

Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades  
der Fakultät für Chemie und Pharmazie  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Eine neue Domäne der IL-6 Rezeptor  $\beta$ -Kette,  
gp130, vermittelt Zellwachstum und die Aktivie-  
rung der Kinasen Hck und Erk

Michael Schäffer

aus  
Neunburg v.W.

2000

## Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 13 Abs. 3 bzw. 4 der Promotionsordnung vom 29. Januar 1998 von Prof. Dr. Horst Domdey betreut.

## Ehrenwörtliche Versicherung

Diese Dissertation wurde selbständig, ohne unerlaubte Hilfe erarbeitet.

München, am 12.11.2000

Michael Schäffer

A handwritten signature in dark ink, appearing to be 'MS', is centered on a light blue rectangular background.

Dissertation eingereicht am: 21.11.2000

1. Gutachter: Prof. Dr. Horst Domdey
2. Gutachter: Prof. Dr. Michael Hallek

Mündliche Prüfung am: 18.12.2000

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von Januar 1996 bis September 2000 am Klinikum Innenstadt der Ludwig-Maximilians-Universität München und der GSF unter der Anleitung von Prof. Dr. Michael Hallek angefertigt.

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht oder werden zur Veröffentlichung eingereicht:

Hallek M., Neumann C., Schäffer M., Danhauser-Riedl S., von Bubnoff N., de Vos G., Druker B.J., Yasukawa K., Griffin J.D., Emmerich B. Signal Transduction of Interleukin-6 involves Tyrosine Phosphorylation of multiple cytosolic Proteins and Activation of Src-family Kinases Fyn, Hck, and Lyn in Multiple Myeloma Cell Lines. *Experimental Hematology* 25: 1367-1377 (1997)

Michael Schäffer, Michaela Schneiderbauer, Sascha Weidler, Markus Warmuth, Gabriele de Vos, and Michael Hallek. Signaling through a novel acidic domain of gp130 mediates cell proliferation and activation of Hck and Erk Kinase. (2000, eingereicht)

Und wenn ich prophetisch reden könnte  
und alle Geheimnisse wüsste  
und alle Erkenntnis hätte;  
wenn ich alle Glaubenskraft besäße  
und Berge damit versetzen könnte,  
hätte aber die Liebe nicht,  
wäre ich nichts.

Für meine Mutter  
(1 Kor 13,2)

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Michael Hallek, der mich in den letzten Jahren nicht nur wissenschaftlich sondern auch menschlich geprägt hat.

Herrn Prof. Dr. Horst Domdey gilt mein Dank für seine Bereitschaft, meine Dissertation vor der Fakultät für Chemie und Pharmazie zu vertreten.

Mein herzlicher Dank gilt Gabriele, Michaela, Rosário und Sascha für die hervorragende Arbeitsatmosphäre und die fruchtbaren Diskussionen. Ihre Anwesenheit trug wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit bei.

Allen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Hallek an der GSF und im Genzentrum danke ich für die freundschaftliche Zusammenarbeit und stetige Hilfsbereitschaft.

Ich danke allen Mitgliedern des Teams SiREEN und hoffe mit ihnen auf eine gemeinsame und erfolgreiche Zukunft.

Ich danke allen Menschen, die in den letzten Jahren in mein Leben getreten sind. Sie alle haben auf ihre Weise Spuren hinterlassen und diese Arbeit mit beeinflusst.

---

# INHALTSVERZEICHNIS

INHALTSVERZEICHNIS .....	1
1. EINLEITUNG .....	3
1.1 Einführung .....	3
1.2 Die Biologie von Interleukin-6 .....	4
1.2.1 Struktur und Expression von Interleukin-6 .....	4
1.2.2 Die Physiologie von Interleukin 6 .....	5
1.3 Das Multiple Myelom (Plasmozytom) .....	7
1.3.1 Allgemeines .....	7
1.3.2 Die Pathogenese des Multiplen Myeloms .....	8
1.4 Die Signaltransduktion von Interleukin 6 .....	11
1.4.1 Der Interleukin-6 Rezeptorkomplex .....	11
1.4.2 Die Signaltransduktion von Interleukin-6: Stand der Forschung .....	14
1.5 Die Src-Kinasen .....	17
1.5.1 Die Src Protein-Tyrosin Kinase Familie .....	17
1.5.2 Die Funktion der konservierten Src-Kinase Domänen .....	17
1.5.3 Src-Kinasen in der Signaltransduktion hämatopoetischer Wachstumsfaktoren .....	18
1.6 Fragestellung und Hintergrund .....	19
1.7 Ergebnisse aus eigenen Vorarbeiten .....	21
1.8 Ziele der Arbeit .....	23
2. MATERIAL UND METHODEN .....	24
2.1 Material .....	24
2.1.1 Zelllinien .....	24
2.1.2 Bakterienstämme .....	24
2.1.3 Plasmide, Primer, cDNAs .....	25
2.1.4 Zellkulturmaterialien .....	26
2.1.5 Labormaterial .....	27
2.1.6 Chemikalien und Antikörper .....	28
2.2 Methoden .....	29
2.2.1 Arbeiten mit Bakterien .....	29
2.2.2 Präparation und Analyse von DNA .....	32

---

2.2.3 Zellkultur.....	35
2.2.4 Herstellung stabil und transient exprimierender Zelllinien .....	37
2.2.5 Hungern und Stimulieren der Zellen.....	40
2.2.6 Protein Analyse .....	41
2.2.7 Proliferations-Assays.....	50
3. ERGEBNISSE .....	51
3.1 Sequenz –und Strukturanalyse von gp130.....	51
3.2 Mutation von gp130.....	52
3.2.1 Analyse der verschiedenen gp130 Mutanten.....	54
3.3 Die Eingrenzung der Hck-Bindungsdomäne von gp130 .....	56
3.3.1 Verwendung von gp130 Trunktions- und Deletionsmutationen .....	56
3.3.2 Verwendung von gp130 Punktmutanten .....	60
3.4 Durch die Hck/gp130 Interaktion vermittelte biologische Effekte .....	62
3.4.1 Die Aktivierung von Hck .....	63
3.4.2 Die Aktivierung von STAT3 .....	64
3.4.3 Untersuchung des Zellwachstums .....	66
3.5 Durch Hck vermittelte Signalwege .....	69
3.5.1 Die Regulation von Pyk2.....	70
3.5.2 Die Regulation von Erk .....	72
4. DISKUSSION .....	74
4.1 Diskussion der Versuchsergebnisse.....	74
4.2 Modell der Rolle von Hck in der Signaltransduktion von Interleukin-6.....	79
4.3 Funktionelle Bedeutung der Versuchsergebnisse und Perspektiven.....	80
5. ZUSAMMENFASSUNG.....	85
6. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS .....	86
7. LITERATURVERZEICHNIS .....	90
8. LEBENSLAUF .....	110

---

# 1. EINLEITUNG

## 1.1 Einführung

Biologische Prozesse wie das Wachstum und die Differenzierung von Zellen werden durch ein feinreguliertes Netzwerk von Signalproteinen, die Signaltransduktion, gesteuert. Die Entstehung von Krebs wird heute als ein stufenweiser Prozess angesehen, bei dem die Signaltransduktion so fehlreguliert wird, dass es zum unkontrollierten Zellwachstum kommt. Dabei ist der initiale Schritt die durch biochemische, virale oder physikalische Einflüsse induzierte Transformation von Protoonkogenen in Onkogene. Die schrittweise Transformation weiterer Protoonkogene kann dann schließlich zur Ausbildung eines malignen Tumors führen. Da Signalproteine die Genprodukte von Protoonkogenen sind, leisten die Ergebnisse aus der Erforschung von Signaltransduktionsmechanismen einen wichtigen Beitrag für das Verständnis der Krebsentstehung.

Die Signaltransduktion von Zytokine erfordert die Bindung des Interleukins an seinen spezifischen Rezeptor auf der Zelloberfläche. Dadurch werden verschiedenste intrazelluläre Prozesse induziert. Immer erfolgt dabei die Aktivierung von Tyrosinkinase und Serin-/Threoninkinase, die dann ihre Substrate phosphorylieren und somit die Weiterleitung des extrazellulären Signals gewährleisten.

In der vorliegenden Dissertation wurden neue Erkenntnisse über die molekularen Mechanismen der Signaltransduktion von Interleukin-6 gewonnen. Dieses Zytokin ist ein zentraler Wachstumsfaktor für das Multiple Myelom, einem bislang meist unheilbaren Blutkrebs.



## 1.2 Die Biologie von Interleukin-6

### 1.2.1 Struktur und Expression von Interleukin-6

#### STRUKTUR

Humanes Interleukin-6 (IL-6) ist ein Polypeptid von 184 Aminosäuren Länge, das als Precursor von 212 Aminosäuren synthetisiert wird. Der menschliche Organismus produziert mindestens fünf Formen von IL-6, die sich in Masse (21,5-28 kD) und durch posttranslationale Modifikationen (Glykosylierung, Phosphorylierung) unterscheiden. Im Plasma gibt es außerdem eine 42-45 kD schwere Form, die mit einem Carrierprotein (Alpha-2-Makroglobulin) komplexiert ist (Kishimoto T., 1989).

