Aktivierung und Phosphorylierung von Jak1. Jak1 ist konstitutiv mit der membranproximalen Region von gp130 assoziiert (25, 165) und phosphoryliert im aktiven Zustand Tyrosylreste des Rezeptors. Um die Anzahl der kinetischen Parameter, die mit der Rezeptoraktivie-

rung verbunden sind, zu reduzieren, wurde Modellannahme (2) getroffen, die Phosphorylierung von Jak1 dient als Indikator für die Aktivierung des Rezeptorkomplexes (siehe Kapitel 4.2.3).

Um zu untersuchen, ob sich die Dynamik der IL-6 induzierten Phosphorylierung von gp130 und Jak1 unterscheidet, wurden HEK-gp80 Zellen für die angegebenen Zeiträume kontinuierlich mit IL-6 (200 U/ml) stimuliert, anschließend lysiert und mittels Western Blot analysiert. Sowohl gp130 (Abb. 4.19 A, Spur 7) als auch Jak1 (siehe Abb. 4.19 B, Spur 7) sind in unstimulierten Zellen nicht phosphoryliert. Nach Stimulation mit IL-6 steigt die Phosphorylierung bis zum Zeitpunkt  $t = 5$  min an und erreicht dann ein Plateau. Abb. 4.19 C zeigt, dass sowohl die Stärke als auch die Dynamik der Phosphorylierung von gp130 und Jak1 nahezu identisch sind. Die Phosphorylierung von Jak1 ist daher ein guter Indikator für die Aktivierung von gp130.

Modellannahme (2) konnte somit experimentell validiert werden. Es ist möglich, den Rezeptorkomplex im Modell zu vereinfachen und zu einer Spezies R, zusammenzufassen.



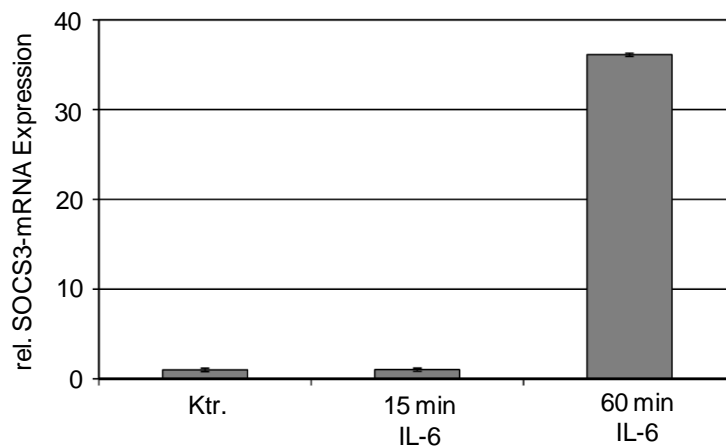
**Abb. 4.19 Die Phosphorylierung von Jak1 dient als Indikator für die Aktivierung des Rezeptorkomplexes.** HEK-gp80 Zellen wurden unter standardisierten Bedingungen kultiviert, gehungert und für die angegebenen Zeiträume mit IL-6 (200 U/ml) stimuliert und anschließend lysiert. Für die Färbung von gp130 wurde dieses zunächst präzipitiert. Die Analyse der Präzipitate (A) und der Lysate (B) erfolgte mittels SDS-Gelelektrophorese, randomisiertem quantitativem Western Blot und anschließender Immundetektion. Die Färbung erfolgte mit spezifischen Antikörpern gegen (p)Y, (p)JAK, JAK und HSP70. Die Färbung von HSP70 dient als Ladekontrolle. Dargestellt ist je ein repräsentatives Experiment aus  $n = 3$  Experimenten. (C) Densitometrische Analyse von (p)gp130 und (p)Jak1. Dargestellt ist der Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung aus  $n = 3$  Experimenten. Abbildung: (167)

#### 4.2.4.3. IL-6 induziert in 15 min keine Synthese von SOCS3

Um die Modellannahme (3), IL-6 induziert in 15 min keine Synthese von SOCS3 (siehe Kapitel 4.2.3), zu prüfen wurden HEK-gp80 Zellen mit IL-6 (200 U/ml) stimuliert und zu den angegebenen Zeitpunkten die gesamte RNA isoliert. Mittels RT-qPCR wurde die Expression der SOCS3 mRNA bestimmt (Abb. 4.20). Erwartungsgemäß wird die Expression der SOCS3 mRNA nach 60 min deutlich induziert. Eine 15-minütige Stimulation ist jedoch nicht ausreichend, um die Synthese der SOCS3 mRNA auszulösen.

Modellannahme (3) konnte somit experimentell validiert werden. In den ersten 15 Minuten der IL-6-induzierten Signaltransduktion kommt es zu keiner Synthese des *feedback* Inhibitors SOCS3. SOCS3 wird demnach nicht im Modell abgebildet.

Zusammenfassend konnten die Modellierungsannahmen (1) bis (3) experimentell bestätigt werden.



**Abb. 4.20 IL-6 induziert in 15 min keine Synthese von SOCS3** HEK-gp80 Zellen wurden unter standardisierten Bedingungen kultiviert, gehungert und für die angegebenen Zeiträume mit IL-6 (200 U/ml) stimuliert. Nach Isolation der gesamten RNA wurde die Expression von humaner SOCS3 mRNA mittels RT-qPCR analysiert. Als *housekeeping* Gen diente humane HPRT. Dargestellt sind Mittelwerte aus  $n = 3$  unabhängigen Experimenten  $\pm$  Standardabweichung. Die mRNA Expression in unstimulierten Zellen wurde auf 1 normiert. Abbildung: (167)

#### 4.2.5. Quantifizierung der Startwerte

Differentialgleichungsmodelle stellen Veränderungen der absoluten Konzentration der beteiligten Proteine über die Zeit dar. Als Startwerte für diese Veränderungen dienen die Konzentrationen der Proteine zum Zeitpunkt  $t = 0$ .

Abb. 4.17 und 4.18 zeigen, dass zum Zeitpunkt  $t = 0$  keine Phosphorylierung von Jak1, STAT3 und SHP2 nachgewiesen werden kann. Die Startwerte für die korrespondierenden Spezies: actR, actSTAT, pSHP2 entsprechen folglich 0 nM. Da zum Zeitpunkt  $t = 0$  keine Stimulation erfolgt, ist auch die Konzentration aller mit IL-6 assoziierten Spezies (\*\_IL) 0 nM.

Die initialen Konzentrationen von gp130 (stellvertretend für gp130 assoziiert mit Jak), STAT3 und SHP2 wurden experimentell bestimmt. Die Anzahl der Moleküle/Zelle wurde hierzu auf das Zellvolumen von 500 fl bezogen. Dieses wurde aus dem durchschnittlichen Durchmesser trypsinierter HEK-gp80 Zellen von 10,13  $\mu\text{m}$  in Approximation einer kugelförmigen Zelle berechnet.

### 4.2.5.1. Quantifizierung der Oberflächenexpression von gp130

Zur Quantifizierung der Rezeptorkomplexe (R) wurde ein FACS-basierter Assay entwickelt. Dieses Vorgehen ermöglicht die Quantifizierung membranständiger Rezeptoren. Rezeptoren, die auf dem Syntheseweg vom endoplasmatischen Retikulum zur Membran sind oder internalisiert wurden, werden nicht analysiert. Weiterhin wurde die Konzentration von gp130 und nicht von Jak1 quantifiziert, da Jak1 neben gp130 auch mit anderen Rezeptoren assoziiert ist. Somit ist die Jak1 Konzentration in der Zelle größer als die gp130 Konzentration (168). Für die IL-6-induzierte Signaltransduktion ist daher die Anzahl an gp130 relevant, da sie der begrenzende Faktor für die Anzahl der Rezeptorkomplexe R ist.

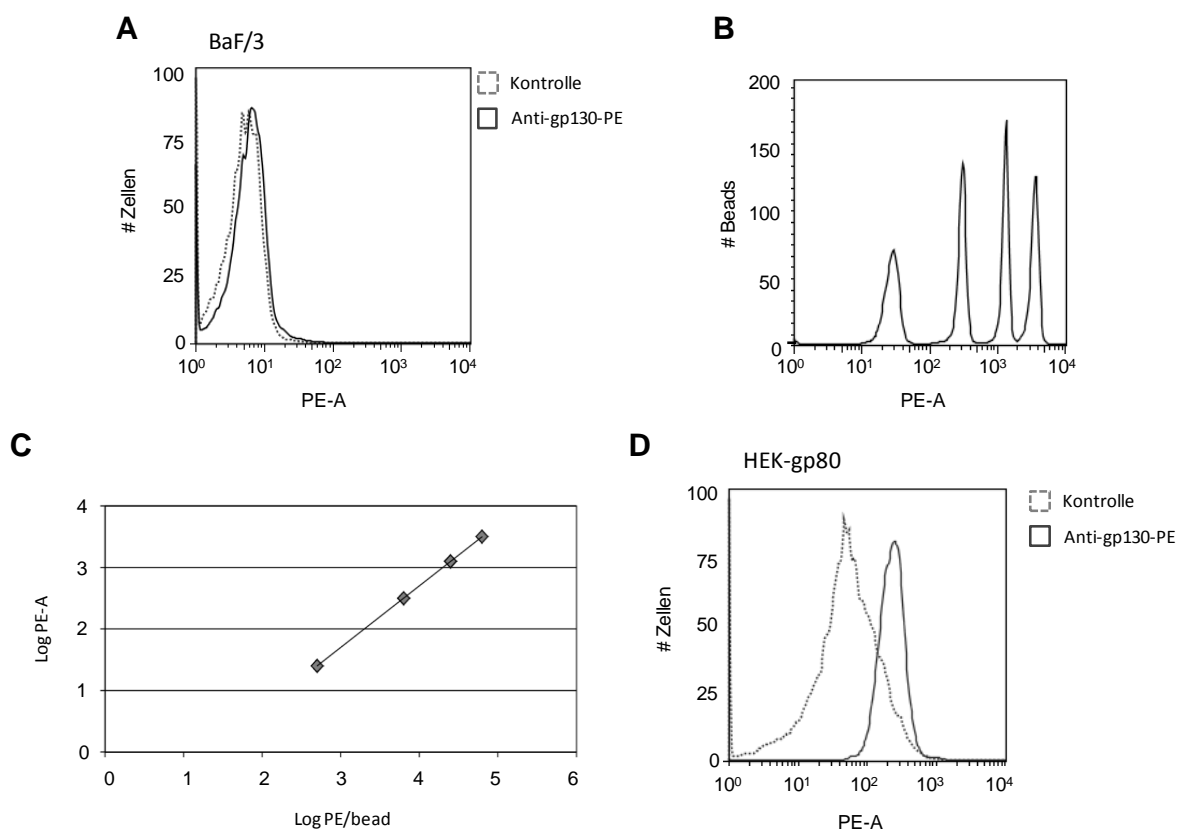
Als Basis des FACS-basierten Assays diente das QuantiBRITE™ Kit (BD). Es beinhaltet vier *bead*-Populationen, die unterschiedliche bekannte Mengen an fluoreszierenden Phycoerythrin (PE) Molekülen auf der Oberfläche tragen. Aus der mittels FACS gemessenen Fluoreszenzintensität der *beads* kann eine Eichgerade berechnet werden. Die Eichgerade ermöglicht die Umrechnung der Fluoreszenzintensität von Zellen, die mit PE-gekoppelten Antikörpern gegen einen Rezeptor gefärbt und im FACS analysiert wurden, in die absolute Anzahl von Rezeptoren pro Zelle. In herkömmlichen FACS-Analysen wird die Intensität der Färbung oft durch den Einsatz von Zweitantikörpern verstärkt. Um diese nicht quantifizierbare Verstärkung zu vermeiden, wurden direkt mit PE-gekoppelte Erstantikörper mit einem bekannten Verhältnis von PE und Antikörper eingesetzt.

Zur Quantifizierung von gp130 wurde ein Antikörper, der spezifisch an den extrazellulären Anteil von gp130 bindet, mittels Maleinimid-Chemie an PE gekoppelt. Das Verhältnis von PE-Molekülen zu gp130 Antikörpern wurde basierend auf dem Lambert-Beerschen Gesetz über die unterschiedlichen maximalen Extinktionen des PE und des Antikörpers bestimmt. Für die zuvor mit PE-gekoppelten Anti-gp130 Antikörper ergab sich ein Verhältnis von drei PE-Molekülen pro Antikörper.

Um zu untersuchen, ob die chemische Kopplung eine Antigen-unabhängige Bindung des Antikörpers an Zelloberflächen induziert, wurden Ba/F3 Zellen mit den PE-gekoppelten Antikörpern gefärbt. Da Ba/F3 Zellen kein gp130 exprimieren, sollte der für gp130 spezifische Antikörper die Zellen nicht anfärben. Abb. 4.21 A zeigt, dass nahezu kein PE-gekoppelter Antikörper an Ba/F3 Zellen bindet. Der direkt gekoppelte Antikörper bindet somit nicht Antigen-unabhängig an Zelloberflächen und konnte zur Quantifizierung von gp130 eingesetzt werden.

Hierzu wurden HEK-gp80 Zellen unter Standardbedingungen kultiviert, mit den PE-gekoppelten Antikörpern gegen gp130 gefärbt und anschließend mittels FACS analysiert. Das Verhältnis der Signalstärke von gefärbten Zellen zu ungefärbten Kontrollzellen (Abb. 4.21 D, vergleiche schwarze Linie mit gepunkteter Linie) war erwartungsgemäß schwächer als nach der Färbung von HEK-gp80 Zellen mit Anti-gp130 Primärantikörpern und PE-gekoppelten Zweitantikörpern (vergleiche mit Abb. 4.14 B), da keine Signalverstärkung durch die mehrfache Bindung des Zweitantikörpers erfolgte. Die Stärke des PE-Signals wurde über eine mit QuantiBRITE *beads* erstellte Eichgerade (Abb. 4.21 B, C) in die absolute Anzahl PE/Zelle umgerechnet. Das Ergebnis wurde um das Verhältnis von PE/Antikörper (3:1) korrigiert.

Die Quantifizierung von membranständigem gp130 auf HEK-gp80 Zellen ergab einen Wert von  $870 \pm 66$  Molekülen/Zelle (Mittelwert aus  $n = 3$  unabhängigen Experimenten  $\pm$  Standardabweichung). Zusätzlich wurde in der im Verlauf dieser Doktorarbeit betreuten Diplomarbeit von Dipl. Biologe Dieter Schwache die Anzahl von gp80 mit  $87251 \pm 1126$  Molekülen/Zelle bestimmt (169).



**Abb. 4.21 Bead-basierte Quantifizierung von gp130** (A) Ba/F3 Zellen wurden mit PE-gekoppeltem gp130 Antikörper gefärbt und mittels FACS analysiert. Als Kontrolle dienten ungefärbte Ba/F3 Zellen. (B) Durchflusszytometrische Analyse der vier mit unterschiedlichen Mengen PE besetzten Populationen der QuantiBRITE *beads* (BD). (C) Eichgerade aus den vier *bead* Populationen. (D) HEK-gp80 Zellen wurden mit PE-gekoppelten gp130 Antikörpern gefärbt und mittels FACS analysiert. Als Kontrolle dienten ungefärbte HEK-gp80 Zellen. Dargestellt sind repräsentative Ergebnisse aus  $n = 3$  Experimenten. Abbildung: (167)

#### 4.2.5.2. Quantifizierung von STAT3, (p)STAT3, SHP2 und (p)SHP2

Zur Bestimmung der Konzentration von STAT3, (p)STAT3, SHP2 und (p)SHP2 in HEK-gp80 Zellen wurden quantitative Western Blots eingesetzt. Hierzu wurden die Proteine zunächst mit spezifischen Antikörpern aus Zelllysaten präzipitiert. Die Präzipitate wurden gemeinsam mit rekombinanten Teilstücken des zu quantifizierenden Proteins mit bekannter Konzentration (Kalibratoren) mittels Western Blot und anschließender Immundetektion analysiert. Da die Kalibratoren und die endogenen Proteine von den gleichen Antikörpern erkannt werden, kann aus den Signalstärken der Kalibratoren eine Eichgerade erstellt werden. Die Eichgerade ermöglicht, unter Berücksichtigung der Anzahl der eingesetzten Zellen, die Berechnung der Konzentration des untersuchten Proteins in der Zelle. Als Kalibrator für STAT3 und (p)STAT3 wurde ein kommerziell erhältliches STAT3-GST-Fusionsprotein eingesetzt. Die Konzentrationsbestimmung von SHP2 und (p)SHP2 erfolgte über ein von Dr. rer. nat. Pia Müller etabliertes Fusionsprotein aus den zwei SH2-Domänen von SHP2 und einem GST-Tag.

Zur Quantifizierung von STAT3 und SHP2 wurden STAT3 (Abb. 4.22 A, Spur 6) und SHP2 (Abb. 4.23 A, Spur 3) mittels Immunpräzipitation aus Zelllysaten unstimulierter HEK-gp80 Zellen isoliert. Um die Phosphorylierung von STAT3 und SHP2 zu quantifizieren, wurden HEK-gp80 Zellen für 6 min mit IL-6 stimuliert und anschließend lysiert. Aus diesen Lysaten wurden (p)STAT3 (Abb. 4.22 A, Spur 3) bzw. (p)SHP2 (Abb. 4.23 A, Spur 6) präzipitiert. Sowohl die unphosphorylierten als auch die phosphorylierten, präzipitierten, endogenen Proteine wurden gemeinsam mit unterschiedlichen Mengen der rekombinanten STAT3- bzw. SHP2-Fusionsproteine (Abb. 4.22 A und 4.23 A, Spuren 1, 2, 4, 5 und 7) im Western Blot analysiert. Die Detektion erfolgte mit Antikörpern gegen unphosphoryliertes STAT3 bzw. SHP2. Dies ermöglicht sowohl die Konzentration der unphosphorylierten, als auch die Konzentration der phosphorylierten Moleküle zu bestimmen. Aus der Signalstärke der Kalibratoren wurde eine Eichgerade erstellt (Abb. 4.22 B und 4.23 B), die zur Berechnung der Konzentration von STAT3 und (p)STAT3, bzw. SHP2 und (p)SHP2 eingesetzt wurde.

Um Fehler durch eine nicht vollständige Immunpräzipitation zu korrigieren, wurde die Effizienz der Immunpräzipitationen bestimmt. Hierzu wurden gleiche Mengen Zelllysate vor und nach der Immunpräzipitation mittels Western Blot analysiert. Die Immundetektion erfolgte mit spezifischen Antikörpern gegen das präzipitierte Protein (Abb. 4.22 C und 4.23 C). Die Färbung von HSP70 dient als Ladungskontrolle. Die Effizienz der Immunpräzipitation wurde wie folgt berechnet:

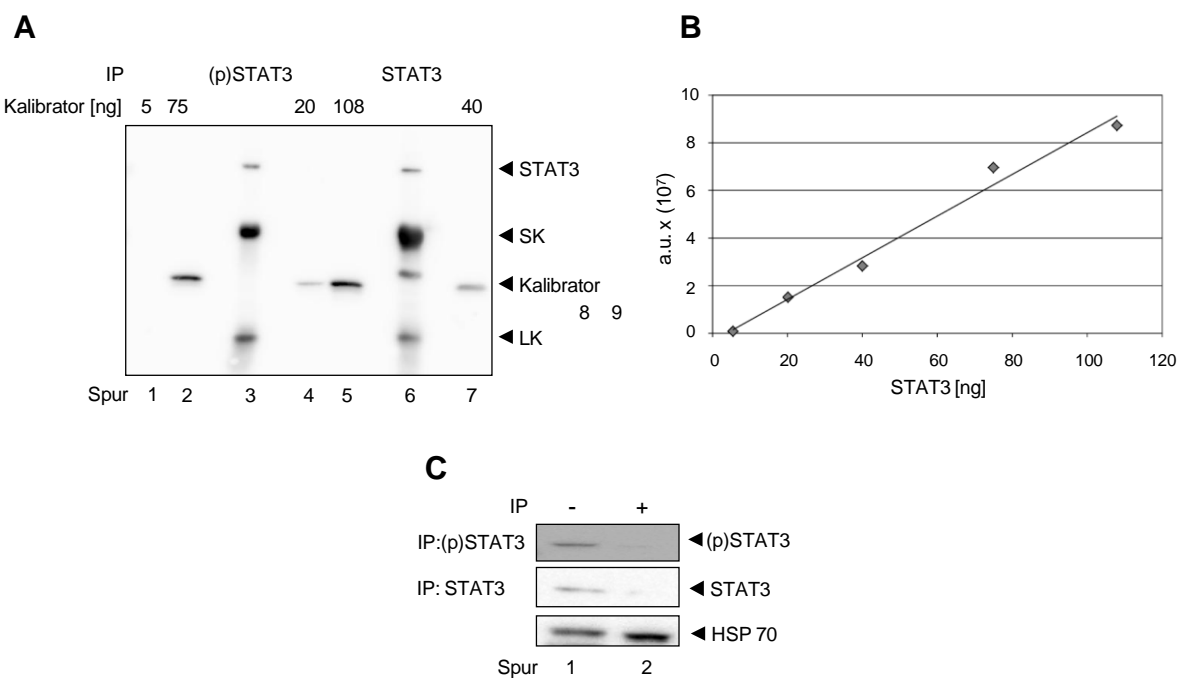
$$\text{Effizienz} = 1 - \left( \frac{\text{Signalstärke nach Präzipitation} \times 100}{\text{Signalstärke vor Präzipitation}} \right)$$

Die Effizienz der Immunpräzipitationen von (p)STAT3, (p)SHP2, STAT3 und SHP2 lag bei allen Experimenten zwischen 75 und 95 %. Sie wurde in die Berechnung der Konzentration einbezogen.

HEK-gp80 Zellen exprimieren ~ 74.000 Moleküle STAT3 und ~ 72.000 Moleküle SHP2. Nach 6-minütiger Stimulation mit IL-6 sind ca. 50 % der STAT3 Moleküle und ca. 30 der SHP2 Moleküle phosphoryliert. Die Ergebnisse der Quantifizierungen sind in Tabelle 4.2 zusammengefasst.

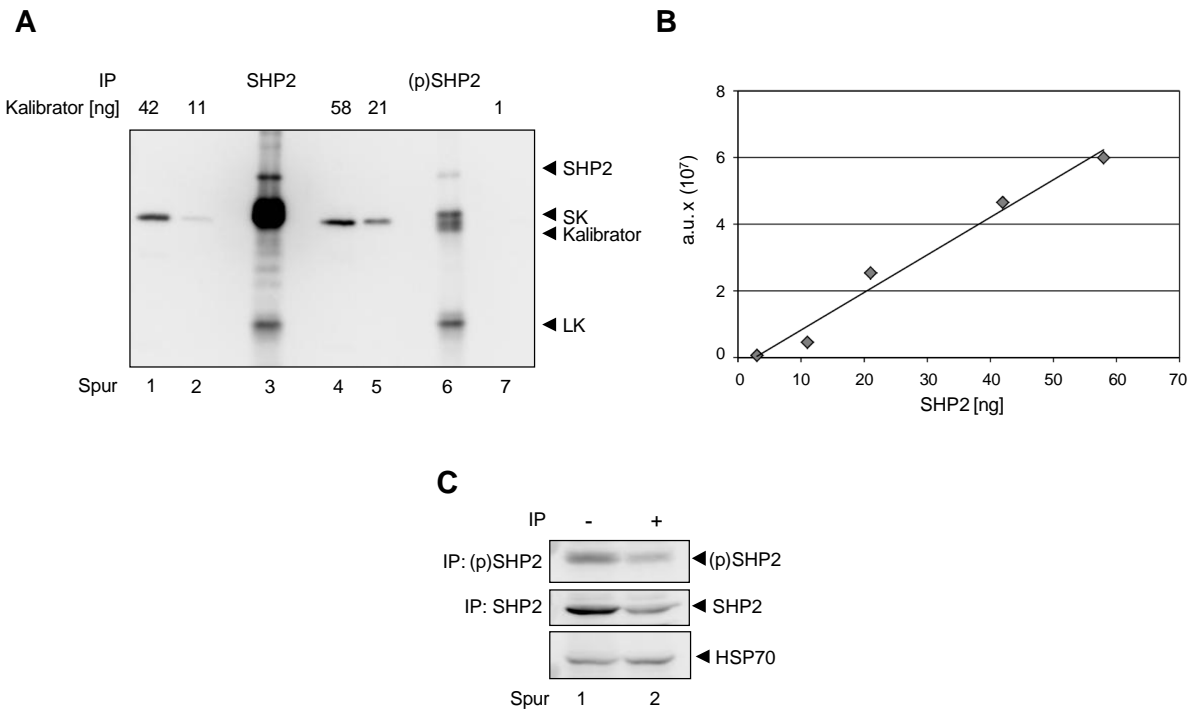
**Tab. 4.2 Zusammenfassung der Ergebnisse der Quantifizierungen**

Molekül	Methode	Konzentration [nM]	n/Zelle
gp130	FACS	$2,66 \pm 0,2$	~ 870
gp80	FACS	$266 \pm 3,4$	~ 87.000
STAT3	WB	$216 \pm 72$	~ 74.000
SHP2	WB	$222 \pm 62$	~ 72.000
(p)STAT3 $t=6\text{min}$	WB	$117 \pm 32$	~ 40.000
(p)SHP2 $t=6\text{min}$	WB	$67 \pm 16$	~ 22.000



**Abb. 4.22 Quantifizierung von (p)STAT3 und STAT3 (A)** HEK-gp80 Zellen wurden für 6 min mit IL-6 (200 U/ml) stimuliert und anschließend lysiert oder unstimuliert lysiert. (p)STAT3 und STAT3 wurden mit spezifischen Antikörpern präzipitiert und gemeinsam mit STAT3 Kalibratoren mittels quantitativem Western Blot und anschließender Immundetektion analysiert. Die Detektion erfolgte mit einem Anti-STAT3 Antikörper. **(B)** Eichgerade bestimmt aus der Signalstärke der Kalibratoren. **(C)** Gleiche Mengen Totallysat vor und nach der Präzipitation wurden mittels Western Blot und Immundetektion analysiert. Die Färbung erfolgte mit spezifischen Antikörpern gegen (p)STAT3, STAT3 und HSP70. Die Färbung von HSP70 diente als Ladekontrolle. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment aus  $n = 6$  unabhängigen Experimenten. SK = schwere Antikörperkette, LK = leichte Antikörperkette. Abbildung: (167)





**Abb. 4.23 Quantifizierung von SHP2 und (p) SHP2 (A)** HEK-gp80 Zellen wurden für 6 min mit IL-6 (200 U/ml) stimuliert und anschließend lysiert oder unstimuliert lysiert. (p)SHP2 und SHP2 wurden mit spezifischen Antikörpern präzipitiert und gemeinsam mit SHP2 Kalibratoren mittels quantitativem Western Blot und anschließender Immundetektion analysiert. Die Detektion erfolgte mit einem Anti-SHP2 Antikörper. **(B)** Eichgerade bestimmt aus der Signalstärke der Kalibratoren. **(C)** Gleiche Mengen Totallysat vor und nach der Präzipitation wurden mittels Western Blot und Immundetektion analysiert. Die Färbung erfolgte mit spezifischen Antikörpern gegen (p)SHP2, SHP und HSP70. Die Färbung von HSP70 diente als Ladekontrolle. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment aus  $n = 8$  unabhängigen Experimenten. SK = schwere Antikörperkette, LK = leichte Antikörperkette. Abbildung: (167)

#### 4.2.6. Experimentsatz I

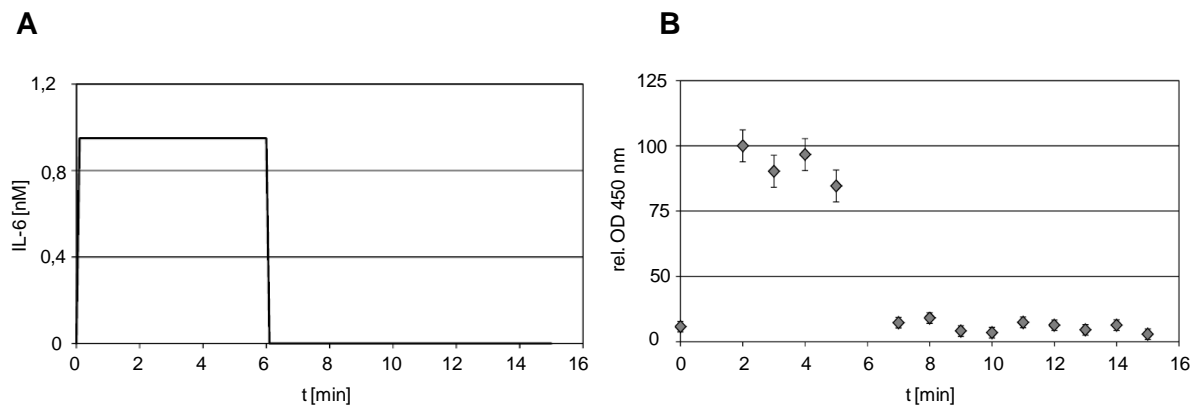
Um die kinetischen Parameter des mathematischen Modells an experimentell generierte Daten anzupassen, wurde die frühe IL-6-induzierte Aktivierung des Jak/STAT Signalweges quantitativ analysiert. Diese Daten werden im Folgenden als Experimentsatz I bezeichnet.

Wie in Kapitel 4.2.3 beschrieben, wurde die Analyse auf die ersten 15 Minuten nach Stimulationsbeginn beschränkt. Die Stimulation erfolgte mit einem 6-minütigen IL-6 Puls (200 U/ml). Dies ermöglicht sowohl die Analyse der Geschwindigkeit der initialen Phosphorylierung als auch des Verlaufs der Phosphorylierung nach dem Entzug des Stimulus.

Zunächst wurde untersucht, ob durch Stimulation mit IL-6 und anschließendes Abwaschen des IL-6-haltigen Mediums ein pulsartiges Stimulationsmuster erreicht werden kann. Abb. 4.24 A zeigt den im Modell abgebildeten Stimulus. Die Konzentration von IL-6 ist über 6 min konstant bei 0,95 nM (=200 U/ml) und wird zum Zeitpunkt  $t = 6$  min auf 0 nM reduziert. Um zu kontrollieren, ob dieses Stimulationsmuster experimentell erzeugt werden kann, wurden HEK-gp80 Zellen mit IL-6 stimuliert. Nach 6 min wurde das Medium entfernt und durch IL-6-freies Medium ersetzt. Die zu den angegebene-

nen Zeitpunkten entnommenen Überstände wurden in einem IL-6 ELISA analysiert (Abb. 4.24 B). Die Stimulation mit IL-6 erzeugt eine konstante IL-6 Konzentration im Medium. Es kommt zu keiner signifikanten Reduktion der IL-6 Konzentration, die zum Beispiel durch Internalisierung IL-6 bindender Rezeptorkomplexe erklärbar wäre. Nach dem Abwaschen des Stimulus ist im Medium kein IL-6 mehr nachzuweisen.

Es ist demnach möglich in Zellkulturexperimenten pulsförmige Stimulationen durchzuführen, die dem theoretischen Modelleingang entsprechen.



**Abb. 4.24 Kontrolle der pulsförmigen Stimulation (A)** Theoretischer Modelleingang. 0,95 nM IL-6 entsprechen 200 U/ml. **(B)** HEK-gp80 Zellen wurden mit IL-6 (200 U/ml) stimuliert und der Überstand der Zellen zu den angegebenen Zeitpunkten abgenommen. Die Analyse der Überstände erfolgte mittels eines IL-6 ELISAs. Dargestellt sind Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung aus  $n = 3$  Experimenten. Die jeweils höchste OD450 zu einem Messpunkt wurde auf 100 normiert.

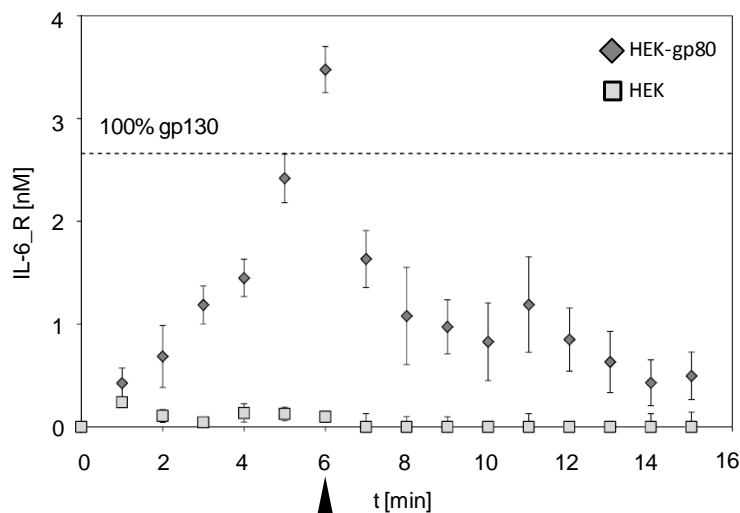
#### 4.2.6.1. Analyse der Dynamik der Bindung von IL-6 an den Rezeptorkomplex

Zunächst wurde untersucht, wie viel IL-6 bei einem 6-minütigen Puls an den Rezeptorkomplex auf der Zelloberfläche bindet. Dieses Experiment gibt Aufschluss darüber, wie schnell die Rezeptoren IL-6 binden und ob sie nach dem Abwaschen des Stimulus noch weiter mit dem Zytokin assoziiert sind (Abb. 4.25).

HEK-gp80 Zellen wurden mit einem 6-minütigen IL-6 Puls (200 U/ml) stimuliert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen mit eiskaltem PBS von den Zellkulturschalen gelöst. Nach einem Zentrifugationsschritt wurden die Zellen lysiert. In den Lysaten befand sich nun das an die Oberfläche der Zellen gebundene IL-6. Um die unspezifische Bindung von IL-6 an die Plastikoberfläche zu quantifizieren, wurden parallel Zellkulturschalen ohne Zellen mit IL-6 inkubiert (Kontrollschalen). Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden die Kontrollschalen mit PBS gespült. Das PBS enthielt nun das an die Plastikoberfläche der Zellkulturschalen gebundene IL-6. Die Quantifizierung des IL-6 erfolgte mit einem IL-6 ELISA. Die IL-6 Konzentration in den Zelllysaten wurde um die unspezifische Bindung von IL-6 an die Plastikoberfläche der Zellkulturschalen korrigiert und anschließend auf die Anzahl der

eingesetzten Zellen bezogen. Als zweite Kontrolle wurde die unspezifische Bindung von IL-6 an die Zellmembran untersucht, indem das gleiche Experiment mit HEK Zellen durchgeführt wurde. Diese Zellen exprimieren gp80 nicht (siehe Abb. 4.14 A). Da die Bindung von IL-6 an gp80 essentiell für die Assoziation von IL-6 mit gp130 ist (17) sollte IL-6 nicht an HEK Zellen binden. Die hellen Quadrate in Abb. 4.25 zeigen, dass HEK Zellen erwartungsgemäß kein IL-6 binden. Die im Folgenden beschriebene Interaktion von IL-6 mit HEK-gp80 Zellen ist demnach nicht auf eine unspezifische Interaktion von IL-6 mit der Zellmembran zurück zu führen.

Das von HEK-gp80 Zellen gebundene IL-6 steigt bis zum Pulsende ( $t = 6$  min) an (Abb. 4.25, dunkle Diamanten). Nach 6 min binden 3,5 nM IL-6 an die Rezeptorkomplexe. Somit übersteigt das gebundene IL-6 die gp130 Konzentration um 30 %, liegt jedoch deutlich unter der gp80 Konzentration von 266 nM (siehe Tab. 4.2 in Kapitel 4.2.5.2). Nach dem Abwaschen des Stimulus sinkt die Konzentration des gebundenen IL-6 innerhalb einer Minute auf 1,6 nM und nimmt bis zum Ende des Experiments langsam bis auf 0,5 nM ab. Obwohl im Medium nach Abwaschen des Stimulus kein IL-6 mehr nachzuweisen ist (siehe Abb. 4.24), sind demnach noch ca. 20% der Rezeptoren mit IL-6 assoziiert.



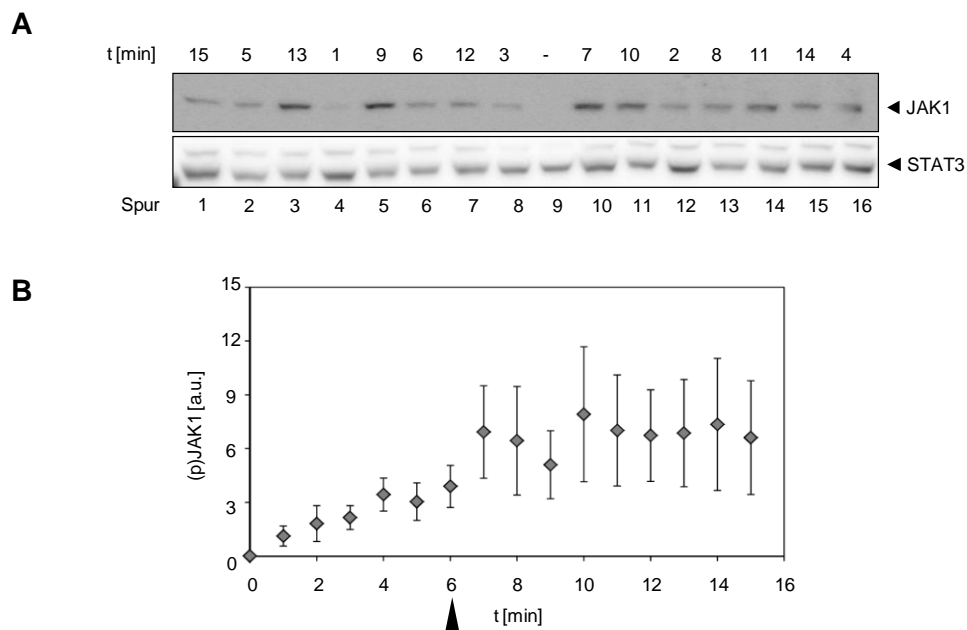
**Abb. 4.25 Bindung von IL-6 an den Rezeptorkomplex aus gp80 und gp130** HEK Zellen (helle Quadrate) und HEK-gp80 Zellen (dunkle Diamanten) wurden unter standardisierten Bedingungen kultiviert, gehungert, mit einem 6-minütigen IL-6 Puls (200 U/ml, schwarzes Dreieck) stimuliert und zu den angegebenen Zeitpunkten in eiskaltem PBS geerntet. Nach einem Zentrifugationsschritt wurden die Zellen lysiert und die Lysate in einem IL-6 ELISA analysiert. Dargestellt sind Mittelwerte aus je  $n = 3$  unabhängigen Experimenten. Abbildung: (167)

#### 4.2.6.2. Analyse der Dynamik der Phosphorylierung von Jak1, STAT3 und SHP2

Die Analyse der Dynamik der Phosphorylierung von Jak1, STAT3 und SHP2 bei einem 6-minütigen IL-6 Puls erfolgte mittels quantitativen Western Blots. Eine minutengenaue Analyse der Phosphorylierung wurde durch das Einfrieren der Zellen in flüssigem Stickstoff und anschließende Lyse gewährleistet. Um Fehler durch unzureichendes Strippen der Membranen auszuschließen, wurde als Ladungskon-

trolle HSP70 (bzw. STAT3 bei der Detektion von (p)Jak1) gefärbt. Abb. 4.17 und 4.18 zeigen, dass die Konzentration von Jak1, STAT3 und SHP2 über den Stimulationszeitraum konstant ist.

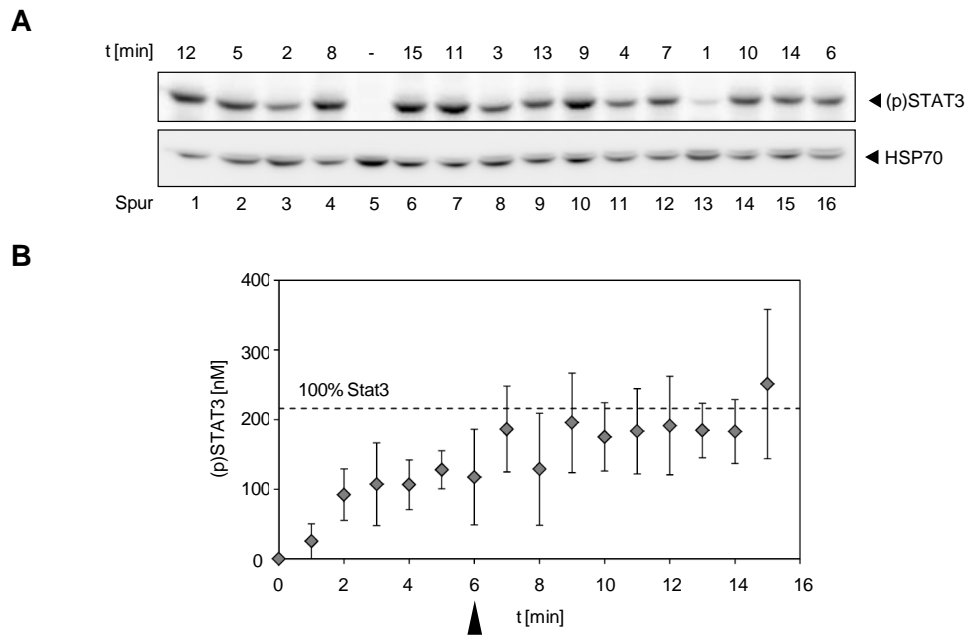
Abb. 4.26 zeigt die IL-6-induzierte Phosphorylierung von Jak1. In den ersten 6 min der Stimulation steigt der Grad der Jak1 Phosphorylierung langsam an und erreicht nach 7 min ein Plateau. Die Standardabweichung wird nach dem Mediumwechsel zum Zeitpunkt  $t = 6$  min größer (Abb.4.24 B). Dieses Phänomen zeigt, dass das Abwaschen des Mediums eine Störung der Signaltransduktion darstellt, die möglichst kurz und reproduzierbar durchgeführt werden muss.



