

Michael Neher  
Dr. med.

## **Transkriptionskontrolle des Interleukin-6- Gens in Astrozyten durch Adenosin, einem Mediator bei cerebraler Ischämie**

Geboren am 5.3.1956 in Darmstadt  
Reifeprüfung am 15.5.1975 in Darmstadt  
Studiengang der Fachrichtung Medizin vom WS 1991/92 bis SS 1999  
Physikum am 24.8.1993 an der Universität Heidelberg  
Klinisches Studium in Heidelberg  
Praktisches Jahr in Heidelberg und Huttwil (Schweiz)  
Staatsexamen am 3.5.1999 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach: Neurologie  
Doktorvater: Priv.-Doz. Dr. med. M. Schwaninger

Bei cerebraler Ischämie findet sich im Liquor und im Serum betroffener Patienten eine erhöhte Konzentration von Interleukin 6 (IL-6). Die bekannte neuroprotektive Wirkung von IL-6 war bereits Anlass zu Vorarbeiten, die eine IL-6- Sekretion durch Astrozyten unter dem Einfluss des ebenfalls bei Ischämie zunehmend präsenten Mediators Adenosin über die Bindung an Adenosinrezeptoren demonstriert hatten.

Unter Anwendung molekularbiologischer Methoden wurde die Beteiligung des Promotors des humanen IL-6- Gens an der Steuerung der IL-6- Sekretion durch Adenosin untersucht. Nach transienter Transfektion rekombinanter DNA, in der über den humanen Interleukin-6- Promotor (-179 bis +12) die Transkription eines Reportergens dirigiert wird, zeigte sich bei anschließender Exposition von 100  $\mu$ M 2-Chlor-Adenosin im Zellkulturmedium sowohl bei einer primären Astrozyten- Zellkultur (Maus) als auch bei einer humanen Astrozytom- Zelllinie, U373 MG, die signifikante Adenosin-Responsivität des Interleukin-6- Promotors. Die gewählte Adenosin-Konzentration entsprach einer Größenordnung, die in vivo im Interzellularraum ischämischer cerebraler Gewebe vorliegt. Der Ausschluss posttranskriptionaler Effekte und die Prüfung der Spezifität der IL-6- Promotorwirkung erfolgte durch den Vergleich mit dem Promotor der viralen Thymidinkinase von Herpes Simplex I, mit dem eine signifikante Responsivität der Astrozyten nach Adenosin ausblieb.

Die wesentliche Beteiligung der beiden Transkriptionsfaktoren NF- $\kappa$ B und C/EBP $\beta$  (NF-IL6) wurde durch den Einsatz spezifischer Mutanten des humanen IL-6- Promotors untersucht. Die Mutanten wiesen Änderungen jeweils an den bindenden DNA-Regionen für die genannten Transkriptionsfaktoren auf. Gegenüber dem nativen Promotor war mit keiner der Mutanten ein signifikant ansteigendes Reportersignal nach Stimulation der Zellen durch 2-Chlor-Adenosin messbar.

Zur Prüfung der funktionellen Relevanz des nativen Promotor-Abschnitts -179 bis +12 im verwendeten Vektor erfolgte die Umklonierung eines 1,2 kbp langen humanen IL-6- Promotors vor das Luciferase-Gen. Die korrekte Positionierung und Orientierung des 1,2 kbp- Promotors in der neuen DNA konnte durch die Sequenzierung des neuen Konstruktes gesichert werden. Der funktionelle Vergleich beider Promotoren in der Zellkultur erbrachte bei grundsätzlich gleichem Verhalten einen nur leichten zusätzlichen Signalanstieg bei Einsatz des langen Promotor-Abschnitts, dieser Unterschied war jedoch nicht immer signifikant reproduzierbar. Bereits der Vektor mit dem Promotorabschnitt -179 bis +12 enthält somit wesentliche Elemente für die Regulation der IL-6- Genexpression, insbesondere die Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren NF- $\kappa$ B und C/EBP $\beta$ . Mit den genannten

Ergebnissen war gezeigt, dass die Sekretion von Interleukin-6 durch Astrozyten nach 2-Chlor-Adenosin- Exposition auf der Ebene der Transkriptionskontrolle reguliert ist.

Weiterhin wurde hinsichtlich der IL-6- Genexpression nach Bindung des Liganden 2-Chlor-Adenosin am Rezeptor in zwei unterschiedlichen experimentellen Ansätzen die Beteiligung der Proteinkinase A (PKA) an der intrazellulären Signaltransduktion untersucht. Über die radioaktiv markierte Phosphorylierung eines Testpeptids wurde zunächst die Aktivierung der PKA im Zytosol *2-Chlor-Adenosin- stimulierter* Astrozyten ermittelt unter Bezug auf die *maximale* cAMP-abhängige Enzymaktivierbarkeit *in vitro* (Aktivitätsquotient). Mit diesem experimentellen Design war eine Aktivierung der PKA nach Stimulation mit 2-Chlor-Adenosin nicht eindeutig nachweisbar. Im Gegensatz hierzu war bei der Kotransfektion des humanen IL-6- Promotors mit einem Vektor zur Expression des Proteinkinase-Inhibitors (PKI) eine dosisabhängige Reduktion der 2-Chlor-Adenosin- Responsivität von Astrozyten unter PKI-Einfluss messbar. Der vermeintliche Widerspruch findet bezüglich des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B eine mögliche Erklärung durch die Berücksichtigung von zwei unterschiedlichen PKA-Fraktionen, deren eine als zytosolisch- cAMP-abhängig, die andere als I- $\kappa$ B- komplexiert und cAMP-insensitiv charakterisiert werden kann. Speziell die NF- $\kappa$ B- I- $\kappa$ B- komplexierte PKA ist in die Aktivierung von NF- $\kappa$ B eingebunden. Möglicherweise wird lediglich im PKI-Experiment, nicht aber bei der unspezifischen Messung der gesamten zellulären PKA die für die Regulation von NF- $\kappa$ B relevante (komplexierte) PKA-Fraktion adäquat erfasst. Zugleich deutet aber die Adenosinrezeptor- vermittelte parallele Hochregulation des zweiten Transkriptionsfaktors C/EBP $\beta$  (NF-IL6) auf eine Unterschreitung der Detektionsgrenze bei der A-Kinase- Messung hin, da für *diesen* Signalweg eine cAMP-abhängige PKA-Aktivität experimentell belegt ist.

Das postulierte natürliche System zur Infarktprävention durch Adenosin mit anschließender IL-6- Sekretion basiert somit molekular auf der Regulation der IL-6- Transkription unter Beteiligung der Proteinkinase A sowie der Transkriptionsfaktoren NF- $\kappa$ B und C/EBP $\beta$  an der intrazellulären Signaltransduktion vom membranständigen Adenosinrezeptor zur Kernregion aktivierter Astrozyten.