#### EXPRESSION

Die Hauptquellen für IL-6 *in vivo* sind stimulierte Monozyten, Fibroblasten und Endothelzellen. Außerdem wird IL-6 von Makrophagen, B- und T-Lymphozyten, Eosinophilen, Mastzellen, Gliazellen, Astrozyten und Stromazellen synthetisiert (Ibelgauf H., 1995). Das humane IL-6 Gen ist etwa 5 kB lang. Es liegt auf dem kurzen Arm des Chromosoms 7 (7p21-p14) und weist starke Homologien zum G-CSF-Gen auf. Die IL-6-Produktion wird durch verschiedene Signale reguliert. Lipopolysaccharid (LPS) erhöht die IL-6-Syntheserate in Monozyten und Fibroblasten (Helfgott D.C. et al., 1987). Diverse Zytokine wie TNF (tumor necrosis factor), PDGF, IFN- $\beta$  (Interferon- $\beta$ ) und IL-1 sowie cAMP bewirken dasselbe in anderen Zellen. Ebenso induzieren Influenza- und Rhinoviren die IL-6-Synthese. Dagegen regulieren Glucocorticoide die IL-6-Expression in vielen Geweben *in vivo* negativ. Um den unterschiedlichen Stimuli gerecht zu werden, enthält die IL-6 Promotorregion zahlreiche regulatorische Elemente. So gibt es eine Bindungsstelle für NF- $\kappa$ B, die in nicht lymphoiden Zellen für die Stimulierung der IL-6-Expression durch TNF und IL-1 verantwortlich ist. Des weiteren

liegt eine zum c-fos SRE (serum responsive element) homologe Sequenz vor, die Bindungsstellen für einen speziellen Transkriptionsfaktor, NF-IL-6, und ein CRE Motiv (cAMP responsive element) enthält. Außerdem gibt es noch eine AP-1 (activator protein 1) Binderegion, sowie zwei GRE-Elemente (glucocorticoid response element) zur negativen Kontrolle durch Glucocorticoide (Ibelgaufs H., 1995).

### 1.2.2 Die Physiologie von Interleukin 6

#### FUNKTION

Interleukin-6 kann als Paradebeispiel für die pleiotrope Wirkung von Zytokinen angesehen werden. IL-6 beeinflusst das Immunsystem, die Hämatopoese, die Akute-Phase-Reaktion und das Nervensystem (Abb. 1). Des weiteren spielt es eine wichtige Rolle bei Erkrankungen, wie dem Multiplen Myelom, bestimmten T-Zell Lymphomen und der Rheumatoiden Arthritis (Kishimoto T., 1989).

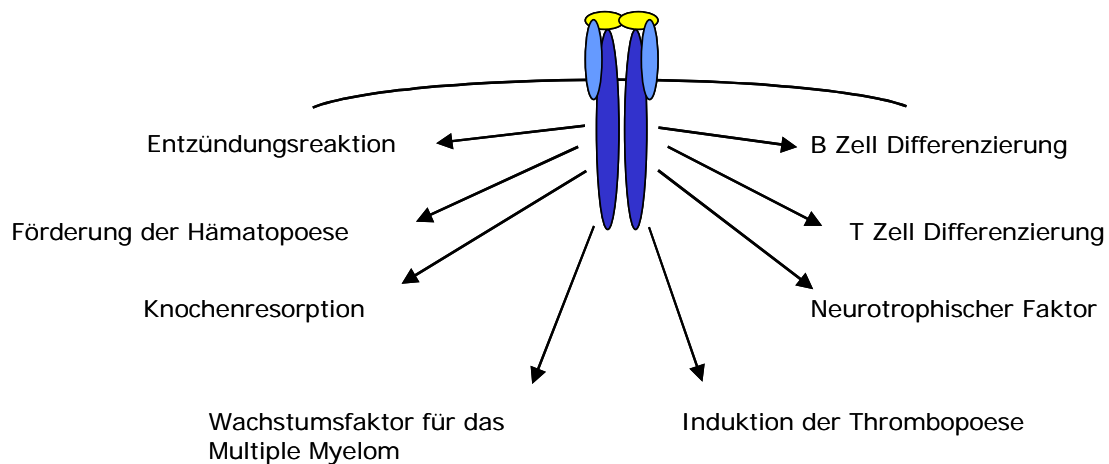


Abb. 1: Pleiotrope, physiologische Funktionen von Interleukin-6

### Immunsystem

IL-6 ist der wichtigste Faktor für die Differenzierung von aktivierten B-Zellen in Antikörper sezernierende Plasmazellen (Muraguchi A. et al., 1988). In mitogen-stimulierten T-Zellen bewirkt es die Induktion von IL-2 und seinem Rezeptor und wirkt somit wachstumsfördernd (Noma T. et al., 1987). Zusätzlich induziert IL-6 zusammen mit IL-2 die Differenzierung von reifen und unreifen T-Zellen in zytotoxische T-Zellen (Takai Y. et al., 1988).

### Hämatopoese

IL-3 und IL-6 wirken *in vitro* synergistisch auf die Proliferation von multipoten-ten hämatopoetischen Vorläuferzellen (Koike K. et al., 1988). Außerdem hat IL-6 auch die Funktion eines Thrombopoetins, da es *in vitro* die Reifung von Mega-karyozyten induziert, sowie die Thrombozytenzahl *in vivo* erhöht (Ibelgauf H., 1995).

### Akute-Phase-Reaktion

Die Akute-Phase-Reaktion ist eine zusammenfassende Beschreibung der syste-mischen Reaktion auf Infektionen, Traumata, Entzündungen oder Gewebs-verletzungen. Sie ist charakterisiert durch Fieber, gesteigerte Gewebsperme-abilität, eine erhöhte Zahl von peripheren Leukozyten und vor allem durch die Synthese sogenannter Akute-Phase-Proteine durch Leberzellen. Diese Reaktion wird durch diverse Faktoren wie TNF, IL-1, TGF- $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$ ), und Glucocorticoide reguliert. Der Hauptauslöser der Akute-Phase-Reaktion ist jedoch IL-6. Insbesondere induziert es die Synthese vieler Akute-Phase-Proteine wie Fibrinogen, Alpha-1-Antitrypsin, Alpha-1-Anti-Chymotrypsin, Haptoglobin und dem C-reaktiven Protein *in vitro* (Castell J.V. et al., 1988).

## Nervensystem

Astrozyten werden durch IL-6 zur Synthese von NGF (nerve growth factor) angeregt. Außerdem ist IL-6 ein Differenzierungsfaktor für Nervenzellen *in vitro* (Ibelgaufts H., 1995).

## Multiples Myelom

Wie Studien mit frisch isolierten Patientenzellen zeigten, ist IL-6 der wichtigste Wachstumsfaktor für das multiple Myelom *in vitro*. IL-6 Antikörper heben diese proliferationsfördernde Wirkung *in vivo* wieder auf (Klein B. et al., 1995). Experimente an transgenen Tieren zeigen, dass hohe IL-6-Spiegel die Entstehung von Plasmozytomen fördern (Kishimoto T. et al., 1995). Zudem sind Mäuse mit einem ausgeschalteten IL-6 Gen nicht in der Lage, ein Multiples Myelom zu entwickeln (Sopreno E. et al., 1996). Eine genauere Beschreibung der Rolle von IL-6 für das Multiple Myelom folgt in Abschnitt 1.3.2.

# 1.3 Das Multiple Myelom (Plasmozytom)

## 1.3.1 Allgemeines

Das Plasmozytom ist ein malignes Non-Hodgkin-Lymphom, welches auf einer malignen Entartung und Wucherung von terminal-ausdifferenzierten B-Zellen (Plasmazellen) beruht. Die Erkrankung kann verschiedene Phasen durchlaufen: eine inaktive Phase, in der die Tumormasse aus reifen, nicht proliferierenden Plasmazellen besteht, eine aktive Phase, in der ein kleiner Anteil der Tumormasse von proliferierenden unreifen Plasmazellen (Plasmazellblasten) gebildet wird, und schließlich eine fulminante Phase, bei der es zur extramedullären Ausbreitung des Tumors kommt und eine Zunahme der undifferenzierten, proliferierenden Plasmazellblasten zu beobachten ist (Hallek M. et al., 1998). Die Ätiologie der Erkrankung ist unbekannt. In einigen Fällen scheinen ionisierende Strahlen

sowie chemische Noxen eine Rolle zu spielen. So konnten zum Beispiel gehäufte Fälle unter Arbeitern in der Kunststoffindustrie festgestellt werden. Auch über familiäre Häufungen wurde berichtet. Unter allen Neoplasien hat das Plasmozytom einen Anteil von etwa 1 % bei der weißen Bevölkerung und etwa 7 % bei der farbigen Bevölkerung. Die jährliche Erkrankungsrate liegt in Mitteleuropa bei 1,5:100.000, in der USA hingegen 4:100.000, wobei der Erkrankungsgipfel um das 70. Lebensjahr liegt. Männer erkranken 1,5 mal häufiger als Frauen (Be-gemann H., 1993). Die mittlere Überlebenszeit der Patienten mit reifzelligem Plasmozytom liegt bei 38-44 Monaten, bei Patienten mit unreifzelligem Plasmozytom bei 12-20 Monaten. Die häufigsten Todesursachen sind Infekte, Niereninsuffizienz und Blutungen. Die Erkrankung ist in der Regel nicht heilbar. Komplette Remissionen werden nur durch Hochdosis-Chemotherapie erreicht.