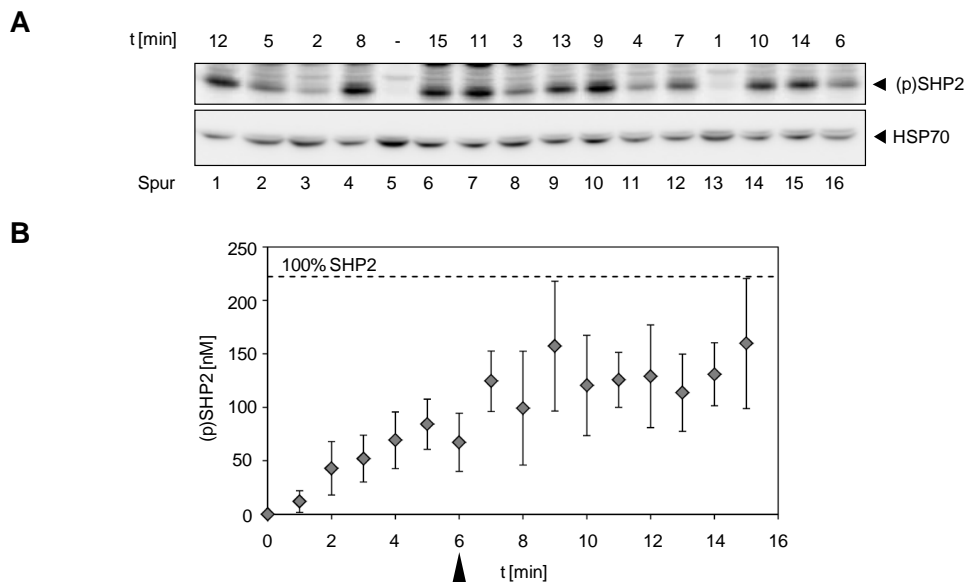
**Abb. 4.26 Dynamik der Phosphorylierung von Jak1 (A)** HEK-gp80 Zellen wurden unter standardisierten Bedingungen kultiviert, gehungert und mit einem 6-minütigen IL-6 Puls (0,98 nM) stimuliert und zu den angegebenen Zeitpunkten lysiert. Die Analyse der Lysate erfolgte mittels SDS-Gelelektrophorese, randomisiertem quantitativem Western Blot und anschließender Immundetektion. Die Färbung erfolgte mit spezifischen Antikörpern gegen (p)Jak1 und STAT3. Die Färbung von STAT3 dient als Ladekontrolle. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment aus  $n = 10$  Experimenten. **(B)** Densitometrische Analyse. Dargestellt ist der Mittelwert aus  $n = 10$  Experimenten  $\pm$  Standardabweichung. Das schwarze Dreieck markiert das Ende des IL-6 Pulses. Abbildung: (167)

Die Analyse der Dynamik der Phosphorylierung von STAT3 und SHP2 wurde analog zu den für Jak1 beschriebenen Experimenten durchgeführt. Zusätzlich wurde die relative Phosphorylierung basierend auf Tabelle 4.2 (siehe Kapitel 4.2.5.2) in absolute Konzentrationen umgerechnet. Die Konzentration phosphorylierter STAT3 Moleküle (Abb. 4.27) steigt in den ersten 2 min der Stimulation mit IL-6 steil auf ca. 100 nM an. In den nächsten fünf Minuten ist der Anstieg der Phosphorylierung geringer. Nach sieben Minuten wird ein Plateau bei ca. 200 nM phosphoryliertem STAT3 erreicht. STAT3 ist zu diesen Zeitpunkten nahezu vollständig phosphoryliert und wird in den letzten 9 min des Experimentes trotz pulsformiger Stimulation nicht dephosphoryliert. Die Konzentration phosphorylierter SHP2

Moleküle steigt in den ersten sieben Minuten nach Stimulation an und erreicht dann ein Plateau bei ca. 125 nM (Abb. 4.28).



**Abb. 4.27 Dynamik der Phosphorylierung von STAT3 (A)** HEK-gp80 Zellen wurden unter standardisierten Bedingungen kultiviert, gehungert, mit einem 6 minütigen IL-6 Puls (200 U/ml) stimuliert und zu den angegebenen Zeitpunkten lysiert. Die Analyse der Lysate erfolgte mittels SDS-Gelelektrophorese, randomisiertem quantitativem Western Blot und anschließender Immundetektion. Die Färbung erfolgte mit spezifischen Antikörpern gegen (p)STAT3 und HSP70. Die Färbung von HSP70 dient als Ladekontrolle. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment aus n = 5 Experimenten. **(B)** Densitometrische Analyse. Dargestellt ist der Mittelwert aus n = 5 Experimenten  $\pm$  Standardabweichung. Das schwarze Dreieck markiert das Ende des IL-6 Pulses Abbildung: (167)



**Abb. 4.28 Dynamik der Phosphorylierung von SHP2 (A)** HEK-gp80 Zellen wurden unter standardisierten Bedingungen kultiviert, gehungert und mit einem 6 minütigen IL-6 Puls (200 U/ml) stimuliert und zu den angegebenen Zeitpunkten lysiert. Die Analyse der Lysate erfolgte mittels SDS-Gelelektrophorese, randomisiertem quantitativem Western Blot und anschließender Immundetektion. Die Färbung erfolgte mit spezifischen Antikörpern gegen (p)SHP2 und HSP70. Die Färbung von HSP70 dient als Ladekontrolle. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment aus n = 5 Experimenten. **(B)** Densitometrische Analyse: Dargestellt ist der Mittelwert aus n = 5 Experimenten  $\pm$  Standardabweichung. Das schwarze Dreieck markiert das Ende des IL-6 Pulses Abbildung: (167)

Interessanterweise unterscheidet sich die Dynamik der Phosphorylierung von Jak1, STAT3 und SHP2 deutlich. Während die Phosphorylierung der STAT3 Kinase Jak1 nur sehr langsam ansteigt, nimmt die Phosphorylierung von STAT3 in den ersten Minuten nach Stimulation mit IL-6 fast exponentiell zu (vergleiche Abb. 4.26 und 4.27). Es ist möglich, dass ein verstärkender Mechanismus die schnelle STAT3 Phosphorylierung fördert. Die Phosphorylierung aller drei Proteine erreicht ca. 1 min nach Ende des Pulses ein Plateau. Die quantitative Auswertung zeigt jedoch, dass sich diese Plateaus unterscheiden. STAT3 wird nahezu vollständig phosphoryliert, so dass das Erreichen des Plateaus durch die Phosphorylierung aller STAT3 Moleküle zu erklären sein könnte. Im Gegensatz zu STAT3 wird SHP2 nur zu 60 % phosphoryliert obwohl die Konzentration beider Moleküle in der Zelle nahezu identisch ist (siehe Tab. 4.2, Kapitel 4.2.5.2)

Diese Beobachtungen verdeutlichen den Mehrwert quantitativer Daten und die Problematik diese nichtlinearen Zusammenhänge direkt interpretieren zu können. Die Komplexität der Dynamik der Phosphorylierungen in der frühen IL-6-induzierten Signaltransduktion zeigt daher bereits die Notwendigkeit der mathematischen Modellierung in der Molekularbiologie.

#### **4.2.7. Analyse der Phosphorylierung von SHP2 und STAT3 in Einzelzellen**

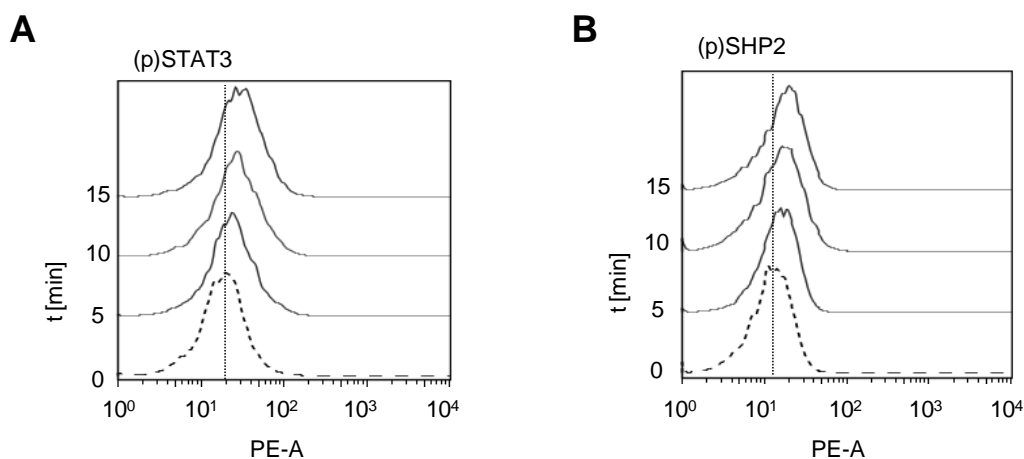
Die bisher beschriebenen Phosphorylierungskinetiken wurden mittels Western Blot und Immundetection ermittelt. Da in Western Blots ein Pool von Zellen untersucht wird, geht die Information über das Verhalten einzelner Zellen verloren. Es ist somit unklar, ob alle Zellen in einem Experiment homogen auf einen Stimulus reagieren oder ob einzelne Zellpopulationen unterschiedliche Antworten zeigen. Um die in Kapitel 4.2.6.2 beschriebenen Ergebnisse richtig zu interpretieren und als Grundlage für die mathematische Modellierung nutzen zu können, müssen diese beiden Szenarien unterschieden werden. Daher wurde die Phosphorylierung von STAT3 und SHP2 in Einzelzellen mittels intrazellulären FACS Analysen charakterisiert.

HEK-gp80 Zellen wurden mit einem 6-minütigem Puls IL-6 (200 U/ml) stimuliert und zu den angegebenen Zeitpunkten mit 2 % Paraformaldehyd fixiert, mit 90 % Methanol permeabilisiert und mit phosphorylierungsspezifischen Antikörpern gefärbt. Die spezifischen Antikörper gegen (p)Jak1 ermöglichten keine Färbung des nativen Proteins mittels FACS (Daten nicht abgebildet), so dass nur die Phosphorylierung von STAT3 und SHP2 analysiert wurde. In Abbildung 4.29 A und B entspricht die Fluoreszenzintensität (x-Achse) der Stärke der Phosphorylierung von STAT3 respektive SHP2. Auf der y-Achse sind zur besseren Vergleichbarkeit die Ergebnisse von vier FACS Messungen übereinander dargestellt (t = 0, 5, 10, 15 min). Die Hintergrundfluoreszenz unstimulierter Zellen (t = 0 min) ist durch eine gepunktete Linie dargestellt. Die Daten zeigen eine sehr homogene Phosphorylierung von STAT3 und SHP2. Die Phosphorylierung beider Moleküle steigt innerhalb der ersten 5 min nach Stimulation an (vergleiche Maxima der gestrichelten Linie und der untersten schwarzen Linie). Nach zehn Minu-

ten erreicht die Konzentration phosphorylierter STAT3 bzw. SHP2 Moleküle ein Plateau (vergleiche Maxima der drei schwarzen Linien).

Die im FACS gewonnenen Ergebnisse stimmen somit quantitativ mit den Ergebnissen der Western Blot Analysen überein. Zusätzlich zeigen sie, dass die pulsformige Stimulation von HEK-gp80 Zellen mit IL-6 eine homogene Phosphorylierung von STAT3 und SHP2 auslöst.

Bei intrazellulären FACS Analysen ist es nicht möglich zu kontrollieren, ob die Permeabilisierung der Zellmembran und der Kernmembran vollständig ist und ob in der fixierten Zelle alle Epitope für die Detektionsantikörper frei zugänglich sind. Daher ist keine absolute Quantifizierung intrazellulärer Proteine mittels FACS (z.B. mit QuantiBRITE *beads*, siehe Abb. 4.21) möglich. Die Ergebnisse aus den quantitativen Western Blots und die intrazellulären FACS Analysen ergänzen sich daher. Während im Western Blot mittels Kalibratoren die absolute Quantifizierung der Signaltransduktionsereignisse erfolgt, bietet die intrazelluläre FACS Analyse die Möglichkeit die Homogenität der Zellantwort zu überprüfen. Für die systembiologische Analyse der Kinetiken sind beide Aussagen essentiell und müssen daher parallel untersucht werden.



**Abb. 4.29 Intrazelluläre FACS Analyse von (p)STAT3 und (p)SHP2** HEK-gp80 Zellen wurden unter standardisierten Bedingungen kultiviert, gehungert und mit einem 6 minütigen IL-6 Puls (200 U/ml) stimuliert, zu den angegebenen Zeitpunkten in 2 % Paraformaldehyd fixiert, mit 90 % Methanol permeabilisiert und mit spezifischen Antikörpern gegen **(A)** (p)STAT3 und **(B)** (p)SHP2 gefärbt. Als Kontrolle (gestrichelte Linie) dienen ungefärbte Zellen. Die gepunktete Linie markiert den Median der Fluoreszenz unstimulierter Zellen. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis aus  $n = 3$  Experimenten.

#### 4.2.8. Zusammensetzung der Modellausgänge

Um die komplexen Zusammenhänge zwischen der Interaktion von IL-6 und dem Rezeptorkomplex und der anschließenden Phosphorylierung von Jak1, STAT3 und SHP2 zu verstehen, wurde Experimentsatz I als Grundlage für die Parametrisierung des in Kapitel 4.2.3 vorgestellte Modells  $M^0$  genutzt. Die Messdaten entsprechen jedoch nicht immer einer einzigen Modellspezies, sondern z.B. der

zu einem Modellausgang zusammengefassten Summe mehrerer Modellspezies. Zur Erläuterung wird im Folgenden dargestellt, welchen Modellausgängen die Messdaten entsprechen (Abb. 4.30).

Modellausgang  $y_1$  entspricht der Veränderung der Modellspezies pSHP2 über die Zeit und damit direkt der Kinetik der Phosphorylierung von SHP2 (Abb.4.28), da in  $M^0$  keine Komplexe mit phosphorylierter SHP2 vorliegen.

Modellausgang  $y_2$  entspricht der Veränderung der Modellspezies actSTAT über die Zeit. ActSTAT beschreibt phosphoryliertes dimerisiertes STAT3. Da die Experimente unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt wurden, entspricht die Kinetik der Phosphorylierung von STAT3 (Abb. 4.27) phosphoryliertem, monomerem STAT3. Damit der Modellausgang diese experimentell generierten Daten widerspiegelt, muss er demnach mit dem Faktor 2 multipliziert werden.

Modellausgang  $y_3$  entspricht der Veränderung aller IL-6 bindender Rezeptorkomplexe über die Zeit. Durch den IL-6 ELISA (Abb. 4.25) wird die Bindung von IL-6 unabhängig von der Dimerisierung des Rezeptorkomplexes bestimmt. Da der Rezeptorkomplex R im Modell immer Rezeptordimere abbildet (vergleiche Modellierungsannahme (5) in Kapitel 4.2.3), muss der Modellausgang mit dem Faktor 2 multipliziert werden, um den experimentellen Daten zu entsprechen.

Modellausgang  $y_4$  beschreibt die Veränderung aktiver, dimerer Rezeptorkomplexe (actR) über die Zeit. Die Aktivierung der Rezeptorkomplexe wird durch die Phosphorylierung von Jak1 repräsentiert (siehe Abb. 4.19). Da die Experimente jedoch unter denaturierenden Bedingungen durchgeführt wurden, entspricht die Kinetik der Phosphorylierung von Jak1 (Abb. 4.26) phosphoryliertem, monomerem actR. Damit der Modellausgang die experimentellen Daten widerspiegelt, muss er demnach mit dem Faktor 2 multipliziert werden. Da keine absolute Quantifizierung der Phosphorylierung von Jak1 erfolgte, muss zusätzlich ein Skalierungsfaktor (*scaleJak*) eingeführt werden. Er ermöglicht die Umrechnung von relativen biologischen Daten in absolute Konzentrationen bei der Modellierung.

$$y_1: \text{pSHP2}$$

$$y_2: 2 \text{ actSTAT}$$

$$y_3: 2( \text{R_IL} + \text{actR_IL} + \text{R_IL_SHP2} + \text{actR_IL_SHP2} + \text{actR_IL_STAT} )$$

$$y_4: 2 * \text{scaleJak} ( \text{actR} + \text{actR_IL} + \text{actR_IL_SHP2} + \text{actR_SHP2} + \text{actR_STAT} + \text{actR_IL_STAT} )$$

**Abb. 4.30 Zusammenhang zwischen Modellausgängen und biologischen Messungen.**  $y_1$  entspricht der Messung von phosphorylierter SHP2,  $y_2$  der Messung von phosphoryliertem STAT3,  $y_3$  der Analyse der Bindung von IL-6 an Rezeptorkomplexe und  $y_4$  der Messung von phosphoryliertem Jak1. Reproduziert mit Erlaubnis von Tom Quaiser. Abbildung: (167)



#### 4.2.9. Modellmodifikation: $M^0$ bis $M^4$

Im Folgenden wurde Modell  $M^0$  mit Hilfe der identifizierbarkeitsbasierten Modellmodifikation (163) angepasst, um ein identifizierbares Modell der frühen IL-6-induzierten Signaltransduktion zu entwickeln. Basierend auf dem Ausgangsmodell  $M^0$  und Experimentsatz I wird ein Zyklus aus

- A) Parameterschätzung,
- B) Analyse der Güte des Fits des Modells ( $\chi^2$  – Wert) und der statistischen Analyse des  $\chi^2$  – Wertes,
- C) Analyse der Identifizierbarkeit und
- D) identifizierbarkeitsbasierter Modellreduktion

beschrieben. Der Zyklus wird abgebrochen wenn das Endmodell identifizierbar ist oder zur Anpassung des Endmodells weitere biologische Daten gewonnen werden müssen.

Bei der Parameterschätzung (A) werden  $10^3$  Parameterschätzungen von unterschiedlichen Startpunkten durchgeführt. Um eine möglichst gleichmäßige Abdeckung des Parameterraums zu erreichen, werden die Parameterstartwerte aus einem durch Parameterschranken begrenzten Raum mit *Latin Hypercube Sampling* verteilt. Um für biochemische Reaktionen realistische Parameterwerte zu erhalten, wurden  $p_i \times 10^{-5} \geq p_i \times 10^5$  als Intervallgrenzen für die Parameterschranken gewählt, wobei für Reaktionen erster Ordnung  $p_i = 0,1$  und für Reaktionen zweiter Ordnung  $p_i = 0,001$  gilt (167). Aus den so bestimmten Parametersätzen wird der Parametersatz für die weitere Analyse ausgewählt, mit dem das Modell die experimentellen Daten am besten wiedergibt.

Die Güte des Fits (B) wird über den  $\chi^2$  – Wert analysiert. Je kleiner der  $\chi^2$  – Wert, desto geringer ist die gewichtete Fehlerquadratsumme und somit der Abstand zwischen den Modellausgängen  $y_1 - y_4$  und den experimentellen Daten. Um den  $\chi^2$  – Wert objektiv zu beurteilen, wurde mittels eines  $\chi^2$ -Tests ermittelt, ob ein Modell verworfen werden muss (Verwerfung eines Modells bei  $p \leq 0,01$ ). Bei einem zu verwerfenden Modell ist der  $\chi^2$  – Wert und somit der Abstand zwischen den Modellausgängen und den experimentellen Daten nicht normalverteilt. Da das Modell die Daten nicht wiedergeben kann, muss es modifiziert werden.

Wenn ein Modell nicht aufgrund der Güte des Fits verworfen werden kann, wird in Schritt (C) die Identifizierbarkeit der Parameter analysiert. Finden sich nicht identifizierbare Parameter so beginnt die Modellmodifikation bei dem am wenigsten identifizierbaren Parameter. Dies entspricht Modellmodifikationsschritt (D).

Ausgehend von dem modifizierten Modell wird der Zyklus mit einer neuen Parameterschätzung beginnend erneut durchlaufen.

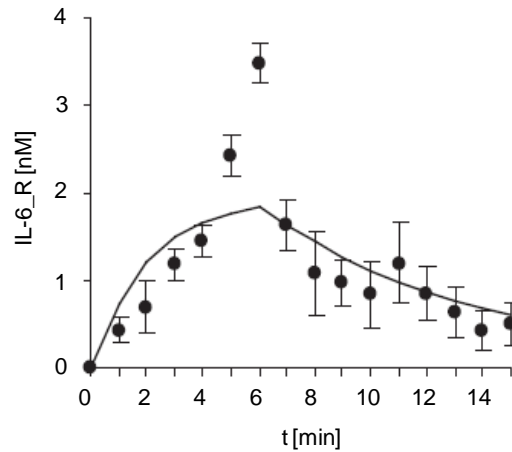
Tab. 4.3 fasst die Modellmodifikation von Modell  $M^0$  zu  $M^4$  zusammen. Die Spalte "Modelltheoretische Grundlage für die Modellanpassung" beschreibt das Ergebnis der Analyse der Güte des Fits (B) und der Identifizierbarkeitsanalyse (D). Basierend auf den in (B) bzw. (D) hervorgehobenen Schwächen des Modells erfolgte die in Spalte vier beschriebene Modellanpassung. Zur Generierung von Modell  $M^4$  wurde der Zyklus (A-B-C-D) viermal durchlaufen. Die Ergebnisse der Analyse werden im Folgenden beschrieben.

**Tab. 4.3 Übersicht über die Modellmodifikation:  $M^0$  bis  $M^4$**

Modell	$\chi^2$ Wert	Modelltheoretische Grundlage für die Modellanpassung	Modellanpassung	Darstellung
$M^0$	84,6	Güte des Fits nicht ausreichend ( $p \leq 0,01$ )	Erweiterung um gp80	Abb. 4.32
$M^1$	51,8	11 Parameter des Modells nicht identifizierbar	„Basale Parameter“ = „Induzierte Parameter“	Abb. 4.33
$M^2$	57,36	Parameter kb3, kf4, kf7 erreichen Parameterschranken	Reduktion um SHP2_actR Komplexe Dimerisierung von STAT3	Abb. 4.34
$M^3$	56,11	Parameter kf2 und kf6 nicht identifizierbar	Reduktion um SHP2_R Komplexe Reduktion um Inaktivierung von IL_actR	Abb. 4.35
$M^4$	55,36	Parameter kf1, kf9 und K3new nicht identifizierbar	Optimales experimentelles Design	Abb. 4.36

#### 4.2.9.1. $M^0 \rightarrow M^1$

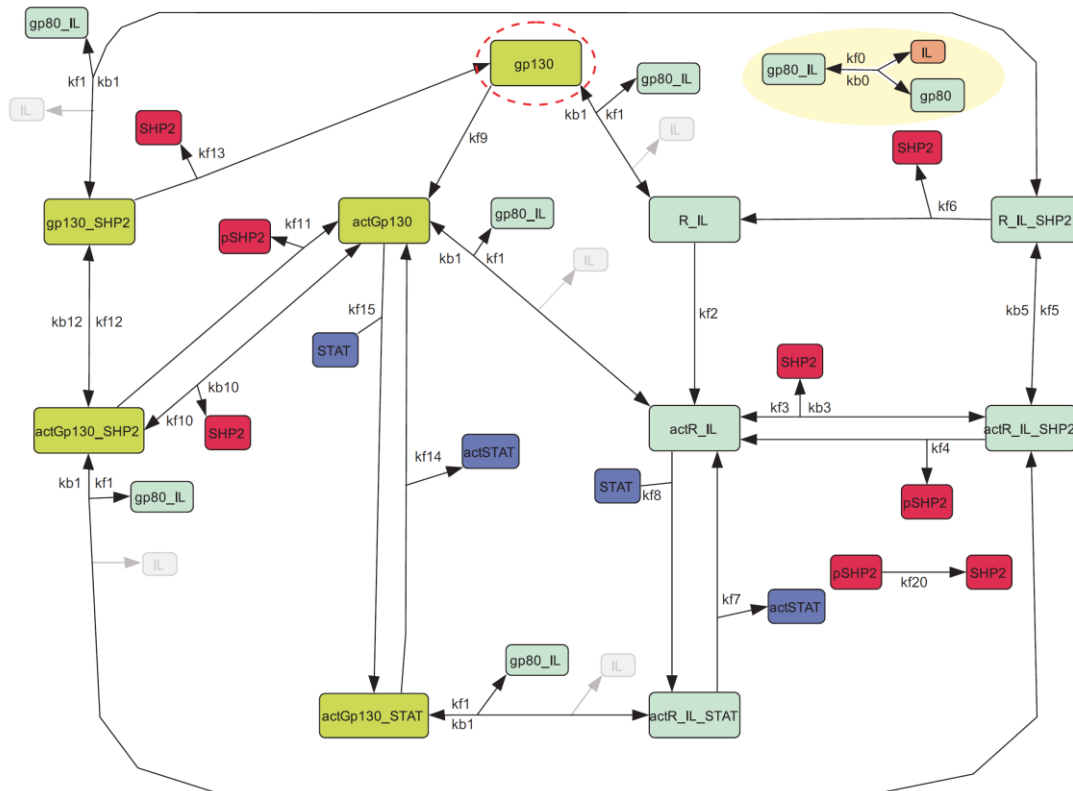
Basierend auf Experimentsatz I wurden  $10^3$  Parameterschätzungen für Modell  $M^0$  durchgeführt. Analyseschritt (B) ergab, dass Modell  $M^0$ , auch mit dem besten Parametersatz, die Daten nicht adäquat wiedergeben kann. Es muss basierend auf dem  $\chi^2$ -Test ( $p = 0,0022$ ) verworfen werden. Die Analyse der Modellausgänge zeigte, dass Modellausgang  $y_3$ , also die Bindung von IL an R, nicht die experimentell bestimmte maximale Bindung von IL-6 an die Rezeptorkomplexe (siehe Abb. 4.25) darstellen kann (Abb. 4.31).



**Abb. 4.31 Vergleich des Modellausgangs  $y_3(M^0)$  mit experimentellen Daten** Die schwarze Linie entspricht Modellausgang  $y_3$  die Punkte entsprechen den Messdaten (siehe Abb. 4.25). Reproduziert mit Erlaubnis von Tom Quaiser. Abbildung: (167)

Um diese Schwäche des Modells zu korrigieren, wurde  $M^0$  zunächst um die Spezies gp80 erweitert (Abb. 4.32). Die Reaktionen um gp80 umfassen die Bindung von IL-6 (IL) an gp80 und die anschließende Assoziation des gp80\_IL Komplexes mit der neuen Spezies gp130 zu R\_IL. In Folge dieser Assoziation wird R\_IL aktiviert (actR\_IL). Weiterhin binden alle Komplexe, die gp130 enthalten, nun gp80\_IL statt IL. Da HEK-gp80 Zellen deutlich mehr gp80 als gp130 exprimieren (siehe Tabelle 4.2. in Kapitel 4.2.5.2), ermöglicht die Spezies gp80 im Modell die Bindung von mehr IL-6 und somit ein höheres Maximum des Modellausgangs  $y_3$ .

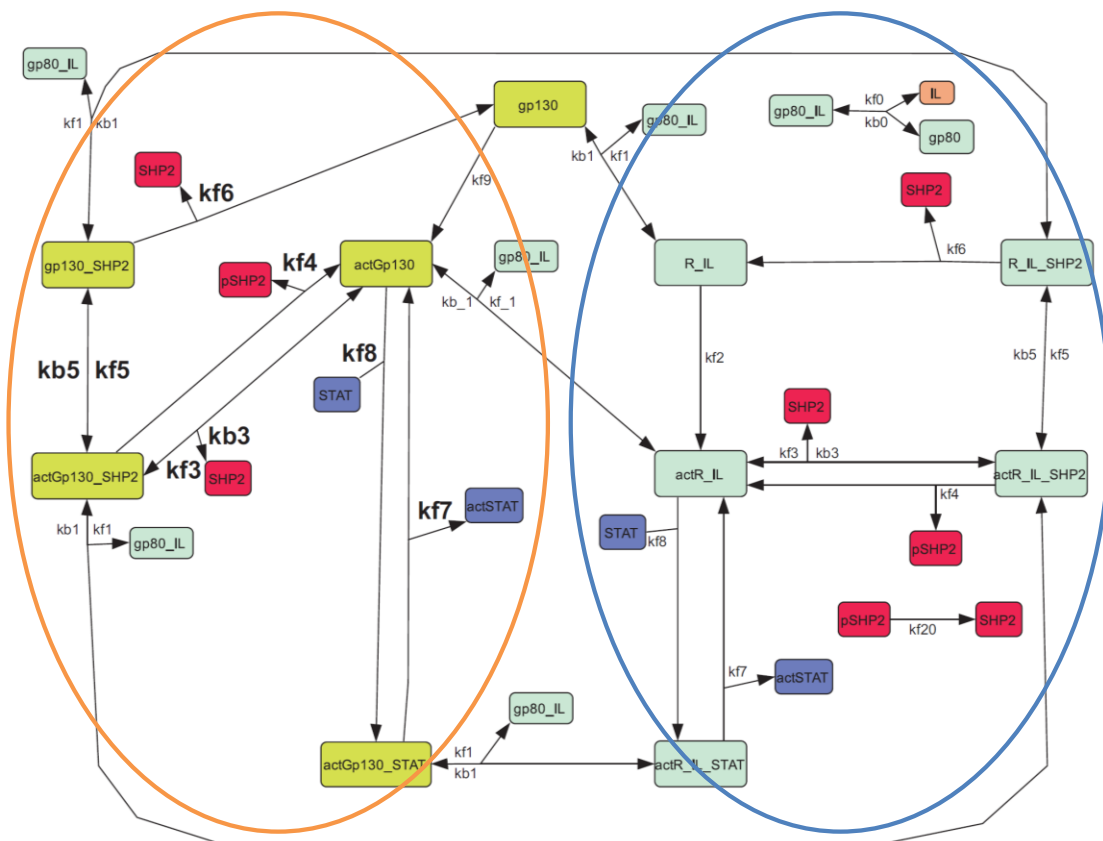
Die Bindung von IL-6 an gp80 ist somit essentiell für die Dynamik der frühen IL-6-induzierten Signaltransduktion. Das resultierende Modell ist  $M^1$ .



**Abb. 4.32 Modellmodifikation  $M^0$  zu  $M^1$**  Der gestrichelte Kreis markiert die neue Spezies gp130. Der gelbe Kreis markiert die Assoziation von IL-6 und gp80. Reproduziert mit Erlaubnis von Tom Quaiser. Abbildung: (167)

#### 4.2.9.2. $M^1 \rightarrow M^2$

Der beste Fit von Modell  $M^1$  hat einen  $\chi^2$ -Wert von 51,8, daher kann  $M^1$  nicht aufgrund der Güte des Fits verworfen werden. Die Untersuchung der Identifizierbarkeit (C), ergab jedoch, dass in  $M^1$  11 Parameter nicht identifizierbar sind. Um das Modell drastisch zu vereinfachen, wurde angenommen, dass sich die Parameterwerte für die Bindung und anschließende Phosphorylierung von STAT3 bzw. SHP2 an IL-6 freie, aktive Rezeptorkomplexe (actgp130, oranger Kreis in Abb. 4.33) und IL-6 gebundene, aktive Rezeptoren (actR, blauer Kreis in Abb. 4.33) nicht unterscheiden. Des Weiteren wurde angenommen, dass die Parameterwerte für die Inaktivierung von actgp130 und actR durch SHP2 gleich sind. Das resultierende Modell ist  $M^2$ .



**Abb. 4.33 Modellmodifikation  $M^1$  zu  $M^2$**  Die Parameter in der orange markierten Hälfte des Modells entsprechen in  $M^2$  den korrespondierenden Parametern in der blau markierten Hälfte des Modells. Reproduziert mit Erlaubnis von Tom Quaiser. Abbildung: (167)

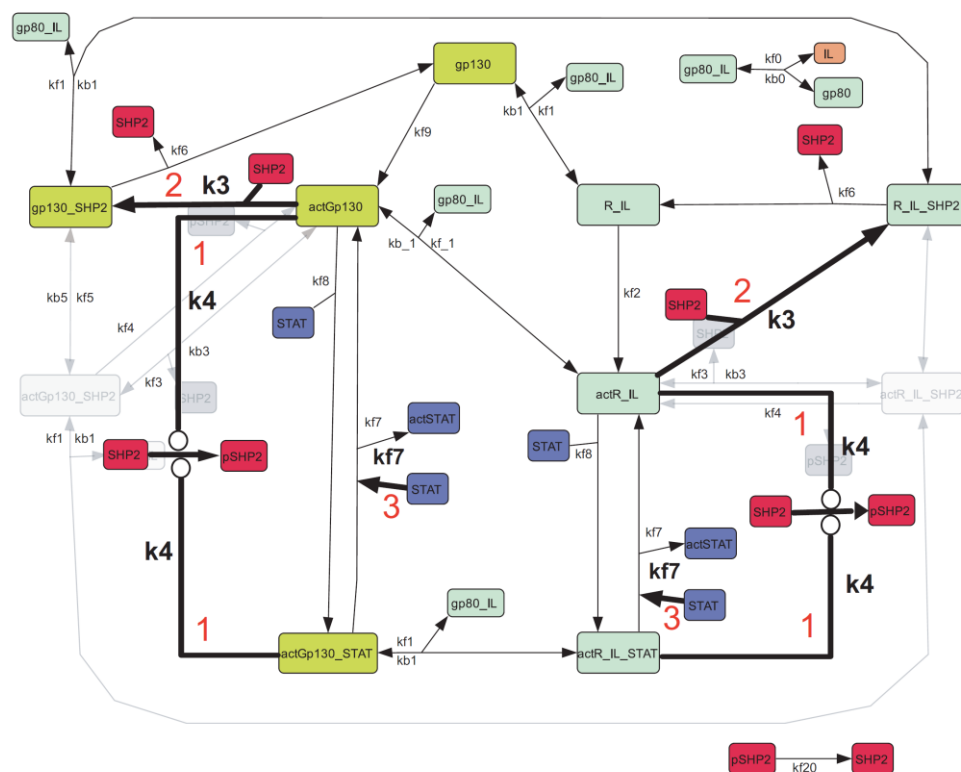
#### 4.2.9.3. $M^2 \rightarrow M^3$

Der beste Fit von Modell  $M^2$  hat zwar einen etwas höheren  $\chi^2$  Wert als Modell  $M^1$  ( $\chi^2$ -Wert 57,22 im Vergleich zu 51,8), konnte jedoch in Analyseschritt (B) nicht verworfen werden. Die Analyse der Parameter zeigte, dass die Parameter kb3, kf4 und kf7 an die für die Parameterschätzung gesetzten Intervallschranken stoßen und somit nicht bestimmbar sind. Vereinfacht sind diese Reaktionen zu schnell, um mit einem realistischen kinetischen Parameter beschrieben zu werden.

Parameter kb3 und kf4 beschreiben die Interaktion von SHP2 mit den aktivierten Rezeptorspezies actGp130 und actR sowie die anschließende Phosphorylierung von SHP2. Da diese Reaktionen offensichtlich sehr schnell sind, wurden sie in Modell  $M^3$  drastisch vereinfacht. Die Spezies actGp130 und actR induzieren nun die Phosphorylierung von SHP2 in einer modifizierten Reaktion erster Ordnung, bei der die Reaktion nur von der Konzentration von SHP2 abhängt und kein Komplex gebildet wird (siehe rote 1 in Abb. 4.34). Die Inaktivierung des Rezeptors basiert weiterhin auf der Komplexbildung zwischen SHP2 und den aktivierten Rezeptorspezies (siehe rote 2 in Abb. 4.34).

Der dritte an die Parameterschranken stoßende Parameter  $kf7$  beschreibt die Phosphorylierung von STAT3. Bereits die Betrachtung der langsam steigenden Phosphorylierung von Jak1 im Vergleich zu der nahezu exponentiell wachsenden STAT3 Phosphorylierung deutete auf die Notwendigkeit eines verstärkenden Mechanismus hin (vergleiche Abb. 4.26 und 4.27). In  $M^0$  bis  $M^2$  wurden sowohl die Rezeptoren, als auch STAT3 als vorgeformte Dimere abgebildet (siehe Modellannahme (5), Kapitel 4.2.3). Um den verstärkenden Mechanismus abzubilden wurde in  $M^3$  die Aktivierung von STAT3 komplexer dargestellt (siehe rote 3 in Abb. 4.34). Nach der Bindung eines monomeren STAT Faktors an einen Rezeptor des dimeren Rezeptorkomplexes ( $actGP130$  bzw.  $actR\_IL$ ) kann nun ein weiterer STAT Faktor binden und phosphoryliert werden. Zwei phosphorylierte STAT Faktoren ( $actSTAT$ ) dissoziieren vom Rezeptorkomplex und ermöglichen die Aktivierung weiterer STAT Faktoren. Demnach beschleunigt in  $M^3$  die hohe Konzentration monomerer STAT Faktoren die Ausbildung von aktiviertem dimerem STAT und ermöglicht die Aktivierung einer großen Anzahl von STATs durch wenige Rezeptoren.

Die Dimerisierung von STAT3 am Rezeptor ist somit essentiell für die frühe Dynamik der IL-6-induzierten Jak/STAT Signaltransduktion. Das resultierende Modell ist  $M^3$ .



**Abb. 4.34 Modellmodifikation  $M^2$  zu  $M^3$**  Rote Zahlen entsprechen den in Kapitel 4.2.9.3 beschriebenen Modifikationen. Reproduziert mit Erlaubnis von Tom Quaiser. Abbildung: (167)

#### 4.2.9.4. $M^3 \rightarrow M^4$

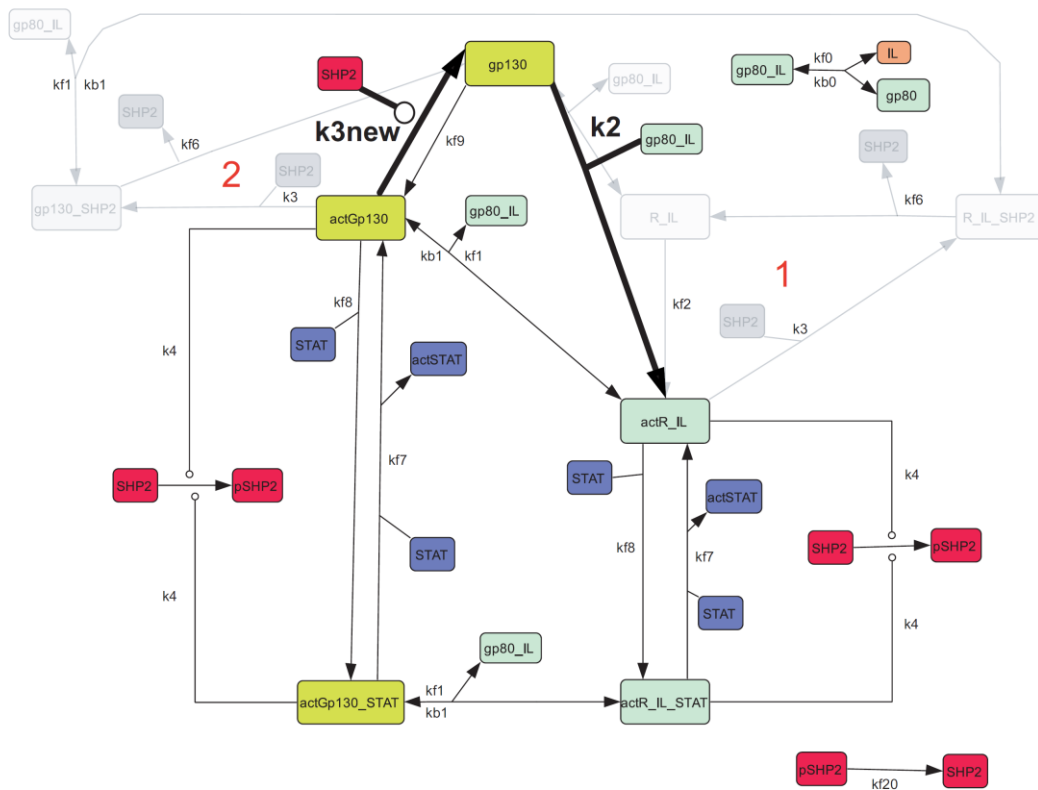
Modell  $M^3$  gab die Daten marginal besser wieder als  $M^2$  ( $\chi^2$ -Wert 56,11 im Vergleich zu 57,36). Die Identifizierbarkeitsanalyse ergab jedoch, dass die Parameter  $kf_2$  und  $kf_6$  nicht identifizierbar sind. Die Parameter  $kf_2$  und  $kf_6$  beschreiben die Rezeptor Aktivierung durch die Bindung von  $gp80_{IL}$  und die Inaktivierung des IL-6-freien ( $actGP130$ ) und des IL-6-bindenden ( $actR_{IL}$ ) Rezeptors durch SHP2.

Zunächst wurden die IL-6-abhängige Aktivierung des Rezeptorkomplexes und seine Inaktivierung durch SHP2 modifiziert. Da phosphorylierte SHP2 vom Rezeptorkomplex dissoziiert (siehe Kapitel 4.2.3), kann die Phosphatase den  $gp80_{IL}$ -bindenden Rezeptor nicht mehr inaktivieren. In  $M^4$  wurde angenommen, dass die  $gp80_{IL}$ -bindenden Rezeptoren mit größerer Wahrscheinlichkeit SHP2 phosphorylieren, als selbst von SHP2 inaktiviert zu werden. Folglich kann die Inaktivierung des Zytokin-bindenden Rezeptors durch SHP2 aus dem Modell entfernt werden (siehe rote 1 in Abb. 4.35). Diese Annahme stimmt mit den Ergebnissen von Yamada *et al.* (57) überein, die zeigen, dass die Inaktivierung aktivierter Rezeptoren bei kontinuierlicher Stimulation nicht abhängig von SHP2 ist.

