

Nicole Petersen

Dr. med.

## **Die Stimulation der Interleukin-6 Transkription durch NF-IL6 und NF- $\kappa$ B.**

Geboren am 24.11.1973 in Heidelberg

Reifeprüfung am 11.5.1993 in Sandhausen

Studiengang der Fachrichtung Medizin vom SS 1994 bis WS 2000/2001

Physikum am 1.4.1996 an der Universität Heidelberg

Klinisches Studium in Heidelberg

Praktisches Jahr im KKH Sinsheim / University Hospital of Wales, Cardiff

Staatsexamen am 13.11.2000 an der Universität Heidelberg

Promotionsfach Neurologie

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

Aus verschiedenen Vorarbeiten ist eine maßgebliche Beteiligung von Interleukin-6 (IL-6) an den Auswirkungen einer zerebralen Ischämie auf das Gehirn bekannt. Dem Zytokin IL-6 werden neuroprotektive Eigenschaften zugeschrieben. Andererseits kommt es durch eine gesteigerte IL-6 Genexpression unter und nach zerebraler Ischämie auch zu einer Zunahme des Hirnödems und zur Ausbildung weiterer entzündlicher Veränderungen. Die Expression von IL-6 in Astrozyten wird von den Neuromodulatoren Adenosin und Bradykinin stimuliert. In Zellkulturexperimenten konnte die Signalkaskade, über die Adenosin an der IL-6 Aktivierung beteiligt ist, aufgeklärt werden. Bekannt war, daß die durch Adenosin aktivierte IL-6 Gentranskription über den A<sub>2B</sub>-Rezeptor vermittelt wird. Intrazellulär kommt es nachfolgend zu einer Aktivierung der Proteinkinase A (PKA) und über cAMP-Bildung zur IL-6 Expression. Die Proteinkinase C und die Ca<sup>2+</sup>/Calmodulin-abhängige Proteinkinase haben keinen Effekt auf die Adenosinstimulation. Die vorliegende Arbeit sollte den molekularen Mechanismus der Induktion der IL-6-Transkription durch Adenosin, cAMP und Bradykinin weiter charakterisieren.

Im IL-6 Promoter konnten bisher verschiedene cAMP-responsive Elemente beschrieben werden. Eine dieser DNA-Bindungsstellen ist die CAAT-Box, deren Mutation zu einer deutlichen Verminderung der IL-6 Expression nach Adenosin-/cAMP-Stimulation führt.

Unter anderem zeigten Bandshift Assays sowohl die Bindung eines NF-IL6 / C/EPB $\delta$ -Heterodimers an die CAAT-Box im IL-6 Promoter als auch die eines NF-IL6-Homodimers. Die Bindung dieser Proteindimere konnte durch Konkurrenzexperimente als sequenzspezifisch identifiziert werden.

Eine Aktivierung durch Adenosin oder dessen Analogon 2CA und den cAMP-Agonisten Forskolin führte zeitabhängig zu einer vermehrten DNA-Bindung in Bandshift Assays, wobei erst nach 2 Stunden eine Verstärkung der Banden nachweisbar war. Die Latenz bis zum Auftreten der Stimulationseffekte macht eine Translokation des NF-IL6 vom Zytosol in den Nucleus sehr unwahrscheinlich. Auch befindet sich mit GFP markiertes NF-IL6 sowohl vor als auch nach Stimulation durch Adenosinanaloga im Zellkern. Eine Erhöhung der DNA-Bindungsaffinität des NF-IL6 durch eine Phosphorylierung an Ser<sup>105</sup> durch PKA erscheint ebenso unwahrscheinlich, da genannte Phosphorylierungsstelle dem Maus-NF-IL6 fehlt.

Nach unserem Modell vermuten wir eine de novo-Synthese des NF-IL6 als Ursache für die verstärkte NF-IL6 DNA-Bindung nach Stimulation mit Adenosinanaloga. Eine vorherige Behandlung der primären Astrozyten mit Cycloheximid - einem Hemmstoff der Proteinbiosynthese - führt zu einer deutlichen Abschwächung der DNA-Bindung sowohl ohne, als auch mit Stimulation durch Forskolin. Diese Ergebnisse wurden durch Versuche mit einem Antisense-Oligonukleotid gegen die Translationsstartstelle von NF-IL6 weiter gestützt. Die verminderte Translation von NF-IL6 stellte sich in Bandshift Assays als verminderte Bandenintensität, in Transfektions-Assays als verminderte Induktion der IL-6 Transkription durch cAMP dar. Andere Arbeiten stützen diese These, so sind erhöhte NF-IL6 mRNA-Spiegel nach Stimulation mit VIP oder Noradrenalin beschrieben.

Die durch die de novo-Synthese angestiegene intranukleäre NF-IL6 Konzentration ist über eine Trans-Aktivierung in der Lage, die IL-6 Genexpression zu steigern. Eine Überexpression von NF-IL6 führte zu einer deutlichen Zunahme der IL-6-Transkription. Andererseits verhindert eine Blockade der NF-IL6 Translationsstartstelle durch ein gegensinniges Oligonukleotid die NF-IL6 Bildung und damit auch die IL-6 Genexpression.

Ein weiterer Stimulus für die IL-6 Genexpression ist neben dem skizzierten Modell Bradykinin, welches seine Wirkung unter anderem über den Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B vermittelt. Durch eine Bradykininstimulation erfolgt eine Aktivierung des NF- $\kappa$ B, was in einer zeitabhängig verstärkten DNA-Bindung des NF- $\kappa$ B in Bandshift Assays zum Ausdruck kommt. Die Protein-DNA-Komplexe bestehen aus p50-Homodimeren und p50/RelA-Heterodimeren. Aus diesen Daten und den Ergebnissen aus Vorarbeiten kann man folgern, daß in primären Mäuse-Astrozyten die Bradykininwirkung auf die IL-6 Gentranskription

durch eine PKC- und  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Aktivierung der Unterheiten p50 und RelA des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B erfolgt.

Zusammenfassend zeigen unsere Ergebnisse zwei molekulare Mechanismen, durch die die Transkription des Entzündungsmediators IL-6 in Astrozyten im Rahmen einer zerebralen Ischämie stimuliert werden kann. Das verbesserte Verständnis der beteiligten Signalkaskade wird vielleicht in Zukunft eine differenzierte Induktion von Entzündungsmediatoren wie IL-6 mit schützenden und schädigenden Eigenschaften erlauben.