### *1.3.2 Die Pathogenese des Multiplen Myeloms*

Die Ursprungszelle des Myelomzellklons ist letztlich ungeklärt. Es wurden Myelomzellklone gefunden, die Merkmale früher B-Zellen tragen, wie beispielsweise das Oberflächenmolekül CD 10. Es wurde daher postuliert, dass dem Plasmozytom ursprünglich die Entartung einer Prä-B-Zelle oder einer Stammzelle zu Grunde liegt (Mellstedt H. et al., 1982; Pilarski L.M. und Jensen G.S., 1992; Takishita M. und Kosaka M., 1995). Phänotypisch ähneln Plasmozytomzellen reifen, langlebigen Plasmazellen. Untersuchungen des Genoms von Myelomzellen zeigen, dass diese somatisch hypermutierte Ig-Gene besitzen. Daraus folgt, dass die Reifungsphase der somatischen Hypermutation wie bei reifen langlebigen Plasmazellen bereits durchlaufen wurde (Bakkus M.H. et al., 1995; Vescio R.A. et al., 1995). Man vermutet, dass Myelomzellen außerhalb des Knochenmarks entstehen und durch die Expression bestimmter Adhäsionsmoleküle ins Knochenmark wandern und sich dort ansiedeln.

## ZYTOGENETISCHE DEFEKTE

Im Gegensatz zu vielen anderen Lymphomen und Leukämien zeigt das Plasmozytom keine krankheitsspezifischen chromosomalen Anomalien. Jedoch treten chromosomale Anomalien in Abhängigkeit vom Ansprechen auf die Therapie, vom Verlauf und vom Stadium auf. Strukturelle Anomalien betreffen meist das Chromosom 1 ohne spezifischen Genlocus. Weiterhin findet man Chromosomenanomalien in 14q32 (IgH) bei ca. 30 %, in 11q13 (bcl-1 locus, Cyclin D1) bei ca. 20 %, in 13q14 bei 15 % und in 8q24 (c-myc) bei 10 % der Fälle. Häufig finden sich Translokationen in IgH-switch-Regionen, wobei die Partnerchromosomen wechseln (in 25 % 11q13 (bcl-1, Cyclin D1), in 25 % 4p16.3 (FGFR3), in 50 % verschiedene andere).

In Myelomzellen konnten unterschiedlichste Mutationen nachgewiesen werden, die für die Proliferation oder für die Hemmung der Apoptose der Zellen verantwortlich sind. So liegen bei ca. 34 % der Plasmozytompatienten Ras-Mutationen vor. Diese können zu IL-6-unabhängigem Tumorwachstum führen (Neri A. et al., 1989; Portier M. et al., 1992; Tanaka K. et al., 1992). Bcl-2 wird meist von Myelomzellen überexprimiert und ist verantwortlich für die Hemmung der Medikament-induzierten Apoptose in Myelomzellen (Schwarze M. M. und Hawley R. G., 1995). Das Tumor-Suppressorgen p53 liegt in Myelomzellen in 5-40 % der Fälle mutiert vor und kann als solches zur Hemmung der Apoptose und Differenzierung in den Tumorzellen führen (Neri A. et al., 1993; Preudhomme C. et al., 1992). In ähnlicher Weise kann sich eine Mutation im Retinoblastoma (Rb)-Gen, welche bei 70 % aller Myelompatienten gefunden wurde, auswirken (Juge-Morineau N. et al., 1995; Weinberg, 1995).

## DER EINFLUSS VON ZYTOKINEN

### Interleukin-6

Wie zahlreiche Untersuchungen belegen, ist IL-6 der potenteste Wachstumsfaktor für das Plasmozytom *in vitro* und *in vivo*. IL-6 wird parakrin von Knochenmarkstromazellen und Osteoklasten produziert, sowie autokrin von einigen Mye-

lomzelllinien (Kawano M. et al., 1988; Klein B. et al., 1995). In Tumorbiopsien von Plasmazytompatienten konnten 500- bis 5000-fach erhöhte IL-6-Konzentrationen gefunden werden (Klein B. et al., 1995). IL-6 stimuliert das Wachstum von frisch isolierten Plasmazytomzellen *in vitro*. Die Etablierung von Plasmazytom-Zelllinien aus frischen Tumorzellen gelingt vor allem unter der Zugabe von IL-6, und die Zelllinien bleiben meist lange IL-6-abhängig. Anti-IL-6-Antikörper hemmen das Wachstum von Plasmazytomzellen *in vitro* (Kawano M. et al., 1988; Klein B. et al., 1995; Zhang X.G. et al., 1989), und auch klinisch konnte eine gewisse Wirksamkeit von anti-IL-6-Antikörpern gegen das Plasmazytomwachstum gezeigt werden. Weiterhin ist IL-6 ein wichtiger Faktor in der Pathogenese der Osteoporose und wird für die skeletalen Komplikationen bei Plasmazytompatienten verantwortlich gemacht.

Erwähnenswert ist zudem eine lösliche Form der  $\alpha$ -Untereinheit des IL-6-Rezeptors, welche im Serum von Plasmazytompatienten nachgewiesen werden kann. Dabei korreliert ein hoher IL-6-Serumspiegel mit einer schlechten Prognose. Mehr und mehr ins Interesse gerückt ist in den letzten Jahren ein virales IL-6-ähnliches Protein, das vom humanen Herpesvirus 8 (HHV 8) sezerniert wird. Allerdings zeigt es gegenüber dem humanen IL-6 Unterschiede in seiner Struktur und seinen Bindungseigenschaften an gp 130 (Hideshima T. et al., 2000; Osborne J. et al., 1999). Die klinische Bedeutung dieser Beobachtungen ist noch unklar.

#### Andere Zytokine

G-CSF, IL-10, GM-CSF, IL-3, Stem cell factor (SCF), insulin-like growth factor 1 und 2 (IGF1 und 2) und Interferon-alpha (IFN- $\alpha$ ) stimulieren das Wachstum von Plasmazytomzellen *in vitro* (Klein B. et al., 1995; Mandelli F. et al., 1990). G-CSF und IL-10 bewirken wahrscheinlich auch die verstärkte Expression von Rezeptoren wachstumsfördernder Zytokine, wie IL-11, LIF und OSM durch die Myelomzelle (Gu H. et al., 1997; Klein B. et al., 1995; Lu Z.Y. et al., 1995). IFN- $\alpha$  zeigt dagegen in klinischen Studien einen hemmenden Effekt in der adjuvanten Therapie (Mandelli F. et al., 1990).

## Inhibitoren des Plasmozytomwachstums

Interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ) wirkt antagonistisch auf die IL-6-abhängige Tumorzellproliferation, wobei der genaue Mechanismus noch unklar ist (Portier M. et al., 1993). Darüber hinaus hemmt IFN- $\gamma$  die Zytokin-induzierte Knochenresorption, welche ein wesentliches Problem bei den Plasmozytom-Patienten darstellt, so dass IFN- $\gamma$  auch in klinischer Hinsicht interessant ist (Klein B. et al., 1995). Ferner drosseln Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), IL-4 und transforming growth factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) *in vitro* das Plasmozytomwachstum (Schwabe M. et al., 1996; Taylor C.W. et al., 1990). Die Stimulation des Fas-Antigens (CD 95, APO-1) führt in Plasmozytomzellen und verschiedenen anderen Zellen zum programmierten Zelltod. Allerdings bewirkt die Stimulation des Fas-Antigens auf Myelomzellen nicht bei allen Patienten die Apoptose der Zellen. Chauhan et al. konnten zeigen, dass IL-6 die zellulären Effekte von Fas antagonisiert (Chauhan D. et al., 1997).

## 1.4 Die Signaltransduktion von Interleukin 6

### 1.4.1 Der Interleukin-6 Rezeptorkomplex

Wie man bereits aus der pleiotropen Wirkung von IL-6 schließen kann, wird der IL-6 Rezeptor (IL-6R) von vielen verschiedenen Zelltypen exprimiert. Insbesondere sind dies: Myelomzellen, T-Zellen, aktivierte B-Zellen, Monozyten und Hepatozyten, wobei die Zahl der Rezeptoren bei Myelomzelllinien etwa um den Faktor 10-100 über der von anderen Zellen liegt (Kishimoto T., 1989; Kishimoto T. et al., 1995). Der aktive IL-6 Rezeptorkomplex (IL-6R) ist ein Hexamer bestehend aus zwei  $\alpha$ -Ketten, zwei gp130 Molekülen und zwei Molekülen IL-6 (Abb.2) (Simpson R.J., 1997; Somers W. et al., 1997; Ward L.D. et al., 1996). Das durch die Bindung von IL-6 an gp80 induzierte Signal wird durch gp130 ü-



bertragen. Gp130 assoziiert nach Ligandenbindung mit gp80 und komplettiert so den physiologischen IL-6 Rezeptorkomplex (Taga T. et al., 1989).