Es wurde jedoch beibehalten, dass SHP2 den IL-6-freien Rezeptor ( $actGP130$ ), im Gegensatz zum IL-6-bindenden Rezeptor ( $actR_{IL}$ ), inaktivieren kann (siehe rote 2 in Abb.4.35). Diese Reaktion wurde zu einer modifizierten Reaktion erster Ordnung verändert, um die Anzahl der Parameter zu reduzieren. Das resultierende Modell ist  $M^4$ .

Zusammenfassend haben die Modellmodifikationen  $M^0$  zu  $M^4$  die Rolle von SHP2 in der IL-6-induzierten Signaltransduktion genauer definiert. Wenn der Rezeptor IL-6 bindet ( $actR_{IL}$ ), phosphoryliert er SHP2, so dass SHP2 vom Rezeptor dissoziiert und nicht mehr als Rezeptorphosphatase fungiert. Nach Abwaschen des Zytokins kann SHP2 den aktiven IL-6-freien Rezeptor ( $actGp130$ ) dephosphorylieren. Des Weiteren wurden die Bedeutung der Assoziation von IL-6 mit  $gp80$  und die Bedeutung der Dimerisierung von STAT3 am Rezeptor für die Dynamik der frühen IL-6-induzierten Signaltransduktion hervorgehoben.

Der  $\chi^2$ -Wert von  $M^4$  verbesserte sich von 56,11 auf 55,36. Die Identifizierbarkeitsanalyse von  $M^4$  zeigte jedoch weitere nicht identifizierbare Parameter ( $k_1$ ,  $k_{3new}$  und  $kf_9$ ) auf. Da keine weiteren Modellreduktionen möglich sind, war es notwendig neue experimentelle Daten zu generieren, um ein vollständig identifizierbares Modell zu erreichen. Die Auswahl der Experimente mittels computergestütztem optimalen experimentellen Design (OED) wird im nächsten Kapitel beschrieben.



**Abb. 4.35 Anpassung und Reduktion von Modell  $M^3$  zu  $M^4$ .** Rote Zahlen beschreiben die Kapitel. 4.2.9.4 beschriebenen Modifikationen des Modells. Reproduziert mit Erlaubnis von Tom Quaiser. Abbildung: (167)

#### 4.2.10. Computergestütztes, optimales experimentelles Design

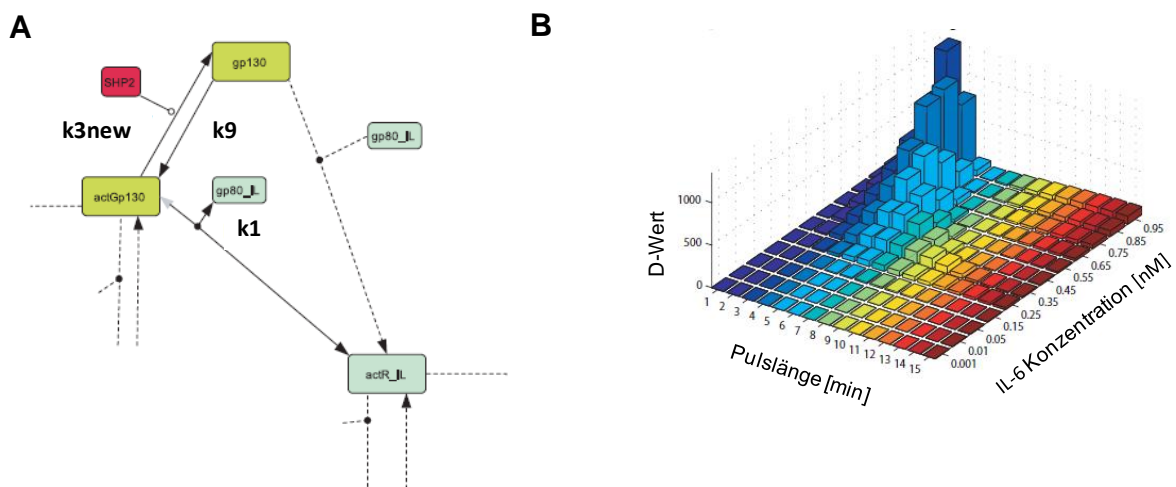
Mit Hilfe von OED werden Experimente entworfen, die möglichst viele Informationen für die weitere Modellidentifizierung liefern (siehe [14] zur Übersicht). Hierzu werden zunächst Design-Variablen definiert. Diese beschreiben experimentelle Parameter (z.B. Stimulationsmuster oder Zytokinkonzentrationen), die variiert werden können. Im Anschluss werden alle Kombinationen der Design-Variablen gebildet und die Kombination mit dem größten Informationsgehalt gewählt. Als Kriterium für den Informationsgehalt dient der D-Wert. Der D-Wert ist das Produkt der Eigenwerte der Parameter. Da nicht identifizierbare Parameter durch sehr kleine Eigenwerte nahe 0 charakterisiert werden, ist ein großer D-Wert ein Zeichen vieler identifizierbarer Parameter. Die Kombination der Design-Variablen, die den höchsten D-Wert ergibt, bietet daher die meisten Informationen zur Modellidentifizierung.

In  $M^4$  sind die Parameter  $k_1$ ,  $k_{3\text{new}}$  und  $k_9$  nicht identifizierbar. Wie der Ausschnitt aus  $M^4$  in Abb. 4.36 A zeigt, beschreiben diese Parameter die Aktivierung des Rezeptors ohne IL-6 ( $k_9$ ), die Reassoziierung von  $\text{gp80\_IL}$  mit dem IL-6 freien aktiven Rezeptor ( $k_1$ ) und die Dephosphorylierung des IL-6-



freien Rezeptors durch SHP2 (k3new). Da die Funktion von SHP2 im Fokus des Modells steht und k3new durch die bisherigen Experimente nicht identifizierbar ist, wurde als erste Design-Variable der *knockdown* von SHP2 mit siRNA gewählt. Weiterhin wurden die Dauer des IL-6 Pulses und die IL-6 Konzentration als Design Variablen definiert. Während es für die Pulsdauer (1 - 15 min) und die IL-6 Konzentration (0,001 - 0,95 nM) möglich ist Zeitintervalle bzw. Konzentrationen zu definieren, ist es nicht möglich die Effizienz eines *Knockdowns* vor dem Experiment genau zu definieren. Daher wurde ein OED gesucht, welches für verschiedene *knockdown* Effizienzen den höchsten D-Wert ergibt. Es wurden daher parallel 5 OED Analysen durchgeführt, wobei jede Analyse eine SHP2 *knockdown* Effizienz zwischen 20 und 80 % als Design Variable beinhaltet. Abb. 4.36 B zeigt exemplarisch das Ergebnis des OED für eine *knockdown* Effizienz von 50 %. Bei dieser Effizienz liefert ein 3-minütiger Puls (x-Achse) mit 0,95 nM (= 200 U/ml) IL-6 (z-Achse) den höchsten D-Wert (y-Achse) und damit den höchsten Informationsgehalt. Interessanterweise ergab die Kombination aus kurzem Puls und hoher IL-6 Konzentration auch in Kombination mit den anderen SHP2 *knockdown* Effizienzen den höchsten D-Wert (Daten nicht abgebildet).

Basierend auf der computergestützten OED Analyse wurde daher im Folgenden ein SHP2 *knockdown* in Kombination mit einem 3-minütigen Puls mit 200 U/ml IL-6 durchgeführt.



**Abb. 4.36 OED (A)** Ausschnitt aus  $M^4$ , der die nicht identifizierbaren Parameter k1, k9 und k3new zeigt. **(B)** Ergebnis des OED für eine SHP2 *knockdown* Effizienz von 50 %. Reproduziert mit Erlaubnis von Tom Quaiser. Abbildung B: (166)

#### 4.2.11. Experimente basierend auf OED

Um die nicht identifizierbaren Parameter in  $M^4$  zu charakterisieren, wurden die im OED ermittelten Experimente durchgeführt. Sie werden im Folgenden als Experimentsatz II bezeichnet.

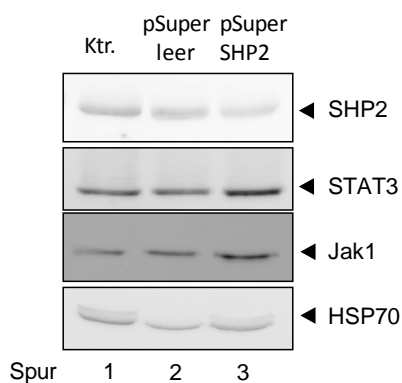
HEK-gp80 Zellen wurden mit einem Plasmid, das eine siRNA gegen SHP2 kodiert, transfiziert. Als Transfektionskontrolle wurden die Zellen mit einem Leervektor transfiziert. Um die Effizienz des

*knockdowns* zu bestimmen, wurden die Lysate mittels Western Blot und anschließender Immundete-  
 ktion analysiert. Die Färbung von HSP70 dient als Ladungskontrolle. Die Expression von SHP2 konn-  
 te in HEK-gp80 Zellen um 40 % reduziert werden (Abb. 4.37 A, Spur 3), während die Expression des  
 Kontrollvektors zu keiner Reduktion der SHP2 Menge führt (Spur 2). Die Expression von STAT3 und  
 Jak1 wird durch die Reduktion der SHP2 Expression nicht verringert. Um zu untersuchen, ob die  
 Transfektion die Oberflächenexpression von gp130 beeinflusst, wurde die Oberflächenexpression  
 von gp130 mittels FACS Analyse untersucht. Die Expression von siRNA gegen SHP2 führt zu einer  
 7 %-igen Reduktion der gp130 Oberflächenexpression (Abb. 4.37 B, vergleiche schwarze Linie mit  
 grauer Fläche). Die Startwerte für die Parameterschätzung mit dem zweiten Parametersatz ändern  
 sich demnach wie in Tab. 4.4 abgebildet.

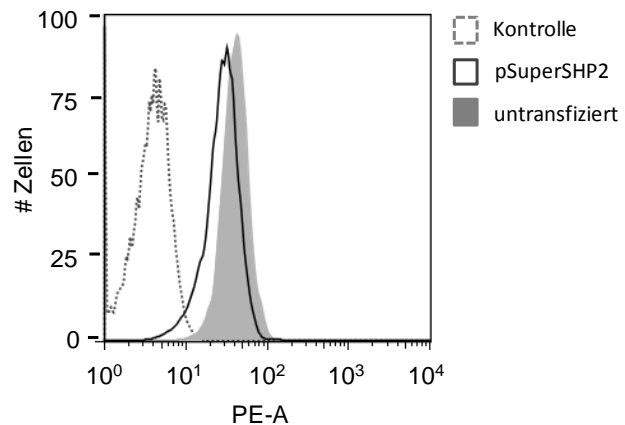
**Tab. 4.4 Veränderung der Startwerte nach SHP2 knockdown**

Molekül	Konzentration ohne SHP2 knockdown [nM]	Konzentration mit SHP2 knockdown [nM]
siehe Tab. 4.2		
SHP2	222	130
STAT3	216	216
gp130 (R)	2,66	2,48

**A**



**B**



**Abb. 4.37 Analyse der Startwerte nach SHP2 knockdown.** HEK-gp80 Zellen wurden mit pSuper leer und pSuperSHP2 transfiziert und unter standardisierten Bedingungen kultiviert und gehungert **(A)** Zelllysate wurden mittels SDS-Gelelektrophorese, Western Blot und anschließender Immundete-  
 ktion analysiert. Die Färbung erfolgte mit spezifischen Antikörpern gegen SHP2, STAT3, Jak und HSP70. Die Färbung von HSP70 dient als Ladekontrolle. **(B)** Zellen wurden mit spezifischen Antikörpern gegen gp130 gefärbt und mittels FACS analysiert.  
 Abbildung: (166)

Basierend auf dem OED wurden die mit der SHP2 siRNA transfizierten HEK-gp80 Zellen mit einem 3-minütigen IL-6 Puls (200 U/ml) stimuliert. Analog zu den in Kapitel 4.2.6.1 und 4.2.6.2 beschriebenen Experimenten wurde die Bindung von IL-6 an die Rezeptorkomplexe und die Phosphorylierung von JAK1, STAT3 und SHP2 untersucht. In Abbildung 4.38 sind die Ergebnisse der ELISA und Western Blot Analysen zusammengefasst. Da verschiedene siRNA Experimente trotz standardisierter Bedingungen unterschiedliche SHP2 *knockdown* Effizienzen zeigen (Daten nicht abgebildet), ist eine Mittelwertbildung über verschiedene Experimente nicht möglich. In Abb. 4.38 sind daher die Ergebnisse aus einem Experiment abgebildet.

Die Bindung von IL-6 an die Rezeptorkomplexe ist im Vergleich zu Experimentsatz I leicht reduziert (vergleiche Abb. 4.25 und Abb.4.38 A). Es ist jedoch zu bedenken, dass durch die Transfektion die Oberflächenexpression von gp130 um ca. 10 % reduziert wird (siehe Tab. 4.4). Die Bindung von IL-6 sinkt mit dem Abwaschen des Signals schnell und liegt zum Zeitpunkt  $t = 6$  min unter die Detektionsgrenze.

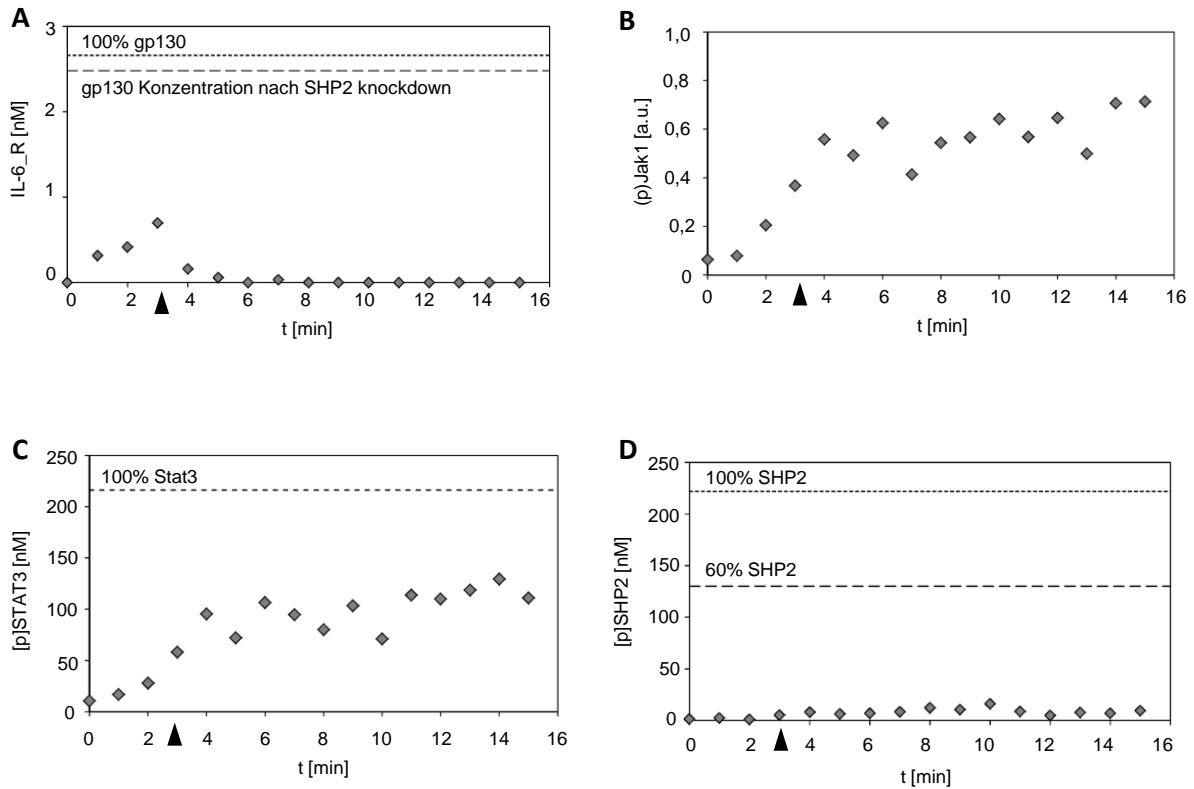
Der Grad der Phosphorylierung von Jak1 (Abb. 4.38 B) erreicht zum Zeitpunkt  $t = 4$  min ein Plateau. Der Anstieg der Phosphorylierung in den ersten 3 min des Experimentes entspricht nahezu der initialen Steigung in Experimentsatz I (siehe Abb. 4.26).

Abb. 4.37 C und D zeigen die Dynamik der Phosphorylierung von STAT3 und SHP2. Die absolute Quantifizierung von (p)STAT3 und (p)SHP2 in den SHP2 *knockdown* Zellen erfolgte mit Referenzlysaten aus untransfizierten für 6 min mit 200 U/ml IL-6 stimulierten HEK-gp80 Zellen (siehe Tab. 4.2 in Kapitel 4.2.5.2). Es ist interessant, dass in SHP2 *knockdown* Zellen zum Zeitpunkt  $t = 0$  eine geringe basale Phosphorylierung von STAT3 nachweisbar ist (Abb. 4.38 C). Ausgehend von diesem veränderten Startwert, steigt die Konzentration phosphorylierter STAT3 Moleküle in den drei Minuten des IL-6 Pulses auf ca. 60 nM. Nach vier Minuten wird eine Konzentration von ca. 100 nM phosphoryliertem STAT3 erreicht. Dieser Wert entspricht ca. der Phosphorylierung von STAT3 in WT Zellen zum gleichen Zeitpunkt bei einem 6-minütigen Puls. Im Gegensatz zu Experimentsatz I steigt die Konzentration phosphorylierter STAT3 Moleküle in Experimentsatz II jedoch nicht bis zum theoretisch möglichen Maximum an, sondern erreicht nach 4 min ein Maximum bei ca. 50 % der STAT3 Konzentration.

Die Konzentration phosphorylierter SHP2 Moleküle ist in SHP2 *knockdown* Zellen deutlich reduziert (Abb. 4.38 D). Sie steigt innerhalb von 8 Minuten langsam auf ca. 12 nM und entspricht damit nur ca. 10 % der Konzentration phosphorylierter SHP2 Moleküle in WT HEK-gp80 Zellen (siehe Abb. 4.28). Obwohl der *knockdown* von SHP2 die SHP2 Konzentration nur um 40 % reduziert, ist die Phosphorylierung von SHP2 somit drastisch beeinflusst.

Zusammenfassend zeigt Experimentsatz II, dass der 40 % *knockdown* von SHP2 eine geringe basale Phosphorylierung von STAT3 induziert. Trotzdem ist die IL-6-induzierte Phosphorylierung von STAT3

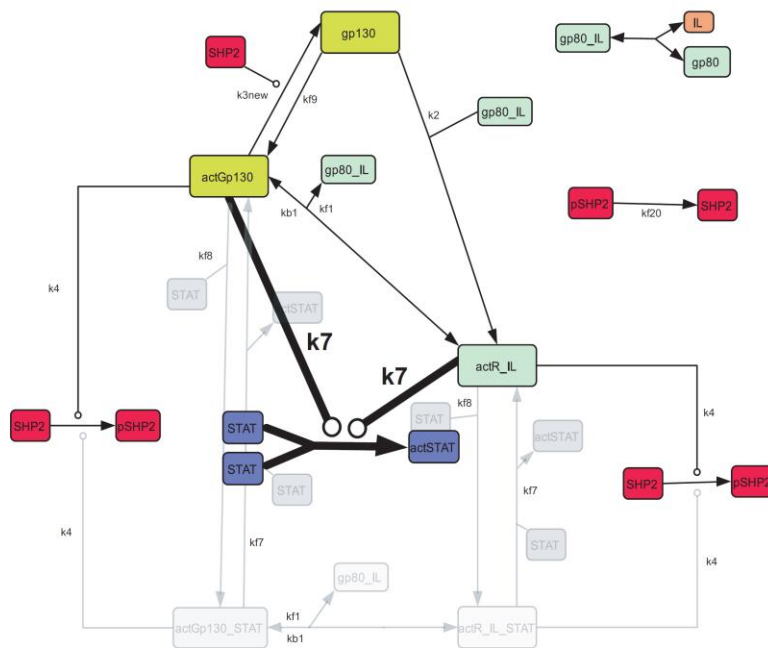
zu den hier untersuchten Zeitpunkten nicht verstärkt, obwohl SHP2 als Negativregulator der IL-6-induzierten Signaltransduktion angesehen wird. Die Phosphorylierung von SHP2 hingegen ist drastisch reduziert. Die Bindung von IL-6 an den Rezeptor und die Dynamik der Phosphorylierung von Jak1 und werden durch den SHP2 *knockdown* kaum verändert.



**Abb. 4.38 Experimentsatz II** HEK-gp80 Zellen wurden mit pSuperSHP2 transfiziert, unter standardisierten Bedingungen kultiviert, gehungert und für 3 min mit IL-6 (200 U/ml, schwarzes Dreieck) stimuliert. **(A)** Die Zellen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten in eiskaltem PBS geerntet. Nach einem Zentrifugationsschritt wurden die Zellen lysiert und die Lysate in einem IL-6 ELISA analysiert. **(B,C,D)** Die Zellen wurden zu den angegebenen Zeitpunkten lysiert. Die Analyse der Lysate erfolgte mittels SDS-Gelelektrophorese, randomisiertem quantitativem Western Blot und anschließender Immundetektion. Die Färbung erfolgte mit spezifischen Antikörpern gegen (p)Jak1 **(B)**, (p)STAT3 **(C)** und (p)SHP2 **(D)**. Als Ladekontrolle diente HSP70. Dargestellt ist die densitometrische Analyse eines Experimentes. Abbildung: (167)

#### 4.2.12. $M^4 \rightarrow M^5$

Da der *knockdown* von SHP2 eine basale Phosphorylierung von STAT3 auslöst (Abb. 4.38 C), ist zu erwarten, dass auch der in der Signaltransduktion oberhalb von STAT3 liegende Rezeptor zum Zeitpunkt  $t = 0$  min aktiv ist. Die Konzentration dieser Spezies (actGp130\_0) musste daher mit dem Modell geschätzt werden. Damit die Summe der zu schätzenden Parameter und somit die Komplexität des Modells trotz dieses zusätzlichen Schätzwertes konstant bleibt, wurde Modell  $M^4$  vereinfacht, indem die Aktivierung von STAT3 in eine modifizierte Reaktion erster Ordnung umgewandelt wurde (siehe Parameter  $k_7$  in Abb. 4.39). Das aus dieser Vereinfachung resultierende Modell ist  $M^5$ .



**Abb. 4.39 Anpassung und Reduktion von Modell  $M^4$  zu  $M^5$ .** Die Modifikationen sind in Kapitel 4.2.12 beschrieben. Reproduziert mit Erlaubnis von Tom Quaiser. Abbildung: (167)

#### 4.2.13. Modellmodifikation: $M^5$ bis $M^8$

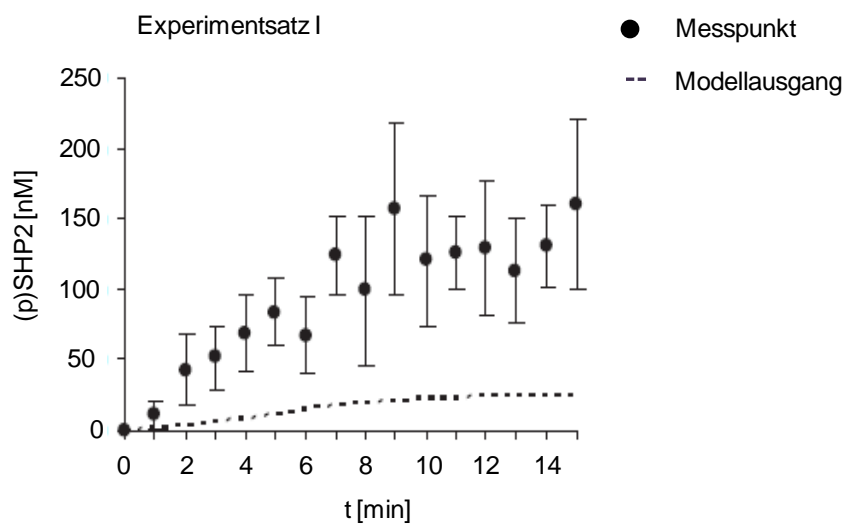
Um die in den ersten Zyklen der Modellmodifikation noch nicht identifizierten Parameter zu bestimmen, wurde eine zweite identifizierbarkeitsbasierte Modellmodifikation mit  $M^5$  als Ausgangsmodell basierend auf Experimentsatz I und II durchgeführt. Tab. 4.5 fasst die Modellentwicklung von Modell  $M^5$  zu  $M^7$  zusammen. Da Experimentsatz II auf einem einzelnen Experiment basiert, wurde die Standardabweichung von Experimentsatz II entsprechend der doppelten durchschnittlichen Standardabweichung von Experimentsatz I geschätzt.

**Tab. 4.5 Übersicht über die Modellmodifikation:  $M^5$  bis  $M^6$**

Modell	$\chi^2$ Wert	Modelltheoretische Grundlage für die Modellanpassung	Modellanpassung	Darstellung
$M^5$	229,7	Güte des Fits nicht ausreichend ( $p \leq 0,01$ )	SHP2 <i>feedback</i>	Abb. 4.41
$M^6$	151,9	Güte des Fits nicht ausreichend ( $p \leq 0,01$ )	„basale“ Parameter $\neq$ „induzierte“ Parameter	Abb. 4.41
$M^7$	139,8	Parameter actGp130_0, kf9, kb4, k4 und k20 und nicht identifizierbar	actGp130_0 = 0, Entfernen von kf9, Fixieren von k4b, k20 und k1	Abb. 4.42

#### 4.2.13.1. $M^5 \rightarrow M^6$

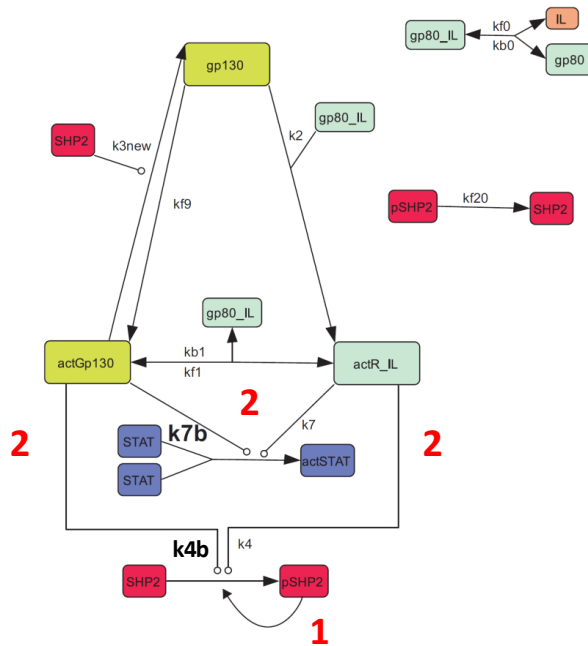
Der beste Fit von  $M^5$  resultierte in einem  $\chi^2$ -Wert von 229,7. Der anschließende  $\chi^2$ -Test ergab, dass Modell  $M^5$  basierend auf der Güte des Fits zu verwerfen ist. Die Analyse der Modellausgänge zeigte, dass  $M^5$  die große Differenz der Phosphorylierung von SHP2 in Experimentsatz I und II (siehe Abb. 4.28 und 4.38 D) nicht wiedergeben kann. Abb. 4.40 zeigt exemplarisch die Abweichung zwischen Modellausgang  $y_3$  und der Dynamik der Phosphorylierung von SHP2 in Experimentsatz I. Um die Nichtlinearität des Modells zu erhöhen, wurde in  $M^6$  ein positiver *feedback* von phosphorylierter SHP2 auf die Phosphorylierung von SHP2 eingeführt (siehe rote 1 in Abb. 4.41). Die Notwendigkeit dieser Modifikation könnte in der Komplexität der Interaktion von SHP2 mit den Rezeptordimeren begründet sein, die nicht durch eine lineare Reaktion beschreibbar sind (siehe (50) zur Übersicht).



**Abb.4.40 Vergleich des Modellausgangs  $y_3(M^5)$  mit Experimentsatz I** Die gestrichelte Linie entspricht dem Modellausgang  $y_3$  die Punkte entsprechen der Kinetik Phosphorylierung von SHP2 in Experimentsatz I (siehe Abb. 4.28). Verändert mit Erlaubnis von Tom Quaiser. Abbildung: (167)

#### 4.2.13.2. $M^6 \rightarrow M^7$

Obwohl Modell  $M^6$  die Daten deutlich besser darstellt als Modell  $M^5$  ( $\chi^2$ -Wert von 151,9 in Vergleich zu 259,7), musste es aufgrund der Güte des Fits verworfen werden. Um die Flexibilität des Modells zu vergrößern, wurde angenommen, dass sich die Parameterwerte für die Phosphorylierung von STAT3 bzw. SHP2 durch den IL-6 bindenden und den IL-6 freien aktiven Rezeptor (actR\_IL und actGp130) unterscheiden (siehe rote 2 in Abb. 4.41). Diese Annahme revidiert die Vereinfachung von Modell  $M^2$  zu  $M^3$  (siehe Abb. 4.34). Der neue Experimentsatz II ließ diese nur auf Experimentsatz I basierende Beschränkung jedoch nicht mehr zu. Das resultierende Modell ist  $M^7$ .



**Abb. 4.41 Anpassung und Reduktion von Modell  $M^5$  zu  $M^7$**  Rote Zahlen beschreiben die den Kapiteln 4.2.13.1 und 4.2.13.2 beschriebenen Modifikationen des Modells. Reproduziert mit Erlaubnis von Tom Quaiser. Abbildung: (167)

#### 4.2.13.3. $M^7 \rightarrow M^8$

Modell  $M^7$  gibt die Daten adäquat wieder ( $\chi^2$ -Wert von 139,8) und konnte daher nicht verworfen werden. Die Analyse der Identifizierbarkeit zeigte, dass die Parameter  $actGp130_0$ ,  $k_{f9}$  und  $k_{3new}$  sowie  $k_{4b}$ ,  $k_{f1}$ ,  $k_{f2}$ ,  $k_{f0}$  und  $k_{4b}$  nicht identifizierbar sind.

Parameter  $k_{f9}$  beschreibt die basale Aktivierung von  $gp130$ . Die aus dieser basalen Aktivierung folgende Phosphorylierung von  $gp130$  zum Zeitpunkt  $t = 0$  min wird durch  $actGp130_0$  geschätzt. Die Schätzungen für  $k_{f9}$  und  $actGp130_0$  ergeben jedoch Werte nahe 0. Somit kann die basale Aktivierung von  $gp130$  in einem Modell der frühen IL-6-induzierten Signaltransduktion vernachlässigt werden. Als Konsequenz wurde Parameter  $k_{f9}$  aus Modell  $M^7$  (Abb. 4.42 A) entfernt und die Konzentration von  $actGp130_0$  auf 0 nM fixiert.

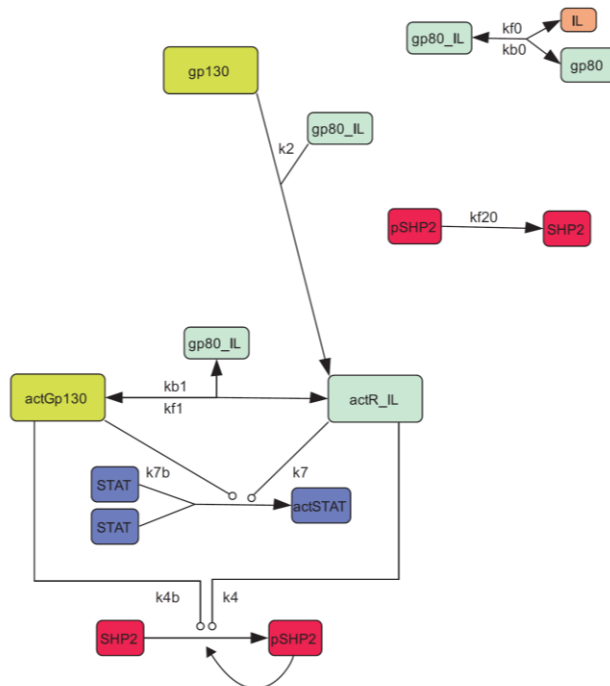
Interessanterweise ist der Parameter  $k_{3new}$ , der die Inaktivierung des IL-6-freien aktiven Rezeptors ( $actgp130$ ) durch  $SHP2$  beschreibt ebenfalls sehr klein und damit vernachlässigbar. Daher konnten auch die durch Parameter  $k_{3new}$  charakterisierten Reaktionen aus dem Modell entfernt werden, ohne dass die Wiedergabe der Daten durch das Modell schlechter wird. Da zusätzlich die Inaktivierung des IL-6 gebundenen, aktiven Rezeptors ( $actR$ ) durch  $SHP2$  vernachlässigbar ist (siehe Kapitel 4.2.10.4), ergibt die modellbasierte Analyse der quantitativen Daten, dass  $SHP2$  kein früher *feedback* Inhibitor ist.

Anschließend wurden die weiteren nicht identifizierbaren Parameter  $k4b$ ,  $kf1$ ,  $kf2$ ,  $kf0$  und  $k7b$  auf ihre geschätzten Werte fixiert. Damit sind die restlichen Parameter des finalen Modell  $M^8$  (siehe Abb. 4.42 A) vollständig identifizierbar und resultieren in einem geringen  $\chi^2$ -Wert von 139,8. Abb. 4.42 B zeigt die Parametrisierung des finalen Modells  $M^8$ .

Das finale Modell  $M^8$  beschreibt somit folgende Eigenschaften der ersten 15 min der IL-6-induzierten Signaltransduktion:

- (1) Die Bindung von IL-6 an die Rezeptoruntereinheit gp80 und somit die schrittweise Rezeptor-assemblierung ist essentiell für die Dynamik der Aktivierung des Jak/STAT Signalweges,
- (2) die Dimerisierung von STAT3 am Rezeptor ist essentiell für die Dynamik der STAT3 Phosphorylierung,
- (3) die Phosphorylierung von SHP2 ist ein nichtlinearer Prozess und
- (4) SHP2 dient nicht als früher *feedback* Inhibitor der IL-6-induzierten Jak/STAT Signaltransduktion.

A



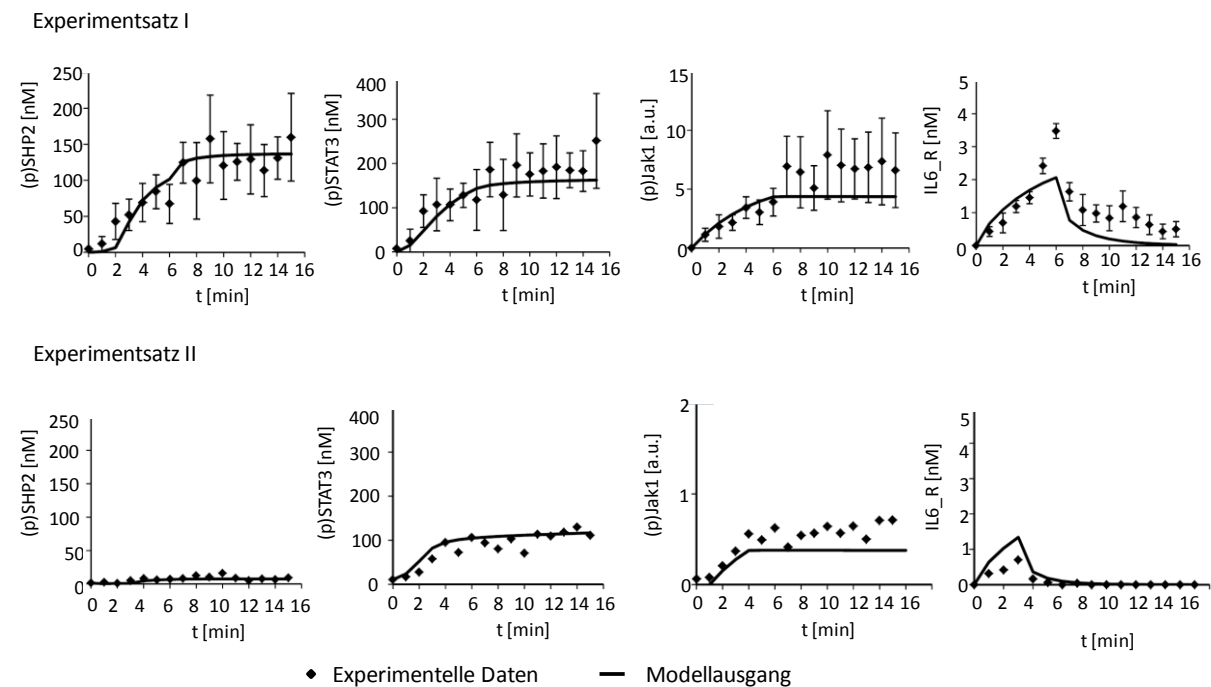
B

Parameter	Wert
actGp130_0	0
k2	0,11
k4	0,84
k4b	1,2
k7	$0,21 \times 10^{-4}$
k7b	$0,15 \times 10^{-5}$
kb0	43
kb1	1,5
kf0	$0,26 \times 10^{-1}$
kf1	$0,11 \times 10^5$
kf20	$0,1 \times 10^3$
scale JAK	2,2
scale JAK2	0,3

**Abb. 4.42 Modell  $M^8$**  A) Modell  $M^8$  B) Parameterwerte von  $M^8$ . Einheiten:  $s^{-1}$  für Reaktionen erster Ordnung,  $nM^{-1} s^{-1}$  für Reaktionen zweiter Ordnung. Der Parameter *scaleJak* ist der Skalierungsfaktor für Experimentsatz 1. Der Parameter *scaleJak2* ist der Skalierungsfaktor für Experimentsatz II. Verändert mit Erlaubnis von Tom Quaiser.



Abb. 4.43 zeigt den Vergleich der Modellausgänge  $\gamma_1$  bis  $\gamma_4$  mit den beiden Experimentsätzen. Das Modell kann sowohl die starke Aktivierung der Signalmoleküle in Experimentsatz I, die zur Sättigung von phosphoryliertem STAT3 und zur ca. halbmaximalen Aktivierung von SHP2 führt, als auch die nichtlinear abgeschwächte Phosphorylierung von SHP2 in Experimentsatz II wiedergeben. Die Phosphorylierung von Jak1 wird in beiden Experimentsätzen wiedergegeben. Die leichte Unterschätzung des Jak1 Plateaus durch das Modell liegt innerhalb der Standardabweichung. Einzig das Maximum der Bindung von IL-6 an den Rezeptorkomplex in Experiment I kann nicht vollständig durch das Modell wiedergegeben werden. Die Abweichung ist jedoch zu gering, um eine Ablehnung des Modells aufgrund der Güte des Fits zu erlauben.



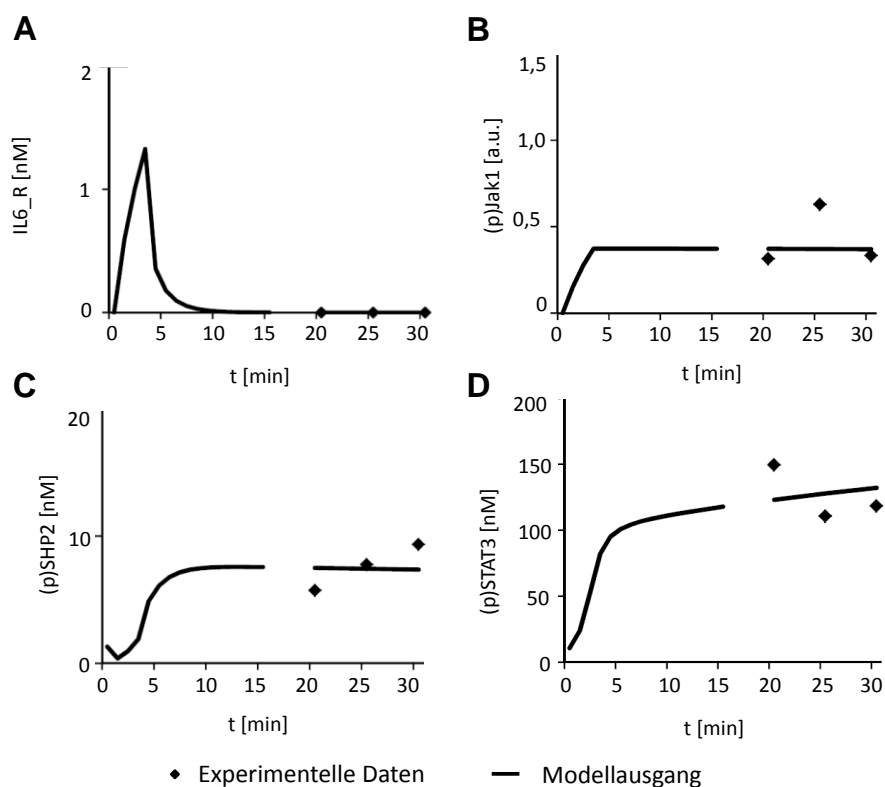
**Abb. 4.43. Wiedergabe der Experimentsätze I und II mit Modell  $M^8$ .** In der ersten Spalte ist Experimentsatz I dargestellt, in der zweiten Spalte Experimentsatz II. Die schwarzen Diamanten entsprechen den experimentell generierten Daten die schwarzen durchgezogenen Linien sind die Modellausgänge. Verändert mit Erlaubnis von Tom Quaiser. Abbildung: (167)

#### 4.2.14. Validierung von $M^8$

Neben der Wiedergabe von experimentell generierten Daten, die zur Schätzung eingesetzt wurden (siehe Abb. 4.43) ist ein Ziel der mathematischen Modellierung die Vorhersage eines noch unbekanntes Verhaltens des zu untersuchenden Systems. Um die Vorhersagekraft von Modell  $M^8$  zu testen, wurden die Phosphorylierung von SHP2, STAT3 und Jak1, sowie die Bindung von IL-6 an den Rezeptorkomplex bei einem SHP2 *knockdown* von 40 % (entsprechend Experimentsatz II) mit dem Modell vorhergesagt. Als Zeitrahmen für die Modellvalidierung wurde  $t = 17 - 27$  min nach einem 3-minütigen IL-6 Puls gewählt. Die Modellvorhersage umfasst somit ein Zeitintervall, das doppelt so lang ist wie die Experimente, die zur Parameterschätzung eingesetzt wurden. Die im Verlauf dieser

Doktorarbeit betreute Bachelorarbeit von Hannes Bongartz (170) zeigt, dass 30 min nach kontinuierlicher IL-6 Stimulation keine deutliche Expression des SOCS3 Proteins in HEK-gp80 Zellen nachgewiesen werden kann. Die Modellannahme (3), im Modellierungszeitraum kommt es zu keiner Expression von SOCS3 (siehe Kapitel 4.2.4.2), kann somit aufrechterhalten werden. Abb. 4.44 zeigt den Vergleich der vorhergesagten Modellausgänge mit nicht zur Parameterschätzung verwendeten Daten ( $t = 20, 25$  und  $30$  min). Das Modell sagt voraus, dass die Phosphorylierung von Jak1 (Abb. 4.44 B) und SHP2 (Abb. 4.44 D) konstant bleibt während die Phosphorylierung von STAT3 sogar noch leicht ansteigt (Abb. 4.44 C). Diese Vorhersagen entsprechen quantitativ den unabhängigen, experimentell generierten Daten. Die Bindung von IL-6 an den Rezeptor ist ebenfalls in Kongruenz mit den Modellvorhersagen (Abb. 4.44 A).

Mit Unterstützung von Modell  $M^8$  ist es möglich, die Ergebnisse unabhängiger Experimente quantitativ vorherzusagen. Die datenbasierte Modellmodifikation führte zu einem identifizierbaren und prädiktiven Modell der frühen IL-6-induzierten Signaltransduktion.



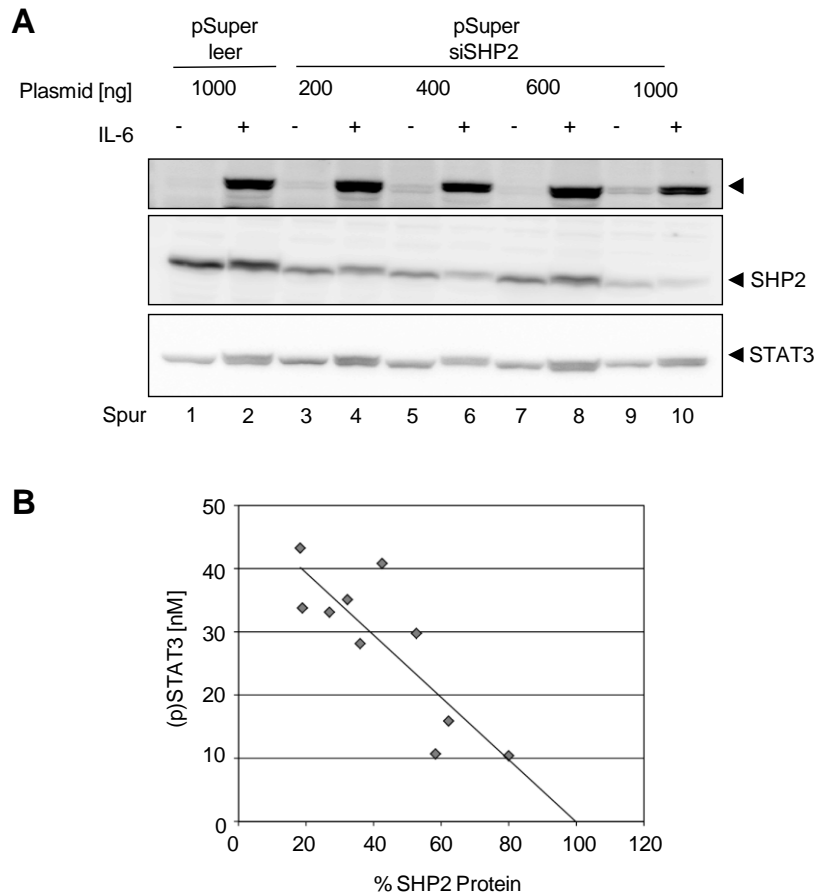
**Abb. 4.44 Modell  $M^8$  ist prädiktiv.** Vergleich der Modellvorhersage mit der experimentell bestimmten Bindung von IL-6 an den Rezeptorkomplex (A) und der Dynamik der Phosphorylierung von (p) Jak1 (B), (p)STAT3 (C) und (p)SHP2 (D) bei einem SHP2 *knockdown* von 40 %. Die schwarzen durchgezogenen Linien sind die Modellausgänge. Die schwarzen Diamanten entsprechen den experimentell generierten Daten. HEK-gp80 Zellen wurden mit pSuperSHP2 transfiziert, unter standardisierten Bedingungen kultiviert, gehungert, für 3 min mit IL-6 (200 U/ml) stimuliert und zu den angegebenen Zeitpunkten lysiert. Die Analyse der Proben erfolgte wie in Abb. 4.38. Dargestellt ist das Ergebnis aus einem Versuch. Verändert mit Erlaubnis von Tom Quaiser. Abbildung: (167)

#### 4.2.15. SHP2 ist ein basaler Repressor der IL-6-induzierten Signaltransduktion

Basierend auf den Ergebnissen der Modellanalyse ist SHP2 kein früher *feedback* Regulator der IL-6-induzierten Jak/STAT Signaltransduktion. Die quantitative Analyse der STAT3 Aktivierung in HEK-gp80 Zellen, in denen die Expression von SHP2 mittels siRNA reduziert wurde, zeigte jedoch eine Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors in Abwesenheit von IL-6 (siehe Abb. 4.38 C). Um diesen Effekt genauer zu charakterisieren, wurden HEK-gp80 Zellen mit verschiedenen Konzentrationen des für die SHP2 siRNA kodierenden Vektors transfiziert. 76 h nach der Transfektion wurde eine Hälfte der Zellen für 6 min mit IL-6 (200 U/ml) stimuliert. Anschließend wurden die Zellen lysiert und mittels quantitativem Western Blot und anschließender Immundetektion analysiert. Abb. 4.45 A zeigt, dass mit zunehmender siRNA Konzentration eine erhöhte SHP2 *knockdown* Effizienz erreicht wird (vergleiche Spuren 1 und 2 mit 3 bis 10), während die Konzentration der Ladungskontrolle STAT3 konstant bleibt. Übereinstimmend mit der Modellanalyse beeinflusst der SHP2 *knockdown* die IL-6-induzierte Phosphorylierung von STAT3 nach 6 min nicht (Abb. 4.45 A, Spuren 4, 6, 8 und 10).

In Kontroll-Zellen ist keine basale STAT3 Phosphorylierung detektierbar (Abb. 4.45 A, Spur 1). Je größer jedoch die SHP2 *knockdown* Effizienz ist, desto stärker ist die basale IL-6-unabhängige STAT3 Phosphorylierung (Abb. 4.45 A, Spuren 3, 5, 7 und 9). Basierend auf der Stärke der IL-6-induzierten Phosphorylierung von STAT3 nach 6 min (siehe Tab. 4.2 in Kapitel 4.2.5.2) konnte die basale Phosphorylierung von STAT3 quantifiziert werden. Abb. 4.44 B zeigt die Ergebnisse von n = 10 unabhängigen Experimenten. Bei niedrigen *knockdown* Effizienzen von 20 bis 40 % ist die basale Aktivierung von STAT3 gering und beträgt ca. 5 % der verfügbaren STAT3 Moleküle (vergleiche mit Tab. 4.2 in Kapitel 4.2.5.2). Bei höheren *knockdown* Effizienzen von 50 – 80 % wird eine basale Aktivierung von bis zu 40 nM erreicht. Dies entspricht ca. 20 % der STAT3 Moleküle. Ein kompletter *knockdown* konnte nicht induziert werden, da dieser das Sterben der Zellen bewirkte.

Zusammenfassend erzeugt der *knockdown* von SHP2 in Übereinstimmung mit der mathematischen Analyse keine erhöhte frühe IL-6-induzierte STAT3 Phosphorylierung. Vielmehr ist eine deutliche basale Aktivierung des Transkriptionsfaktors nachzuweisen, die linear mit zunehmendem *knockdown* von SHP2 zunimmt. Dies wirft die Hypothese auf, dass SHP2 nicht als früher *feedback* Inhibitor, sondern als Repressor einer basalen, Zytokin-unabhängigen Rezeptoraktivität wirkt. SHP2 könnte so ein spontanes Auslösen der IL-6-induzierten Signaltransduktion verhindern. In Abwesenheit von SHP2 würde diese spontane Aktivierung die beobachtete basale STAT3 Phosphorylierung induzieren.



**Abb. 4.45 Der knockdown von SHP2 erzeugt eine basale Phosphorylierung von STAT3 (A)** HEK-gp80 Zellen wurden mit pSuper leer und pSuperSHP2 transfiziert und unter standardisierten Bedingungen kultiviert, gehungert und für 6 min mit IL-6 (200 U/ml) stimuliert. Zelllysate wurden mittels SDS-Gelelektrophorese, quantitativem Western Blot und anschließender Immundetektion analysiert. Die Färbung erfolgte mit spezifischen Antikörpern gegen (p)STAT3, SHP und STAT3. Die Färbung von STAT3 dient als Ladekontrolle. Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment. **(B)** Densitometrische Analyse von  $n = 10$  unabhängigen Experimenten. Die schwarze Linie ist eine lineare Regression. Abbildung: (167)

#### 4.2.16. Zusammenfassung: Systembiologische Analyse der Funktion von SHP2 im IL-6-induzierten Jak/STAT-Signalweg

Im zweiten Teil der Arbeit wurde ein identifizierbares, prädiktives Modell der frühen IL-6-induzierten Signaltransduktion entwickelt. Hierzu wurde ein iterativer Zyklus aus Modelldefinition, Parameterschätzung basierend auf zeitlich hoch aufgelösten quantitativen Daten und Modellmodifikation durchlaufen. Die Modellmodifikation zeigte auf, dass

- (1) die schrittweise Assemblierung des Rezeptorkomplexes,
- (2) die Dimerisierung von STAT3 am Rezeptor und
- (3) die nicht lineare Phosphorylierung von SHP2

essentiell für die Dynamik der frühen IL-6-induzierten Signaltransduktion sind.

Interessanterweise ergab die Analyse des Modells, dass SHP2, kein früher *feedback* Inhibitor der IL-6-induzierten Signaltransduktion ist.

Allerdings zeigen quantitative Experimente eine bisher nicht beschriebene Funktion von SHP2 als basaler Repressor einer spontanen IL-6-unabhängigen Aktivierung von STAT3.

SHP2 könnte somit eine essentielle Funktion in der Unterdrückung einer konstitutiven, unkontrollierten Aktivierung des Jak/STAT Signalweges einnehmen, die mit vielen inflammatorischen und proliferativen Krankheiten assoziiert wird.

---

## 5. Diskussion

### 5.1. Regulation der IL-6-induzierten Signaltransduktion

IL-6 ist ein bedeutender Regulator der Entzündungsreaktion. Eine konstitutive oder deregulierte IL-6-induzierte Signaltransduktion kann chronische entzündliche Krankheiten und die Entwicklung von Tumoren auslösen. Unter physiologischen Bedingungen wird die Jak/STAT Signaltransduktion durch verschiedene Inhibitoren reguliert. Zu diesen Inhibitoren gehören der *feedback* Inhibitor SOCS3 und die Proteintyrosinphosphatase SHP2. Sowohl SOCS3 als auch SHP2 binden an das phosphorylierte Y759 in gp130. Ihre Funktionen sind jedoch unabhängig. Während SOCS3 durch die Inhibition der Januskinasen die Phosphorylierung von Jak Substraten unterbindet, dephosphoryliert SHP2 bereits phosphorylierte Moleküle. Weiterhin wird die Expression von SOCS3 erst nach ca. 45 min durch die Stimulation mit IL-6 induziert, während SHP2 konstitutiv exprimiert wird. Basierend auf den Expressionsmustern der beiden Inhibitoren ist es daher möglich die IL-6-induzierte Signaltransduktion in zwei Phasen zu unterteilen. Zum einen in eine frühe Signaltransduktion, in der SHP2 aber nicht SOCS3 exprimiert wird, zum anderen in eine späte Signaltransduktion in der beide Moleküle in der Zelle vorliegen. Das Gleichgewicht beider Phasen trägt zur regulierten Aktivierung und Inaktivierung der IL-6-induzierten Jak/STAT Signaltransduktion bei. In dieser Arbeit wurde die Funktion von SHP2 in der frühen IL-6-induzierten Signaltransduktion und die Regulation der SOCS3 Expression durch synthetische Glukokortikoide während der späten IL-6-induzierten Signaltransduktion in der Leber untersucht.

### 5.2. Reduktion der SOCS3 Expression durch Glukokortikoide

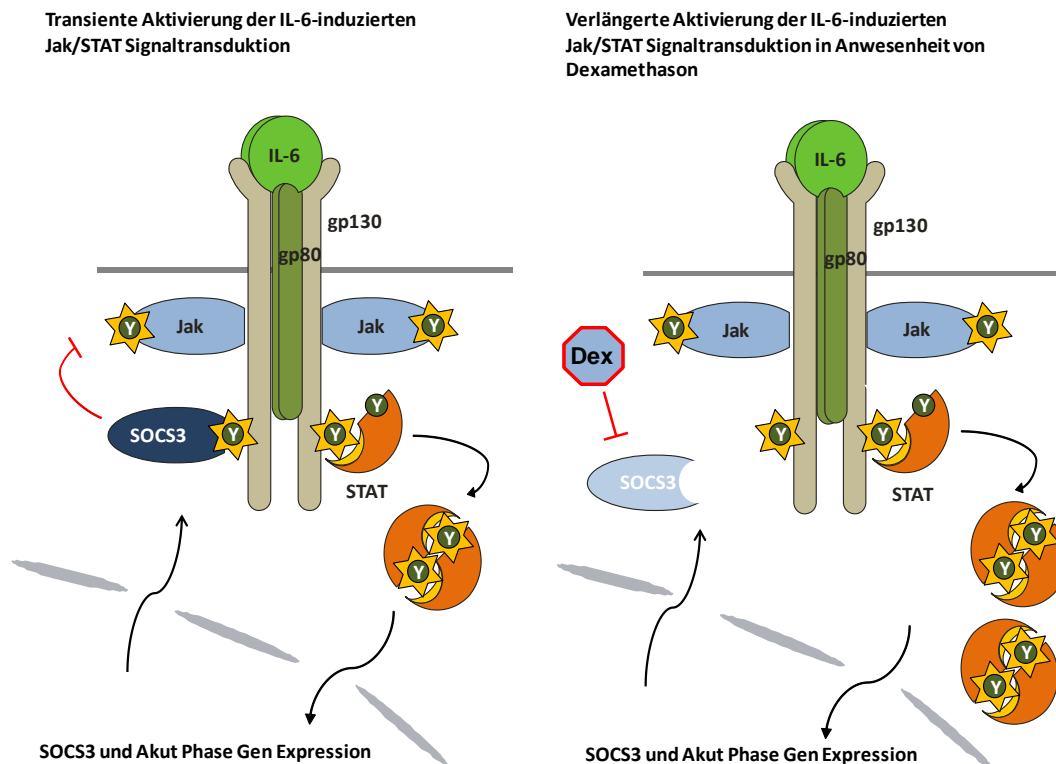
In der Leber werden IL-6-abhängig Akut-Phase Proteine synthetisiert. Akut-Phase Proteine ermöglichen u. a. die Isolation von Entzündungsherden und die Markierung von Erregern. Somit tragen sie zu einer schnellen Wiederherstellung der Körperhomöostase nach einer Entzündung bei. Neben den Zytokinen spielen auch die zu den Steroidhormonen gehörenden Glukokortikoide eine bedeutende Rolle in der Regulation einer Entzündungsreaktion. Sie wirken immunsuppressiv und anti-inflammatorisch. Aufgrund ihrer anti-inflammatorischen Wirkung werden sie seit mehr als 50 Jahren erfolgreich in der Therapie entzündlicher Krankheiten eingesetzt. Die Integration dieser beiden Netzwerke im Körper ermöglicht eine Feinabstimmung ihrer Funktionen. Das Wissen über die molekularen Grundlagen ihrer Interaktionen ist deshalb essentiell für die therapeutische Anwendung synthetischer Glukokortikoide und das Verständnis der Regulation der Körperhomöostase.

#### 5.2.1. Globale Verstärkung der Akut-Phase Reaktion durch Glukokortikoide

Baumann *et al.* (111) beschrieben 1989 die Verstärkung der Akut-Phase Reaktion durch Glukokortikoide. Übereinstimmend mit (111) zeigt diese Arbeit, dass die IL-6-induzierte Synthese der mRNA der

Akut-Phase Proteine  $\gamma$ -Fibrinogen und Antichymotrypsin durch das synthetische Glukokortikoid Dexamethason verstärkt wird. Dieser Effekt konnte in humanen Hepatom Zellen (siehe Abb. 4.1 A und B) und in primären murinen Hepatozyten (Abb. 4.1 C) nachgewiesen werden. Zusätzlich wird *in vivo* die IL-6-induzierte mRNA Expression und die Serumkonzentration des Akut-Phase Proteins Serum Amyloid A durch die Injektion von Dexamethason verstärkt (siehe Abb. 4.12 A und B).

Der molekulare Mechanismus der Verstärkung der Akut-Phase Reaktion durch Glukokortikoide ist nicht vollständig aufgeklärt. In dieser Arbeit wurde jedoch ein neuer globaler Mechanismus entdeckt (Abb. 5.1). Dexamethason reduziert die Expression des IL-6-induzierten *feedback* Inhibitors SOCS3 (siehe Abb. 4.4). Durch die Reduktion der SOCS3 Expression wird die späte IL-6-induzierte STAT3 Phosphorylierung verstärkt (siehe Abb. 4.2 B, C). Die verlängerte und verstärkte STAT3 Phosphorylierung erhöht die Expression STAT3-abhängiger Akut-Phase Proteine (siehe Abb. 4.1). In SOCS3 defizienten Zellen (siehe Abb. 4.9) und in Hepatozyten, in denen das SOCS3 Rekrutierungsmotiv in gp130 mutiert ist (siehe Abb. 4.10), wird daher die IL-6-induzierte Akut-Phase Reaktion durch Glukokortikoide nicht erhöht.



**Abb. 5.1 Einfluss von Dexamethason auf die IL-6-induzierte STAT3 Phosphorylierung** In Abwesenheit von Dexamethason induziert IL-6 eine transiente STAT3 Phosphorylierung. In Anwesenheit von Dexamethason wird die Expression des *feedback* Inhibitors SOCS3 reduziert und IL-6 induziert eine verstärkte STAT3 Phosphorylierung.

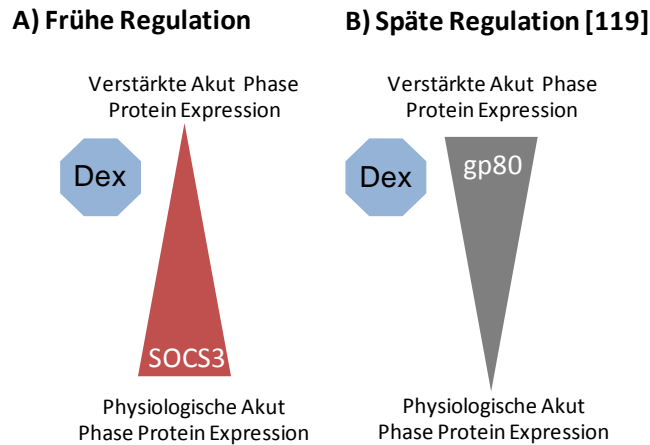
Im Gegensatz zu der hier beschriebenen globalen Regulation sind in der Literatur sind primär genspezifische Mechanismen der Glukokortikoid-induzierten Verstärkung der Akut-Phase Gen Expression

---

beschrieben. Die verstärkte Expression von Metallothionein (115), Haptoglobin (117) und  $\alpha$ 2-Makroglobulin (116) wird durch die Ausbildung von Komplexen, die sowohl STAT3 als auch den GR enthalten erklärt. Diese Komplexe binden an die Promotoren der betreffenden Gene und verstärken ihre Transkription. Da die Expression von Metallothionein (171), Haptoglobin (172) und  $\alpha$ 2-Makroglobulin (173) STAT3-abhängig ist, sollte die durch Glukokortikoide verstärkte STAT3 Aktivierung auch die Synthese dieser Gene fördern. Zur Überprüfung dieser Hypothese, wurde die IL-6- und Dexamethason-abhängige Aktivität des  $\alpha$ 2-Makroglobulin Promotors untersucht. Übereinstimmend mit den Ergebnissen von Lerner *et al.* (116) erhöht Dexamethason die IL-6-induzierte Aktivität des  $\alpha$ 2-Makroglobulin Promotors (siehe Abb. 4.13). In Zellen, in denen das SOCS3 Rekrutierungsmotiv in gp130 mutiert ist, ist dieser Effekt jedoch stark reduziert. Somit scheint die Reduktion der SOCS3 Konzentration sogar einen größeren Einfluss auf die Aktivität des STAT3-abhängigen  $\alpha$ 2-Makroglobulin Promotors zu haben, als die Ausbildung des STAT3/GR Enhanceosomes.

Schooltink *et al.* beschreiben einen weiteren globalen Glukokortikoid-abhängigen Mechanismus, der die Expression von Akut-Phase Proteinen verstärken kann (119). Sie zeigen, dass Dexamethason nach 18 h die Oberflächenexpression von gp80 in HepG2 Zellen erhöht. Die Erhöhung der gp80 Expression resultiert in einer verstärkten IL-6-induzierten Signaltransduktion und der verstärkten Expression von  $\gamma$ -Fibrinogen. Dieser Mechanismus konnte in (158) (siehe Abb. 4.3 B) für kurze Stimulationen mit Dexamethason ausgeschlossen werden. Die Verstärkung der Akut-Phase Gen Expression durch Induktion der gp80 Expression scheint erst zu späten Zeitpunkten relevant zu sein. Somit existieren in der Leber mindestens zwei zeitlich versetzt wirkende globale Mechanismen, die Glukokortikoid-abhängig, die IL-6-induzierte Expression von Akut-Phase Proteinen verstärken. Zum einen, die in dieser Arbeit beschriebene frühe Reduktion der SOCS3 Proteinexpression (Abb. 5.2 A), zum anderen die späte von Schooltink *et al.* (119) beschriebene Erhöhung der gp80 Expression (Abb. 5.2 B). Zusätzlich gibt es genspezifische Mechanismen, die eine weitere Verstärkung der Akut-Phase Reaktion vermitteln. Das Vorliegen mehrerer paralleler Mechanismen zeigt, dass die Verstärkung der Akut-Phase Reaktion eine bedeutende Funktion der Glukokortikoide ist.

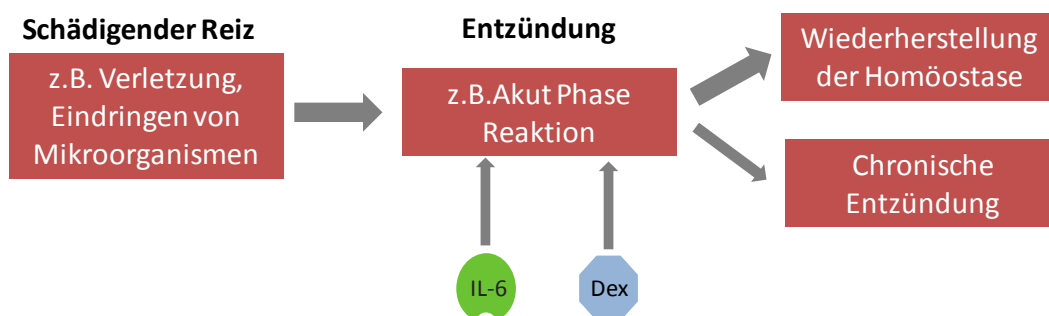




**Abb. 5.2 Dexamethason verstärkt die Expression von Akut-Phase Genen** **A)** Dexamethason verstärkt die Expression von Akut-Phase Proteinen durch die Reduktion der SOCS3 Expression. **B)** Dexamethason verstärkt die Expression von Akut-Phase Proteinen durch die Induktion der gp80 Expression.

### 5.2.2. Physiologische Konsequenzen einer verstärkten Akut-Phase Reaktion

Glukokortikoide verlängern und verstärken die IL-6-induzierte Jak/STAT Signaltransduktion in der Leber und somit die Expression der im Verlauf einer Entzündung sezernierten Akut-Phase Proteine. Es erscheint zunächst unerwartet, dass anti-inflammatorische Glukokortikoide den Verlauf einer Entzündung verstärken. Die IL-6-abhängige Akut-Phase Reaktion trägt jedoch entscheidend zur Entfernung schädigender Reize und zur Wiederherstellung der Homöostase im Organismus bei (12) (Abb. 5.3). Die Entzündungsreaktion respektive die Synthese von Akut-Phase Proteinen muss in diesem Zusammenhang daher als positiver Prozess verstanden werden. Die Behandlung mit anti-inflammatorischen Glukokortikoiden kann durch die Induktion der Akut-Phase Reaktion den Heilungsprozess fördern. Wenn eine Entzündung jedoch chronisch verläuft, könnte die verstärkte Synthese von Akut-Phase Proteinen die Symptome einer chronischen Entzündung verstärken und den Körper schädigen. Die beobachteten Effekte könnten dann zu den noch nicht vollständig verstandenen Nebenwirkungen der Glukokortikoide beitragen.



**Abb. 5.3 Vereinfachter Verlauf der Reaktionen des Körpers nach einem schädigenden Reiz** Die Entzündungsreaktion trägt im Normalfall zur Wiederherstellung der Homöostase bei, kann aber auch in einer chronischen Entzündung resultieren.

### 5.2.3. Physiologische Konsequenzen der Reduktion von SOCS3

Bei der Interpretation der physiologischen Konsequenzen der Reduktion der SOCS3 Expression in der Leber ist zu beachten, dass eine Reduktion der SOCS3 Expression nicht nur die Phosphorylierung von STAT3 beeinflusst. Croker *et al.* (76) zeigen, dass in SOCS3 defizienten Hepatozyten neben einer verstärkten Phosphorylierung von STAT3 auch eine verstärkte IL-6-induzierte Phosphorylierung von STAT1 auftritt. Die starke Phosphorylierung von STAT1 induziert die Expression von IFN $\gamma$  Zielgenen. Die verstärkte Expression von IFN $\gamma$  Zielgenen induziert in IFN $\gamma$  transgenen Mäusen die Entwicklung chronischer Hepatitis (174). Die Glukokortikoid-abhängige Reduktion der SOCS3 Expression könnte daher auch in einer verstärkten IL-6-induzierten STAT1 Phosphorylierung resultieren, die zur Entwicklung chronischer Hepatitis beiträgt.

In Patienten mit Leberfibrose wird eine Reduktion der SOCS3 Protein Expression durch Methylierung des SOCS3 Promotors beschrieben (175). Die Reduktion der SOCS3 Protein Expression resultiert in diesen Patienten in einer vermehrten Expression von TGF $\beta$ , welches die Entwicklung der Leberfibrose fördert. Zusätzlich wird die leberspezifische Deletion des SOCS3 Gens mit der Entwicklung von Hepatitis-induzierten Leberkarzinomen in Verbindung gebracht (176). Somit könnte auch die durch Glukokortikoide reduzierte Expression von SOCS3 die Entwicklung von Leberfibrose und Karzinomen fördern. (177).

Sowohl Glukokortikoide als auch IL-6 wirken nicht nur auf Hepatozyten, sondern auch auf Zellen des Immunsystems, wie z.B. Makrophagen und T-Zellen. Während IL-6 in WT Makrophagen eine starke pro-inflammatorische Antwort auslöst, erzeugt es in SOCS3 defizienten Makrophagen eine dem anti-inflammatorischen Zytokin IL-10 ähnliche Antwort (74, 75). Eine stark pro-inflammatorische Antwort auf die Stimulation mit IL-6 scheint in Makrophagen demnach abhängig von einer transienten Aktivierung der IL-6-induzierten Signaltransduktion zu sein, die durch den *feedback* Inhibitor SOCS3 beschränkt wird. Während ein Mangel an SOCS3 ein entzündungshemmendes Milieu erzeugt, induzieren einige pro-inflammatorische Stimuli wie LPS oder CpG durch die Synthese von SOCS3 daher eine pro-inflammatorische Antwort (72, 178). Vor diesem Hintergrund könnte die Reduktion der SOCS3 Proteinexpression durch Glukokortikoide in Makrophagen eine anhaltende STAT3 Phosphorylierung und somit eine anti-inflammatorische Antwort fördern.

Die Differenzierung von IL-17 sezernierenden CD4<sup>+</sup> T<sub>H</sub>17 Zellen wird durch IL-6 und TGF $\beta$  eingeleitet (179). TGF $\beta$  reduziert die IL-6-induzierte SOCS3 Expression in CD4<sup>+</sup> Vorläuferzellen und induziert somit eine verlängerte und verstärkte IL-6-induzierte STAT3 Phosphorylierung, die die Differenzierung der T<sub>H</sub>17 Zellen ermöglicht (180). Die Expression von SOCS3 ist somit ein entscheidender Regulator der T<sub>H</sub>17 Differenzierung. Glukokortikoide könnten daher gemeinsam mit TGF $\beta$  durch die Reduktion der SOCS3 Expression in CD4<sup>+</sup> Vorläuferzellen, die Entwicklung von T<sub>H</sub>17 Zellen induzieren. T<sub>H</sub>17 Zel-

len fördern die Heilung nach Infektionen mit Bakterien und Pilzen (181), werden aber auch mit der Entwicklung von Autoimmunkrankheiten assoziiert (182). Die physiologischen Konsequenzen einer Glukokortikoid-vermittelten T<sub>H</sub>17 Differenzierung müssen daher in der Zukunft untersucht werden.

Zusammengefasst könnte die Reduktion der SOCS3 Expression in verschiedenen Geweben und Zelltypen zum einen die Entwicklung chronischer Entzündungen, Karzinomen und Autoimmunkrankheiten fördern, zum anderen die Wiederherstellung der Homöostase nach einer Infektion unterstützen. Daher muss der Einfluss von Glukokortikoiden auf die Expression von SOCS3 in verschiedenen Geweben und Zelltypen untersucht werden.

#### **5.2.4. Einfluss von SOCS3 auf die Leberentwicklung und Regeneration**

IL-6-Typ Zytokine und Glukokortikoide haben nicht nur einen Einfluss auf die Steuerung pathologischer Prozesse. Kamiya *et al.* zeigen, dass die Entwicklung der murinen Leber sowohl von der Expression des IL-6-Typ Zytokins OSM als auch von endogenen Glukokortikoiden abhängt. Der molekulare Mechanismus dieser Beobachtung ist jedoch unklar (183). Die Ergebnisse dieser Arbeit könnten dazu beitragen diesen Mechanismus aufzuklären, da Glukokortikoide, wie in eigenen Vorarbeiten gezeigt, auch die OSM-induzierte SOCS3 Expression reduzieren (158). Die Reduktion der SOCS3 Expression durch endogene Glukokortikoide könnte durch die Verlängerung der OSM-induzierten Signaltransduktion die Entwicklungsphase der Leber verlängern und so die vollständige Ausreifung der Leber ermöglichen.

IL-6 ist weiterhin essentiell für die Leberregeneration nach einer partiellen Hepatektomie oder nach einer Lebertransplantation (siehe (184) zur Übersicht). Nach einer Lebertransplantation werden häufig Glukokortikoide eingesetzt, um eine Abstoßung des transplantierten Organs zu unterdrücken. Debonera *et al.* haben den Einfluss von Dexamethason auf die Leberregeneration in einem orthotopen Lebertransplantationsmodell in der Ratte untersucht (185). Sie zeigen, dass die Behandlung der Ratten mit Dexamethason zeitnah zur Transplantation die IL-6-induzierte STAT3 Phosphorylierung reduziert und die Leberregeneration verlangsamt, da Dexamethason die Synthese von IL-6 unterdrückt. Sie untersuchen jedoch nicht, welchen Einfluss Dexamethason auf die Leberregeneration hat, wenn die Behandlung zeitversetzt zur Transplantation begonnen wird. Es ist zu vermuten, dass Dexamethason bei einer zeitversetzten Behandlung die IL-6-induzierte STAT3 Phosphorylierung verstärkt und somit nicht nur die Abstoßung des Transplantats reduziert, sondern auch die Leberregeneration verbessern könnte.

Der Einfluss von Glukokortikoiden auf die SOCS3 Expression und die STAT3 Phosphorylierung sollte daher in der Zukunft auch in der Leberentwicklung und der Leberregeneration genauer untersucht werden.

### 5.2.5. Die transaktivierende Funktion von Dexamethason ist essentiell für die Verstärkung der Akut-Phase Reaktion

Neben der Analyse der Konsequenzen der SOCS3 Reduktion auf die Akut-Phase Reaktion, wurde in dieser Arbeit der molekulare Mechanismus der Reduktion der SOCS3 Expression durch Glukokortikoide untersucht. Glukokortikoide können durch die Bindung des aktivierten GR an GRE in den Promotoren von Glukokortikoid Zielgenen (Transaktivierung) oder durch die Interaktion des GR mit den Transkriptionsfaktoren AP-1 und NF- $\kappa$ B (Transrepression) wirken. Um zu untersuchen, ob Dexamethason die Verstärkung der Akut-Phase Gen Expression durch Transaktivierung oder Transrepression vermittelt, wurde der Einfluss der selektiven Transrepressoren RU-486 (160) und ZK-216348 (161) auf die IL-6-induzierte Expression von  $\gamma$ -Fibrinogen mRNA untersucht (siehe Abb. 4.8 A und B). Beide Transrepressoren verstärken die IL-6-induzierte Synthese von FGG mRNA nicht. RU-486 kann die Effekte von Dexamethason sogar signifikant unterdrücken. Die Verstärkung der Akut-Phase Gen Expression und somit die Reduktion der SOCS3 Protein Konzentration ist demnach abhängig von Glukokortikoid-induzierter Transkription (Transaktivierung). Diese Abhängigkeit wurde ebenfalls für die Dexamethason-abhängige Verstärkung der IL-6-induzierten Synthese von Serin Protease Inhibitor 2.3 (112), Metallothionein (115) und Serum Amyloid A (113) beschrieben. In diesen Arbeiten wurde jedoch keine globale SOCS3-vermittelte Verstärkung der Akut-Phase Reaktion postuliert, sondern eine genspezifische Wirkung der Glukokortikoide angenommen.

Im Körper führt die Transaktivierung primär zur Synthese von metabolischen Zielgenen und wird daher mit den, dem *Cushing*-Syndrom ähnelnden, Nebenwirkungen der Glukokortikoide assoziiert (186). Um diese Nebenwirkungen bei einer Glukokortikoid Therapie zu vermeiden, wurde der Transrepressor ZK-216348 entwickelt. Die Untersuchung der Nebenwirkungen von ZK-216348 bei verschiedenen Entzündungsmodellen wird in der Zukunft helfen die Frage zu beantworten, ob die durch Transaktivierung induzierte verstärkte Akut-Phase Reaktion die Heilung beschleunigt oder zu den Nebenwirkungen der Glukokortikoide beiträgt.

### 5.2.6. Einfluss von Dexamethason auf die SOCS3 Synthese und Degradation

Um zu untersuchen, welcher Schritt der SOCS3 Synthese durch die Dexamethason-abhängige Transaktivierung beeinflusst wird, wurde der Einfluss von Dexamethason auf die einzelnen Ebenen der SOCS3 Synthese untersucht

Es ist bekannt, dass Glukokortikoide die Oberflächenexpression von Zytokinrezeptoren beeinflussen können. So reguliert Dexamethason z.B. die Expression des IL-4 Rezeptors durch Reduktion seiner mRNA Stabilität (187) und erniedrigt die Menge des IL-2 Rezeptor auf der Zelloberfläche (188). Weiterhin wurde beschrieben, dass Dexamethason die Expression von gp130 auf Brustepithelzellen reduziert (189). In dieser Arbeit konnte jedoch gezeigt werden, dass Dexamethason die Expression von

gp80 und gp130 nicht reduziert (siehe Abb. 4.3 B, (158)). Die SOCS3 Expression wird daher nicht durch eine Dexamethason-abhängige Reduktion der Rezeptorexpression vermittelt.

Der Liganden-induzierten Aktivierung von gp130 folgt die Phosphorylierung der Signalmoleküle des Jak/STAT Weges. Abb. 4.3 C (158) zeigt, dass Dexamethason die frühe IL-6-induzierte Phosphorylierung von STAT3 nicht beeinflusst. Eine Untersuchung von mit IL-6 stimulierten MCF7 Brustkrebszellen zeigte bei der Behandlung mit Dexamethason ebenfalls keine Änderung in der STAT3 Phosphorylierung (126). Phosphoryliertes STAT3 transloziert in den Nukleus (31, 32). Abb. 4.5 A und B zeigen, dass auch die Kerntranslokation von STAT3 durch Dexamethason nicht reduziert wird.

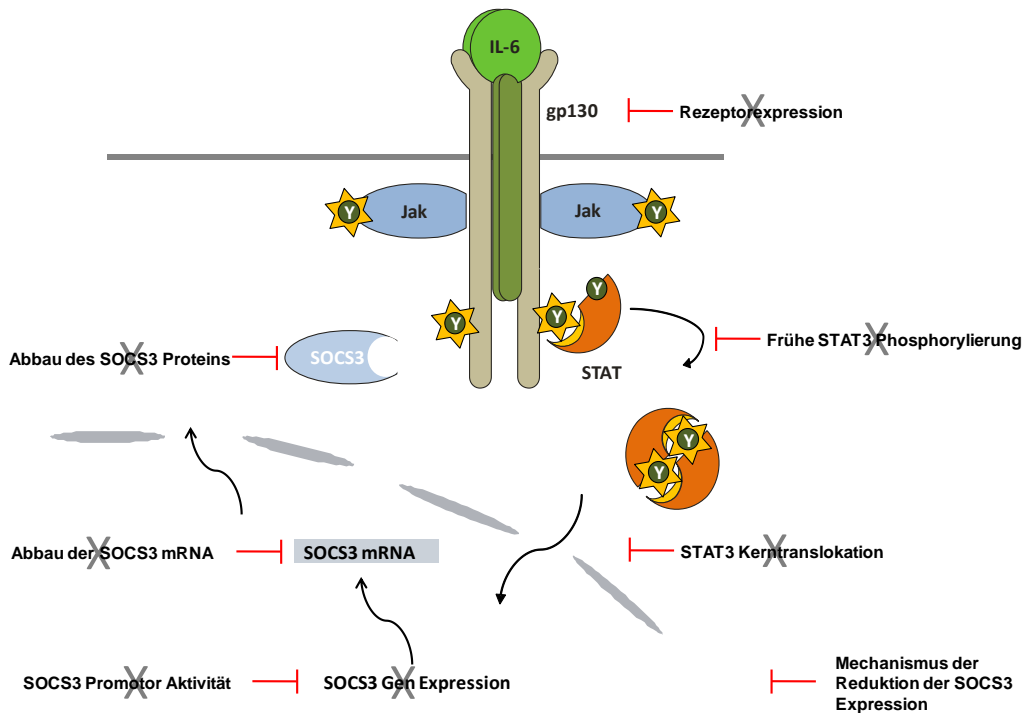
Die Kerntranslokation von phosphoryliertem STAT3 resultiert in der Expression von STAT3 Zielgenen, zu denen auch SOCS3 gehört (190). Die Aktivierung des SOCS3 Promotors wird durch Glukokortikoide jedoch nicht reduziert (siehe Abb. 4.3. D, (158)). Die Reduktion der SOCS3 Protein Expression ist demnach nicht in einer verminderten Transkription der SOCS3 mRNA begründet. Übereinstimmend ist die Gleichgewichtskonzentration IL-6-induzierter SOCS3 mRNA nach Stimulation mit Dexamethason nicht reduziert (siehe 4.6 A). Interessanterweise zeigen Paul *et al.*, dass Glukokortikoide in Ratten Hepatozyten die IL-6-induzierten SOCS3 mRNA Konzentration reduzieren (131). Der molekulare Mechanismus der SOCS3 Reduktion scheint daher speziesspezifisch zu sein.

Glukokortikoide können die Stabilität von mRNAs beeinflussen, deren Stabilität durch TTP (Tristetraprolin) reguliert wird. Die Bindung von unphosphoryliertem TTP an Adenosin/Uridin-reiche Elemente (ARE) in der 3' untranslatierten Region (UTR) markiert diese mRNAs für den exosomalen Abbau. Wenn TTP von der aktiven MAPK p38 phosphoryliert wird, kann es nicht an die ARE binden und die mRNA ist vor der Degradation geschützt. Dexamethason induziert die Expression der inhibitorischen p38 Phosphatase MKP-1 (108). Die Inhibition von p38 durch MKP-1 verhindert die Phosphorylierung von TTP und löst somit den exosomalen Abbau TTP-bindender mRNA aus. Dieser Glukokortikoid-abhängige Mechanismus ist z.B. für die Degradation von COX-2 mRNA (108), IL-8 mRNA (191) und IL-6 mRNA (192) beschrieben. Ehltling *et al.* zeigen, dass auch die SOCS3 mRNA durch TTP reguliert wird (69). Um zu untersuchen ob Dexamethason zum beschleunigten Abbau der SOCS3 mRNA führt, wurden *pulse chase* Experimente durchgeführt. Abb. 4.7 B zeigt, dass die Halblebenszeit der SOCS3 mRNA in HepG2 Zellen jedoch nicht durch Dexamethason beeinflusst wird.