#### DIE INTERLEUKIN-6 REZEPTOR $\alpha$ -KETTE (gp80)

Die  $\alpha$ -Kette des IL-6R ist ein transmembranäres Glykoprotein mit einer Masse von 80 kD (449 Aminosäuren). Es existieren mindestens zwei Formen des Rezeptors, die sich durch posttranslationale Modifikationen, sowie durch verschiedenartige Dissoziationskonstanten für IL-6 ( $K_d = 10^{-9}$ - $10^{-11}$  M) unterscheiden. Der extrazelluläre Anteil des Moleküls enthält neben einer Immunglobulin-Domäne auch eine, die der Zytokinrezeptor-Familie zuzurechnen ist. Lange Zeit wurde gp80 nur die Funktion der spezifischen Bindung von IL-6 zugeschrieben. Neuere Untersuchungen belegten jedoch, dass der aus 82 Aminosäuren bestehende intrazelluläre Anteil von gp80 zwei wichtige Signalmotive enthält. Martens und Mitarbeiter konnten zeigen, dass die Motive Y<sub>408</sub>SLG und PL<sub>427</sub>I essenziell für die basolaterale Expression des IL6-R in polarisierten MDCK-Zellen sind (Martens A.S. et al., 2000).

#### DIE INTERLEUKIN-6 REZEPTOR $\beta$ -KETTE (gp130)

Das für die Signaltransduktion verantwortliche Protein gp130 ist nicht auf den IL-6 Rezeptor beschränkt, sondern assoziiert auch mit den Rezeptoren von LIF (leukaemia inhibitory factor), Oncostatin M (OSM), CNTF (ciliary neurotrophic factor), CT-1 (Cardiotrophin-1) und IL-11. Es besteht aus 918 Aminosäuren und enthält eine Zytokin-Rezeptor-Domäne, sowie eine Immunglobulin ähnliche Domäne mit dem charakteristischen WSXWS-Motiv im extrazellulären Anteil (Hibi M. et al., 1990). Innerhalb des zytoplasmatischen Anteils von gp130 gibt es als Box1, Box2 und Box3 bezeichnete, hochkonservierte Bereiche, die auch in anderen Zytokinrezeptoren wie G-CSFR, IL-2R $\beta$ , IL-3 und EpoR zu finden sind. Auch gibt es zwei Motive, die für die für die Internalisierung des IL-6 Rezeptors von Bedeutung sind. Ein Serin an Position 782 und ein Di-Leucin Motiv (L786, L787) (Dittrich E. et al., 1996; Gibson R.M. et al., 2000).

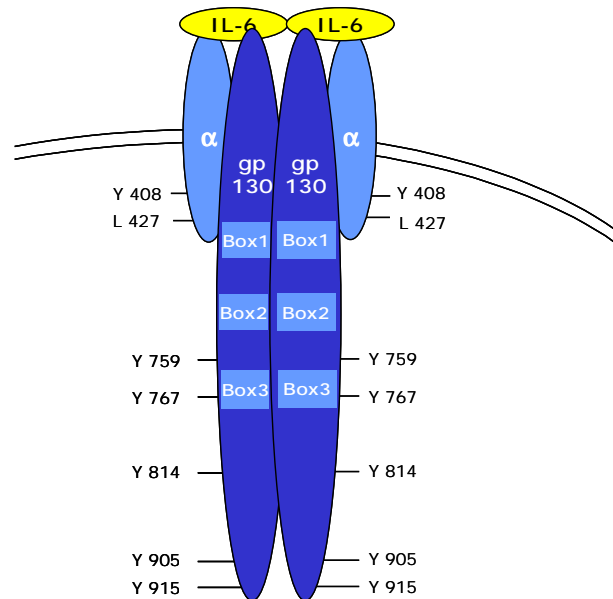


Abb. 2: Der Interleukin-6 Rezeptorkomplex

Die Abbildung zeigt den funktionellen, hexameren IL-6 Rezeptorkomplex. Die Lage der Homologiedomänen Box1, Box2 und Box3, sowie der für die Signaltransduktion relevanten Tyrosine im zytoplasmatischen Anteil von gp130 sind angegeben. Die Lage der zwei basolateralen Signalmotive in gp80 ist ebenfalls angegeben.

Die zytoplasmatische Domäne von gp130 enthält fünf Tyrosinreste, die für die weitere Signaltransduktion wichtig sind. So wurde gezeigt, dass die Tyrosinphosphatase Shp-2 (Src homology 2 (SH2) domain containing protein tyrosine phosphatase 2) an das Tyrosin an Position 759 (Y759) von gp130 bindet. STAT1 (signal transducer and activator of transcription 1) bindet ausschließlich an Y905 und Y915 während STAT3 an Y767, Y814, Y905 und Y915 bindet. Für alle Tyrosine und auch für die Box1-, Box2- und Box3-Motive wurde vor allem mittels Mutationsanalysen gezeigt, dass sie für die Transduktion von Signalen durch IL-6 und gp130 wichtig sind (French J.D., 1998; Fukada T. et al., 1996; Gerhartz C. et al., 1996; Luttkien C. et al., 1994; Murakami M. et al., 1991; Schaper F. et al., 1998; Schmitz J. et al., 2000; Tanner J.W. et al., 1995; Terstegen L. et al., 2000).

### *1.4.2 Die Signaltransduktion von Interleukin-6: Stand der Forschung*

Interleukin-6 vermittelt pleiotrope Effekte auf hämatopoetische wie nicht-hämatopoetische Zellen und ist der wichtigste Wachstumsfaktor für das Multiple Myelom (1.2.2) (Hallek M. et al., 1998; Kawano M. et al., 1988; Kishimoto T., 1989; Kishimoto T. et al., 1995; Klein B., 1995; Klein B. and Bataille R., 1992; Klein B. et al., 1995; Taga T. et al., 1989; Zhang X.G. et al., 1989). Die Bindung von IL-6 an den IL-6R induziert die Tyrosinphosphorylierung von gp130 (Murakami M. et al., 1993) und die Aktivierung von mindestens drei Mitgliedern der Familie der Janus-Kinasen; Jak1, Jak2 und Tyk2 (Lütticken C. et al., 1994; Narazaki M. et al., 1994; Stahl N. et al., 1994). Janus-Kinasen sind Protein-Tyrosinkinasen, die mit zahlreichen Zytokinrezeptoren konstitutiv assoziieren und nach Aktivierung die Phosphorylierung des Rezeptors und verschiedener zellulärer Substrate wie beispielsweise den STAT-Proteinen induzieren. Verschiedene Beobachtungen weisen jedoch daraufhin, dass nicht alle durch Tyrosinkinasen vermittelten Zytokinrezeptor-Signalwege durch Janus-Kinasen aktiviert werden (Daum G. et al., 1994). Beispielsweise benötigt die Aktivierung des Ras-Signalwegs durch GM-CSF und IL-3 nicht die Aktivierung von Jak2, obwohl diese Kinase mit der gemeinsamen  $\beta$ -Untereinheit des GM-CSF/IL-3 Rezeptors assoziiert (Ihle J.N. et al., 1994). Plasmozytomzellen reagieren auf IL-6 mit verstärktem Wachstum, unabhängig davon ob sie Janus-Kinasen exprimieren oder nicht (Ogata A. et al., 1997). Also müssen auch an der Signaltransduktion von IL-6 zusätzliche Tyrosinkinasen beteiligt sein. Folgerichtig konnten wir und andere zeigen, dass die Src-Kinasen Hck und Lyn konstitutiv mit gp130 assoziiert sind und durch Stimulation mit IL-6 aktiviert werden (Ernst M. et al., 1999; Ernst M., 1994; Hallek M. et al., 1997) und Diplomarbeit (M. Schäffer).

Die Aktivierung von Src-Kinasen und Janus-Kinasen führt zur Induktion von mindestens zwei wichtigen Signalkaskaden. Der Shp-2/MAPK- (mitogen activated protein kinase) Kaskade (Boulton T.G., 1994; Kim H., 1999; Neumann C., 1996; Ogata A. et al., 1997; Shi Z. Q. et al., 1998; Takahashi-Tezuka M., 1998),

und dem Jak/STAT-Signalweg (Berger L. C., 1994; Gerhartz C. et al., 1996; Ihle J. N. et al., 1994; Stahl N. et al., 1994). *In vivo* Untersuchungen in knock-in Mäuse, die ein humanes gp130 exprimierten, in dem entweder alle STAT-Bindungsstellen (gp130<sup>FxxQ</sup>) oder die Shp-2 Bindungsstelle (gp130<sup>F759</sup>) mutiert waren, zeigten, dass gp130-vermittelte Signale durch ein Gleichgewicht zwischen diesen beiden Signalwegen reguliert werden (Ohtani T. et al., 2000). So war beispielsweise die Produktion von IgG2a, IgG2b und IFN- $\gamma$  in gp130<sup>F759</sup>-Mäusen erhöht, während sie in gp130<sup>FxxQ</sup>-Mäusen erniedrigt war. Janus-Kinasen binden an das Box1-Motiv und phosphorylieren die STAT-Bindungsstellen (Y767, Y814, Y905, Y915) in gp130 (Tanner J.W. et al., 1995). Nach ihrer Bindung an gp130 werden auch die STAT-Proteine durch Janus-Kinasen phosphoryliert und können daraufhin Dimere bilden. Die vollständige Aktivierung der STAT-Dimere wird vermutlich durch die Akt Kinase induzierte Phosphorylierung an Serin 727 (S727) erreicht. Die STAT-Dimere wirken als Transkriptionsfaktoren und induzieren unter anderem die Expression von SOCS (suppressors of cytokine signaling) und CIS (cytokine inducible SH2-containing protein). Diese Proteine inhibieren die Aktivität der Janus-Kinasen, eine Funktion, die auch von einer aktiven MAPK ausgeübt wird (Kim H. et al., 1998; Symes A. et al., 1997). Die Signalwege, die zur Aktivierung der MAPK führen, müssen noch genau charakterisiert werden. Einige Untersuchungen zeigten, dass die Punktmutation Y759F zum Abbruch der Shp-2 Bindung an gp130 führte und die Aktivierung der MAPK deutlich reduzierte (Kim H., 1999). Ein anderer Signalweg, der möglicherweise die Aktivierung der MAPK induziert, könnte aus dem Komplex gp130/Hck/Shc/Grb2 bestehen, da wir Shc und Grb2 im Komplex mit Hck in der Plasmozytomzelllinie LP-1 gefunden haben (eigene Beobachtungen und (Neumann C., 1996)). Die Aktivierung der MAPK scheint auch wichtig für die Weiterleitung von gp130-vermittelten Wachstumssignalen zu sein. Eine Aktivierung der MAPK wurde nur in Zellen gefunden, die nach Stimulation mit IL-6 auch proliferierten (Ogata A. et al., 1997). Außerdem hatte die Unterbrechung der Shp-2/gp130 Interaktion die Reduktion des Zellwachstums zur Folge (Kim H., 1999). Die Abbildung 3 fasst den Stand der Forschung vor der Abfassung dieser Arbeit grafisch zusammen.

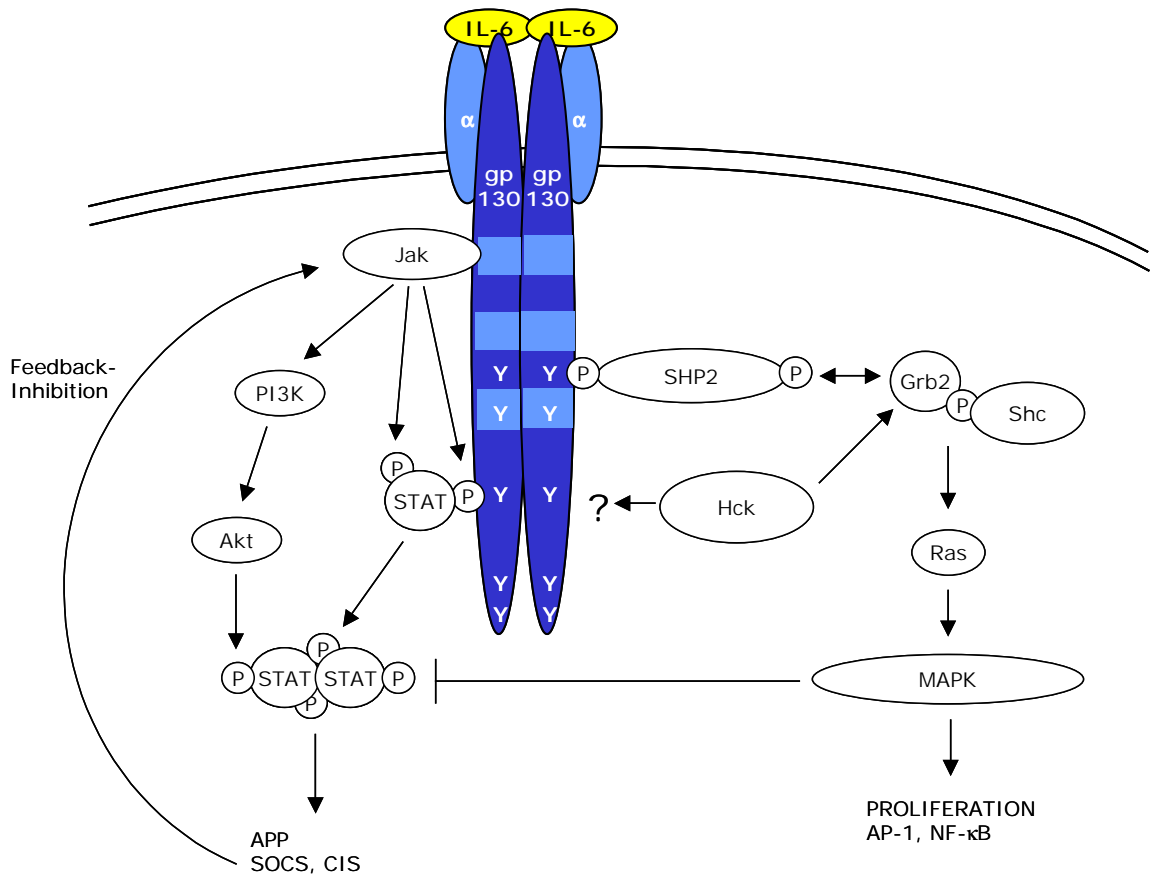


Abb. 3: IL-6 Signaltransduktion: Stand der Forschung vor Abfassung dieser Arbeit

Janus- und Src-Kinasen assoziieren konstitutiv mit gp130 und werden nach der Bindung von IL-6 aktiviert. Janus-Kinasen aktivieren dann Signalproteine wie STAT und Akt. STAT-Dimere induzieren als Transkriptionsfaktoren die Expression von Akute-Phase-Proteinen (APP), sowie unter anderem von SOCS und CIS, die als negative Feedback Regulatoren des Jak/STAT-Signalwegs wirken. Janus-Kinasen binden an das Box1-Motiv von gp130; die Bindungsdomäne der Src-Kinasen (hier Hck) wurde in der vorliegenden Arbeit identifiziert. Shp-2 bindet an Y795 in gp130 und induziert die Aktivierung der MAPK durch seine Assoziation mit Grb2. Dieser Shp-2/MAPK Signalweg wirkt inhibierend auf STAT vermittelte Signale. Grb2 und Shc assoziieren nach IL-6 Stimulation mit Hck und induzieren möglicherweise die Aktivierung der MAPK. Die MAPK vermittelt Zellwachstum und induziert die Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren, unter anderem AP-1 und NF-κB.

## 1.5 Die Src-Kinasen

### *1.5.1 Die Src Protein-Tyrosin Kinase Familie*

Zur Zeit umfasst die Src-Tyrosin Kinase Familie acht Membran-assoziierte, zytoplasmatische Protein-Tyrosinkinase: c-Src, c-Yes, c-Fgr, Blk, Fyn, Lyn, Hck und Lck. Die Kinasen Blk (p55blk), Hck(p59/56hck), und Lck (p56lck) werden ausschließlich; die Kinasen Lyn (p56/53lyn) und Fyn (p59fyn) hauptsächlich von hämatopoetischen Zellen exprimiert. Dagegen werden c-Fgr (p57c-fgr), c-Src (p60c-src) und c-Yes (p62c-yes) in vielen verschiedenen Zelltypen gefunden (Bolen J.B. et al., 1992; Bolen J.B. et al., 1991; Taguchi T. et al., 2000).