Da Glukokortikoide keinen Einfluss auf die frühen Syntheseschritte des SOCS3 Proteins haben, wurde untersucht, ob Dexamethason die Degradation des SOCS3 Proteins beeinflusst. Die Degradation von Muskelproteinen (Myopathie) ist eine bekannte Nebenwirkung einer Glukokortikoid Therapie (siehe (193) zur Übersicht) und wird u.a. durch den Ubiquitin-abhängigen proteasomalen Abbau von  $\alpha$ -Aktin vermittelt (194). Im Gegensatz zu Aktin wird SOCS3 jedoch nicht Glukokortikoid-abhängig proteaso-

mal abgebaut (siehe Abb. 4.7 A). Zusätzlich zeigen Abb. 4.7 B und C, dass Glukokortikoide weder den Proteasom-unabhängigen Abbau von exogenem noch von endogenem SOCS3 induzieren.

Zusammenfassend zeigt diese Arbeit, dass Dexamethason weder die Schritte, die zur SOCS3 mRNA Transkription führen, inhibiert noch den Abbau der SOCS3 mRNA oder des SOCS3 Proteins induziert (Abb. 5.4).



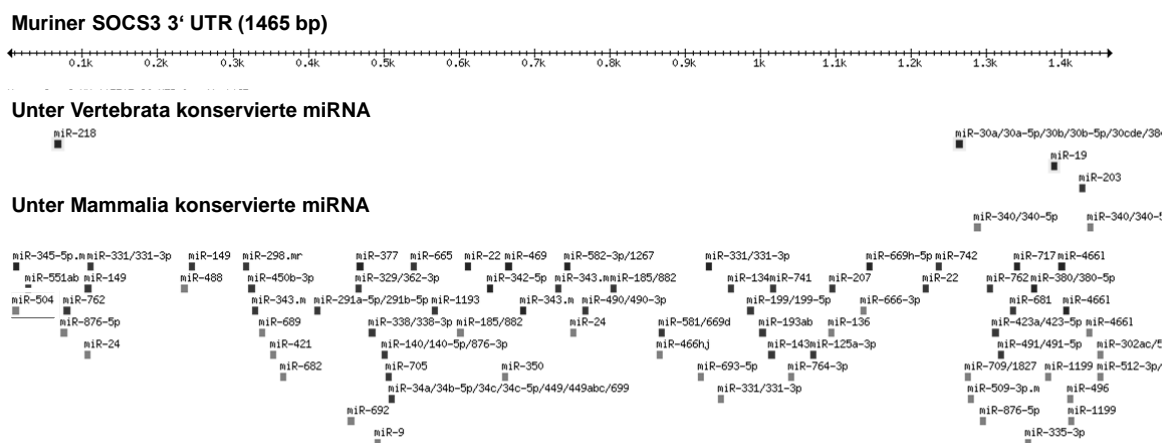
**Abb. 5.4. Einfluss von Dexamethason auf die SOCS3 Synthese und Degradation** Dexamethason reduziert weder die Schritte, die zur SOCS3 mRNA Transkription führen, noch den Abbau der SOCS3 mRNA oder des SOCS3 Proteins.

### 5.2.7. Induziert Dexamethason die Expression von miRNAs?

Die durch Dexamethason vermittelte Verstärkung der Akut-Phase Reaktion ist abhängig von der Glukokortikoid-induzierten Transkription von Zielgenen (Transaktivierung). Die Synthese eines noch unbekanntes Zielgens führt zur Reduktion der SOCS3 Konzentration ohne die Synthese der SOCS3 mRNA oder die Degradation der SOCS3 mRNA bzw. des SOCS3 Protein zu beeinflussen. Ein möglicher Mechanismus der Transkriptions- und Degradations-unabhängigen Regulation der Konzentration eines Proteins ist die miRNA-vermittelte Unterdrückung der Translation. MiRNAs sind kurze, nicht kodierende RNA Moleküle, die die Expression von mehr als 30 % aller Gene regulieren, indem sie an den 3'UTR der mRNA ihrer Zielgene binden. Diese Bindung kann zum einen den Abbau der mRNA induzieren oder ihre Translation unterdrücken (siehe (195) zur Übersicht). Da die Konzentration der SOCS3 mRNA nicht durch Glukokortikoide reduziert wird (siehe Abb. 4.6), kann jedoch ausgeschlossen werden, dass sie durch die Bindung von miRNAs Dexamethason-abhängig degradiert wird.

Die Analyse des murinen SOCS3 3'UTR mit dem *targetscan* Algorithmus (196) (Abb. 5.5) zeigt, dass eine große Anzahl putativer miRNA Bindestellen vorhanden sind. Es ist noch unbekannt ob eine oder mehrere dieser miRNAs durch Glukokortikoide induziert werden. In der Literatur sind bis heute gegensätzliche Effekte zur Glukokortikoid-induzierten Synthese von miRNAs beschrieben. Die Expression von miRNAs ist bei Asthmapatienten (197) und in einem Asthma Tiermodell (198) nicht durch Glukokortikoide beeinflusst. Smith *et al.* zeigen sogar eine globale Reduktion der miRNA Synthese durch Stimulation mit Glukokortikoiden (103). Im Gegensatz dazu konnte in Patienten mit akuten Leukämien eine Glukokortikoid-induzierte Synthese von miRNAs nachgewiesen werden (199). Izzotti *et al.* zeigen, dass das synthetische Glukokortikoid Budesidon die Expression von miRNAs in murinen Hepatozyten auslöst (200). Es ist daher möglich, dass auch Dexamethason die Synthese von miRNAs in Hepatozyten induziert.

Die Analyse der Glukokortikoid-vermittelten Synthese von miRNAs und ihrem Einfluss auf die Akut-Phase Reaktion wird in der Zukunft helfen die molekularen Mechanismen der verstärkten Akut-Phase Reaktion zu verstehen. Die Bedeutung von miRNAs in der Induktion der Akut-Phase Reaktion wurde kürzlich von Brock *et al.* beschrieben (201). Sie zeigen, ohne die Funktion von Glukokortikoiden zu untersuchen, dass die Expression von miRNAs die Expression des STAT3 Inhibitors PIAS3 reduziert und so die IL-6-induzierte Expression von Akut-Phase Proteinen verstärkt.



**Abb. 5.5** Potentielle miRNA Bindestellen im murinen SOCS3 3'UTR Die Analyse der SOCS3 UTRs erfolgte mit dem *targetscan* Algorithmus (196).

### 5.3. Systembiologische Analyse der Funktion von SHP2

Während in der späten IL-induzierten Signaltransduktion SOCS3 und SHP2 exprimiert werden, wird in der frühen IL-6-induzierten Signaltransduktion nur SHP2 exprimiert. Um die Regulation der Signaltransduktion durch SHP2 zu verstehen, wurde im zweiten Teil dieser Arbeit ein identifizierbares, prädiktives Differentialgleichungsmodell der frühen IL-6-induzierten Jak/STAT Signaltransduktion entwickelt. Hierzu wurde ein iterativer Zyklus der Generation experimenteller Daten und identifizierbarkeitsbasierter Modellmodifikation durchlaufen.

#### 5.3.1. Etablierung standardisierter experimenteller Bedingungen

Die Identifizierung eines mathematischen Modells bedarf quantitativer, dynamischer, experimentell generierter Daten mit geringen Schwankungen (siehe (202) zur Übersicht). Um das Schwanken biologischer Daten zu reduzieren, ist es notwendig standardisierte Zellsysteme und standardisierte experimentelle Bedingungen zu definieren (z.B. (150, 203)). In dieser Arbeit wurden daher zunächst HEK Zellen etabliert, die stabil gp80 exprimieren (siehe Abb. 4.14). Der Einsatz einer Zelllinie bietet gegenüber primären Zellen mehrere Vorteile. Erstens wird jedes Experiment mit genetisch identischen Zellen durchgeführt, zweitens ist eine genetische Manipulation der Zellen, z.B. ein *knockdown* mit siRNA (siehe Abb. 4.37), möglich. Um die Reproduzierbarkeit der Experimente zu erhöhen, wurden weiterhin standardisierte experimentelle Bedingungen definiert (siehe Abb. 4.15). Durch den Einsatz dieser standardisierten Bedingungen war es möglich, die Dynamik der Aktivierung und die Stöchiometrie der Signalmoleküle des Jak/STAT Signalweges mit geringen Standardabweichungen zu bestimmen.

#### 5.3.2. Die Stöchiometrie des Jak/STAT Signalweges

Bei der Modellierung von Signaltransduktionsereignissen mit gewöhnlichen Differentialgleichungen wird angenommen, dass die Zelle einem gleichmäßig durchmischten Reaktionsgefäß entspricht. Somit kann die räumliche Verteilung und die Diffusion einzelner Moleküle vernachlässigt werden. Das Volumen einer HEK-gp80 Zelle und somit des Reaktionsgefäßes entspricht ca. 0,5 pl (siehe Kapitel 4.2.5). Das Volumen eukaryontischer Zellen variiert stark je nach Zelltyp und beträgt zum Beispiel bei erythropoietischen Vorläuferzellen ca. 0,4 pl (145) und bei primären murinen Hepatozyten ca. 13 pl (204). HEK-gp80 Zellen gehören daher zu den kleineren eukaryontischen Zellen, so dass die Vernachlässigung der Diffusion einzelner Moleküle auch durch die geringe Größe der Zelle begründet werden kann. Im Gegensatz dazu kann bei der mathematischen Modellierung großer Zellen mit partiellen Differentialgleichungen die Diffusion oder der Transport einzelner Moleküle berücksichtigt werden.

HEK-gp80 Zellen exprimieren ca. 870 Moleküle gp130 und ca. 87.250 Moleküle gp80 auf ihrer Oberfläche (siehe Tabelle 4.2 in Kapitel 4.2.5.2). Die Anzahl von gp130 auf HEK-gp80 Zellen entspricht ca.



der Expression von gp130 auf HepG2 Zellen. HepG2 Zellen exprimieren 1200 (205) bis 2000 (206) Moleküle gp130. Die Anzahl von gp80 auf HepG2 Zellen wurde indirekt von Baumann *et al.* (207) bestimmt. Sie weisen zwei IL-6 Rezeptor Populationen nach. 5000 Rezeptoren binden IL-6 mit einer geringen Affinität, während ca. 450 Rezeptoren IL-6 mit hoher Affinität binden. Die Interaktion von IL-6 und gp80 ist zunächst instabil, erst die Ausbildung eines Komplexes aus IL-6, gp80 und gp130 stabilisiert die Bindung von IL-6 (208). Somit entsprechen die 5000 niedrig affinen Rezeptoren der Anzahl von gp80 auf der Zelle, während hochaffine Rezeptoren Komplexen aus IL-6, gp130 und gp80 entsprechen. Diese Daten zeigen, dass HepG2 Zellen, die endogen gp80 exprimieren, ebenso wie HEK-gp80 Zellen deutlich mehr gp80 als gp130 auf ihrer Oberfläche exprimieren. Da Jak1 konstitutiv mit gp130 assoziiert ist (25), kann der Komplex aus gp130 und Jak1 als Rezeptortyrosinkinase interpretiert werden (209). Da die Anzahl von Jak1 in der Zelle deutlich größer ist als die Anzahl von gp130 (204), wurde zur Modellierung angenommen, dass jedes gp130 mit Jak assoziiert ist. Die Anzahl von Jak1-gebundenem gp130 entspricht somit 870 Molekülen/Zelle.

Die Konzentration von STAT3 in HEK-gp80 Zellen beträgt  $216 \pm 72$  nM (siehe Tabelle 4.2 in Kapitel 4.2.5.2). Dies entspricht ca. 74.000 Molekülen pro Zelle. Die in der Literatur beschriebene Anzahl von STAT3 in primären murinen Hepatozyten schwankt zwischen 222.000 (204) und 750.000 (203). Es ist jedoch zu bedenken, dass Hepatozyten deutlich größer sind als HEK-gp80 Zellen. Erythropoietischen Vorläuferzellen, die in ihrem Volumen ca. HEK-gp80 Zellen entsprechen, exprimieren ca. 20.000 Moleküle STAT5 (145).

HEK-gp80 Zellen exprimieren  $222 \pm 62$  nM SHP2 (siehe Tabelle 4.2 in Kapitel 4.2.5.2). Dies entspricht ca. 72.000 Molekülen/Zelle. In der Literatur ist bisher keine absolute Quantifizierung von SHP2 beschrieben. Die Anzahl der mit SHP1 verwandten Phosphatase SHP1 pro Zelle schwankt in verschiedenen Zelltypen zwischen 8.500 (145) und 800.000 (210) Molekülen.

Die deutlichen Unterschiede in der Expression von gp130, gp80, STAT3 und SHP2 in verschiedenen Zelltypen zeigen, dass für eine aussagekräftige Parameterschätzung quantitative Daten nicht zwischen verschiedenen Zelltypen und Signalmolekülen übertragbar sind und daher für jedes Zellmodell neu bestimmt werden müssen.

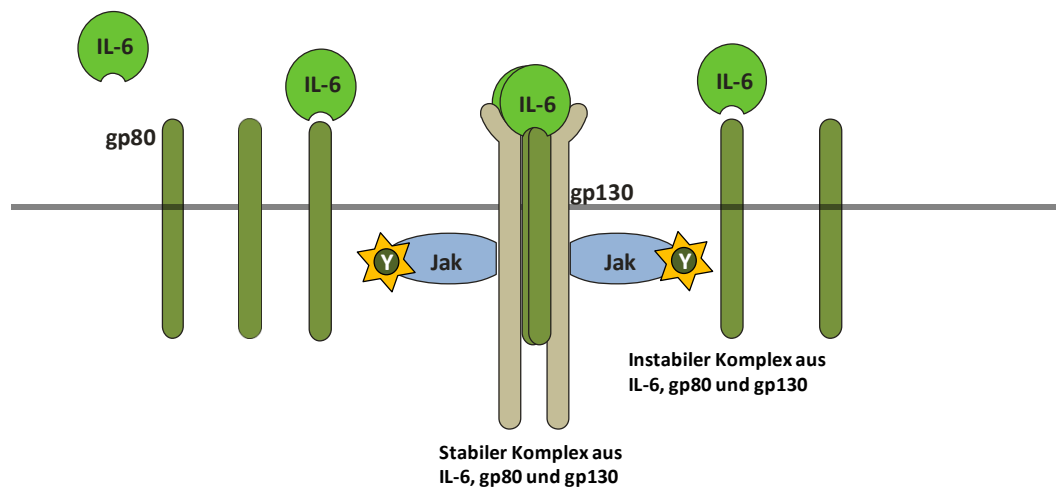
### **5.3.3. Die Dynamik der Aktivierung des Jak/STAT Signalweges**

Neben der Quantifizierung der absoluten Konzentration von gp130, gp80, STAT3 und SHP2 wurde die Dynamik des frühen Jak/STAT Signalweges nach Stimulation mit IL-6 quantitativ untersucht.

Die Stimulation von HEK-gp80 Zellen mit 200 U/ml IL-6 resultiert in einem linearen Anstieg der Bindung von IL-6 an die Zelloberfläche (siehe Abb. 4.25). Obwohl auf jeder HEK-gp80 Zelle durch die hohe Expression von gp80 87.000 Bindestellen für IL-6 zur Verfügung stehen, binden nach 6-

minütiger Stimulation mit 0,95 nM IL-6 nur ca. 1000 IL-6 Moleküle an die Zelle. Dies entspricht in etwa der Anzahl von gp130 Molekülen auf der Zelloberfläche. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die niedrig affine Interaktion von gp80 und IL-6 sehr transient ist, während die hoch affine Interaktion des Komplexes aus gp80, IL-6 und gp130 eine feste Bindung von IL-6 an den Rezeptorkomplex ermöglicht (208). (Abb. 5.6).

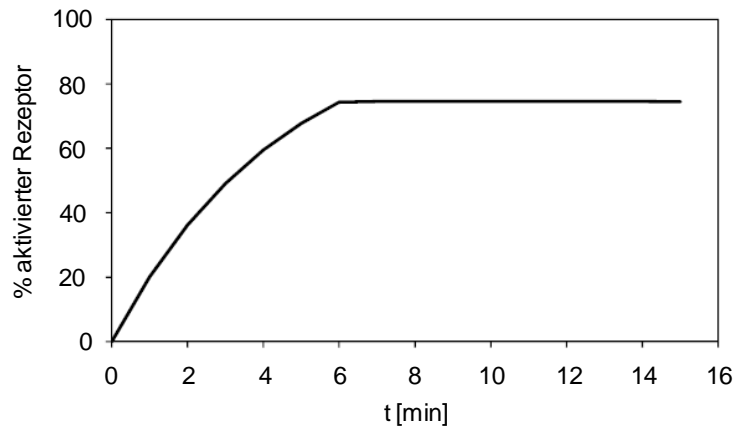
Nach dem Abwaschen von IL-6 nimmt die Konzentration von IL-6 an der Zelloberfläche ab. Bis zum Ende des Experimentes bindet IL-6 jedoch an ca. 20 % der Rezeptoren. Das Abwaschen des Stimulus resultiert auf zellulärer Ebene somit nicht in einem Alles-oder-Nichts Puls, sondern in einer graduellen Änderung der Bindung von IL-6 an den Rezeptorkomplex.



**Abb. 5.6 Interaktion von IL-6 mit gp80 und gp130** IL-6 bindet mit niedriger Affinität an gp80, der Komplex aus IL-6 und gp80 ist daher instabil. Der Komplex aus IL-6, gp80 und gp130 ist stabil

Die Bindung von IL-6 an den Rezeptorkomplex induziert die Aktivierung von Januskinasen und die anschließende Phosphorylierung von Jak1 und gp130. Abb. 4.19 zeigt, dass sich die Dynamik der Phosphorylierung von gp130 und Jak1 nicht unterscheidet. Daher diente die Phosphorylierung von Jak1 als Indikator für die Rezeptoraktivierung. Der bei der Parameterschätzung ermittelte Skalierungsparameter *scaleJak* ermöglicht bei der Modellierung die Umrechnung von relativ experimentell generierten Daten in absolute Konzentrationen (siehe Abb. 4.30). Nach der Parameterschätzung können *vice versa* mit *scaleJak* relative biologische Daten in absolute Konzentrationen umgerechnet werden. Für Experimentsatz I beträgt *scaleJak* 2,2 (siehe Abb. 4.41 B). Die maximale Phosphorylierung von Jak1 beträgt in Abb. 4.26 ca. 6 a.u. Nach der Umrechnung mit *scaleJak* ergibt sich, dass ca. 75 % der Rezeptoren phosphoryliert sind (Abb. 5.7). Auch in Experimentsatz II werden ca. 70 % der Rezeptoren aktiviert (siehe Abb. 4.38 B und *scaleJak2* in Abb. 4.42 B). Im Gegensatz dazu induziert in primären Hepatozyten die Stimulation mit der gleichen IL-6 Konzentration die Aktivierung von weniger als 10 % der gp130 Moleküle (204). Der Unterschied zwischen den Zelltypen könnte in der hohen

Expression von gp80 auf HEK-gp80 Zellen begründet sein, die die Ausbildung vieler aktiver Rezeptorkomplexe fördert.



**Abb. 5.7 Aktivierung des Rezeptors** Dargestellt ist der beste Fit der Phosphorylierung von Jak1 in Experiment I (siehe Abb. 4.26) mit  $M^8$ . Die relativen Daten wurden mit *scaleJak* in absolute Konzentrationen umgerechnet und auf die Anzahl von gp130 bezogen.

IL-6 induziert in HEK-gp80 Zellen eine sehr schnelle und starke Phosphorylierung von STAT3. Nach sieben Minuten sind nahezu alle STAT3 Moleküle phosphoryliert (siehe Abb. 4.27). Diese schnelle Aktivierung von STAT3 ist besonders hervorzuheben, da die Anzahl aktivierter Rezeptoren ca. 100 x geringer ist, als die Anzahl an STAT3 Molekülen. In primären murinen Hepatozyten, in denen das Verhältnis aktivierter Rezeptoren zu STAT3 Molekülen 1:350 beträgt, ist die Zeitspanne bis zur maximalen Phosphorylierung ca. 10 min länger und es werden maximal 20 % der STAT3 Moleküle phosphoryliert (204). Das Verhältnis zwischen aktivierten Rezeptoren und verfügbaren STAT3 Molekülen scheint somit die Geschwindigkeit und die Höhe der maximalen Phosphorylierung zu beeinflussen.

Im Gegensatz zu STAT3 wird SHP2 im analysierten Zeitraum nicht vollständig phosphoryliert (siehe Abb. 4.28), obwohl die Konzentration von STAT3 und SHP2 in der Zelle nahezu identisch ist (siehe Tab. 4.2 in Kapitel 4.2.5.2). STAT3 und SHP2 werden jedoch unterschiedlich an gp130 rekrutiert. Während STAT3 über die Assoziation mit vier phosphorylierten Tyrosylresten an gp130 rekrutiert werden kann (28), interagiert SHP2 nur mit phosphoryliertem Y759 in gp130 (155). Die größere Anzahl der Bindungsstellen könnte die Rekrutierung von STAT3 an den Rezeptor erleichtern und in einer stärkeren Phosphorylierung resultieren. Da SHP2 die phosphorylierten Tyrosylreste in ihrer C-terminalen Region selbst dephosphorylieren kann (43), ist die geringere Konzentration phosphorylierter SHP2 Moleküle jedoch auch durch Autodephosphorylierung zu erklären. Die Autophosphorylierung von SHP2 kann häufiger stattfinden als die Dephosphorylierung von STAT3, da die Dephosphorylierung von STAT3 eine Interaktion von STAT3 mit einer Phosphatase voraussetzt, während phosphorylierte SHP2 sich direkt dephosphorylieren kann. Zusammengefasst kann die geringere Kon-

---

zentration phosphorylierter SHP2 Moleküle sowohl durch eine reduzierte Phosphorylierung als auch durch eine starke Dephosphorylierung erklärt werden.

Die quantitative Analyse der IL-6-induzierten Jak/STAT Signaltransduktion zeigte den komplexen Zusammenhang zwischen der Stöchiometrie der einzelnen Signalmoleküle und der Dynamik ihrer Aktivierung. Die identifizierbarkeitsbasierte Modellmodifikation ermöglichte im Folgenden die Definition von Reaktionen, die essentiell für diese Dynamik sind.

#### **5.3.4. Die Assoziation von IL-6 mit gp80 ist essentiell für die frühe Signaltransduktion**

Die identifizierbarkeitsbasierte Modellmodifikation zeigte zunächst die Bedeutung der schrittweisen Rezeptorassemblierung für die frühe IL-6-induzierte Signaltransduktion.

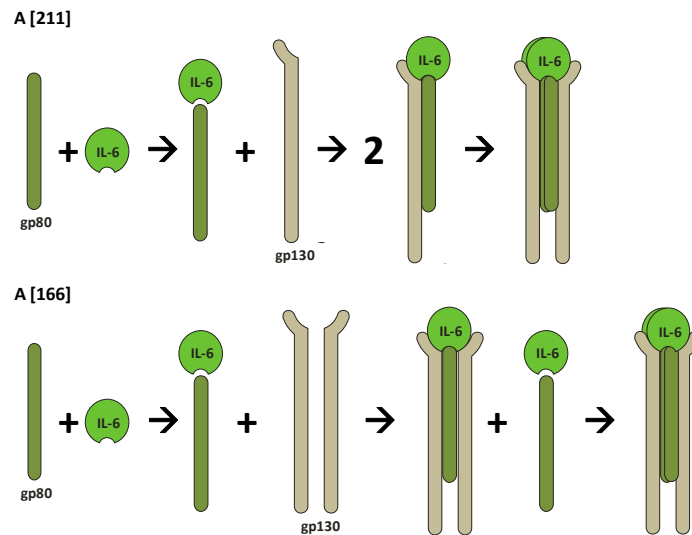
Im Ausgangsmodell  $M^0$  wurden die IL-6 Rezeptorkomplexe vereinfacht durch gp130 repräsentiert (siehe Kapitel 4.2.3). Da gp130 im Vergleich zu gp80 sehr gering exprimiert wird (siehe Tabelle 4.2 in Kapitel 4.2.5.2), wurde angenommen, dass die Anzahl an gp130 begrenzend für die Ausbildung aktiver Rezeptorspezies ist.  $M^0$  konnte die experimentell generierten Daten jedoch nicht wiedergeben (siehe Abb. 4.31), so dass die Spezies gp80 in das Modell eingeführt werden musste. Das bedeutet, dass die Konzentration von gp80 auf der Zelloberfläche essentiell für die Rezeptorassemblierung und die Dynamik der anschließenden Signaltransduktion ist. Die sehr große Anzahl an gp80 Molekülen auf der Oberfläche von HEK-gp80 Zellen kann jedoch die Ausbildung stabiler Komplexe mit gp130 fördern, indem zu jedem Zeitpunkt instabile Komplexe aus gp80 und IL-6 existieren, die mit gp130 assoziieren können (siehe Abb. 5.6).

Über die Reihenfolge der Assoziation des hexameren IL-6-Rezeptorkomplexes gibt es in der Literatur zwei Hypothesen. Beide beginnen mit der Dimerisierung von IL-6 und gp80. Boulanger *et al.* (211) postulieren die anschließende Formation eines trimeren Komplexes aus je einem IL-6/gp80 Dimer und einem gp130 Monomer. Je zwei trimere Komplexe assoziieren schließlich zum hexameren Komplex (Abb. 5.8 A). Im Gegensatz dazu zeigen Schroers *et al.* (166) basierend auf Fluoreszenz-Korrelations-Spektroskopie, dass das Dimer aus IL-6 und gp80 mit einem vorgeformten gp130 Dimer zu einem Tetramer interagiert. Das Tetramer reagiert bei hohen IL-6 Konzentrationen mit einem weiteren IL-6/gp80 Dimer zum aktiven Hexamer (Abb. 5.8 B). Die Darstellung der Rezeptorassemblierung in dieser Arbeit entspricht der aktuellen Hypothese von Schroers *et al.* (166). Die Spezies gp80 assoziiert mit IL zu gp80\_IL. Die Komplexe aus gp80 und IL-6 assoziieren mit einem vorgeformten Rezeptordimer gp130 zu R\_IL (siehe Abb. 4.32).

Singh *et al.* (212) bilden hingegen in einem mathematischen Modell der IL-6-induzierten Signaltransduktion die Assemblierung des IL-6 Rezeptorkomplexes nach Boulanger *et al.* (211) ab. Sie analysieren jedoch nicht, ob das von ihnen präsentierte Modell auch ohne gp80 valide wäre. Die mathemati-

sche Modellierung des IL-6-induzierten Jak/STAT Signalweges in Hepatozyten kann, wie in  $M^0$  angenommen, ohne die Darstellung von gp80 erfolgen (144, 204). Diese Modelle fokussieren jedoch genau wie Singh *et al.* (212) nicht auf die frühe IL-6-induzierte Signaltransduktion.

Durch die Fokussierung auf die initiale Aktivierung des Jak/STAT Signalweges zeigt diese Arbeit zum ersten Mal mit systembiologischen Methoden, dass die schrittweise Assemblierung eines vollständigen Rezeptorhexamers essentiell für die Dynamik der frühen IL-6-induzierten Signaltransduktion ist.



**Abb. 5.8. Zwei Möglichkeiten der Rezeptorassamblierung (verändert nach (166))** In beiden Fällen bindet IL-6 zunächst an gp80. **A)** Boulanger *et al.* (211) beschreiben die Ausbildung von zwei IL-6, gp80, gp130 Komplexen, die anschließend dimerisieren. **B)** Schroers *et al.* (166) beschreiben, dass zunächst ein Komplex aus einem IL-6/gp80 Komplex und einem vorgeformten gp130 Dimer entsteht, der dann mit einem zweiten IL-6/gp80 Komplex interagiert.

### 5.3.5. Die Dimerisierung von STAT3 ist essentiell für die frühe Signaltransduktion

Die identifizierbarkeitsbasierte Modellmodifikation zeigte neben der Bedeutung der Rezeptorassamblierung, die Bedeutung der Dimerisierung von STAT3 für die frühe IL-6-induzierte Signaltransduktion.

In  $M^0$  bis  $M^2$  wird die Spezies STAT3 als vorgeformtes Dimer abgebildet, welches am dimeren Rezeptorkomplex phosphoryliert wird (siehe Kapitel 4.2.3). Der Parameter  $kf7$ , welcher die Phosphorylierung von dimerem STAT3 beschreibt, erreichte bei der Schätzung jedoch die Intervallschranken des Parameterraums (siehe Kapitel 4.2.9.3). Die Phosphorylierung eines dimeren STAT Moleküls wäre demnach unbestimmbar schnell. Dies spiegelt die große Differenz zwischen der Anzahl an gp130 und STAT3 Molekülen (siehe Tab. 4.2 in Kapitel 4.2.5.2), sowie die nahezu vollständige Phosphorylierung von STAT3 durch wenige gp130 wieder (siehe Abb. 4.27). Um die Dynamik der STAT3 Aktivierung mit dem Modell wiederzugeben, wurde in  $M^3$  eine strukturelle Änderung im Modell vorgenommen (siehe Abb. 4.34). An einen dimeren, aktiven Rezeptorkomplex bindet zunächst ein monomeres STAT3 Mo-

lekül. Die Bindung und Phosphorylierung eines zweiten STAT Moleküls induziert die Dimerisierung von STAT3 sowie die anschließende Dissoziation des STAT Dimers. Demnach verstärkt die hohe Konzentration unphosphorylierter, monomerer STAT Faktoren die Ausbildung von aktiviertem dimeren STAT und ermöglicht somit die Aktivierung einer großen Anzahl von STAT3 Molekülen durch wenige Rezeptoren. Die Dimerisierung von STAT3 ist daher essentiell für die frühe Dynamik der IL-6-induzierten Signaltransduktion.

Diese Ergebnisse werden durch Literaturdaten gestützt. Obwohl STAT3 im unstimulierten Zustand dimerisiert sein kann (35, 213), ist die Stabilität des unphosphorylierten STAT3 Dimers gering (214). Der Aufbau des unphosphorylierten STAT3 Dimers unterscheidet sich weiterhin deutlich von dem Aufbau des phosphorylierten STAT3 Dimers. Die Dimerisierung unphosphorylierter STAT3 Moleküle erfolgt unter Beteiligung der N-terminalen Domäne und der SH2-Domäne (34, 215). Im Gegensatz dazu erfolgt die Dimerisierung von phosphoryliertem STAT3 durch eine Interaktion der phosphorylierten Y705 mit den SH2-Domänen (216). Neueste Ergebnisse zeigen zusätzlich, dass die Ausbildung unphosphorylierter Dimere keine Voraussetzung für die Ausbildung von phosphorylierten Dimeren ist (34). Die Ergebnisse dieser Arbeit implizieren, dass vorgeformte STAT3 Dimere die Aktivierung von STAT3 sogar verlangsamen könnten, da die schnelle Phosphorylierung von STAT3 durch das Vorhandensein von monomeren STAT3 Faktoren getrieben wird.

Es ist daher interessant zu untersuchen, ob die Dynamik der Aktivierung von STAT3 Mutanten, die keine unphosphorylierten Dimere ausbilden können, verändert ist.

### 5.3.6. Die Phosphorylierung von SHP2 ist nichtlinear

Die identifizierbarkeitsbasierte Modellmodifikation zeigte als dritte essentielle Eigenschaft der frühen IL-6-induzierten Signaltransduktion die Nichtlinearität der SHP2 Phosphorylierung auf.

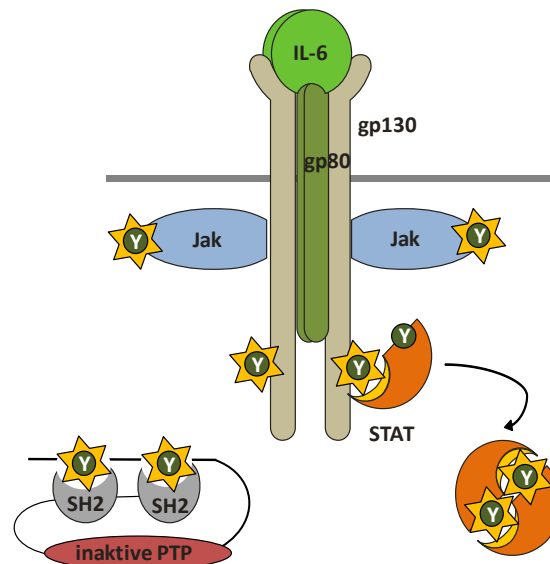
In HEK-gp80 Zellen induziert ein 6-minütiger Puls mit IL-6 eine Phosphorylierung von 60 % der SHP2 Moleküle (siehe Abb. 4.28). Ein 40 %iger *knockdown* von SHP2 verhindert die Phosphorylierung von SHP2 nahezu vollständig (siehe Abb. 4.38 D). Um diesen nichtlinearen Zusammenhang zwischen der Anzahl von SHP2 Molekülen und dem Grad der IL-6-induzierten Phosphorylierung von SHP2 mit dem Model abzubilden, wurde in  $M^6$  ein positiver *feedback* von phosphorylierter SHP2 auf die Phosphorylierung von SHP2 eingeführt (siehe Abb. 4.41). Die Nichtlinearität der Phosphorylierung von SHP2 kann durch die Interaktion von SHP2 mit gp130 erklärt werden (42), die ein prototypisches Beispiel für die Komplexität der Interaktion zwischen Signalproteinen mit multiplen Domänen ist. Die Bindung an Y759 in gp130 kann sowohl über die N- als auch über die C-terminale SH2 Domäne von SHP2 erfolgen. Zusätzlich kann die PTP Domäne von SHP2 an ihre potentiellen Substrate die phosphorylierten Tyrosylreste Y759, Y767, Y814, Y905 und Y915 in gp130 binden. Weiterhin stehen in einem akti-

vierten Rezeptordimer zwei phosphorylierte Y759 als Bindungspartner für die zwei SH2-Domänen und zweimal fünf phosphorylierte Tyrosylreste als Bindungspartner für die PTP zur Verfügung. Barua *et al.* (50) haben diese Interaktionen in einem kinetischen Modell analysiert und zeigen über 1000 mögliche Interaktionskombinationen, die in einer nichtlinearen Phosphorylierung von SHP2 resultieren können.

### **5.3.7. SHP2 ist kein früher *feedback* Inhibitor**

Neben der Definition von Reaktionen, die essentiell für die Dynamik der frühen IL-6-induzierten Signaltransduktion sind, stand die Funktion von SHP2 in der frühen IL-6-induzierten Jak/STAT Signaltransduktion im Mittelpunkt der Modellanalyse.

Da SHP2 konstitutiv exprimiert wird, könnte sie, im Gegensatz zu den SOCS3 Proteinen, die erst in der späten Signaltransduktion exprimiert werden, als früher *feedback* Inhibitor der IL-6-induzierten Signaltransduktion wirken. Yamada *et al.* zeigen jedoch an einem mathematischen Modell, dass SHP2 keinen Einfluss auf die Jak/STAT Signaltransduktion hat (57). Im Gegensatz dazu zeigen verschiedene qualitative Studien, dass SHP2 die Phosphorylierung von gp130, Jak1 und STAT3 reduzieren kann (40, 43) und aktivierende pathogene SHP2 Mutanten mit einer reduzierten STAT3 Phosphorylierung assoziiert werden (56). Um diesen Konflikt zu lösen wurde in dieser Arbeit basierend auf einem identifizierbaren mathematischen Modell der Einfluss von SHP2 auf die frühe IL-6-induzierte Signaltransduktion untersucht. Das hier präsentierte Modell ist die einzige systembiologische Arbeit, die die Resultate der Strukturanalyse von SHP2 mit in die Modellierung einfließen lässt (44-46). Die Strukturanalyse zeigt, dass die IL-6-induzierte Phosphorylierung von SHP2 an Y542 und Y580 die intramolekulare Interaktion der phosphorylierten Tyrosine mit den zwei SH2 Domänen in SHP2 bewirkt (siehe Abb. 1.3). Diese intramolekulare Interaktion verhindert die Interaktion von SHP2 mit dem phosphorylierten Y759 in gp130 und resultiert in der Dissoziation von SHP2 vom aktivierten Rezeptor. Folglich befindet sich phosphorylierte SHP2 nicht in räumlicher Nähe des aktiven Rezeptors und kann nicht als Inhibitor wirken (Abb. 5.9).



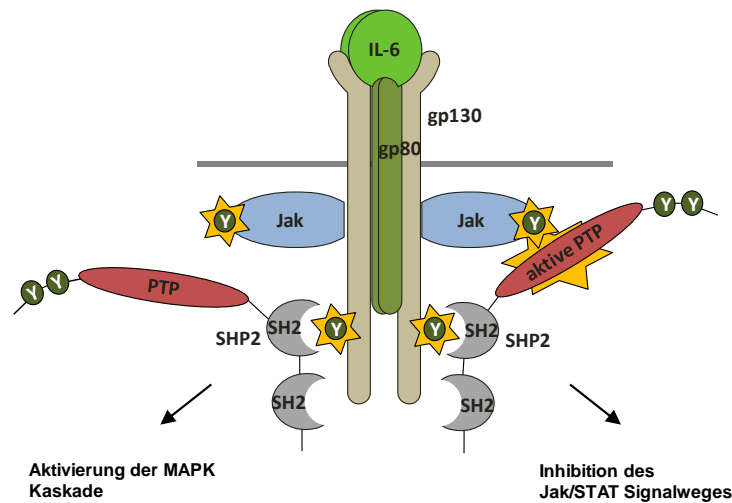
**Abb. 5.9 Phosphorylierte SHP2 kann nicht an Y759 in gp130 binden**

Im Gegensatz dazu bilden Raia *et al.* (217) die zu SHP2 homologe Phosphatase SHP1 als konstitutiv aktiven Inhibitor der IL-13-induzierten JAK/STAT Signaltransduktion ab. Sie bilden somit weder die Aktivierung von SHP1 durch die Interaktion der N-terminalen SH-Domäne mit phosphorylierten Tyrosylresten anderer Moleküle (218) noch die Aktivierung durch die Interaktion der SH2-Domänen mit den phosphorylierten Y536 und Y564 im C-terminalen Bereich von SHP1 ab (219). Bachmann *et al.* (145) sowie Yamada *et al.* (57) und die auf (57) basierenden Arbeiten (141, 212, 220) bilden SHP1 bzw. SHP2 als klassische, posttranslational aktivierte *feedback* Inhibitoren ab. Die Phosphorylierung von SHP1 bzw. SHP2 aktiviert ihre Phosphatasefunktion. Im Gegensatz zu dem in dieser Arbeit entwickelten Modell ist somit in (57, 145) die phosphorylierte und nicht die unphosphorylierte SHP2 ein Inhibitor der Zytokin-induzierten Signaltransduktion.

In HEK-gp80 Zellen sind zum Zeitpunkt der maximalen Phosphorylierung ca. 40 % der SHP2 Moleküle unphosphoryliert (siehe Abb. 4.28). Da ca. 100 x mehr SHP2 Moleküle exprimiert werden, als gp130 (siehe Tabelle 4.2 in Kapitel 4.2.5.2) könnte jedes gp130 Molekül durch eine unphosphorylierte SHP2 inhibiert werden. Die schrittweise identifizierbarkeitsbasierte Modellmodifikation zeigte jedoch, dass SHP2 kein früher *feedback* Inhibitor der IL-6-induzierten Signaltransduktion ist (siehe Kapitel 4.2.9.4 und 4.2.13.3). Die Bindung von SHP2 an gp130 resultiert jedoch nicht nur in der Inhibition der JAK/STAT Signaltransduktion, sondern auch in der Aktivierung der MAPK Kaskade (Abb. 5.10, siehe (16) zur Übersicht). An Y759 gebundenes SHP2 rekrutiert den Grb2-SOS Komplex an gp130 (221). Die Rekrutierung des Grb2-SOS Komplex resultiert in der Aktivierung von Ras, welches wiederum die Ras-Raf-MAPK Kaskade aktiviert. Weiterhin kann an Y759 bindendes SHP2 mit Gab1 interagieren und so zur Aktivierung der MAPK Kaskade beitragen (222). Bis heute ist der genaue Mechanismus der Aktivierung der MAPK Kaskade und die genaue molekulare Funktion von SHP2 in diesem Ablauf un-



bekannt. Es ist jedoch möglich, dass die Interaktion von SHP2 mit Grb2 oder Gab1 sterisch verhindert, dass SHP2 als früher *feedback* Inhibitor der Jak/STAT Signaltransduktion dient.



**Abb. 5.10 Die Bindung von SHP2 an Y759 resultiert in der Aktivierung der MAPK Kaskade und der Inhibition der Jak/STAT Signaltransduktion**

Während in dieser Arbeit eindeutig belegt wurde, dass SHP2 kein früher *feedback* Inhibitor der IL-6-induzierten Jak/STAT Signaltransduktion ist, zeigen viele experimentelle Arbeiten, dass ein *knock-down* oder die Inhibition von SHP2 eine verstärkte Zytokin-induzierte Jak/STAT Signaltransduktion auslöst (z.B. (43, 223)).

Diese Studien untersuchen jedoch nicht die Dynamik der frühen Zytokin-induzierten Signaltransduktion, sondern die Aktivierung des Signalweges zu späteren Zeitpunkten. Es ist möglich, dass SHP2 zu späteren Zeitpunkten zur Beendigung der Jak/STAT Signaltransduktion beiträgt. In diesem Fall würde SHP2 gemeinsam mit SOCS3 als später Regulator der IL-6-induzierten Signaltransduktion wirken. Während SOCS3 durch die Inhibition von Jak1 die Phosphorylierung weiterer Signalmoleküle verhindert (67), könnte SHP2 die bereits phosphorylierten Signalmoleküle dephosphorylieren. SOCS3 und SHP2 binden jedoch beide an das phosphorylierte Y759 in gp130 (43, 60). De Souza *et al.* zeigen, dass die Affinität von SOCS3 an gp130 stärker ist als die Affinität von SHP2 an Y759 (224). SHP2 könnte daher durch SOCS3 vom Rezeptor verdrängt werden. Es ist jedoch zu beachten, dass SHP2 unabhängig von der Interaktion mit Y759 in gp130 an Jak1 (51) und STAT3 (52) binden kann. In diesem Fall könnte SHP2 als später Negativregulator der Jak/STAT-Signaltransduktion dienen, ohne an Y759 in gp130 zu binden. Da die Halblebenszeit von SOCS3 sehr kurz ist (225) und die Expression des SOCS3 Proteins nach Stimulation mit IL-6 oszillieren kann (60, 143), ist es zusätzlich möglich, dass SHP2 an Y759 bindet wenn die Expression von SOCS3 gering ist.