### *1.5.2 Die Funktion der konservierten Src-Kinase Domänen*

Die Zugehörigkeit zur Src-Familie definiert sich durch eine 500-530 Aminosäuren lange Homologieregion. Die Abbildung 4 zeigt schematisch den Aufbau von Src-Kinasen am Beispiel von Hck. Die N-terminale Myristoylierungsstelle ist verantwortlich für die Lokalisierung der Src-Kinase an der Membran. Myristat wird hierbei über eine Amid-Bindung an ein konserviertes Glycin gebunden (David-Pfeuty T. et al., 1993; Resh M.D., 1996). Anschließend an die „unique“ Domäne folgt die SH3-Domäne, die als Erkennungsregion für prolin-reiche Sequenzen fungiert. In fast allen zytoplasmatischen Tyrosinkinase findet man SH2-Domänen, die als Erkennungssequenz für Phosphotyrosine fungieren (Pawson T., 1995; Songyang Z. et al., 1993; Yu H., 1994). Die Kinase oder SH1-Domänen haben die höchste Sequenzhomologie innerhalb der Src-Kinasefamilie. Am C-Terminus befindet sich eine Region, die wichtig für die negative Regulation der Kinaseaktivität ist. Die Aktivität von Src Kinasen wird durch komplexe intramolekulare Faltungsvorgänge reguliert. Innerhalb der Domäne liegt ein Tyrosinrest (Y416 in Hck), durch dessen Phosphorylierung die Enzymaktivität der

Kinasen positiv reguliert wird. Im inaktiven Zustand ist die Kinase so gefaltet, dass sowohl der Tyrosinrest 416, als auch die ATP-Bindungsstelle (K295) unzugänglich sind. Die Faltung im inaktiven Zustand wird durch die Wechselwirkung der SH3-Domäne mit der Region zwischen SH2- und Kinasedomäne, sowie durch die Interaktion der SH2 Domäne mit dem negativ regulatorischen Tyrosin (Y527 von Hck) im C-Terminus der Kinase stabilisiert. Je nach dem Phosphorylierungsstatus der C-terminalen regulatorischen Domäne wird entweder eine aktive (Y527 nicht-phosphoryliert) oder eine inaktive (Y527 phosphoryliert) Konformation der Src-Kinasen stabilisiert (Sicheri F. et al., 1997; Xu W. et al., 1997). Ein zelluläres Protein, das die Aktivität von Src-Kinasen regulieren kann, ist die C-terminale Kinase (CSK). Diese stabilisiert die inaktive Form von Src-Kinasen, indem sie Y527 phosphoryliert (Nada S. et al., 1991; Okada M. et al., 1991).

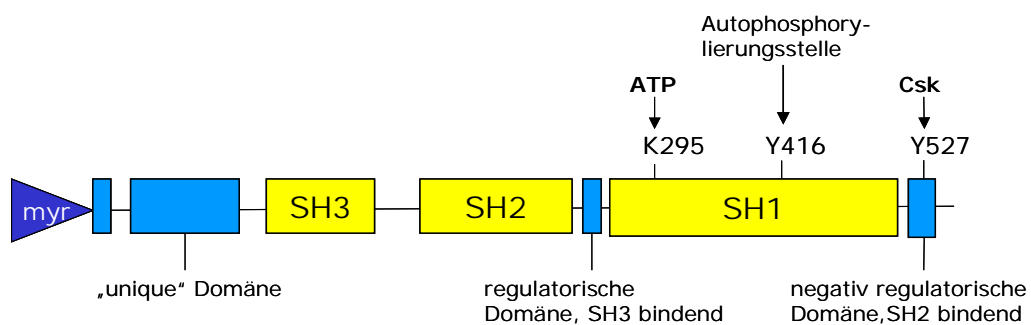


Abb. 4: Die Struktur von Src-Kinasen

### 1.5.3 Src-Kinasen in der Signaltransduktion hämatopoetischer Wachstumsfaktoren

Aufgrund des Expressionsmusters der Src-Kinasen (s.1.5.1), sowie ihrer bekannten Assoziation mit einigen Rezeptorproteinen wurde schon vor längerem erkannt, dass die Src-Kinasen eine wichtige Rolle in den Signalkaskaden hämatopoetischer Wachstumsfaktoren spielen. Die Aktivierung von Src-Kinasen wurde bisher für IL-2, IL-3, IL-6, IL-7, IL-12, GM-CSF und G-CSF beschrieben (Anderson S.M. and Jorgensen B., 1995; Corey S.J. et al., 1994; Ernst M., 1994; Mi-

nami Y. et al., 1993; Pignata C. et al., 1995; Venkitaraman A.R. and Cowling R.J., 1992). Außerdem assoziieren Src-Kinasen mit den Rezeptoren für IL-2, IL-6, IL-7 und der gemeinsamen  $\beta$ -Kette der Rezeptoren für IL-3, GM-CSF and IL-5 (Adachi T. et al., 1999; Hallek M. et al., 1997; Hatakeyama M. et al., 1991; Venkitaraman A.R. and Cowling R.J., 1992; Ward L.D. et al., 1996). Die wichtige Rolle von Src-Kinasen in Signaltransduktion hämatologischer Faktoren wird zusätzlich dadurch bestärkt, dass Mäuse mit defekten Src-Genen eine Reihe pathologischer Veränderungen in der Hämatopoese zeigen. So ist in diesen Mäusen beispielsweise die Reifung und das Wachstum von T -und B Zellen sowie von Neutrophilen gestört (De Franceschi L. et al., 1997; Lowell C.A. et al., 1996; Molina T.J. et al., 1993; Nishizumi H. et al., 1995; Stein P.L. et al., 1992).

## 1.6 Fragestellung und Hintergrund

Wie in Abschnitt 1.2.2 erwähnt, spielt IL-6 eine bedeutende Rolle bei Erkrankungen wie dem Plasmozytom, aber auch bei der Akute-Phase-Reaktion bei inflammatorischen Ereignissen. Unabdingbare Voraussetzung für ein selektives, therapeutisches Eingreifen in Erkrankungen mit erhöhter IL-6R Aktivierung ist ein detailliertes Verständnis der zugrundeliegenden Signalprozesse. Im Falle der Akute-Phase-Reaktion gilt es dabei, die zur systemischen Ausschüttung von Entzündungsmediatoren (Sepsis) führenden Prozesse zu charakterisieren. Um eine kausale Therapie des Plasmozytoms zu ermöglichen, sind zunächst diejenigen Signalkaskaden zu ermitteln, welche für das gesteigert Zellwachstum verantwortlich sind. Aus der Identifikation der krankheitsrelevanten Signalprozesse ergeben sich mögliche Angriffsorte für therapeutische Eingriffe in die Signaltransduktion von IL-6. Diese sind in Abbildung 5 schematisch dargestellt. Die Blockierung der Bindung von IL-6 an den IL-6R mittels IL-6 Antikörpern und Rezeptorantagonisten wurde bereits klinisch angewandt und zeigte auch eine gewisse Wirksamkeit *in vivo* (Klein B. et al., 1995; Sopreno E. et al., 1996). Auch die Hemmung von entscheidenden Enzymaktivitäten könnte ein sinnvoller Ansatzpunkt sein, um einzelne Signalwege auszuschalten. Ein wichtiger Nachteil dieser beiden Ansätze ist jedoch, dass alle durch IL-6 oder durch das gehemmte Enzym in-



duzierten Vorgänge, also auch die physiologischen, blockiert werden. Als besonders attraktiver Ansatzpunkt erscheint daher die Blockierung krankheitsrelevanter Protein-Protein-Interaktionen, da hier vermutlich die höchste Kausalität in der Behandlung erreicht werden kann.

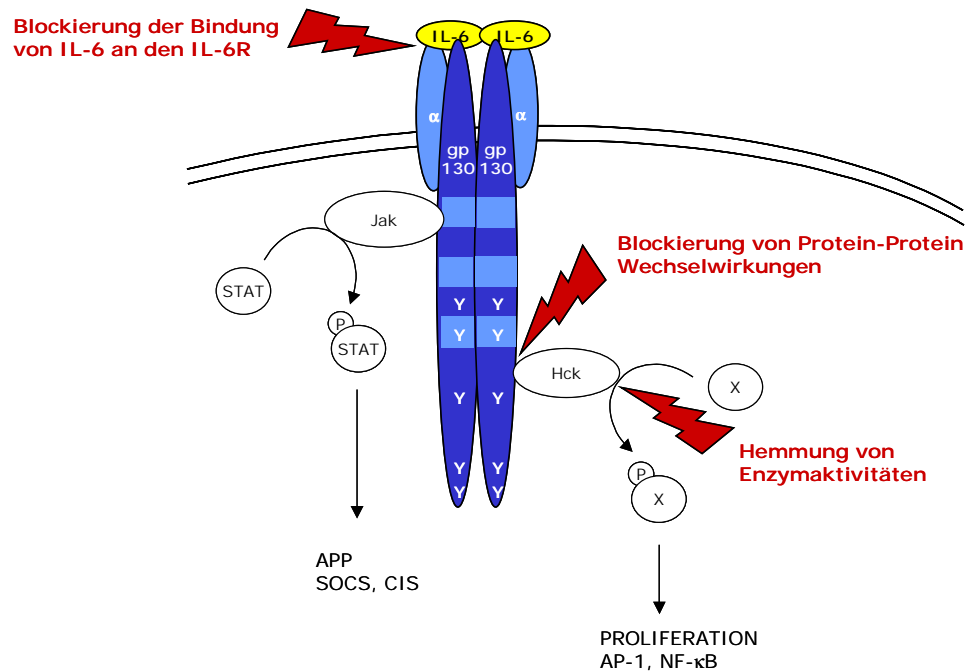


Abb. 5: Mögliche Angriffsziele für therapeutische Eingriffe in die IL-6 Signaltransduktion

Die IL-6 Signaltransduktion kann potentiell über verschiedene Ziele blockiert werden. Als Beispiele sind hier schematisch die Blockierung der Bindung von IL-6 an den IL-6R, die Blockierung von Protein-Protein Wechselwirkungen und die Hemmung von Enzymaktivitäten aufgezeigt (Abkürzungen siehe Abb. 3).

Ein wichtiges Ziel dieser Arbeit war es daher, durch IL-6 induzierte intrazelluläre Signalkaskaden detailliert zu charakterisieren. Im Hinblick auf das Plasmozytom wurden dabei insbesondere Signalwege untersucht, die das Zellwachstum steuern.

## 1.7 Ergebnisse aus eigenen Vorarbeiten

Aus Ergebnissen der Diplomarbeit und anderen eigenen Vorarbeiten konnten bereits einige wichtige Schlüsse über Signaltransduktionsmechanismen am IL-6-Rezeptor gezogen werden (de Vos G., 2000; Hallek M. et al., 1997; Schäffer M., 1995):

1. In verschiedenen Plasmozytomzelllinien werden zahlreiche Proteine nach Stimulation an Tyrosinresten phosphoryliert.
2. In der Plasmozytomzelllinie LP-1 werden die Src-Kinasen Hck, Lyn und Fyn nach Stimulation mit IL-6 aktiviert.
3. Hck, Lyn und Blk sind konstitutiv mit gp130 assoziiert.
4. IL-6 induziert die Bildung eines Komplexes, an dem die Proteine Shc, Grb2, Sos und Hck beteiligt sind.
5. Erk assoziiert verstärkt mit Hck nach IL-6 Stimulation.

Die folgende Abbildung (6 A) zeigt zwei wichtige Ergebnisse der Vorarbeiten. Die stimulationsabhängige Aktivierung der Src-Kinase Hck in LP-1 Zellen (Abb. 6 A) und die Interaktion von Hck mit gp130 (Abb. 6 B). LP-1 Zellen wurden zunächst mit IL-6 stimuliert, dann lysiert und in einen Kinase Assay und eine Co-Immunpräzipitation eingesetzt. Der *in vitro* Kinase-Assay (A) zeigt die deutliche stimulationsabhängige Aktivierung von Hck (Spuren 1 und 2). Der Kontrollblot der IP-Überstände (B, Spuren 1, 2) zeigt, dass nur etwa ein Drittel der Hck Kinase präzipitiert wurde, jedoch in vergleichbarer Menge aus stimulierten und unstimulierten LP-1 Zellen (A, B untere Blots). Gp130 co-präzipitiert mit Hck (B, Spuren 3, 4). Diese Ergebnisse ließen folgende Schlüsse zu: Hck ist vermutlich stimulationsunabhängig, also konstitutiv mit gp130 assoziiert (B, oberer Blot, Spuren 3, 4) und wird nach Stimulation mit IL-6 aktiviert (A, Spuren 1, 2, *in vitro* Kinase Assay).

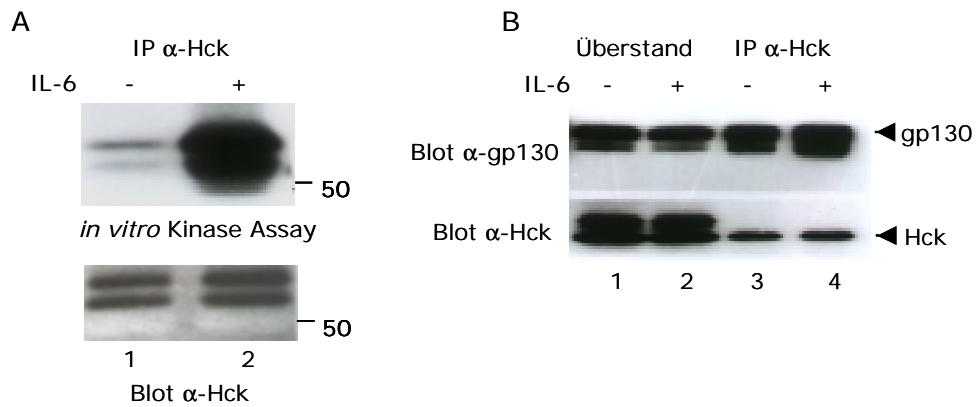


Abb. 6: Hck interagiert mit gp130 und wird nach Stimulation mit IL-6 aktiviert.

LP-1 Zellen wurden für 10 min mit Medium (-) oder 350 ng/ml IL-6 stimuliert (+). Nach dem Zellaufschluss wurde Hck mittels Immunpräzipitation (IP) aus den Lysaten aufgereinigt. (A) Die Aktivität von Hck wurde in einem Immunkomplex-Kinase Assay getestet. Dazu wurden Hck IPs für 15 min mit  $^{32}$ P-ATP inkubiert. Nach Auftrennung auf dem SDS-Gel wurde die Autophosphorylierung von Hck durch Autoradiographie ermittelt. (B) Die Hck IPs wurden mit einem spezifischen Antikörper gegen gp130 inkubiert. Zusätzlich wurde noch der Überstand zur quantitativen Kontrolle der IP-Reaktion geladen. Zur Überprüfung der Präzipitation von Hck wurden Aliquots der IPs mit einem spezifischen Antikörper gegen Hck inkubiert (untere Blots)

Zusammengefasst wiesen die Befunde der Vorarbeiten darauf hin, dass neben dem Jak-STAT Signalweg mindestens ein zusätzlicher Weg besteht, über den IL-6 Signale in der Zelle weitergeleitet werden. An diesem Signalweg könnten gp130, Src-Kinasen, Shc, Grb2, Sos und Erk beteiligt sein. Wie oben bereits beschrieben treten bei über 30 % der Plasmozytom-Patienten Mutationen an Ras auf. Daher war die mögliche Beteiligung von Erk von besonderem Interesse, da die Aktivierung von Erk zur Aktivierung von Ras führen kann.

Ein Ziel der vorliegenden Arbeit war es diesen zusätzlichen IL-6 Signalweg näher zu charakterisieren. Dazu wurden zunächst die molekularen Grundlagen der Interaktion von gp130 mit Hck untersucht, um dann in folgenden Experimenten deren biologische Effekte zu analysieren.

## 1.8 Ziele der Arbeit

Ziel der Arbeit war es, die Mechanismen der transmembranären Signalübertragung von Interleukin-6 in malignen B-Zellen möglichst detailliert zu charakterisieren. Vorhergehende Arbeiten der Arbeitsgruppe hatten gezeigt, dass Src-Kinasen durch IL-6 aktiviert werden. Die Rolle der Src-Kinasen für die molekulare Pathogenese des Multiplen Myeloms sollte genauer aufgeklärt werden. Die folgenden Untersuchungen sollten dazu durchgeführt werden:

1. Eingrenzung der Hck-Bindungsregion von gp130 durch Mutationsanalyse.
2. Analyse von Signalwegen, die in Abhängigkeit der Bindung von Src Kinasen an den IL-6R reguliert werden.
3. Aufklärung von physiologischen Effekten, die über Hck vermittelt werden.
4. Entwicklung und Verwendung von spezifischen Inhibitoren zur Hemmung der durch Hck vermittelten Effekte.

---

## 2. MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Material

#### *2.1.1 Zelllinien*

BAF-B03

IL-3 abhängige murine pro B-Zelllinie (Dr. Mark Showers, Boston).

COS-7

Nierenzelllinie von grünen Meerkatzen. Gewonnen durch Transformation der Affenzelllinie CV-1 mit einer origin-defekten Mutante des SV-40 Virus (Gluzman Y., 1981).

WEHI-3B

Myelomonozytische Leukämie aus der Maus. Diese Zelllinie produziert IL-3 (Warner N.L. et al., 1969).

#### *2.1.2 Bakterienstämme*

XL-1 Blue, Genotyp: *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* (F' *proAB lacqZΔM15 Tn10 Tetr*), (Stratagene, Heidelberg)

### 2.1.3 Plasmide, Primer, cDNAs

#### Plasmide

pA Puro (Dr. Seth Corey, Pittsburgh, USA)

pcDNA3 (Invitrogen Groningen, Niederlande)

pcDNA3.1/myc-His (Invitrogen Groningen, Niederlande)

pcDNA6/V5-His (Invitrogen, Groningen)

pUC 18 (Stratagene, Heidelberg)

#### Primer

Eg unis 5'-gggccctctagaccagccatggacaaactc-3'

Eg a cctagtggatccctgaggcatgtagccgccttg

t 828a atctggggatccttcatgctgactgcagttctg

t 770a gacttggactgaggatccttgggtgtctgta

t 775a tcttgatctagattggactgacggaacttg

t 722a actgctggatccttcagtattaatTTTTTc

t 710a gagctctctagactgaggcatgtagccgcc

t 702a ttctggggatcccttttgcatttgcttctat

t 685a ggcaatatgactggatccaggatctggaac

t 650a atctggaacattaggggatccgtgtttttaattag

d 681-721s cacaatTTTaatcaaaaggacacagcagtggtatt

d 681-721a aataccactgctgtgtcctttgaattaaattgtg

d 771-827s agtggctacagacaccaaatTcacattttgaaagg

d 771-827a cctttcaaaatgtgaaattgggtgtctgtagccact

d 771-811s agtggctacagacaccaacaacagtacttcaaacag

d 771-811a ctgtttgaagtactgttgggtgtctgtagccact

d 820-827s tacttcaaacagaactgcattTcacattttgaaagg

d 820-827a cctttcaaaatgtgaaatgcagttctgtttgaaagta

d 812-827s gatggtattttgccaggagtcagcatgaatccagt

d 812-827a	actggattcatgctgactcctgggcaaaataccatc
d 812-819s	gatggtatTTTgcccaggagtcagcatgaatccagt
d 812-819a	actggattcatgctgactcctgggcaaaataccatc
Ecosfp	ctgaccgctagcgaattcacttttactacc
Bamafp	ggtaccgagctcggatccctgaggcatgtagcc
759 sfP	ctgtccagtttctaccgtggtacaca
759 afP	cggtagaaaactggacagtgctcgaag
814 sfP	ggcaacagttcttcaaacagaactgcagtc
814 afP	gtttgaagaactgttgctgggcaaaatac
905 sfP	ctaaaagtttcttaccacagactgtac
905 afp	gtggaagaaaacttttaggcatgccttc
915 afP	gaggtcggatccctgaggcatgaagccgcc