Zusammengefasst zeigt diese Arbeit, dass es die Kombination quantitativer experimentell generierter Daten und identifizierbarkeitsbasierter Modellmodifikation ermöglicht neue biologische Aussagen zu

---

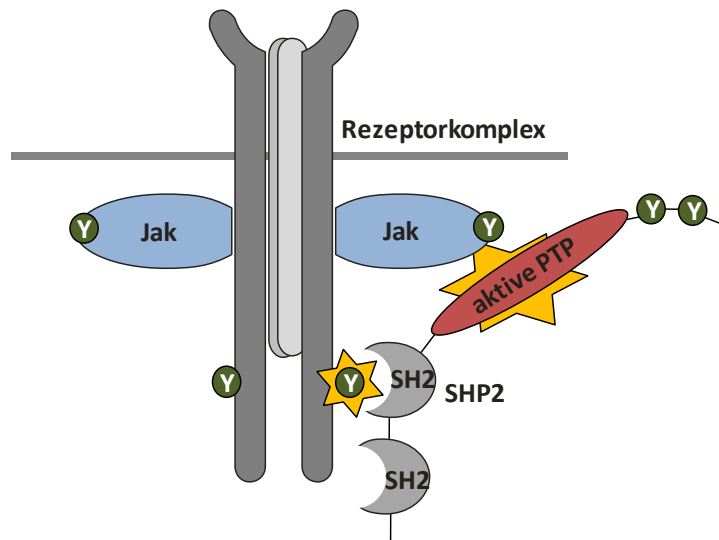
generieren. Dazu ist es jedoch notwendig identifizierbare Modelle zu entwickeln. Da große Modelle häufig nicht identifizierbare Parameter beinhalten (139), müssen zunächst kleine, identifizierbare Module eines Signaltransduktionsweges generiert werden. An Hand dieser kleinen Modelle können, wie in dieser Arbeit gezeigt, essentielle Charakteristika eines Signalweges aufgedeckt werden. In der Zukunft kann ausgehend von dem kleinen identifizierbaren Modell M<sup>8</sup> eine Erweiterung erfolgen, die z.B. die späte IL-6-induzierte Signaltransduktion und das Gleichgewichts zwischen MAPK Kaskade und Jak/STAT Signaltransduktion darstellt. Dieser Ansatz kann helfen die Pathogenese von Krankheiten zu verstehen, die durch ein Ungleichgewicht zwischen MAPK Kaskade und Jak/STAT Signaltransduktion entstehen können (226).

### 5.3.8. SHP2 ist ein basaler Repressor

Neben der systembiologischen Analyse der Funktion von SHP2 in der IL-6-induzierten Signaltransduktion erfolgte in dieser Arbeit eine experimentelle Analyse der Funktion von SHP2 in Abwesenheit von IL-6. Der *knockdown* von SHP2 resultiert in einer basalen Phosphorylierung von STAT3, die linear mit steigender SHP2 *knockdown* Effizienz auf bis zu 20 % der STAT3 Gesamtmenge ansteigt (siehe Abb. 4.45). SHP2 unterdrückt somit als basaler Repressor eine Liganden-unabhängige Aktivierung des Jak/STAT Signalweges (siehe Abb. 5.11).

Diese Ergebnisse stimmen mit Lehmann et al. (43) überein. Die Expression dominant negativer SHP2 induziert neben einer verstärkten späten IL-6-induzierten Jak/STAT Signaltransduktion auch eine basale Phosphorylierung von gp130, Jak1 und STAT3. In (43) wurde diese basale Aktivierung jedoch weder adressiert noch quantifiziert. Die basale Phosphorylierung von Jak1 impliziert, dass Jak1 eine basale Aktivität besitzt, die durch die konstitutive Anwesenheit von SHP2 unterdrückt wird. Neben Jak1 kann STAT3 jedoch auch durch andere Mitglieder der Jak-Familie oder Mitglieder der src Kinase Familie aktiviert werden (siehe (16) zur Übersicht). Diese könnten ebenfalls zur basalen Aktivierung der Jak/STAT Signaltransduktion beitragen.

Interessanterweise ist in SHP2 defizienten Hepatozyten keine basale Phosphorylierung von STAT3 detektierbar (227). Es ist jedoch möglich, dass in der Leber, die das primäre Zielorgan von IL-6 ist, mehrere Repressoren exprimiert werden, die eine basale Aktivierung der Jak/STAT Signaltransduktion effektiv unterbinden. In diesem Fall würde der *knockout* eines Repressors, in diesem Fall SHP2, keine basale Aktivierung auslösen.



**Abb. 5.11 SHP2 ist ein basaler Repressor** SHP2 kann den spontan aktivierten Rezeptorkomplex dephosphorylieren und verhindert so eine spontane Liganden-unabhängige Aktivierung der Jak/STAT Signaltransduktion.

Eine basale, Stimulus-unabhängige Phosphorylierung von STAT3 kann in vielen malignen Erkrankungen nachgewiesen werden (z.B. (228)). Die Unterdrückung dieser basalen STAT3 Phosphorylierung durch SHP2 könnte die Entwicklung von Tumoren unterdrücken. SHP2 würde in diesem Zusammenhang als Tumorsuppressor dienen (227). Dies ist besonders interessant, da SHP2 *gain-of-function* Mutanten u.a. die Entwicklung von Leukämien fördern und SHP2 somit auch als Proto-Onkogen angesehen wird (229, 230). Die Definition von SHP2 als Proto-Onkogen förderte die Entwicklung pharmazeutischer SHP2 Inhibitoren (231). Es ist daher notwendig zu untersuchen ob SHP2 Inhibitoren, durch die Unterbindung der basalen Repression, eine basale Phosphorylierung von STAT3 fördern und im schlimmsten Fall kontraindiziert zur Tumorgenese beitragen.

Zusammenfassend zeigt diese Arbeit, dass die Regulation der IL-6-induzierten Signaltransduktion ein komplexes nichtlineares Zusammenspiel verschiedener Inhibitoren ist. Die Bindung der beiden Inhibitoren SOCS3 und SHP2 an das phosphorylierte Y759 in gp130 dient dabei als zentraler Regulator der IL-6-induzierten STAT3 Phosphorylierung. Obwohl viele anti-inflammatorische Medikamente, wie z.B. Glukokortikoide, oder Tumorthérapien diese Inhibitoren beeinflussen ist ihr genaues Zusammenspiel bis heute nicht vollständig verstanden.

---

## 6. Ausblick

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Reduktion der SOCS3 Expression durch Glukokortikoide die IL-6-induzierte Akut-Phase Expression verstärkt und dass SHP2 kein früher *feedback* Inhibitor, sondern ein basaler Repressor der IL-6-induzierten Signaltransduktion ist. Aus diesen Ergebnissen ergeben sich neue Fragestellungen, die in weiteren Versuchen adressiert werden müssen.

### 6.1. Welche pathophysiologischen Konsequenzen hat die durch Glukokortikoide verstärkte Akut-Phase Protein Expression?

Dexamethason verstärkt die Expression hepatischer Akut-Phase Proteine durch mehrere unabhängige Mechanismen. Hierzu gehören die genspezifische Verstärkung der Transkription (z.B. (116)), die Induktion der gp80 Expression (119) und die in dieser Arbeit nachgewiesene Reduktion der SOCS3 Expression. Die physiologischen Konsequenzen der verstärkten Akut-Phase Reaktion sind jedoch noch unklar. Um den Einfluss von Glukokortikoiden auf die Expression von Akut-Phase Genen bei einem akuten oder chronischen Verlauf einer Entzündung zu untersuchen, ist es wichtig *in vivo* den Einfluss von Glukokortikoiden auf die Expression von Akut-Phase Proteinen sowohl in Modellsystemen akuter Entzündungen als auch in Modellsystemen chronischer Entzündungen zu untersuchen. Diese Studien werden helfen zu verstehen, ob die verstärkte Expression der Akut-Phase Proteine zu den Nebenwirkungen der Glukokortikoide beiträgt oder zu einer schnelleren Wiederherstellung der Homöostase nach einem schädigenden Reiz beiträgt.

### 6.2. Reguliert Dexamethason auch die nicht hepatische SOCS3 Expression ?

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Dexamethason die IL-6-induzierte SOCS3 Expression in Hepatozyten (siehe Abb. 4.4) und in Fibroblasten (siehe Abb. 4.9 A) reduziert. Interleukin-6 ist jedoch ein pleiotropes Zytokin und reguliert neben der Expression der Akut-Phase Proteine in der Leber auch viele andere Prozesse. So induziert es die Synthese von Antikörpern in B-Zellen (232), fördert die Entwicklung von T<sub>H</sub>17 Zellen (233), beeinflusst den Knochenmetabolismus (234) und die Hämatopoese (235). Weiterhin stimuliert IL-6 die Synthese des adrenokortikotropen Hormons im Hypophysenvorderlappen und induziert so die Sekretion des endogenen Glukokortikoids Kortisol (20). Es ist daher zu erwarten, dass die SOCS3 Expression auch in anderen Zelltypen durch Glukokortikoide beeinflusst wird. Wenn Dexamethason z.B. in hypophysären Zellen die IL-6-induzierte Signaltransduktion verstärkt, könnte ein positiver *feedback* zwischen IL-6 und Glukokortikoiden zu einer verstärkten Synthese von endogenem Kortisol führen.

Es ist daher wichtig, den Einfluss von Dexamethason auf die IL-6-induzierte Signaltransduktion in nicht hepatischen Zellen zu untersuchen. Die Ergebnisse können helfen, die noch nicht vollständig verstandenen molekularen Mechanismen der Glukokortikoid Therapie zu verstehen.

### **6.3. Induzieren Glukokortikoide die Expression von miRNA gegen SOCS3?**

Die durch Dexamethason vermittelte Reduktion der SOCS3 Expression ist abhängig von der Glukokortikoid-induzierten Transkription von Zielgenen (siehe Abb. 4.8) und beeinflusst die SOCS3 Expression wahrscheinlich auf Ebene der Translation. Es ist daher möglich, dass Glukokortikoide, die Transkription von miRNAs induzieren, welche die Translation von SOCS3 hemmen. Um den genauen molekularen Mechanismus der Glukokortikoid-vermittelten Reduktion der SOCS3 Expression aufzudecken, muss eine globale Analyse der Glukokortikoid-induzierten miRNAs erfolgen. Die Ergebnisse dieser Analyse werden im Vergleich mit der bioinformatischen Analyse des 3'UTR von SOCS3 (siehe Abb. 5.5) helfen, miRNAs zu finden, die potentiell die Reduktion der SOCS3 Konzentration vermitteln können. Eine miRNA kann die Translation von mehreren hundert Genen regulieren (siehe (195) zur Übersicht). Aus diesem Grund wird es interessant sein zu untersuchen, welche Gene neben SOCS3 durch Glukokortikoide reguliert werden und welchen Einfluss diese Regulation auf die Therapie entzündlicher Krankheiten hat.

Falls diese Studien keinen Einfluss einer Glukokortikoid-vermittelten miRNA Expression auf die SOCS3 Translation zeigen, ist es notwendig weitere genspezifische Mechanismen der Translationsregulation zu untersuchen. Diese könnte zum Beispiel durch die Bindung von Translations-hemmenden Proteinen (236) oder Riboproteinen (237) an die mRNA erfolgen.

### **6.4. Wie unterscheidet sich die Dynamik der IL-6-induzierten Signaltransduktion in verschiedenen Zelltypen?**

Die quantitative Analyse der frühen IL-6-induzierten Jak/STAT Signaltransduktion unterscheidet sich in verschiedenen Zelltypen stark. So konnte in dieser Arbeit in HEK-gp80 Zellen eine nahezu vollständige Aktivierung von Jak1 und STAT3 (siehe Abb. 4.27 und 5.7) nachgewiesen werden, während in Hepatozyten nur ca. 20 % der STAT3 Moleküle durch eine Stimulation mit IL-6 phosphoryliert werden (204). Beide Zelltypen unterscheiden sich sowohl in ihrer Größe als auch in der Stöchiometrie der Signalmoleküle deutlich. Die Konzentration und somit die Verfügbarkeit einzelner Signalmoleküle kann, unabhängig von der Expression regulatorischer Proteine, eine zelluläre Antwort steuern. Zusätzlich beeinflusst die Größe der Zelle die Gewichtung von Diffusion und gerichtetem Transport einzelner Moleküle. In der Zukunft wird die experimentelle Bestimmung von Diffusionskonstanten und die räumliche Auflösung von Einzelmolekülen in Zellen die Möglichkeit bieten, den Einfluss von Diffusion und Transport in räumlich aufgelösten mathematischen Modellen zu untersuchen. Auf diese Weise wird es möglich sein zu verstehen, wieso verschiedene Zellen in einem Organismus denselben Signaltransduktionsweg unterschiedlich stark und schnell aktivieren.

### **6.5. Welchen Einfluss hat SHP2 auf die späte IL-6-induzierte Signaltransduktion?**

Während viele experimentelle Arbeiten zeigen, dass SHP2 ein Inhibitor des Jak/STAT Signalweges ist (z.B. (43, 223)), konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass SHP2 zumindest die frühe IL-6-induzierte Signaltransduktion nicht beeinflusst. Es ist interessant Modell M<sup>8</sup> (siehe Abb. 4.42 A) zu erweitern, um neben der frühen auch die späte IL-6-induzierte Signaltransduktion zu untersuchen und abzubilden. Dies wird neben der Generation weiterer quantitativer Daten, die einen größeren Zeitrahmen umfassen, auch eine grundlegende strukturelle Veränderung des Modells verlangen. Während in dem hier präsentierten Modell die Funktion von SOCS3 vernachlässigt werden konnte, muss diese in der späten IL-6-induzierten Signaltransduktion abgebildet werden. Da beide Inhibitoren konkurrierend an Y759 in gp130 binden, wird es notwendig sein, die im Rahmen der Modellmodifikation getroffene Vereinfachung der Komplexbildung zu modifizierten Reaktionen erster Ordnung zu revidieren. Des Weiteren muss in der Zukunft auch der Einfluss weiterer Phosphatasen, wie z.B. TC-PTP (36) und anderer Inhibitoren, z.B. PIAS (37), im Modell abgebildet werden.

### **6.6. Welchen Einfluss hat Y759 in gp130 auf die IL-6-induzierte Signaltransduktion?**

Die Bindung von SHP2 an das phosphorylierte Y759 ermöglicht neben der Negativregulation des Jak/STAT Signalweges auch die Aktivierung der MAPK Kaskade (40). Somit ist Y759 ein zentraler Regulationspunkt der IL-6-induzierten Signaltransduktion, an dem das Gleichgewicht zwischen MAPK Kaskade und Jak/STAT Signalweg gesteuert wird. Wird das Gleichgewicht zwischen MAPK Kaskade und Jak/STAT Signalweg gestört, können sich Krankheiten entwickeln (siehe (226) zur Übersicht). Die Entwicklung eines mathematischen Modells, welches sowohl die MAPK Kaskade als auch den Jak/STAT Signalweg abbildet, wird helfen dieses Gleichgewicht zu verstehen. Zentrale Fragestellungen werden sein:

- (1) Wie initiiert SHP2 die MAPK Kaskade, wenn phosphorylierte SHP2 vom Rezeptor dissoziiert?
- (2) Kann SHP2 gleichzeitig die MAPK initiieren und die Jak/STAT Signaltransduktion inhibieren?
- (3) Können an ein Rezeptordimer SHP2 und SOCS3 binden oder verdrängt SOCS3 SHP2?

### **6.7. Ist SHP2 in allen Zellen ein basaler Repressor und welche Kinasen sind basal aktiv?**

Die Ergebnisse dieser Arbeit und die Daten von Lehmann *et al.* (43) zeigen, dass SHP2 ein basaler Repressor einer Zytokin-unabhängigen Rezeptoraktivierung ist. Im Gegensatz dazu ist in SHP2 defizienten Hepatozyten keine basale STAT3 Phosphorylierung nachzuweisen (227). In der Zukunft muss daher untersucht werden, welche basal aktiven Kinasen STAT3 phosphorylieren und ob in verschiedenen Zelltypen neben SHP2 weitere basale Repressoren exprimiert werden.

## 7. Zusammenfassung

IL-6 ist ein wichtiger Regulator der Entzündungsreaktion. Sein Wirkungsspektrum umfasst sowohl pro- als auch anti-inflammatorische Eigenschaften. Eine konstitutive oder deregulierte IL-6-induzierte Jak/STAT Signaltransduktion kann chronische Entzündungen und Tumorstadium auslösen. Unter physiologischen Bedingungen wird die Jak/STAT Signaltransduktion durch verschiedene Repressoren kontrolliert. Zu diesen Repressoren gehören der *feedback* Inhibitor SOCS3 und die Proteintyrosinphosphatase SHP2.

Glukokortikoide haben anti-inflammatorische Eigenschaften und werden in der Therapie entzündlicher Krankheiten eingesetzt. Im ersten Teil dieser Arbeit wurde gezeigt, dass das synthetische Glukokortikoid Dexamethason die IL-6-induzierte Akut-Phase Reaktion in Hepatom Zellen, in primären murinen Hepatozyten und *in vivo* verstärkt, indem es die Expression des *feedback* Inhibitors SOCS3 reduziert. In SOCS3 defizienten Zellen und in Hepatozyten, in denen das SOCS3 Rekrutierungsmotiv in gp130 mutiert ist, wird daher die Akut-Phase Reaktion durch Glukokortikoide nicht erhöht. Die Verminderung der SOCS3 Expression wird weder durch die Reduktion der IL-6-induzierten frühen STAT3 Phosphorylierung, der STAT3 Kerntranslokation, der SOCS3 Promotoraktivierung noch durch eine Reduktion der Halblebenszeit der SOCS3 mRNA oder des SOCS3 Proteins vermittelt. Jedoch ist die transkriptionelle Aktivität des Glukokortikoid Rezeptors essentiell für die beobachtete Verstärkung der Akut-Phase Reaktion. Die hier präsentierten Daten stellen einen neuen globalen Mechanismus der Integration von anti-inflammatorischen Glukokortikoiden und dem im Verlauf einer Entzündung sezernierten IL-6 dar.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde ein identifizierbares, prädiktives mathematisches Modell der frühen IL-6-induzierten Signaltransduktion entwickelt. Hierzu wurde ein iterativer Zyklus aus Modelldefinition, identifizierbarkeitsbasierter Modellmodifikation und Generierung quantitativer Daten durchlaufen. Die Daten umfassen die Quantifizierung der Stöchiometrie und der Dynamik der frühen IL-6-induzierten Signaltransduktion in WT und SHP2 *knockdown* Zellen. Die Modellmodifikation zeigte auf, dass 1) die schrittweise Rezeptorassoziation, 2) die Dimerisierung von STAT3 am Rezeptor und 3) die nichtlineare Phosphorylierung von SHP2 essentiell für die Dynamik der IL-6-induzierten Signaltransduktion sind. Interessanterweise zeigt das Modell, dass SHP2 kein früherer *feedback* Inhibitor der frühen IL-6-induzierten Signaltransduktion ist. Zusätzlich zeigen quantitative Experimente eine bisher nicht beschriebene Funktion von SHP2 als basaler Repressor einer spontanen Zytokin-unabhängigen Aktivierung des Rezeptors. SHP2 könnte somit eine essentielle Funktion in der Unterdrückung einer konstitutiven unkontrollierten Aktivierung des Jak/STAT Signalweges einnehmen, die mit vielen inflammatorischen und proliferativen Krankheiten assoziiert wird.

---

## 8. Summary

IL-6 is a well known mediator of inflammatory signals. Misregulated or constitutive IL-6-induced Jak/STAT signaltransduction contributes to chronic inflammatory diseases and tumorigenesis. Under non-pathological conditions Jak/STAT signaling is tightly regulated by a complex network of inhibitors. Two of these inhibitors are the *feedback* inhibitor SOCS3 and the protein tyrosine phosphatase SHP2.

Glucocorticoids are known as potent regulators of inflammation and have been used pharmacologically to improve inflammatory, immune and lymphoproliferative diseases for more than 50 years. In the first part of this thesis it is demonstrated that the synthetical glucocorticoid dexamethasone enhances the IL-6-induced acute-phase response in hepatoma cells, primary murine hepatocytes, and *in vivo*. This is caused by the downregulation of the SOCS3 protein expression. Consequently, in SOCS3 deficient cells glucocorticoids do not affect the IL-6-induced expression of acute-phase proteins. Moreover, in hepatocytes lacking the SOCS3 recruiting motif within gp130, the synthesis of acute-phase proteins is not enhanced by dexamethasone. The downregulation of SOCS3 expression is neither caused by a reduction of early IL-6-induced STAT3 phosphorylation, STAT3 nuclear translocation or reduced SOCS3 promoter activity nor by a destabilization of SOCS3 mRNA or protein. However, the transcriptional activity of the glucocorticoid receptor (transactivation) is essential for the up regulation of the expression of acute-phase proteins.

In summary a new global mechanism for the integration of anti-inflammatory glucocorticoids and the IL-6-induced acute-phase response has been described.

In the second part of this thesis an identifiable model of early Jak/STAT signaling was developed that adequately describes quantitative experimental data and proved to be predictive. To develop the model an iterative cycle of model definition, identifiability based model refinement, computational experimental design and generation of quantitative biochemical experiments was applied. The quantitative biochemical experiments comprise the analysis of the stoichiometry and the dynamics of the early IL-6-induced Jak/STAT signaltransduction in wild type and SHP2 knockdown cells. The model-based analysis implies that 1) the stepwise assembly of the receptor, 2) the dimerization of STAT3 at the receptor, and 3) the nonlinear phosphorylation of SHP2 are essential for the dynamics of early pathway activation. Most importantly it was found that SHP2 does not act as feedback inhibitor of early IL-6-induced Jak/STAT signaling. However, experimental data reveal that SHP2 acts as basal repressor of cytokine-independent basal receptor activity. Hence, SHP2 might have an essential function in the repression of constitutive cytokine-independent Jak/STAT pathway activation, which is associated with chronic inflammatory diseases and tumor genesis.



## 9. Anhang

### Mathematische Repräsentation der identifizierbarkeitsbasierten Modellmodifikation

Die Abbildung der Differentialgleichungen erfolgt mit Erlaubnis von Tom Quaiser. Tabellen: (167)

#### Modell $M^0$

Variablen	Beschreibung	Startwerte	Differentialgleichungen
$x_1$	R	1.32	$\dot{x}_1 = -v_1 - v_9 + v_{13}$
$x_2 \rightarrow u$	IL	0.475	
$x_3$	SHP2	222.36	$\dot{x}_3 = -v_3 + v_6 + v_{10} + v_{13} + v_{20}$
$x_4$	STAT	108.08	$\dot{x}_4 = -v_8 - v_{15}$
$x_5$	R_IL	0	$\dot{x}_5 = +v_1 - v_2 + v_6$
$x_6$	actR_IL	0	$\dot{x}_6 = +v_2 - v_3 + v_4 + v_7 - v_8 + v_{16}$
$x_7$	actR_IL_SHP2	0	$\dot{x}_7 = +v_3 - v_4 - v_5 + v_{17}$
$x_8$	pSHP2	0	$\dot{x}_8 = +v_4 + v_{11} - v_{20}$
$x_9$	actR	0	$\dot{x}_9 = +v_9 + v_{10} + v_{11} + v_{14} - v_{15} - v_{16}$
$x_{10}$	actR_SHP2	0	$\dot{x}_{10} = -v_{10} - v_{11} + v_{12} - v_{17}$
$x_{11}$	actR_STAT	0	$\dot{x}_{11} = -v_{14} + v_{15} - v_{19}$
$x_{12}$	actR_IL_STAT	0	$\dot{x}_{12} = -v_7 + v_8 + v_{19}$
$x_{13}$	actSTAT	0	$\dot{x}_{13} = +v_7 + v_{14}$
$x_{14}$	R_IL_SHP2	0	$\dot{x}_{14} = +v_5 - v_6 + v_{18}$
$x_{15}$	R_SHP2	0	$\dot{x}_{15} = -v_{12} - v_{13} - v_{18}$

#### Ratengleichungen

$$\begin{aligned}
 v_1 &= kf1 \cdot x_1 \cdot IL - kb1 \cdot x_5 \\
 v_2 &= kf2 \cdot x_5 \\
 v_3 &= kf3 \cdot x_6 \cdot x_3 - kb3 \cdot x_7 \\
 v_4 &= kf4 \cdot x_7 \\
 v_5 &= kf5 \cdot x_7 - kb5 \cdot x_{14} \\
 v_6 &= kf6 \cdot x_{14} \\
 v_7 &= kf7 \cdot x_{12} \\
 v_8 &= kf8 \cdot x_6 \cdot x_4 \\
 v_9 &= kf9 \cdot x_1 \\
 v_{10} &= kb10 \cdot x_{10} - kf10 \cdot x_3 \cdot x_9 \\
 v_{11} &= kf11 \cdot x_{10} \\
 v_{12} &= kb12 \cdot x_{15} - kf12 \cdot x_{10} \\
 v_{13} &= kf13 \cdot x_{15} \\
 v_{14} &= kf14 \cdot x_{11} \\
 v_{15} &= kf15 \cdot x_9 \cdot x_4 \\
 v_{16} &= kf1 \cdot x_9 \cdot IL - kb1 \cdot x_6 \\
 v_{17} &= kf1 \cdot x_{10} \cdot IL - kb1 \cdot x_7 \\
 v_{18} &= kf1 \cdot x_{15} \cdot IL - kb1 \cdot x_{14} \\
 v_{19} &= kf1 \cdot x_{11} \cdot IL - kb1 \cdot x_{12} \\
 v_{20} &= kf20 \cdot x_8
 \end{aligned}$$

**Modell M<sup>1</sup>**

Variablen	Beschreibung	Startwerte	Differentialgleichungen
$x_1$	gp130	1.32	$\dot{x}_1 = -v_1 - v_9 + v_{13}$
$x_2 \rightarrow u$	IL	0.475	
$x_3$	SHP2	222.36	$\dot{x}_3 = -v_3 + v_6 + v_{10} + v_{13} + v_{20}$
$x_4$	STAT	108.08	$\dot{x}_4 = -v_8 - v_{15}$
$x_5$	R_IL	0	$\dot{x}_5 = +v_1 - v_2 + v_6$
$x_6$	actR_IL	0	$\dot{x}_6 = +v_2 - v_3 + v_4 + v_7 - v_8 + v_{16}$
$x_7$	actR_IL_SHP2	0	$\dot{x}_7 = +v_3 - v_4 - v_5 + v_{17}$
$x_8$	pSHP2	0	$\dot{x}_8 = +v_4 + v_{11} - v_{20}$
$x_9$	actGp130	0	$\dot{x}_9 = +v_9 + v_{10} + v_{11} + v_{14} - v_{15} - v_{16}$
$x_{10}$	actGp130_SHP2	0	$\dot{x}_{10} = -v_{10} - v_{11} + v_{12} - v_{17}$
$x_{11}$	actGp130_STAT	0	$\dot{x}_{11} = -v_{14} + v_{15} - v_{19}$
$x_{12}$	actR_IL_STAT	0	$\dot{x}_{12} = -v_7 + v_8 + v_{19}$
$x_{13}$	actSTAT	0	$\dot{x}_{13} = +v_7 + v_{14}$
$x_{14}$	R_IL_SHP2	0	$\dot{x}_{14} = +v_5 - v_6 + v_{18}$
$x_{15}$	gp130_SHP2	0	$\dot{x}_{15} = -v_{12} - v_{13} - v_{18}$
$x_{16}$	gp80	133.10	$\dot{x}_{16} = -v_{21}$
$x_{17}$	gp80_IL	0	$\dot{x}_{17} = -v_1 - v_{16} - v_{17} - v_{18} - v_{19} + v_{21}$

**Ratengleichungen**

$$\begin{aligned}
 v_1 &= kf1 \cdot x_1 \cdot x_{17} - kb1 \cdot x_5 \\
 v_2 &= kf2 \cdot x_5 \\
 v_3 &= kf3 \cdot x_6 \cdot x_3 - kb3 \cdot x_7 \\
 v_4 &= kf4 \cdot x_7 \\
 v_5 &= kf5 \cdot x_7 - kb5 \cdot x_{14} \\
 v_6 &= kf6 \cdot x_{14} \\
 v_7 &= kf7 \cdot x_{12} \\
 v_8 &= kf8 \cdot x_6 \cdot x_4 \\
 v_9 &= kf9 \cdot x_1 \\
 v_{10} &= kb10 \cdot x_{10} - kf10 \cdot x_3 \cdot x_9 \\
 v_{11} &= kf11 \cdot x_{10} \\
 v_{12} &= kb12 \cdot x_{15} - kf12 \cdot x_{10} \\
 v_{13} &= kf13 \cdot x_{15} \\
 v_{14} &= kf14 \cdot x_{11} \\
 v_{15} &= kf15 \cdot x_9 \cdot x_4 \\
 v_{16} &= kf1 \cdot x_9 \cdot x_{17} - kb1 \cdot x_6 \\
 v_{17} &= kf1 \cdot x_{10} \cdot x_{17} - kb1 \cdot x_7 \\
 v_{18} &= kf1 \cdot x_{15} \cdot x_{17} - kb1 \cdot x_{14} \\
 v_{19} &= kf1 \cdot x_{11} \cdot x_{17} - kb1 \cdot x_{12} \\
 v_{20} &= kf20 \cdot x_8 \\
 v_{21} &= kf0 \cdot \text{IL} \cdot x_{16} - kb0 \cdot x_{17}
 \end{aligned}$$

Modell M<sup>2</sup>

Variablen	Beschreibung	Startwerte	Differentialgleichungen
$x_1$	gp130	1.32	$\dot{x}_1 = -v_1 - v_9 + v_{13}$
$x_2 \rightarrow u$	IL	0.475	
$x_3$	SHP2	222.36	$\dot{x}_3 = -v_3 + v_6 + v_{10} + v_{13} + v_{20}$
$x_4$	STAT	108.08	$\dot{x}_4 = -v_8 - v_{15}$
$x_5$	R_IL	0	$\dot{x}_5 = +v_1 - v_2 + v_6$
$x_6$	actR_IL	0	$\dot{x}_6 = +v_2 - v_3 + v_4 + v_7 - v_8 + v_{16}$
$x_7$	actR_IL_SHP2	0	$\dot{x}_7 = +v_3 - v_4 - v_5 + v_{17}$
$x_8$	pSHP2	0	$\dot{x}_8 = +v_4 + v_{11} - v_{20}$
$x_9$	actGp130	0	$\dot{x}_9 = +v_9 + v_{10} + v_{11} + v_{14} - v_{15} - v_{16}$
$x_{10}$	actGp130_SHP2	0	$\dot{x}_{10} = -v_{10} - v_{11} + v_{12} - v_{17}$
$x_{11}$	actGp130_STAT	0	$\dot{x}_{11} = -v_{14} + v_{15} - v_{19}$
$x_{12}$	actR_IL_STAT	0	$\dot{x}_{12} = -v_7 + v_8 + v_{19}$
$x_{13}$	actSTAT	0	$\dot{x}_{13} = +v_7 + v_{14}$
$x_{14}$	R_IL_SHP2	0	$\dot{x}_{14} = +v_5 - v_6 + v_{18}$
$x_{15}$	gp130_SHP2	0	$\dot{x}_{15} = -v_{12} - v_{13} - v_{18}$
$x_{16}$	gp80	133.10	$\dot{x}_{16} = -v_{21}$
$x_{17}$	gp80_IL	0	$\dot{x}_{17} = -v_1 - v_{16} - v_{17} - v_{18} - v_{19} + v_{21}$

## Ratengleichungen

$$\begin{aligned}
 v_1 &= kf1 \cdot x_1 \cdot x_{17} - kb1 \cdot x_5 \\
 v_2 &= kf2 \cdot x_5 \\
 v_3 &= kf3 \cdot x_6 \cdot x_3 - kb3 \cdot x_7 \\
 v_4 &= kf4 \cdot x_7 \\
 v_5 &= kf5 \cdot x_7 - kb5 \cdot x_{14} \\
 v_6 &= kf6 \cdot x_{14} \\
 v_7 &= kf7 \cdot x_{12} \\
 v_8 &= kf8 \cdot x_6 \cdot x_4 \\
 v_9 &= kf9 \cdot x_1 \\
 v_{10} &= kb3 \cdot x_{10} - kf3 \cdot x_3 \cdot x_9 \\
 v_{11} &= kf4 \cdot x_{10} \\
 v_{12} &= kb5 \cdot x_{15} - kf5 \cdot x_{10} \\
 v_{13} &= kf6 \cdot x_{15} \\
 v_{14} &= kf7 \cdot x_{11} \\
 v_{15} &= kf8 \cdot x_9 \cdot x_4 \\
 v_{16} &= kf1 \cdot x_9 \cdot x_{17} - kb1 \cdot x_6 \\
 v_{17} &= kf1 \cdot x_{10} \cdot x_{17} - kb1 \cdot x_7 \\
 v_{18} &= kf1 \cdot x_{15} \cdot x_{17} - kb1 \cdot x_{14} \\
 v_{19} &= kf1 \cdot x_{11} \cdot x_{17} - kb1 \cdot x_{12} \\
 v_{20} &= kf20 \cdot x_8 \\
 v_{21} &= kf0 \cdot IL \cdot x_{16} - kb0 \cdot x_{17}
 \end{aligned}$$

Modell M<sup>3</sup>

Variablen	Beschreibung	Startwerte	Differentialgleichungen
$x_1$	gp130	1.32	$\dot{x}_1 = -v_1 - v_5 + v_6$
$x_2 \rightarrow u$	IL	0,475	
$x_3$	SHP2	222.36	$\dot{x}_3 = +v_3 + v_6 + v_{11} - v_{15} - v_{16} - v_{17} - v_{18}$
$x_4$	STAT	216.17	$\dot{x}_4 = -v_4 - v_7 - v_{13} - v_{14}$
$x_5$	R_IL	0	$\dot{x}_5 = +v_1 - v_2 + v_3$
$x_6$	actR_IL	0	$\dot{x}_6 = +v_2 - v_4 + v_8 + v_{13} - v_{18}$
$x_8$	pSHP2	0	$\dot{x}_8 = -v_{11} + v_{15} + v_{17}$
$x_9$	actGp130	0	$\dot{x}_9 = +v_5 - v_7 - v_8 + v_{14} - v_{16}$
$x_{11}$	actGp130_STAT	0	$\dot{x}_{11} = +v_7 - v_{10} - v_{14}$
$x_{12}$	actR_IL_STAT	0	$\dot{x}_{12} = +v_4 + v_{10} - v_{13}$
$x_{13}$	actSTAT	0	$\dot{x}_{13} = +v_{13} + v_{14}$
$x_{14}$	R_IL_SHP2	0	$\dot{x}_{14} = -v_3 + v_9 + v_{18}$
$x_{15}$	gp130_SHP2	0	$\dot{x}_{15} = -v_6 - v_9 + v_{16}$
$x_{16}$	gp80	133.10	$\dot{x}_{16} = -v_{12}$
$x_{17}$	gp80_IL	0	$\dot{x}_{17} = -v_1 - v_8 - v_9 - v_{10} + v_{12}$

## Ratengleichungen

$$\begin{aligned}
 v_1 &= kf1 \cdot x_1 \cdot x_{17} - kb1 \cdot x_5 \\
 v_2 &= kf2 \cdot x_5 \\
 v_3 &= kf6 \cdot x_{14} \\
 v_4 &= kf8 \cdot x_6 \cdot x_4 \\
 v_5 &= kf9 \cdot x_1 \\
 v_6 &= kf6 \cdot x_{15} \\
 v_7 &= kf8 \cdot x_9 \cdot x_4 \\
 v_8 &= kf1 \cdot x_9 \cdot x_{17} - kb1 \cdot x_6 \\
 v_9 &= kf1 \cdot x_{15} \cdot x_{17} - kb1 \cdot x_{14} \\
 v_{10} &= kf1 \cdot x_{11} \cdot x_{17} - kb1 \cdot x_{12} \\
 v_{11} &= kf20 \cdot x_8 \\
 v_{12} &= kf0 \cdot IL \cdot x_{16} - kb0 \cdot x_{17} \\
 v_{13} &= x_{12} \cdot x_4 \cdot kf7 \\
 v_{14} &= x_{11} \cdot x_4 \cdot kf7 \\
 v_{15} &= x_3 \cdot x_9 \cdot k4 + x_3 \cdot x_{11} \cdot k4 \\
 v_{16} &= k3 \cdot x_9 \cdot x_3 \\
 v_{17} &= k4 \cdot x_3 \cdot x_6 + k4 \cdot x_3 \cdot x_{12} \\
 v_{18} &= k3 \cdot x_6 \cdot x_3
 \end{aligned}$$

Modell M<sup>4</sup>

Variablen	Beschreibung	Startwerte	Differentialgleichungen
$x_1$	gp130	1.32	$\dot{x}_1 = -v_2 - v_{12} + v_{13}$
$x_2 \rightarrow u$	IL	0.475	
$x_3$	SHP2	222.36	$\dot{x}_3 = +v_6 - v_{10} - v_{11}$
$x_4$	STAT	216.17	$\dot{x}_4 = -v_1 - v_3 - v_8 - v_9$
$x_6$	actR_IL	0	$\dot{x}_6 = -v_1 + v_4 + v_8 + v_{12}$
$x_8$	pSHP2	0	$\dot{x}_8 = -v_6 + v_{10} + v_{11}$
$x_9$	actGp130	0	$\dot{x}_9 = +v_2 - v_3 - v_4 + v_9 - v_{13}$
$x_{11}$	actGp130_STAT	0	$\dot{x}_{11} = +v_3 - v_5 - v_9$
$x_{12}$	actR_IL_STAT	0	$\dot{x}_{12} = +v_1 + v_5 - v_8$
$x_{13}$	actSTAT	0	$\dot{x}_{13} = +v_8 + v_9$
$x_{16}$	gp80	133.10	$\dot{x}_{16} = -v_7$
$x_{17}$	gp80_IL	0	$\dot{x}_{17} = -v_4 - v_5 + v_7 - v_{12}$

## Ratengleichungen

$$\begin{aligned}
 v_1 &= kf8 \cdot x_6 \cdot x_4 \\
 v_2 &= kf9 \cdot x_1 \\
 v_3 &= kf8 \cdot x_9 \cdot x_4 \\
 v_4 &= kf1 \cdot x_9 \cdot x_{17} - kb1 \cdot x_6 \\
 v_5 &= kf1 \cdot x_{11} \cdot x_{17} - kb1 \cdot x_{12} \\
 v_6 &= kf20 \cdot x_8 \\
 v_7 &= kf0 \cdot \text{IL} \cdot x_{16} - kb0 \cdot x_{17} \\
 v_8 &= x_{12} \cdot x_4 \cdot kf7 \\
 v_9 &= x_{11} \cdot x_4 \cdot kf7 \\
 v_{10} &= x_3 \cdot x_9 \cdot k4 + x_3 \cdot x_{11} \cdot k4 \\
 v_{11} &= k4 \cdot x_3 \cdot x_6 + k4 \cdot x_3 \cdot x_{12} \\
 v_{12} &= k2 \cdot x_1 \cdot x_{17} \\
 v_{13} &= k3new \cdot x_9 \cdot x_3
 \end{aligned}$$

**Modell M<sup>5</sup>**

Variablen	Beschreibung	Startwerte		Differentialgleichungen
		Exp. I	Exp. II	
$x_2 \rightarrow u$	IL	0.48	0.48	
$x_3$	SHP2	222.36	128.27	$\dot{x}_3 = +v_3 - v_5$
$x_4$	STAT	216.17	205.50	$\dot{x}_4 = -2.0 \cdot v_6$
$x_6$	actR_IL	0.00	0.00	$\dot{x}_6 = +v_2 + v_8$
$x_8$	pSHP2	0.00	1.30	$\dot{x}_8 = -v_3 + v_5$
$x_9$	actGp130	0.00	0.00	$\dot{x}_9 = +v_1 - v_2 - v_7$
$x_{13}$	actSTAT	0.00	5.35	$\dot{x}_{13} = +v_6$
$x_{16}$	gp80	133.10	133.10	$\dot{x}_{16} = -v_4$
$x_{17}$	gp80_IL	0.00	0.00	$\dot{x}_{17} = -v_2 + v_4 - v_8$

**Ratengleichungen**

$$\begin{aligned}
 v_1 &= kf9 \cdot (gp130Total - x_6 - x_9) \\
 v_2 &= kf1 \cdot x_9 \cdot x_{17} - kb1 \cdot x_6 \\
 v_3 &= kf20 \cdot x_8 \\
 v_4 &= kf0 \cdot IL \cdot x_{16} - kb0 \cdot x_{17} \\
 v_5 &= x_3 \cdot x_9 \cdot k4 + x_3 \cdot x_6 \cdot k4 \\
 v_6 &= k7 \cdot x_4^2 \cdot x_9 + k7 \cdot x_4^2 \cdot x_6 \\
 v_7 &= k3new \cdot x_9 \cdot x_3 \\
 v_8 &= k2 \cdot (gp130Total - x_6 - x_9) \cdot x_{17}
 \end{aligned}$$

**Modell M<sup>6</sup>**

Variablen	Beschreibung	Startwerte		Differentialgleichungen
		Exp. I	Exp. II	
$x_2 \rightarrow u$	IL	0.48	0.48	
$x_3$	SHP2	222.36	128.27	$\dot{x}_3 = +v_3 - v_5$
$x_4$	STAT	216.17	205.50	$\dot{x}_4 = -2.0 \cdot v_6$
$x_6$	actR_IL	0.00	0.00	$\dot{x}_6 = +v_2 + v_8$
$x_8$	pSHP2	0.00	1.30	$\dot{x}_8 = -v_3 + v_5$
$x_9$	actGp130	0.00	0.00	$\dot{x}_9 = +v_1 - v_2 - v_7$
$x_{13}$	actSTAT	0.00	5.35	$\dot{x}_{13} = +v_6$
$x_{16}$	gp80	133.10	133.10	$\dot{x}_{16} = -v_4$
$x_{17}$	gp80_IL	0.00	0.00	$\dot{x}_{17} = -v_2 + v_4 - v_8$

**Ratengleichungen**

$$\begin{aligned}
 v_1 &= kf9 \cdot (gp130Total - x_6 - x_9) \\
 v_2 &= kf1 \cdot x_9 \cdot x_{17} - kb1 \cdot x_6 \\
 v_3 &= kf20 \cdot x_8 \\
 v_4 &= kf0 \cdot IL \cdot x_{16} - kb0 \cdot x_{17} \\
 v_5 &= x_3 \cdot x_9 \cdot k4 \cdot (1nM + x_8) + x_3 \cdot x_6 \cdot k4 \cdot (1nM + x_8) \\
 v_6 &= k7 \cdot x_4^2 \cdot x_9 + k7 \cdot x_4^2 \cdot x_6 \\
 v_7 &= k3new \cdot x_9 \cdot x_3 \\
 v_8 &= k2 \cdot (gp130Total - x_6 - x_9) \cdot x_{17}
 \end{aligned}$$

Modell M<sup>7</sup>

Variablen	Beschreibung	Startwerte		Differentialgleichungen
		Exp. I	Exp. II	
$x_2 \rightarrow u$	IL	0.95	0.95	
$x_3$	SHP2	222.36	128.27	$\dot{x}_3 = +v_3 - v_5$
$x_4$	STAT	216.17	205.50	$\dot{x}_4 = -2.0 \cdot v_6$
$x_6$	actR_IL	0.00	0.00	$\dot{x}_6 = +v_2 + v_8$
$x_8$	pSHP2	0.00	1.30	$\dot{x}_8 = -v_3 + v_5$
$x_9$	actGp130	0.00	0.00	$\dot{x}_9 = +v_1 - v_2 - v_7$
$x_{13}$	actSTAT	0.00	5.35	$\dot{x}_{13} = +v_6$
$x_{16}$	gp80	133.10	133.10	$\dot{x}_{16} = -v_4$
$x_{17}$	gp80_IL	0.00	0.00	$\dot{x}_{17} = -v_2 + v_4 - v_8$

## Ratengleichungen

$$\begin{aligned}
 v_1 &= kf9 \cdot (gp130Total - x_6 - x_9) \\
 v_2 &= kf1 \cdot x_9 \cdot x_{17} - kb1 \cdot x_6 \\
 v_3 &= kf20 \cdot x_8 \\
 v_4 &= kf0 \cdot IL \cdot x_{16} - kb0 \cdot x_{17} \\
 v_5 &= x_3 \cdot x_9 \cdot k4b + x_3 \cdot x_9 \cdot k4b \cdot x_8 + x_3 \cdot x_6 \cdot k4 + x_3 \cdot x_6 \cdot k4 \cdot x_8 \\
 v_6 &= k7b \cdot x_4^2 \cdot x_9 + k7 \cdot x_4^2 \cdot x_6 \\
 v_7 &= k3new \cdot x_9 \cdot x_3 \\
 v_8 &= k2 \cdot (gp130Total - x_6 - x_9) \cdot x_{17}
 \end{aligned}$$

## Parameterwerte

Modell Parameterwerte ( $s^{-1}$  für Reaktionen erster Ordnung,  $nM^{-1}s^{-1}$  für Reaktionen zweiter Ordnung)

$M_0$	$kb1 = 0.21 \cdot 10^{-2}$ , $kb10 = 1.3$ , $kb12 = 0.21$ , $kb3 = 0.12 \cdot 10^4$ , $kb5 = 0.10 \cdot 10^{-5}$ , $kf1 = 0.12 \cdot 10^{-1}$ , $kf10 = 0.84 \cdot 10^{-3}$ , $kf11 = 0.27 \cdot 10^{-1}$ , $kf12 = 51.$ , $kf13 = 0.20 \cdot 10^{-1}$ , $kf14 = 0.13 \cdot 10^{-4}$ , $kf15 = 0.11 \cdot 10^{-3}$ , $kf2 = 0.36 \cdot 10^{-1}$ , $kf20 = 0.94 \cdot 10^{-5}$ , $kf3 = 44.$ , $kf4 = 0.31 \cdot 10^4$ , $kf5 = 52.$ , $kf6 = 0.23 \cdot 10^{-2}$ , $kf7 = 0.36 \cdot 10^3$ , $kf8 = 67.$ , $kf9 = 0.11 \cdot 10^{-4}$ , $scaleJAK = 0.38 \cdot 10^3$
$M_1$	$kb0 = 0.36 \cdot 10^{-2}$ , $kb1 = 3.3$ , $kb10 = 0.10 \cdot 10^5$ , $kb12 = 0.28$ , $kb3 = 0.18 \cdot 10^4$ , $kb5 = 0.17 \cdot 10^{-5}$ , $kf0 = 0.86 \cdot 10^{-4}$ , $kf1 = 0.42$ , $kf10 = 0.61$ , $kf11 = 0.61 \cdot 10^4$ , $kf12 = 0.10 \cdot 10^5$ , $kf13 = 0.49 \cdot 10^{-5}$ , $kf14 = 0.54 \cdot 10^{-4}$ , $kf15 = 0.10 \cdot 10^{-7}$ , $kf2 = 0.18$ , $kf20 = 0.17 \cdot 10^{-2}$ , $kf3 = 49.$ , $kf4 = 0.10 \cdot 10^5$ , $kf5 = 0.21 \cdot 10^3$ , $kf6 = 0.40 \cdot 10^{-5}$ , $kf7 = 0.10 \cdot 10^5$ , $kf8 = 0.10 \cdot 10^3$ , $kf9 = 0.1 \cdot 10^{-5}$ , $scaleJAK = 0.30 \cdot 10^3$
$M_2$	$kb0 = 0.32 \cdot 10^{-2}$ , $kb1 = 0.89 \cdot 10^3$ , $kb3 = 0.10 \cdot 10^5$ , $kb5 = 0.36 \cdot 10^{-1}$ , $kf0 = 0.86 \cdot 10^{-4}$ , $kf1 = 20.$ , $kf2 = 2.1$ , $kf20 = 0.31 \cdot 10^{-2}$ , $kf3 = 0.62$ , $kf4 = 0.10 \cdot 10^5$ , $kf5 = 0.97 \cdot 10^3$ , $kf6 = 0.1 \cdot 10^{-5}$ , $kf7 = 0.10 \cdot 10^5$ , $kf8 = 0.42$ , $kf9 = 0.1 \cdot 10^{-5}$ , $scaleJAK = 0.15 \cdot 10^3$
$M_3$	$k3 = 3.5$ , $k4 = 0.21 \cdot 10^{-1}$ , $kb0 = 0.41 \cdot 10^{-2}$ , $kb1 = 0.59$ , $kf0 = 0.86 \cdot 10^{-4}$ , $kf1 = 0.18$ , $kf2 = 0.60 \cdot 10^4$ , $kf20 = 0.14 \cdot 10^{-1}$ , $kf6 = 0.94 \cdot 10^3$ , $kf7 = 0.69 \cdot 10^{-2}$ , $kf8 = 0.42$ , $kf9 = 0.60 \cdot 10^{-4}$ , $scaleJAK = 3.9$
$M_4$	$k2 = 0.28$ , $k3new = 0.56 \cdot 10^4$ , $k4 = 0.14 \cdot 10^{-1}$ , $kb0 = 0.37 \cdot 10^{-2}$ , $kb1 = 0.46$ , $kf0 = 0.79 \cdot 10^{-4}$ , $kf1 = 0.63 \cdot 10^{-6}$ , $kf20 = 0.13 \cdot 10^{-1}$ , $kf7 = 0.50 \cdot 10^{-2}$ , $kf8 = 11.$ , $kf9 = 0.40 \cdot 10^{-5}$ , $scaleJAK = 2.7$
$M_5$	$actGp130_0 = 0.1 \cdot 10^{-4}$ , $k2 = 0.27 \cdot 10^{-1}$ , $k3new = 0.10 \cdot 10^{-8}$ , $k4 = 0.92 \cdot 10^{-3}$ , $k7 = 0.18 \cdot 10^{-4}$ , $kb0 = 2.4$ , $kb1 = 0.21$ , $kf0 = 0.46 \cdot 10^{-2}$ , $kf1 = 0.10 \cdot 10^3$ , $kf20 = 0.42 \cdot 10^{-2}$ , $kf9 = 0.10 \cdot 10^{-8}$ , $scaleJAK = 2.4$ , $scaleJAK2 = 0.35$
$M_6$	$actGp130_0 = 0.34 \cdot 10^{-4}$ , $k2 = 0.52 \cdot 10^{-1}$ , $k3new = 0.60 \cdot 10^{-8}$ , $k4 = 1.0$ , $k7 = 0.16 \cdot 10^{-4}$ , $kb0 = 2.9$ , $kb1 = 0.21$ , $kf0 = 0.34 \cdot 10^{-2}$ , $kf1 = 0.10 \cdot 10^3$ , $kf20 = 0.10 \cdot 10^3$ , $kf9 = 0.10 \cdot 10^{-8}$ , $scaleJAK = 2.2$ , $scaleJAK2 = 0.30$
$M_7^*$	$actGp1300 = 0.98 \cdot 10^{-5}$ , $k2 = 0.11$ , $k3new = 0.44 \cdot 10^{-7}$ , $k4 = 0.84$ , $k4b = 1.2$ , $k7 = 0.21 \cdot 10^{-4}$ , $k7b = 0.15 \cdot 10^{-5}$ , $kb0 = 43.$ , $kb1 = 1.5$ , $kf0 = 0.26 \cdot 10^{-1}$ , $kf1 = 0.11 \cdot 10^5$ , $kf20 = 0.10 \cdot 10^3$ , $kf9 = 0.10 \cdot 10^{-8}$ , $scaleJAK = 2.2$ , $scaleJAK2 = 0.30$

---

## Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
ACT	Antichymotrypsin
ActD	Actinomycin D
AEBSF	4-(2-Aminoethyl)-benzensulfonylfluorid
Amp	Ampicillin
APG	Akut-Phase Gen
APP	Akut-Phase Protein
APR	Akut-Phase Reaktion
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ARE	Adenosin/Uridin-reiches Element
As	Aminosäuren
BD	Bindungsdomäne
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serum Albumin
CCL	Chemokin der CC Familie
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CFP	<i>cyan fluorescent protein</i>
CIS	Cytokine-inducible SH2-domain containing protein
C-terminal	Carboxy-terminal
Cy2	<i>cyanine dye 2</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
Dex	Dexamethason
dk	Esel
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
Dox	Doxycyclin
DTT	Dithiothreitol
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>enzyme-linked-immunosorbent assays</i>
Epo	Erythropoietin
ER	Endoplasmatisches Retikulum
F	Phenylalanin
FACS	Durchflusszytometrie
FGG	$\gamma$ -Fibrinogen
FKS	Fötales Kälber Serum
go	Ziege
g	relative Zentrifugalbeschleunigung
Gab1	<i>GRB2-associated-binding protein 1</i>
GAPDH	Glycerinaldehy-3-phosphat-Dehydrogenase
gp	Glycoprotein
GR	Glukokortikoid Rezeptor
Grb2	<i>growth factor receptor-bound protein 2</i>
GRE	<i>glucocorticoid response element</i>
HASMC	<i>human aortic smooth muscle cells</i>



---

HIV	<i>human immunodeficiency virus</i>
HPRT	Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
hsp	<i>heat shock protein</i>
hu	human
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IP	Immunpräzipitation
I $\kappa$ B	<i>inhibitor of <math>\kappa</math>B</i>
Jak	Januskinase
JML	juvenile myelomonozytäre Leukämie
JNK	c-Jun-N-terminale Kinase
K	Lysin
k	Reaktionsratenkonstante
Kan	Kanamycin
KB	Cervix Karzinom Zelllinie
kb	Kilobasen
kDa	kilo Dalton
KIR	<i>kinase inhibitory region</i>
lacZ	Beta-Galactosidase Gen
LB	Luria Bertram
LK	leichte Antikörperkette
LPS	Lipopolysaccharid
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
min	Minute
miRNA	mikroRNA
MK	Mikroskopie
MK2	MAPK-aktivierte Protein Kinase 2
MKK6	Mitogen-aktivierte Protein Kinase Kinase 6
MKP-1	MAPK Phosphatase 1
mRNA	<i>messenger RNA</i>
mu	murin
NF- $\kappa$ B	<i>nuclear factor- <math>\kappa</math>B</i>
NOS	NO-Synthase
N-terminal	Amino-terminal
ODE	<i>ordinary differential equation</i>
OSM	Onkostatine M
p	Protein
PBS	<i>phosphate based saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PE	Phycoerythrin
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinasen
PTP	Proteintyrosinphosphatase
PVDF	Polyvinylidendifluorid
rb	Kaninchen
RBX2	Ring-box 2
RNA	Ribonukleinsäure

RT-qPCR	quantitative Real Time PCR
s	Sekunde
SAA	Serum Amyloid A
SBML	<i>Systems Biology Markup Language</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
SH2	<i>src-homology region 2</i>
SHP2	<i>SH2 domain containing phosphatase 2</i>
siRNA	<i>short interfering RNA</i>
SK	schwere Antikörperkette
SOCS	suppressor of cytokine signaling
SOS	<i>sun of sevenless</i>
SPB	<i>surfactant protein B</i>
Spec	Spectinomycin
STAT	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
T	Thymin
TC-PTP	<i>t-cell protein tyrosine phosphatase</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TNF- $\alpha$	Tumornekrosefaktor $\alpha$
TTP	Tristetraprolin
u	Modelleingang
U	Unit
Upm	Umdrehungen pro Minute
UTR	untranslatierte Region
UV	ultraviolett
WB	Western Blot
WT	Wildtyp
x	Zustandsgröße
Y	Tyrosin
y	Modellausgang
$\alpha$ 2M	$\alpha$ 2 Makroglobulin

---

## Literaturverzeichnis

1. Hirano, T., Taga, T., Nakano, N., Yasukawa, K., Kashiwamura, S., Shimizu, K., Nakajima, K., Pyun, K. H., and Kishimoto, T. (1985) Purification to homogeneity and characterization of human B-cell differentiation factor (BCDF or BSFp-2), *Proc. Natl. Acad. Sci.* **82**, 5490-5494.
2. Weissenbach, J., Chernajovsky, Y., Zeevi, M., Shulman, L., Soreq, H., Nir, U., Wallach, D., Perricaudet, M., Tiollais, P., and Revel, M. (1980) Two interferon mRNAs in human fibroblasts: in vitro translation and Escherichia coli cloning studies, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **77**, 7152-7156.
3. Content, J., De Wit, L., Poupart, P., Opdenakker, G., Van Damme, J., and Billiau, A. (1985) Induction of a 26-kDa-protein mRNA in human cells treated with an interleukin-1-related, leukocyte-derived factor, *Eur. J. Biochem.* **152**, 253-257.
4. Bazan, J. F. (1990) Structural design and molecular evolution of a cytokine receptor superfamily, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **87**, 6934-6938.
5. Scheller, J., Chalaris, A., Schmidt-Arras, D., and Rose-John, S. (2011) The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6, *Biochim. Biophys. Acta* **1813**, 878-888.
6. Suematsu, S., Matsuda, T., Aozasa, K., Akira, S., Nakano, N., Ohno, S., Miyazaki, J., Yamamura, K., Hirano, T., and Kishimoto, T. (1989) IgG1 plasmacytosis in interleukin 6 transgenic mice, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **86**, 7547-7551.
7. Samoilova, E. B., Horton, J. L., Hilliard, B., Liu, T. S., and Chen, Y. (1998) IL-6-deficient mice are resistant to experimental autoimmune encephalomyelitis: roles of IL-6 in the activation and differentiation of autoreactive T cells, *J. Immunol.* **161**, 6480-6486.
8. Ohshima, S., Saeki, Y., Mima, T., Sasai, M., Nishioka, K., Nomura, S., Kopf, M., Katada, Y., Tanaka, T., Suemura, M., and Kishimoto, T. (1998) Interleukin 6 plays a key role in the development of antigen-induced arthritis, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95**, 8222-8226.
9. Kopf, M., Baumann, H., Freer, G., Freudenberg, M., Lamers, M., Kishimoto, T., Zinkernagel, R., Bluethmann, H., and Kohler, G. (1994) Impaired immune and acute-phase responses in interleukin-6-deficient mice, *Nature* **368**, 339-342.
10. Baumann, H., and Gauldie, J. (1994) The acute phase response, *Immunol. Today* **15**, 74-80.
11. Kushner, I. (1982) The phenomenon of the acute phase response, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **389**, 39-48.
12. Moshage, H. (1997) Cytokines and the hepatic acute phase response, *J. Pathol.* **181**, 257-266.
13. Hattori, M., Abraham, L. J., Northemann, W., and Fey, G. H. (1990) Acute-phase reaction induces a specific complex between hepatic nuclear proteins and the interleukin 6 response element of the rat alpha 2-macroglobulin gene, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **87**, 2364-2368.
14. Zhang, Z., Fuentes, N. L., and Fuller, G. M. (1995) Characterization of the IL-6 responsive elements in the gamma fibrinogen gene promoter, *J. Biol. Chem.* **270**, 24287-24291.
15. Alonzi, T., Maritano, D., Gorgoni, B., Rizzuto, G., Libert, C., and Poli, V. (2001) Essential role of STAT3 in the control of the acute-phase response as revealed by inducible gene inactivation [correction of activation] in the liver, *Mol. Cell. Biol.* **21**, 1621-1632.
16. Heinrich, P. C., Behrmann, I., Haan, S., Hermanns, H. M., Müller-Newen, G., and Schaper, F. (2003) Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation, *Biochem. J.* **374**, 1-20.
17. Taga, T., Hibi, M., Hirata, Y., Yamasaki, K., Yasukawa, K., Matsuda, T., Hirano, T., and Kishimoto, T. (1989) Interleukin-6 triggers the association of its receptor with a possible signal transducer, gp130, *Cell* **58**, 573-581.
18. Saito, M., Yoshida, K., Hibi, M., Taga, T., and Kishimoto, T. (1992) Molecular cloning of a murine IL-6 receptor-associated signal transducer, gp130, and its regulated expression in vivo, *J. Immunol.* **148**, 4066-4071.

19. Shirota, K., LeDuy, L., Yuan, S. Y., and Jothy, S. (1990) Interleukin-6 and its receptor are expressed in human intestinal epithelial cells, *Virchows Arch. B Cell Pathol. Incl. Mol. Pathol.* 58, 303-308.
20. Bethin, K. E., Vogt, S. K., and Muglia, L. J. (2000) Interleukin-6 is an essential, corticotropin-releasing hormone-independent stimulator of the adrenal axis during immune system activation, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97, 9317-9322.
21. Mullberg, J., Schooltink, H., Stoyan, T., Gunther, M., Graeve, L., Buse, G., Mackiewicz, A., Heinrich, P. C., and Rose-John, S. (1993) The soluble interleukin-6 receptor is generated by shedding, *Eur. J. Immun.* 23, 473-480.
22. Müller-Newen, G., Kohne, C., Keul, R., Hemmann, U., Müller-Esterl, W., Wijdenes, J., Brakenhoff, J. P., Hart, M. H., and Heinrich, P. C. (1996) Purification and characterization of the soluble interleukin-6 receptor from human plasma and identification of an isoform generated through alternative splicing, *Eur. J. Biochem.* 236, 837-842.
23. Jones, S. A., Richards, P. J., Scheller, J., and Rose-John, S. (2005) IL-6 transsignaling: the in vivo consequences, *J. Interferon Cytokine Res.* 25, 241-253.
24. Hibi, M., Murakami, M., Saito, M., Hirano, T., Taga, T., and Kishimoto, T. (1990) Molecular cloning and expression of an IL-6 signal transducer, gp130, *Cell* 63, 1149-1157.
25. Lütticken, 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) Association of transcription factor APRF and protein kinase Jak1 with the interleukin-6 signal transducer gp130, *Science* 263, 89-92.
26. 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) A major role for the protein tyrosine kinase JAK1 in the JAK/STAT signal transduction pathway in response to interleukin-6, *EMBO J.* 14, 1421-1429.
27. Hemmann, U., Gerhartz, C., Heesel, B., Sasse, J., Kurapkat, G., Grötzinger, J., Wollmer, A., Zhong, Z., Darnell, J. E., Jr., Graeve, L., Heinrich, P. C., and Horn, F. (1996) Differential activation of acute phase response factor/Stat3 and Stat1 via the cytoplasmic domain of the interleukin 6 signal transducer gp130. II. Src homology SH2 domains define the specificity of stat factor activation, *J. Biol. Chem.* 271, 12999-13007.
28. Gerhartz, C., Heesel, B., Sasse, J., Hemmann, U., Landgraf, C., Schneider-Mergener, J., Horn, F., Heinrich, P. C., and Graeve, L. (1996) Differential activation of acute phase response factor/STAT3 and STAT1 via the cytoplasmic domain of the interleukin 6 signal transducer gp130. I. Definition of a novel phosphotyrosine motif mediating STAT1 activation, *J. Biol. Chem.* 271, 12991-12998.
29. Kaptein, A., Paillard, V., and Saunders, M. (1996) Dominant negative stat3 mutant inhibits interleukin-6-induced Jak-STAT signal transduction, *J. Biol. Chem.* 271, 5961-5964.
30. Shuai, K., Horvath, C. M., Huang, L. H., Qureshi, S. A., Cowburn, D., and Darnell, J. E., Jr. (1994) Interferon activation of the transcription factor Stat91 involves dimerization through SH2-phosphotyrosyl peptide interactions, *Cell* 76, 821-828.
31. Zhong, Z., Wen, Z., and Darnell, J. E., Jr. (1994) Stat3: a STAT family member activated by tyrosine phosphorylation in response to epidermal growth factor and interleukin-6, *Science* 264, 95-98.
32. Wegenka, U. M., Buschmann, J., Lütticken, C., Heinrich, P. C., and Horn, F. (1993) Acute-phase response factor, a nuclear factor binding to acute-phase response elements, is rapidly activated by interleukin-6 at the posttranslational level, *Mol. Cell. Biol.* 13, 276-288.
33. Novak, U., Ji, H., Kanagasundaram, V., Simpson, R., and Paradiso, L. (1998) STAT3 forms stable homodimers in the presence of divalent cations prior to activation, *Bioch. Biophys. Res. Com.* 247, 558-563.
34. Vogt, M., Domoszlai, T., Kleshchanok, D., Lehmann, S., Schmitt, A., Poli, V., Richter, W., and Müller-Newen, G. (2011) The role of the N-terminal domain in dimerization and nucleocytoplasmic shuttling of latent STAT3, *J. Cell Sci.* 124, 900-909.

35. Haan, S., Kortylewski, M., Behrmann, I., Müller-Esterl, W., Heinrich, P. C., and Schaper, F. (2000) Cytoplasmic STAT proteins associate prior to activation, *Biochem. J.* 345 Pt 3, 417-421.
36. Yamamoto, T., Sekine, Y., Kashima, K., Kubota, A., Sato, N., Aoki, N., and Matsuda, T. (2002) The nuclear isoform of protein-tyrosine phosphatase TC-PTP regulates interleukin-6-mediated signaling pathway through STAT3 dephosphorylation, *Bioch. Biophys. Res. Com.* 297, 811-817.
37. Chung, C. D., Liao, J., Liu, B., Rao, X., Jay, P., Berta, P., and Shuai, K. (1997) Specific inhibition of Stat3 signal transduction by PIAS3, *Science* 278, 1803-1805.
38. 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) A family of cytokine-inducible inhibitors of signalling, *Nature* 387, 917-921.
39. Yoon, W. H., Meinhardt, H., and Montell, D. J. (2011) miRNA-mediated feedback inhibition of JAK/STAT morphogen signalling establishes a cell fate threshold, *Nat. Cell Biol.* 13, 1062-1069.
40. Kim, H., and Baumann, H. (1999) Dual signaling role of the protein tyrosine phosphatase SHP-2 in regulating expression of acute-phase plasma proteins by interleukin-6 cytokine receptors in hepatic cells, *Mol. Cell. Biol.* 19, 5326-5338.
41. Symes, A., Stahl, N., Reeves, S. A., Farruggella, T., Servidei, T., Gearan, T., Yancopoulos, G., and Fink, J. S. (1997) The protein tyrosine phosphatase SHP-2 negatively regulates ciliary neurotrophic factor induction of gene expression, *Current Biology* 7, 697-700.
42. Stahl, N., Farruggella, T. J., Boulton, T. G., Zhong, Z., Darnell, J. E., Jr., and Yancopoulos, G. D. (1995) Choice of STATs and other substrates specified by modular tyrosine-based motifs in cytokine receptors, *Science* 267, 1349-1353.
43. 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) SHP2 and SOCS3 contribute to Tyr-759-dependent attenuation of interleukin-6 signaling through gp130, *J. Biol. Chem.* 278, 661-671.
44. Barford, D., and Neel, B. G. (1998) Revealing mechanisms for SH2 domain mediated regulation of the protein tyrosine phosphatase SHP-2, *Structure* 6, 249-254.
45. Lu, W., Gong, D., Bar-Sagi, D., and Cole, P. A. (2001) Site-specific incorporation of a phosphotyrosine mimetic reveals a role for tyrosine phosphorylation of SHP-2 in cell signaling, *Mol. Cell* 8, 759-769.
46. Lu, W., Shen, K., and Cole, P. A. (2003) Chemical dissection of the effects of tyrosine phosphorylation of SHP-2, *Biochemistry* 42, 5461-5468.
47. Hof, P., Pluskey, S., Dhe-Paganon, S., Eck, M. J., and Shoelson, S. E. (1998) Crystal structure of the tyrosine phosphatase SHP-2, *Cell* 92, 441-450.
48. Wang, W., Liu, L., Song, X., Mo, Y., Komma, C., Bellamy, H. D., Zhao, Z. J., and Zhou, G. W. (2011) Crystal structure of human protein tyrosine phosphatase SHP-1 in the open conformation, *J. Cell. Biochem.* 112, 2062-2071.
49. Schaper, F., Gendo, C., Eck, M., Schmitz, J., Grimm, C., Anhuf, D., Kerr, I. M., and Heinrich, P. C. (1998) Activation of the protein tyrosine phosphatase SHP2 via the interleukin-6 signal transducing receptor protein gp130 requires tyrosine kinase Jak1 and limits acute-phase protein expression, *Biochem. J.* 335 ( Pt 3), 557-565.
50. Barua, D., Faeder, J. R., and Haugh, J. M. (2007) Structure-based kinetic models of modular signaling protein function: focus on Shp2, *Biophys. J.* 92, 2290-2300.
51. Yin, T., Shen, R., Feng, G. S., and Yang, Y. C. (1997) Molecular characterization of specific interactions between SHP-2 phosphatase and JAK tyrosine kinases, *J. Biol. Chem.* 272, 1032-1037.
52. Gunaje, J. J., and Bhat, G. J. (2001) Involvement of tyrosine phosphatase PTP1D in the inhibition of interleukin-6-induced Stat3 signaling by alpha-thrombin, *Bioch. Biophys. Res. Com.* 288, 252-257.

53. Yang, F., Brown, C., Buettner, R., Hedvat, M., Starr, R., Scuto, A., Schroeder, A., Jensen, M., and Jove, R. (2010) Sorafenib induces growth arrest and apoptosis of human glioblastoma cells through the dephosphorylation of signal transducers and activators of transcription 3, *Mol. Cancer Ther.* 9, 953-962.
54. Blechacz, B. R., Smoot, R. L., Bronk, S. F., Werneburg, N. W., Sirica, A. E., and Gores, G. J. (2009) Sorafenib inhibits signal transducer and activator of transcription-3 signaling in cholangiocarcinoma cells by activating the phosphatase shatterproof 2, *Hepatology* 50, 1861-1870.
55. Yao, X., Zhu, F., Zhao, Z., Liu, C., Luo, L., and Yin, Z. (2011) Arctigenin enhances chemosensitivity of cancer cells to cisplatin through inhibition of the STAT3 signaling pathway, *J. Cell. Biochem.* 112, 2837-2849.
56. Zhang, W., Chan, R. J., Chen, H., Yang, Z., He, Y., Zhang, X., Luo, Y., Yin, F., Moh, A., Miller, L. C., Payne, R. M., Zhang, Z. Y., Fu, X. Y., and Shou, W. (2009) Negative regulation of Stat3 by activating PTPN11 mutants contributes to the pathogenesis of Noonan syndrome and juvenile myelomonocytic leukemia, *J. Biol. Chem.* 284, 22353-22363.
57. Yamada, S., Shiono, S., Joo, A., and Yoshimura, A. (2003) Control mechanism of JAK/STAT signal transduction pathway, *FEBS letters* 534, 190-196.
58. Naka, T., Narazaki, M., Hirata, M., Matsumoto, T., Minamoto, S., Aono, A., Nishimoto, N., Kajita, T., Taga, T., Yoshizaki, K., Akira, S., and Kishimoto, T. (1997) Structure and function of a new STAT-induced STAT inhibitor, *Nature* 387, 924-929.
59. Hilton, D. J., Richardson, R. T., Alexander, W. S., Viney, E. M., Willson, T. A., Sprigg, N. S., Starr, R., Nicholson, S. E., Metcalf, D., and Nicola, N. A. (1998) Twenty proteins containing a C-terminal SOCS box form five structural classes, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95, 114-119.
60. Fischer, P., Lehmann, U., Sobota, R. M., Schmitz, J., Niemand, C., Linnemann, S., Haan, S., Behrmann, I., Yoshimura, A., Johnston, J. A., Müller-Newen, G., Heinrich, P. C., and Schaper, F. (2004) The role of the inhibitors of interleukin-6 signal transduction SHP2 and SOCS3 for desensitization of interleukin-6 signalling, *Biochem. J.* 378, 449-460.
61. Yang, X. P., Schaper, F., Teubner, A., Lammert, F., Heinrich, P. C., Matern, S., and Siewert, E. (2005) Interleukin-6 plays a crucial role in the hepatic expression of SOCS3 during acute inflammatory processes in vivo, *J. Hepatol.* 43, 704-710.
62. Babon, J. J., Sabo, J. K., Zhang, J. G., Nicola, N. A., and Norton, R. S. (2009) The SOCS box encodes a hierarchy of affinities for Cullin5: implications for ubiquitin ligase formation and cytokine signalling suppression, *J. Mol. Biol.* 387, 162-174.
63. Orr, S. J., Morgan, N. M., Buick, R. J., Boyd, C. R., Elliott, J., Burrows, J. F., Jefferies, C. A., Crocker, P. R., and Johnston, J. A. (2007) SOCS3 targets Siglec 7 for proteasomal degradation and blocks Siglec 7-mediated responses, *J. Biol. Chem.* 282, 3418-3422.
64. Orr, S. J., Morgan, N. M., Elliott, J., Burrows, J. F., Scott, C. J., McVicar, D. W., and Johnston, J. A. (2007) CD33 responses are blocked by SOCS3 through accelerated proteasomal-mediated turnover, *Blood* 109, 1061-1068.
65. Schmitz, J., Weissenbach, M., Haan, S., Heinrich, P. C., and Schaper, F. (2000) SOCS3 exerts its inhibitory function on interleukin-6 signal transduction through the SHP2 recruitment site of gp130, *J. Biol. Chem.* 275, 12848-12856.
66. Nicholson, S. E., De Souza, D., Fabri, L. J., Corbin, J., Willson, T. A., Zhang, J. G., Silva, A., Asimakis, M., Farley, A., Nash, A. D., Metcalf, D., Hilton, D. J., Nicola, N. A., and Baca, M. (2000) Suppressor of cytokine signaling-3 preferentially binds to the SHP-2-binding site on the shared cytokine receptor subunit gp130, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97, 6493-6498.
67. Sasaki, A., Yasukawa, H., Suzuki, A., Kamizono, S., Syoda, T., Kinjyo, I., Sasaki, M., Johnston, J. A., and Yoshimura, A. (1999) Cytokine-inducible SH2 protein-3 (CIS3/SOCS3) inhibits Janus tyrosine kinase by binding through the N-terminal kinase inhibitory region as well as SH2 domain, *Genes Cells* 4, 339-351.
68. Yang, X. P., Albrecht, U., Zakowski, V., Sobota, R. M., Häussinger, D., Heinrich, P. C., Ludwig, S., Bode, J. G., and Schaper, F. (2004) Dual function of interleukin-1beta for the regulation of

- interleukin-6-induced suppressor of cytokine signaling 3 expression, *J. Biol. Chem.* 279, 45279-45289.
69. Ehltling, C., Lai, W. S., Schaper, F., Brenndörfer, E. D., Matthes, R. J., Heinrich, P. C., Ludwig, S., Blackshear, P. J., Gaestel, M., Häussinger, D., and Bode, J. G. (2007) Regulation of suppressor of cytokine signaling 3 (SOCS3) mRNA stability by TNF-alpha involves activation of the MKK6/p38MAPK/MK2 cascade, *J. Immunol.* 178, 2813-2826.
  70. Haan, S., Ferguson, P., Sommer, U., Hiremath, M., McVicar, D. W., Heinrich, P. C., Johnston, J. A., and Cacalano, N. A. (2003) Tyrosine phosphorylation disrupts elongin interaction and accelerates SOCS3 degradation, *J. Biol. Chem.* 278, 31972-31979.
  71. Sasaki, A., Inagaki-Ohara, K., Yoshida, T., Yamanaka, A., Sasaki, M., Yasukawa, H., Koromilas, A. E., and Yoshimura, A. (2003) The N-terminal truncated isoform of SOCS3 translated from an alternative initiation AUG codon under stress conditions is stable due to the lack of a major ubiquitination site, Lys-6, *J. Biol. Chem.* 278, 2432-2436.
  72. Bode, J. G., Nimmegern, A., Schmitz, J., Schaper, F., Schmitt, M., Frisch, W., Häussinger, D., Heinrich, P. C., and Graeve, L. (1999) LPS and TNFalpha induce SOCS3 mRNA and inhibit IL-6-induced activation of STAT3 in macrophages, *FEBS letters* 463, 365-370.
  73. Cassatella, M. A., Gasperini, S., Bovolenta, C., Calzetti, F., Vollebregt, M., Scapini, P., Marchi, M., Suzuki, R., Suzuki, A., and Yoshimura, A. (1999) Interleukin-10 (IL-10) selectively enhances CIS3/SOCS3 mRNA expression in human neutrophils: evidence for an IL-10-induced pathway that is independent of STAT protein activation, *Blood* 94, 2880-2889.
  74. Yasukawa, H., Ohishi, M., Mori, H., Murakami, M., Chinen, T., Aki, D., Hanada, T., Takeda, K., Akira, S., Hoshijima, M., Hirano, T., Chien, K. R., and Yoshimura, A. (2003) IL-6 induces an anti-inflammatory response in the absence of SOCS3 in macrophages, *Nat. Immunol.* 4, 551-556.
  75. Niemand, C., Nimmegern, A., Haan, S., Fischer, P., Schaper, F., Rossaint, R., Heinrich, P., and Müller-Newen, G. (2003) Activation of STAT3 by IL-6 and IL-10 in primary human macrophages is differentially modulated by suppressor of cytokine signaling 3, *J. Immunol* 170, 3263-3272.
  76. Croker, B. A., Krebs, D. L., Zhang, J. G., Wormald, S., Willson, T. A., Stanley, E. G., Robb, L., Greenhalgh, C. J., Forster, I., Clausen, B. E., Nicola, N. A., Metcalf, D., Hilton, D. J., Roberts, A. W., and Alexander, W. S. (2003) SOCS3 negatively regulates IL-6 signaling in vivo, *Nat. Immunol.* 4, 540-545.
  77. Jo, D., Liu, D., Yao, S., Collins, R. D., and Hawiger, J. (2005) Intracellular protein therapy with SOCS3 inhibits inflammation and apoptosis, *Nat. Med.* 11, 892-898.
  78. Fletcher, T. C., DiGiandomenico, A., and Hawiger, J. (2010) Extended anti-inflammatory action of a degradation-resistant mutant of cell-penetrating suppressor of cytokine signaling 3, *J. Biol. Chem.* 285, 18727-18736.
  79. Hench, P. S., Kendall, E. C., Slocumb, C. H., and Polley, H. F. (1950) Effects of cortisone acetate and pituitary ACTH on rheumatoid arthritis, rheumatic fever and certain other conditions, *Arch. Inter. Med.* 85, 545-666.
  80. Kendall, E. C. (1951) The adrenal cortex and rheumatoid arthritis, *BMJ* 2, 1295-1299.
  81. Whitehouse, M. W. (2011) Anti-inflammatory glucocorticoid drugs: reflections after 60 years, *Inflammopharmacology* 19, 1-19.
  82. M. C. Mason HL, E. K. (1936) The chemistry of chrySTALLINE substances isolated from supraadrenal gland, *J. Biol. Chem.* 114, 613-631.
  83. Grahame-Smith, D. G., Butcher, R. W., Ney, R. L., and Sutherland, E. W. (1967) Adenosine 3',5'-monophosphate as the intracellular mediator of the action of adrenocorticotrophic hormone on the adrenal cortex, *J. Biol. Chem.* 242, 5535-5541.
  84. Clow, A., Hucklebridge, F., and Thorn, L. (2010) The cortisol awakening response in context, *Int. Rev. Neurobiol.* 93, 153-175.
  85. Kleemann CR, L. J., Better O. (1975) Kidney and adrenocortical hormones, *Nephron* 15, 261 - 278.

86. Pivonello, R., De Martino, M. C., De Leo, M., Lombardi, G., and Colao, A. (2008) Cushing's Syndrome, *Endocrinol. Metab. Clin. North Am.* 37, 135-149, ix.
87. Jain, S., Li, Y., Kumar, A., and Sehgal, P. B. (2005) Transcriptional signaling from membrane raft-associated glucocorticoid receptor, *Bioch. Biophys. Res. Com.* 336, 3-8.
88. Tasker, J. G. (2006) Rapid glucocorticoid actions in the hypothalamus as a mechanism of homeostatic integration, *Obesity* 14 Suppl 5, 259S-265S.
89. Giguere, V., Hollenberg, S. M., Rosenfeld, M. G., and Evans, R. M. (1986) Functional domains of the human glucocorticoid receptor, *Cell* 46, 645-652.
90. Tang, Y., Getzenberg, R. H., Vietmeier, B. N., Stallcup, M. R., Eggert, M., Renkawitz, R., and DeFranco, D. B. (1998) The DNA-binding and tau2 transactivation domains of the rat glucocorticoid receptor constitute a nuclear matrix-targeting signal, *Mol. Endocrin.* 12, 1420-1431.
91. Pratt, W. B. (1993) The role of heat shock proteins in regulating the function, folding, and trafficking of the glucocorticoid receptor, *J. Biol. Chem.* 268, 21455-21458.
92. Isohashi, F., and Okamoto, K. (1993) ATP-stimulated translocation promoter that enhances the nuclear binding of activated glucocorticoid receptor complex. Biochemical properties and its function (mini-review), *Receptor* 3, 113-124.
93. Okamoto, K., Hirano, H., and Isohashi, F. (1993) Molecular cloning of rat liver glucocorticoid-receptor translocation promoter, *Bioch. Biophys. Res. Com.* 193, 848-854.
94. Luisi, B. F., Xu, W. X., Otwinowski, Z., Freedman, L. P., Yamamoto, K. R., and Sigler, P. B. (1991) Crystallographic analysis of the interaction of the glucocorticoid receptor with DNA, *Nature* 352, 497-505.
95. Beato, M., and Sanchez-Pacheco, A. (1996) Interaction of steroid hormone receptors with the transcription initiation complex, *Endocr. Rev.* 17, 587-609.
96. Danesch, U., Gloss, B., Schmid, W., Schutz, G., Schule, R., and Renkawitz, R. (1987) Glucocorticoid induction of the rat tryptophan oxygenase gene is mediated by two widely separated glucocorticoid-responsive elements, *EMBO J.* 6, 625-630.
97. Jantzen, H. M., Strahle, U., Gloss, B., Stewart, F., Schmid, W., Boshart, M., Miksicsek, R., and Schutz, G. (1987) Cooperativity of glucocorticoid response elements located far upstream of the tyrosine aminotransferase gene, *Cell* 49, 29-38.
98. Morrison, N., and Eisman, J. (1993) Role of the negative glucocorticoid regulatory element in glucocorticoid repression of the human osteocalcin promoter, *J. Bone Miner. Res.* 8, 969-975.
99. Pei, L. (1996) Identification of a negative glucocorticoid response element in the rat type 1 vasoactive intestinal polypeptide receptor gene, *J. Biol. Chem.* 271, 20879-20884.
100. Malkoski, S. P., and Dorin, R. I. (1999) Composite glucocorticoid regulation at a functionally defined negative glucocorticoid response element of the human corticotropin-releasing hormone gene, *Mol. Endocrin.* 13, 1629-1644.
101. Ehrchen, J., Steinmüller, L., Barczyk, K., Tenbrock, K., Nacken, W., Eisenacher, M., Nordhues, U., Sorg, C., Sunderkotter, C., and Roth, J. (2007) Glucocorticoids induce differentiation of a specifically activated, anti-inflammatory subtype of human monocytes, *Blood* 109, 1265-1274.
102. Tessel, M. A., Krett, N. L., and Rosen, S. T. (2010) Steroid receptor and microRNA regulation in cancer, *Curr. Opin. Oncol.* 22, 592-597.
103. Smith, L. K., Shah, R. R., and Cidlowski, J. A. (2010) Glucocorticoids modulate microRNA expression and processing during lymphocyte apoptosis, *J. Biol. Chem.* 285, 36698-36708.
104. Mukaida, N., Morita, M., Ishikawa, Y., Rice, N., Okamoto, S., Kasahara, T., and Matsushima, K. (1994) Novel mechanism of glucocorticoid-mediated gene repression. Nuclear factor-kappa B is target for glucocorticoid-mediated interleukin 8 gene repression, *J. Biol. Chem.* 269, 13289-13295.
105. Kleinert, H., Euchenhofer, C., Ihrig-Biedert, I., and Forstermann, U. (1996) Glucocorticoids inhibit the induction of nitric oxide synthase II by down-regulating cytokine-induced activity of transcription factor nuclear factor-kappa B, *Mol. Pharmacol.* 49, 15-21.



106. König, H., Ponta, H., Rahmsdorf, H. J., and Herrlich, P. (1992) Interference between pathway-specific transcription factors: glucocorticoids antagonize phorbol ester-induced AP-1 activity without altering AP-1 site occupation in vivo, *EMBO J.* **11**, 2241-2246.
107. Brack, A., Rittner, H. L., Younge, B. R., Kaltschmidt, C., Weyand, C. M., and Goronzy, J. J. (1997) Glucocorticoid-mediated repression of cytokine gene transcription in human arteritis-SCID chimeras, *J. Clin. Invest.* **99**, 2842-2850.
108. Lasa, M., Abraham, S. M., Boucheron, C., Saklatvala, J., and Clark, A. R. (2002) Dexamethasone causes sustained expression of mitogen-activated protein kinase (MAPK) phosphatase 1 and phosphatase-mediated inhibition of MAPK p38, *Mol. Cell. Biol.* **22**, 7802-7811.
109. Ishmael, F. T., Fang, X., Houser, K. R., Pearce, K., Abdelmohsen, K., Zhan, M., Gorospe, M., and Stellato, C. (2011) The human glucocorticoid receptor as an RNA-binding protein: global analysis of glucocorticoid receptor-associated transcripts and identification of a target RNA motif, *J. Immunol.* **186**, 1189-1198.
110. Stöcklin, E., Wissler, M., Gouilleux, F., and Groner, B. (1996) Functional interactions between Stat5 and the glucocorticoid receptor, *Nature* **383**, 726-728.
111. Baumann, H., Prowse, K. R., Marinkovic, S., Won, K. A., and Jahreis, G. P. (1989) Stimulation of hepatic acute phase response by cytokines and glucocorticoids, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **557**, 280-295, discussion 295-286.
112. Simar-Blanchet, A. E., Paul, C., Mercier, L., and Le Cam, A. (1996) Regulation of expression of the rat serine protease inhibitor 2.3 gene by glucocorticoids and interleukin-6. A complex and unusual interplay between positive and negative cis-acting elements, *Eur. J. Biochem.* **236**, 638-648.
113. Thorn, C. F., and Whitehead, A. S. (2002) Differential glucocorticoid enhancement of the cytokine-driven transcriptional activation of the human acute phase serum amyloid A genes, SAA1 and SAA2, *J. Immunol.* **169**, 399-406.
114. Kasutani, K., Itoh, N., Kanekiyo, M., Muto, N., and Tanaka, K. (1998) Requirement for cooperative interaction of interleukin-6 responsive element type 2 and glucocorticoid responsive element in the synergistic activation of mouse metallothionein-I gene by interleukin-6 and glucocorticoid, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **151**, 143-151.
115. Hernandez, J., Carrasco, J., Belloso, E., Giralt, M., Bluethmann, H., Kee Lee, D., Andrews, G. K., and Hidalgo, J. (2000) Metallothionein induction by restraint stress: role of glucocorticoids and IL-6, *Cytokine* **12**, 791-796.
116. Lerner, L., Henriksen, M. A., Zhang, X., and Darnell, J. E., Jr. (2003) STAT3-dependent enhanceosome assembly and disassembly: synergy with GR for full transcriptional increase of the alpha 2-macroglobulin gene, *Genes Dev.* **17**, 2564-2577.
117. Arambasic, J., Poznanovic, G., Ivanovic-Matic, S., Bogojevic, D., Mihailovic, M., Uskokovic, A., and Grigorov, I. (2010) Association of the glucocorticoid receptor with STAT3, C/EBPbeta, and the hormone-responsive element within the rat haptoglobin gene promoter during the acute phase response, *IUBMB Life* **62**, 227-236.
118. Nguyen, M. D., and Simpson-Haidaris, P. J. (2000) Cell type-specific regulation of fibrinogen expression in lung epithelial cells by dexamethasone and interleukin-1beta, *Am. J. Resp. Cell Mol. Biol.* **22**, 209-217.
119. Schooltink, H., Stoyan, T., Lenz, D., Schmitz, H., Hirano, T., Kishimoto, T., Heinrich, P. C., and Rose-John, S. (1991) Structural and functional studies on the human hepatic interleukin-6 receptor. Molecular cloning and overexpression in HepG2 cells, *Biochem. J.* **277 ( Pt 3)**, 659-664.
120. Paysant, J., Blanque, R., Vasse, M., Soria, C., Soria, J., and Gardner, C. R. (2000) Factors influencing the effect of the soluble IL-6 receptor on IL-6 responses in HepG2 hepatocytes, *Cytokine* **12**, 774-779.
121. Amrani, D. L., Mauzy-Melitz, D., and Mosesson, M. W. (1986) Effect of hepatocyte-stimulating factor and glucocorticoids on plasma fibronectin levels, *Biochem. J.* **238**, 365-371.

122. Depraetere, S., Willems, J., and Joniau, M. (1991) Stimulation of CRP secretion in HepG2 cells: cooperative effect of dexamethasone and interleukin 6, *Agents Actions* 34, 369-375.
123. Ganapathi, M. K., Rzewnicki, D., Samols, D., Jiang, S. L., and Kushner, I. (1991) Effect of combinations of cytokines and hormones on synthesis of serum amyloid A and C-reactive protein in Hep 3B cells, *J. Immunol.* 147, 1261-1265.
124. Pierzchalski, P., Rokita, H., Koj, A., Fries, E., and Akerstrom, B. (1992) Synthesis of alpha 1-microglobulin in cultured rat hepatocytes is stimulated by interleukin-6, leukemia inhibitory factor, dexamethasone and retinoic acid, *FEBS letters* 298, 165-168.
125. Sato, M., Yamaki, J., Hamaya, M., and Hojo, H. (1996) Synergistic induction of metallothionein synthesis by interleukin-6, dexamethasone and zinc in the rat, *Int. J. Immunopharmacol.* 18, 167-172.
126. Takeda, T., Kurachi, H., Yamamoto, T., Nishio, Y., Nakatsuji, Y., Morishige, K., Miyake, A., and Murata, Y. (1998) Crosstalk between the interleukin-6 (IL-6)-JAK-STAT and the glucocorticoid-nuclear receptor pathway: synergistic activation of IL-6 response element by IL-6 and glucocorticoid, *J. Endocrinol.* 159, 323-330.
127. Kumon, Y., Suehiro, T., Hashimoto, K., and Sipe, J. D. (2001) Dexamethasone, but not IL-1 alone, upregulates acute-phase serum amyloid A gene expression and production by cultured human aortic smooth muscle cells, *Scand. J. Immunol.* 53, 7-12.
128. Thorn, C. F., Lu, Z. Y., and Whitehead, A. S. (2003) Tissue-specific regulation of the human acute-phase serum amyloid A genes, SAA1 and SAA2, by glucocorticoids in hepatic and epithelial cells, *Eur. J. Immun.* 33, 2630-2639.
129. Kinter, A. L., Biswas, P., Alfano, M., Justement, J. S., Mantelli, B., Rizzi, C., Gatti, A. R., Vicenzi, E., Bressler, P., and Poli, G. (2001) Interleukin-6 and glucocorticoids synergistically induce human immunodeficiency virus type-1 expression in chronically infected U1 cells by a long terminal repeat independent post-transcriptional mechanism, *Mol. Med.* 7, 668-678.
130. Ladenburger, A., Seehase, M., Kramer, B. W., Thomas, W., Wirbelauer, J., Speer, C. P., and Kunzmann, S. (2010) Glucocorticoids potentiate IL-6-induced SP-B expression in H441 cells by enhancing the JAK-STAT signaling pathway, *Am. J. Physiol.* 299, L578-584.
131. Paul, C., Seiliez, I., Thissen, J. P., and Le Cam, A. (2000) Regulation of expression of the rat SOCS-3 gene in hepatocytes by growth hormone, interleukin-6 and glucocorticoids mRNA analysis and promoter characterization, *Eur. J. Biochem.* 267, 5849-5857.
132. Bhattacharyya, S., Zhao, Y., Kay, T. W., and Muglia, L. J. (2011) Glucocorticoids target suppressor of cytokine signaling 1 (SOCS1) and type 1 interferons to regulate Toll-like receptor-induced STAT1 activation, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108, 9554-9559.
133. Haffner, M. C., Jurgeit, A., Berlato, C., Geley, S., Parajuli, N., Yoshimura, A., and Doppler, W. (2008) Interaction and functional interference of glucocorticoid receptor and SOCS1, *J. Biol. Chem.* 283, 22089-22096.
134. Kitano, H. (2002) Systems biology: a brief overview, *Science* 295, 1662-1664.
135. Cho, K. H., and Wolkenhauer, O. (2003) Analysis and modelling of signal transduction pathways in systems biology, *Biochem. Soc. Trans.* 31, 1503-1509.
136. Bruggeman, F. J., and Westerhoff, H. V. (2007) The nature of systems biology, *Trends Microbiol.* 15, 45-50.
137. Bornholdt, S. (2008) Boolean network models of cellular regulation: prospects and limitations, *J. R. Soc. Interface* 5 Suppl 1, S85-94.
138. Pinney, J. W., Westhead, D. R., and McConkey, G. A. (2003) Petri Net representations in systems biology, *Biochem. Soc. Trans.* 31, 1513-1515.
139. Quaiser, T., and Mönnigmann, M. (2009) Systematic identifiability testing for unambiguous mechanistic modeling--application to JAK-STAT, MAP kinase, and NF-kappaB signaling pathway models, *BMC Syst. Biol.* 3, 50.
140. S. Vajda, P. V., T. Turanyi. (1985) Principal component analysis of kinetic models, *Int. J. Chem. Kin.* 17, 55-81.

141. Soebiyanto, R. P., Sreenath, S. N., Qu, C. K., Loparo, K. A., and Bunting, K. D. (2007) Complex systems biology approach to understanding coordination of JAK-STAT signaling, *BioSystems* 90, 830-842.
142. Chu, Y., Jayaraman, A., and Hahn, J. (2007) Parameter sensitivity analysis of IL-6 signalling pathways, *IET Syst. Biol.* 1, 342-352.
143. Wormald, S., Zhang, J. G., Krebs, D. L., Mielke, L. A., Silver, J., Alexander, W. S., Speed, T. P., Nicola, N. A., and Hilton, D. J. (2006) The comparative roles of suppressor of cytokine signaling-1 and -3 in the inhibition and desensitization of cytokine signaling, *J. Biol. Chem.* 281, 11135-11143.
144. Theis, F. J., Bohl, S., and Klingmüller, U. (2011) Theoretical analysis of time-to-peak responses in biological reaction networks, *Bull. Math. Biol.* 73, 978-1003.
145. Bachmann, J., Raue, A., Schilling, M., Böhm, M. E., Kreutz, C., Kaschek, D., Busch, H., Gretz, N., Lehmann, W. D., Timmer, J., and Klingmüller, U. (2011) Division of labor by dual feedback regulators controls JAK2/STAT5 signaling over broad ligand range, *Mol. Syst. Biol.* 7, 516.
146. Arcone, R., Pucci, P., Zappacosta, F., Fontaine, V., Malorni, A., Marino, G., and Ciliberto, G. (1991) Single-step purification and structural characterization of human interleukin-6 produced in *Escherichia coli* from a T7 RNA polymerase expression vector, *Eur. J. Biochem.* 198, 541-547.
147. Berthois, Y., Katzenellenbogen, J. A., and Katzenellenbogen, B. S. (1986) Phenol red in tissue culture media is a weak estrogen: implications concerning the study of estrogen-responsive cells in culture, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 83, 2496-2500.
148. Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
149. Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227, 680-685.
150. Schilling, M., Maiwald, T., Bohl, S., Kollmann, M., Kreutz, C., Timmer, J., and Klingmüller, U. (2005) Quantitative data generation for systems biology: the impact of randomisation, calibrators and normalisers, *Syst. Biol.* 152, 193-200.
151. Schilling, M., Maiwald, T., Bohl, S., Kollmann, M., Kreutz, C., Timmer, J., and Klingmüller, U. (2005) Computational processing and error reduction strategies for standardized quantitative data in biological networks, *FEBS J.* 272, 6400-6411.
152. Pfaffl, M. W. (2001) A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR, *Nucleic Acids Res.* 29, e45.
153. Hucka, M., Finney, A., Sauro, H. M., Bolouri, H., Doyle, J. C., Kitano, H., Arkin, A. P., Bornstein, B. J., Bray, D., Cornish-Bowden, A., Cuellar, A. A., Dronov, S., Gilles, E. D., Ginkel, M., Gor, V., Goryanin, I., Hedley, W. J., Hodgman, T. C., Hofmeyr, J. H., Hunter, P. J., Juty, N. S., Kasberger, J. L., Kremling, A., Kummer, U., Le Novère, N., Loew, L. M., Lucio, D., Mendes, P., Minch, E., Mjolsness, E. D., Nakayama, Y., Nelson, M. R., Nielsen, P. F., Sakurada, T., Schaff, J. C., Shapiro, B. E., Shimizu, T. S., Spence, H. D., Stelling, J., Takahashi, K., Tomita, M., Wagner, J., and Wang, J. (2003) The systems biology markup language (SBML): a medium for representation and exchange of biochemical network models, *Bioinformatics* 19, 524-531.
154. Dittrich, A., Khouri, C., Sackett, S. D., Ehling, C., Böhmer, O., Albrecht, U., Bode, J. G., Trautwein, C., and Schaper, F. (2012) Glucocorticoids increase interleukin-6 dependent gene induction by interfering with the expression of the SOCS 3 feedback inhibitor, *Hepatology* 55, 256-266
155. Schmitz, J., Dahmen, H., Grimm, C., Gendo, C., Müller-Newen, G., Heinrich, P. C., and Schaper, F. (2000) The cytoplasmic tyrosine motifs in full-length glycoprotein 130 have different roles in IL-6 signal transduction, *J. Immunol.* 164, 848-854.
156. Anhuf, D., Weissenbach, M., Schmitz, J., Sobota, R., Hermanns, H. M., Radtke, S., Linnemann, S., Behrmann, I., Heinrich, P. C., and Schaper, F. (2000) Signal transduction of IL-6, leukemia-

- inhibitory factor, and oncostatin M: structural receptor requirements for signal attenuation, *J. Immunol.* **165**, 2535-2543.
157. 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) A new protein containing an SH2 domain that inhibits JAK kinases, *Nature* **387**, 921-924.
158. Dittrich, A. (2007) Regulation der Zytokin-induzierten SOCS3 Expression durch Glucocorticoide, In *Institut für Biochemie und Molekularbiologie*, RWTH Aachen, Aachen.
159. Wang, H. Q., Liu, B. Q., Gao, Y. Y., Meng, X., Guan, Y., Zhang, H. Y., and Du, Z. X. (2009) Inhibition of the JNK signalling pathway enhances proteasome inhibitor-induced apoptosis of kidney cancer cells by suppression of BAG3 expression, *Br. J. Pharmacol.* **158**, 1405-1412.
160. Honer, C., Nam, K., Fink, C., Marshall, P., Ksander, G., Chatelain, R. E., Cornell, W., Steele, R., Schweitzer, R., and Schumacher, C. (2003) Glucocorticoid receptor antagonism by cyproterone acetate and RU486, *Mol. Pharmacol.* **63**, 1012-1020.
161. Schacke, H., Schottelius, A., Docke, W. D., Strehlke, P., Jaroch, S., Schmees, N., Rehwinkel, H., Hennekes, H., and Asadullah, K. (2004) Dissociation of transactivation from transrepression by a selective glucocorticoid receptor agonist leads to separation of therapeutic effects from side effects, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **101**, 227-232.
162. Roberts, A. W., Robb, L., Rakar, S., Hartley, L., Cluse, L., Nicola, N. A., Metcalf, D., Hilton, D. J., and Alexander, W. S. (2001) Placental defects and embryonic lethality in mice lacking suppressor of cytokine signaling 3, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **98**, 9324-9329.
163. Quaiser, T., Dittrich, A., Schaper, F., and Mönnigmann, M. (2011) A simple work flow for biologically inspired model reduction--application to early JAK-STAT signaling, *BMC Syst. Biol.* **5**, 30.
164. Radtke, S., Wuller, S., Yang, X. P., Lippok, B. E., Mutze, B., Mais, C., de Leur, H. S., Bode, J. G., Gaestel, M., Heinrich, P. C., Behrmann, I., Schaper, F., and Hermanns, H. M. (2010) Cross-regulation of cytokine signalling: pro-inflammatory cytokines restrict IL-6 signalling through receptor internalisation and degradation, *J. Cell Sci.* **123**, 947-959.
165. 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) Association and activation of Jak-Tyk kinases by CNTF-LIF-OSM-IL-6 beta receptor components, *Science* **263**, 92-95.
166. Schroers, A., Hecht, O., Kallen, K. J., Pachta, M., Rose-John, S., and Grötzinger, J. (2005) Dynamics of the gp130 cytokine complex: a model for assembly on the cellular membrane, *Protein Sci.* **14**, 783-790.
167. Anna Dittrich, T. Q., Christina Khouri, Dieter Schwache, Martin Mönnigmann, Fred Schaper. Model driven refinement of the function of SHP2 in IL-6-induced signal transduction, *zur Publikation eingereicht*.
168. Rane, S. G., and Reddy, E. P. (2000) Janus kinases: components of multiple signaling pathways, *Oncogene* **19**, 5662-5679.
169. Schwache, D. (2009) Quantitative Analyse der IL-6 Signaltransduktion, In *Institut für Biochemie*, RWTH Aachen, Aachen.
170. Bongartz, H. (2011) Experimentelle Parametrisierung und Validierung eines Petri-Netz-Modells der IL-6-induzierten JAK/STAT-Signaltransduktion, In *Lehrstuhl für Systembiologie*, Otto-von-Guericke Universität Magdeburg.
171. Lee, D. K., Carrasco, J., Hidalgo, J., and Andrews, G. K. (1999) Identification of a signal transducer and activator of transcription (STAT) binding site in the mouse metallothionein-I promoter involved in interleukin-6-induced gene expression, *Biochem. J.* **337 ( Pt 1)**, 59-65.
172. Kim, H., and Baumann, H. (1997) The carboxyl-terminal region of STAT3 controls gene induction by the mouse haptoglobin promoter, *J. Biol. Chem.* **272**, 14571-14579.
173. Hocke, G. M., Cui, M. Z., Ripperger, J. A., and Fey, G. H. (1992) Regulation of the rat alpha 2 macroglobulin gene by interleukin 6 and leukemia inhibitory factor, *Folia Histochem. Cytobiol.* **30**, 137-139.

174. Okamoto, T., Yamamura, K., and Hino, O. (1999) The mouse interferon-gamma transgene chronic hepatitis model (Review), *Int. J. Mol. Med.* 3, 517-520.
175. Ogata, H., Chinen, T., Yoshida, T., Kinjyo, I., Takaesu, G., Shiraishi, H., Iida, M., Kobayashi, T., and Yoshimura, A. (2006) Loss of SOCS3 in the liver promotes fibrosis by enhancing STAT3-mediated TGF-beta1 production, *Oncogene* 25, 2520-2530.
176. Ogata, H., Kobayashi, T., Chinen, T., Takaki, H., Sanada, T., Minoda, Y., Koga, K., Takaesu, G., Maehara, Y., Iida, M., and Yoshimura, A. (2006) Deletion of the SOCS3 gene in liver parenchymal cells promotes hepatitis-induced hepatocarcinogenesis, *Gastroenterology* 131, 179-193.
177. Berasain, C., Castillo, J., Perugorria, M. J., Latasa, M. U., Prieto, J., and Avila, M. A. (2009) Inflammation and liver cancer: new molecular links, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1155, 206-221.
178. Dalpke, A. H., Opper, S., Zimmermann, S., and Heeg, K. (2001) Suppressors of cytokine signaling (SOCS)-1 and SOCS-3 are induced by CpG-DNA and modulate cytokine responses in APCs, *J. Immunol.* 166, 7082-7089.
179. Wilson, N. J., Boniface, K., Chan, J. R., McKenzie, B. S., Blumenschein, W. M., Mattson, J. D., Basham, B., Smith, K., Chen, T., Morel, F., Lecron, J. C., Kastelein, R. A., Cua, D. J., McClanahan, T. K., Bowman, E. P., and de Waal Malefyt, R. (2007) Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells, *Nat. Immunol.* 8, 950-957.
180. Qin, H., Wang, L., Feng, T., Elson, C. O., Niyongere, S. A., Lee, S. J., Reynolds, S. L., Weaver, C. T., Roarty, K., Serra, R., Benveniste, E. N., and Cong, Y. (2009) TGF-beta promotes Th17 cell development through inhibition of SOCS3, *J. Immunol.* 183, 97-105.
181. Kisand, K., Boe Wolff, A. S., Podkrajsek, K. T., Tserel, L., Link, M., Kisand, K. V., Ersvaer, E., Perheentupa, J., Erichsen, M. M., Bratanic, N., Meloni, A., Cetani, F., Perniola, R., Ergun-Longmire, B., Maclaren, N., Krohn, K. J., Pura, M., Schalke, B., Strobel, P., Leite, M. I., Battelino, T., Husebye, E. S., Peterson, P., Willcox, N., and Meager, A. (2010) Chronic mucocutaneous candidiasis in APECED or thymoma patients correlates with autoimmunity to Th17-associated cytokines, *J. Exp. Med.* 207, 299-308.
182. Komiyama, Y., Nakae, S., Matsuki, T., Nambu, A., Ishigame, H., Kakuta, S., Sudo, K., and Iwakura, Y. (2006) IL-17 plays an important role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis, *J. Immunol.* 177, 566-573.
183. Kamiya, A., Kinoshita, T., Ito, Y., Matsui, T., Morikawa, Y., Senba, E., Nakashima, K., Taga, T., Yoshida, K., Kishimoto, T., and Miyajima, A. (1999) Fetal liver development requires a paracrine action of oncostatin M through the gp130 signal transducer, *EMBO J.* 18, 2127-2136.
184. Drucker, C., Gewiese, J., Malchow, S., Scheller, J., and Rose-John, S. (2010) Impact of interleukin-6 classic- and trans-signaling on liver damage and regeneration, *J. Autoimmun.* 34, 29-37.
185. Debonera, F., Krasinkas, A. M., Gelman, A. E., Aldeguer, X., Que, X., Shaked, A., and Olthoff, K. M. (2003) Dexamethasone inhibits early regenerative response of rat liver after cold preservation and transplantation, *Hepatology* 38, 1563-1572.
186. Newton, R., and Holden, N. S. (2007) Separating transrepression and transactivation: a distressing divorce for the glucocorticoid receptor?, *Mol. Pharmacol.* 72, 799-809.
187. Mozo, L., Gayo, A., Suarez, A., Rivas, D., Zamorano, J., and Gutierrez, C. (1998) Glucocorticoids inhibit IL-4 and mitogen-induced IL-4R alpha chain expression by different posttranscriptional mechanisms, *J. Allergy Clin. Immunol.* 102, 968-976.
188. Boumpas, D. T., Paliogianni, F., Anastassiou, E. D., and Balow, J. E. (1991) Glucocorticosteroid action on the immune system: molecular and cellular aspects, *Clin. Exp. Rheumatol.* 9, 413-423.
189. Bertucci, P. Y., Quaglino, A., Pozzi, A. G., Kordon, E. C., and Pecci, A. (2010) Glucocorticoid-induced impairment of mammary gland involution is associated with STAT5 and STAT3 signaling modulation, *Endocrinology* 151, 5730-5740.

190. Minamoto, S., Ikegame, K., Ueno, K., Narazaki, M., Naka, T., Yamamoto, H., Matsumoto, T., Saito, H., Hosoe, S., and Kishimoto, T. (1997) Cloning and functional analysis of new members of STAT induced STAT inhibitor (SSI) family: SSI-2 and SSI-3, *Bioch. Biophys. Res. Com.* **237**, 79-83.
191. Dauletbaev, N., Eklove, D., Mawji, N., Iskandar, M., Di Marco, S., Gallouzi, I. E., and Lands, L. C. (2011) Down-regulation of cytokine-induced interleukin-8 requires inhibition of p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) via MAPK phosphatase 1-dependent and -independent mechanisms, *J. Biol. Chem.* **286**, 15998-16007.
192. Quante, T., Ng, Y. C., Ramsay, E. E., Hennessy, S., Allen, J. C., Parmentier, J., Ge, Q., and Ammit, A. J. (2008) Corticosteroids reduce IL-6 in ASM cells via up-regulation of MKP-1, *Am. J. Resp. Cell Mol. Biol.* **39**, 208-217.
193. Schakman, O., Gilson, H., and Thissen, J. P. (2008) Mechanisms of glucocorticoid-induced myopathy, *J. Endocrinol.* **197**, 1-10.
194. Zhao, W., Pan, J., Zhao, Z., Wu, Y., Bauman, W. A., and Cardozo, C. P. (2008) Testosterone protects against dexamethasone-induced muscle atrophy, protein degradation and MAFbx upregulation, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* **110**, 125-129.
195. Shruti, K., Shrey, K., and Vibha, R. (2011) Micro RNAs: tiny sequences with enormous potential, *Bioch. Biophys. Res. Com.* **407**, 445-449.
196. Friedman, R. C., Farh, K. K., Burge, C. B., and Bartel, D. P. (2009) Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs, *Genome Res.* **19**, 92-105.
197. Williams, A. E., Larner-Svensson, H., Perry, M. M., Campbell, G. A., Herrick, S. E., Adcock, I. M., Erjefalt, J. S., Chung, K. F., and Lindsay, M. A. (2009) MicroRNA expression profiling in mild asthmatic human airways and effect of corticosteroid therapy, *PLoS One* **4**, e5889.
198. Moschos, S. A., Williams, A. E., Perry, M. M., Birrell, M. A., Belvisi, M. G., and Lindsay, M. A. (2007) Expression profiling in vivo demonstrates rapid changes in lung microRNA levels following lipopolysaccharide-induced inflammation but not in the anti-inflammatory action of glucocorticoids, *BMC Genomics* **8**, 240.
199. Rainer, J., Ploner, C., Jesacher, S., Ploner, A., Eduardoff, M., Mansha, M., Wasim, M., Panzer-Grumayer, R., Trajanoski, Z., Niederegger, H., and Kofler, R. (2009) Glucocorticoid-regulated microRNAs and mirtrons in acute lymphoblastic leukemia, *Leukemia* **23**, 746-752.
200. Izzotti, A., Larghero, P., Cartiglia, C., Longobardi, M., Pfeffer, U., Steele, V. E., and De Flora, S. (2010) Modulation of microRNA expression by budesonide, phenethyl isothiocyanate and cigarette smoke in mouse liver and lung, *Carcinogenesis* **31**, 894-901.
201. Brock M, T. M., Gay RE, Gay S, Speich R, Huber LC. (2011) MicroRNA-18a enhances the IL-6 mediated production of the acute-phase proteins fibrinogen and haptoglobin in human hepatocytes., *J. Biol. Chem.*
202. Millat, T., Wolkenhauer, O., Fischer, R. J., and Bahl, H. (2011) Modeling of cellular processes: methods, data, and requirements, *Methods Mol. Biol.* **696**, 429-447.
203. Klingmüller, U., Bauer, A., Bohl, S., Nickel, P. J., Breitkopf, K., Dooley, S., Zellmer, S., Kern, C., Merfort, I., Sparna, T., Donauer, J., Walz, G., Geyer, M., Kreutz, C., Hermes, M., Gotschel, F., Hecht, A., Walter, D., Egger, L., Neubert, K., Borner, C., Brulport, M., Schormann, W., Sauer, C., Baumann, F., Preiss, R., MacNelly, S., Godoy, P., Wiercinska, E., Ciucian, L., Edelmann, J., Zeilinger, K., Heinrich, M., Zanger, U. M., Gebhardt, R., Maiwald, T., Heinrich, R., Timmer, J., von Weizsacker, F., and Hengstler, J. G. (2006) Primary mouse hepatocytes for systems biology approaches: a standardized in vitro system for modelling of signal transduction pathways, *Syst. Biol.* **153**, 433-447.
204. Bohl, S. (2009) Dynamic modeling of signal processing for IL-6-induced STAT3 signal transduction, In *Combined Faculties for the Natural Sciences and for Mathematics*, Ruperto-Carola University Heidelberg, Heidelberg.
205. Sonne, O., Davidsen, O., Moller, B. K., and Munck Petersen, C. (1990) Cellular targets and receptors for interleukin-6. I. In vivo and in vitro uptake of IL-6 in liver and hepatocytes, *Eur. J. Clin. Invest.* **20**, 366-376.

206. Zohlnhöfer, D., Graeve, L., Rose-John, S., Schooltink, H., Dittrich, E., and Heinrich, P. C. (1992) The hepatic interleukin-6 receptor. Down-regulation of the interleukin-6 binding subunit (gp80) by its ligand, *FEBS letters* 306, 219-222.
207. Baumann, H., Prowse, K. R., Won, K. A., Marinkovic, S., and Jahreis, G. P. (1988) Regulation of acute phase protein genes by hepatocyte-stimulating factors, monokines and glucocorticoids, *Tokai J. Exp. Clin. Med.* 13, 277-292.
208. Gerhartz, C., Dittrich, E., Stoyan, T., Rose-John, S., Yasukawa, K., Heinrich, P. C., and Graeve, L. (1994) Biosynthesis and half-life of the interleukin-6 receptor and its signal transducer gp130, *Eur. J. Biochem.* 223, 265-274.
209. Giese, B., Au-Yeung, C. K., Herrmann, A., Diefenbach, S., Haan, C., Küster, A., Wortmann, S. B., Roderburg, C., Heinrich, P. C., Behrmann, I., and Müller-Newen, G. (2003) Long term association of the cytokine receptor gp130 and the Janus kinase Jak1 revealed by FRAP analysis, *J. Biol. Chem.* 278, 39205-39213.
210. Altan-Bonnet, G., and Germain, R. N. (2005) Modeling T cell antigen discrimination based on feedback control of digital ERK responses, *PLoS Biol.* 3, e356.
211. Boulanger, M. J., Chow, D. C., Brevnova, E. E., and Garcia, K. C. (2003) Hexameric structure and assembly of the interleukin-6/IL-6 alpha-receptor/gp130 complex, *Science* 300, 2101-2104.
212. Singh, A., Jayaraman, A., and Hahn, J. (2006) Modeling regulatory mechanisms in IL-6 signal transduction in hepatocytes, *Biotechnol. Bioeng.* 95, 850-862.
213. Kretzschmar, A. K., Dinger, M. C., Henze, C., Brocke-Heidrich, K., and Horn, F. (2004) Analysis of Stat3 (signal transducer and activator of transcription 3) dimerization by fluorescence resonance energy transfer in living cells, *Biochem. J.* 377, 289-297.
214. Wenta, N., Strauss, H., Meyer, S., and Vinkemeier, U. (2008) Tyrosine phosphorylation regulates the partitioning of STAT1 between different dimer conformations, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 105, 9238-9243.
215. Haan, S., Hemmann, U., Hassiepen, U., Schaper, F., Schneider-Mergener, J., Wollmer, A., Heinrich, P. C., and Grötzinger, J. (1999) Characterization and binding specificity of the monomeric STAT3-SH2 domain, *J. Biol. Chem.* 274, 1342-1348.
216. Becker, S., Groner, B., and Müller, C. W. (1998) Three-dimensional structure of the Stat3beta homodimer bound to DNA, *Nature* 394, 145-151.
217. Raia, V., Schilling, M., Bohm, M., Hahn, B., Kowarsch, A., Raue, A., Sticht, C., Bohl, S., Saile, M., Moller, P., Gretz, N., Timmer, J., Theis, F., Lehmann, W. D., Lichter, P., and Klingmüller, U. (2011) Dynamic mathematical modeling of IL13-induced signaling in Hodgkin and primary mediastinal B-cell lymphoma allows prediction of therapeutic targets, *Cancer Res.* 71, 693-704.
218. Yang, J., Liu, L., He, D., Song, X., Liang, X., Zhao, Z. J., and Zhou, G. W. (2003) Crystal structure of human protein-tyrosine phosphatase SHP-1, *J. Biol. Chem.* 278, 6516-6520.
219. Zhang, Z., Shen, K., Lu, W., and Cole, P. A. (2003) The role of C-terminal tyrosine phosphorylation in the regulation of SHP-1 explored via expressed protein ligation, *J. Biol. Chem.* 278, 4668-4674.
220. Moya, C., Huang, Z., Cheng, P., Jayaraman, A., and Hahn, J. (2011) Investigation of IL-6 and IL-10 signalling via mathematical modelling, *IET Syst. Biol.* 5, 15.
221. Holgado-Madruga, M., Emler, D. R., Moscatello, D. K., Godwin, A. K., and Wong, A. J. (1996) A Grb2-associated docking protein in EGF- and insulin-receptor signalling, *Nature* 379, 560-564.
222. Takahashi-Tezuka, M., Yoshida, Y., Fukada, T., Ohtani, T., Yamanaka, Y., Nishida, K., Nakajima, K., Hibi, M., and Hirano, T. (1998) Gab1 acts as an adapter molecule linking the cytokine receptor gp130 to ERK mitogen-activated protein kinase, *Mol. Cell. Biol.* 18, 4109-4117.
223. You, M., Yu, D. H., and Feng, G. S. (1999) Shp-2 tyrosine phosphatase functions as a negative regulator of the interferon-stimulated Jak/STAT pathway, *Mol. Cell. Biol.* 19, 2416-2424.

224. De Souza, D., Fabri, L. J., Nash, A., Hilton, D. J., Nicola, N. A., and Baca, M. (2002) SH2 domains from suppressor of cytokine signaling-3 and protein tyrosine phosphatase SHP-2 have similar binding specificities, *Biochemistry* **41**, 9229-9236.
225. Siewert, E., Muller-Esterl, W., Starr, R., Heinrich, P. C., and Schaper, F. (1999) Different protein turnover of interleukin-6-type cytokine signalling components, *Eur. J. Biochem.* **265**, 251-257.
226. Ernst, M., and Jenkins, B. J. (2004) Acquiring signalling specificity from the cytokine receptor gp130, *Trends Genet.* **20**, 23-32.
227. Bard-Chapeau, E. A., Li, S., Ding, J., Zhang, S. S., Zhu, H. H., Princen, F., Fang, D. D., Han, T., Bailly-Maitre, B., Poli, V., Varki, N. M., Wang, H., and Feng, G. S. (2011) Ptpn11/Shp2 acts as a tumor suppressor in hepatocellular carcinogenesis, *Cancer Cell* **19**, 629-639.
228. Bromberg, J. F., Wrzeszczynska, M. H., Devgan, G., Zhao, Y., Pestell, R. G., Albanese, C., and Darnell, J. E., Jr. (1999) Stat3 as an oncogene, *Cell* **98**, 295-303.
229. Tartaglia, M., Niemeyer, C. M., Fragale, A., Song, X., Buechner, J., Jung, A., Hahlen, K., Hasle, H., Licht, J. D., and Gelb, B. D. (2003) Somatic mutations in PTPN11 in juvenile myelomonocytic leukemia, myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia, *Nat. Genet.* **34**, 148-150.
230. Chan, R. J., and Feng, G. S. (2007) PTPN11 is the first identified proto-oncogene that encodes a tyrosine phosphatase, *Blood* **109**, 862-867.
231. Barr, A. J. (2010) Protein tyrosine phosphatases as drug targets: strategies and challenges of inhibitor development, *Future Med. Chem.* **2**, 1563-1576.
232. 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) Dissection of signaling cascades through gp130 in vivo: reciprocal roles for STAT3- and SHP2-mediated signals in immune responses, *Immunity* **12**, 95-105.
233. Yang, X. O., Panopoulos, A. D., Nurieva, R., Chang, S. H., Wang, D., Watowich, S. S., and Dong, C. (2007) STAT3 regulates cytokine-mediated generation of inflammatory helper T cells, *J. Biol. Chem.* **282**, 9358-9363.
234. Udagawa, N., Takahashi, N., Katagiri, T., Tamura, T., Wada, S., Findlay, D. M., Martin, T. J., Hirota, H., Taga, T., Kishimoto, T., and Suda, T. (1995) Interleukin (IL)-6 induction of osteoclast differentiation depends on IL-6 receptors expressed on osteoblastic cells but not on osteoclast progenitors, *J. Exp. Med.* **182**, 1461-1468.
235. Peters, M., Muller, A. M., and Rose-John, S. (1998) Interleukin-6 and soluble interleukin-6 receptor: direct stimulation of gp130 and hematopoiesis, *Blood* **92**, 3495-3504.
236. Rouault, T. A., Hentze, M. W., Dancis, A., Caughman, W., Harford, J. B., and Klausner, R. D. (1987) Influence of altered transcription on the translational control of human ferritin expression, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **84**, 6335-6339.
237. Ostareck-Lederer, A., Ostareck, D. H., and Hentze, M. W. (1998) Cytoplasmic regulatory functions of the KH-domain proteins hnRNPs K and E1/E2, *Trends Biochem. Sci.* **23**, 409-411.



---

## Lebenslauf

Name	Anna Dittrich
Geburtsdatum	22.01.1983
Geburtsort	Duisburg
Nationalität	deutsch
Familienstand	ledig

---

## Schulbildung

08/1989 – 07/1993	GGG Heinrich-Bongers-Straße, Duisburg
08/1993 – 05/2002	Landfermann Gymnasium, Duisburg
28.05.2002	Abitur

## Hochschulstudium

10/2002 - 09/2004	Studium der Biologie, Heinrich-Heine Universität Düsseldorf Abschluss: Vordiplom
10/2004- 09/2007	Studium der Biologie, RWTH Aachen Hauptfach: Mikrobiologie Nebenfächer: Immunologie, Bionik, Umwelthygiene
10/2006 – 09/2007	Diplomarbeit am Institut für Biochemie und Molekularbiologie, RWTH Aachen Thema: "Regulation der Zytokin-induzierten SOCS3 Expression durch Glucocorticoide" Abschluss Diplom-Biologin Auszeichnung mit der Springorum Medaille der RWTH Aachen
10/2007 – 09/2009	Zusatzstudium Wirtschaftswissenschaften, RWTH Aachen

## Stipendium

2002 - 2007	Stipendiatin der Studienstiftung des deutschen Volkes
-------------	---

## Beruflicher Werdegang

10/2007 – 05/2010	wissenschaftliche Angestellte am Institut für Biochemie und Molekularbiologie, RWTH Aachen
seit 06/2010	wissenschaftliche Angestellte am Lehrstuhl für Systembiologie, Otto-von-Guericke Universität Magdeburg

## Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die von mir eingereichte Dissertation zum Thema

Regulation der IL-6-induzierten JAK/STAT Signaltransduktion

Reduktion der SOCS3 Expression durch Glukokortikoide

und

Systembiologische Analyse der Funktion von SHP2

selbstständig verfasst, nicht schon als Dissertation verwendet habe und die benutzten Hilfsmittel und Quellen vollständig angegeben wurden.

Weiterhin erkläre ich, dass ich weder diese noch eine andere Arbeit zur Erlangung des akademischen Grades doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.) an anderen Einrichtungen eingereicht habe.

Magdeburg, im November 2011

Anna Dittrich

**Mein herzlicher Dank gilt...**

... Prof. Dr. rer. nat. Fred Schaper für die engagierte und persönliche Betreuung meiner Doktorarbeit und die Möglichkeit selbstständig zu forschen

... Prof. Dr. rer. nat. Gerhard Müller-Newen für die Übernahme des Zweitgutachtens

... Christina Khouri und Tom Quaiser für die bestmögliche Zusammenarbeit in der Wissenschaft und die vielen geteilten Erlebnisse in den letzten Jahren

... den ehemaligen und aktuellen Mitgliedern des Institutes für Biochemie und Molekularbiologie in Aachen, ganz besonders Anne Mohr, Tanja Nöcker, Barbara Lippok, Janka Günther, Dr. rer. nat. Thomas Clahsen, Dr. rer. nat. Pia Müller und Barbara Mütze

... den Mitarbeitern des Lehrstuhls für Systembiologie in Magdeburg, besonders Nicole Wundrack, Marlies Liefold und Christin Wallstab, für ein erstes Jahr voller neuer, spannender Aufgaben und Entdeckungen

... den Düsseldorfern Dr. rer. nat. Christian Ehling und Dr. rer. nat. Ute Albrecht für gemeinsame Northern Blots, Hepatozyten-Isolationen und Kongressfahrten

... Sibille Sauer-Lehnen und Carmen Tag für die Unterstützung bei der Präparation muriner Hepatozyten

... Sara Dutton-Sackett, Ph.D. für Mäuse in der Schleuse und wertvolle Hilfe bei *in vivo* Versuchen

... meinen Freunden, besonders den Biologen SPKS, Eva, Laura und Nina für eine tolle gemeinsame Zeit

... meiner Familie und Jörg für die Unterstützung während meines Studiums und meiner Doktorarbeit