#### cDNAs

pAPuro Hck (Dr. Seth Corey, Pittsburgh, USA)

pSVL EpoR/gp130 Fusionsprotein (Prof. Friedemann Horn, Leipzig)

### *2.1.4 Zellkulturmaterialien*

#### GERÄTE UND VERBRAUCHSMATERIAL

Einfriergerät (Cryoson, Schöllkrippen)

Einfrierröhrchen (Nunc, Roskilde DK)

Flüssigstickstofftank (Cryoson, Schöllkrippen)

Inkubator (WTB, Tuttlingen)

Mikroskope (Zeiss, Oberkochen)

Pipetten, Kulturflaschen, Zentrifugenröhrchen (Sarstedt, Nümbrecht)

Sterilbänke (BDK, Sonnenbühl)

Sterilfilter (Gelman Sciences, Ann Arbor USA)

Zählkammern (Brand, Wertheim)

Zellschaber (Beckton Dickinson, Heidelberg)

## MEDIEN, PUFFER UND SONSTIGE SUBSTANZEN

2-Mercaptoethanol (Sigma, St.Louis USA)

Blasticidin (Invitrogen, Groningen, Niederlande)

BSA (Sigma, St.Louis USA)

DMEM Medium (PAN, Aidenbach)

Dimethylsulfoxid (Sigma, St.Louis USA)

Ficoll (Immuno GmbH, Heidelberg)

FKS (Gibco, Eggenstein)

Flüssigstickstoff (Linde, München)

Murines rekombinantes Erythropoetin (Böhringer, Mannheim)

PBS (PAN, Aidenbach)

PP2 (Calbiochem, Schwalbach)

Puromycin (Sigma, St. Louis, USA)

RPMI 1640 Medium (PAN, Aidenbach)

Trypanblau 0.5% (Serva, Heidelberg)

### *2.1.5 Labormaterial*

## GERÄTE UND VERBRAUCHSMATERIAL

Bakterieninkubator (Heraeus, Hanau)

Bakterienschüttler (New Brunswick Scientific, Nürtingen)

Beschichtetes Papier (Schleicher & Schüll, Dassel)

Blotting Papier (Schleicher & Schüll, Dassel)

ECL-Filme (Amersham, Braunschweig)

Elektroporationsgerät (Kodak, New Haven, USA)

Elektroporationsküvetten (Bio-Rad, München)

Entwickler (Agfa-Gevaert, Leverkusen)

Geldokumentationsanlage (LFT, Wasserburg)

Gelelektrophorese-Systeme (Bio-Rad, München und OWL, Portsmouth, USA)

Geltransferkammer (Bio-Rad, München)



Geltrockner-System 583 (Bio-Rad, München)  
Heizblock (Techne, Cambridge GB)  
Parafilm M (American National Can, Greenwich USA)  
PCR Maschine (Perkin Elmer, Norwalk, USA)  
pH-Meter (WTW, Weilheim)  
Photometer (Pharmacia, Freiburg)  
Pipetten (Gilson, Langenfeld)  
Pipettenspitzen, (Sarstedt, Nümbrecht)  
Power-Supplies (Bio-Rad, München)  
Reaktionsgefäße (Eppendorf, Hamburg)  
Reinstwasseranlage (USF, Ransbach Baumbach)  
Schüttler (Bühler, Tübingen)  
Szintillationszähler (Wallac, Turku, Finnland)  
Taumelrolleninkubator (CAT, Staufen)  
Überkopffrotoren (Labinco, Breda, Niederlande)  
Vortex (Heidolph, Kelheim)  
Waage (Sartorius, Göttingen)  
Wasserbad (Köttermann, Hänigsen)  
Zellharvester (Wallac, Turku, Finnland)  
Zentrifugen (Eppendorf, Hamburg) und (Sigma, Osterode)

### *2.1.6 Chemikalien und Antikörper*

A-Beads/G-Beads (Pharmacia, Freiburg)  
Detektions-System ECL (Amersham, Braunschweig)  
DNA Längenstandards (Boehringer, Mannheim)  
DNA Präparationskits (Qiagen, Hilden)  
DNA Isolationskits (Bio101, Vista, USA)  
DOTAP (Boehringer, Mannheim)  
Ni-NTA-Beads (Qiagen, Hilden)

Proteinmarker (Amersham, Braunschweig)

Tritium-markiertes Thymidin (Amersham, Braunschweig)

APS, Glycin, SDS, TEMED und Tris (Bio-Rad, München)

Acrylamid (Serva, Heidelberg)

Agarose (Serva, Heidelberg)

PCR-Primer (Metabion, Martinsried)

Restriktionsenzyme (Boehringer, Mannheim und NEB, Schwalbach)

Alle anderen Chemikalien (Sigma, St.Louis USA)

$\alpha$ -His,  $\alpha$ -V5 (Invitrogen, Groningen)

$\alpha$ -p Y579 Pyk2,  $\alpha$ -p Y402 Pyk2, (Biosource, Solingen)

$\alpha$ -p S727 Stat3 (New England Biolabs, Schwalbach)

$\alpha$ -Maus-HRP,  $\alpha$ -Kaninchen-HRP (Amersham, Braunschweig)

Blockierendes Peptid gegen  $\alpha$ -Hck (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg)

Alle anderen Antikörper (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg)

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Arbeiten mit Bakterien

#### KULTIVIERUNG VON BAKTERIEN

LB/Amp-Medium:

Trypton	1 %
Hefeextrakt	0,5 %
NaCl	0,5 %
NaOH	1 mM
Ampicillin	50 $\mu$ g/ $\mu$ l
Für Platten zusätzlich:	
Agar	1,5 %

#### Plattenkultur

Zur Herstellung der Platten wurde das autoklavierte Medium nach dem Abkühlen auf 55°C in sterile Petrischalen gegossen. Die Platten bei 4 °C invertiert gelagert.

Für die Anlegung von Plattenkulturen wurden die Bakterien aus einer Flüssigkultur mit einem Drygalski-Spatel auf sterile LB/Amp-Agarplatten ausgestrichen. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37 °C im Brutschrank.

### Flüssigkultur

Mittels einer sterilen Impföse wurden Einzelkolonien von Plattenkulturen oder aus Cryo-Kulturen gepickt, in LB/Amp-Medium überimpft und über Nacht bei 200 rpm und 37 °C inkubiert. Aus diesen Kulturen wurde dann die Plasmid-DNA isoliert.

### Cryo-Kulturen von Bakterien

Zum Anlegen von Dauerkulturen wurde eine Übernachtskultur abzentrifugiert und in LB-Amp Medium aufgenommen, das zusätzlich 20 % DMSO enthält. Diese Suspension wurde in 2 ml Röhrchen abgefüllt und bei -80 °C gelagert.

## HERSTELLUNG VON KOMPETENTEN BAKTERIEN

### Medien

#### MgCl<sub>2</sub>-Platten:

Trypton	1 %	
Hefeextrakt	0,5 %	
NaCl	0,5 %	
MgCl <sub>2</sub>		10 mM
Agar	1,5 %	

#### TYM-Medium:

Trypton	2 %	
Hefeextrakt	0,5 %	
NaCl	100 mM	
MgCl <sub>2</sub>		10 mM

#### Tfbl Puffer:

KOAc	30 mM
MnCl <sub>2</sub>	50 mM
CaCl <sub>2</sub>	100 mM
Glycerin	15 %

#### Tfbl Puffer:

NaMOPS	10 mM
CaCl <sub>2</sub>	75 mM
KCl	10 mM
Glycerin	15 %

In den meisten Fällen wurden die kompetenten Zellen fertig gekauft. Um XL-1 blue Bakterien kompetent zu machen, wurden die Bakterien zunächst auf MgCl<sub>2</sub>-LB Platten ausplattiert und über Nacht bei 37 °C bebrütet. Mit einer gepickten-Einzelkolonie wurden 5 ml TYM-Medium angeimpft und über Nacht bei 37 °C

und 200 rpm geschüttelt. Die Übernachtskultur wurde am nächsten Morgen in 300 ml TYM-Medium überimpft und unter den gleichen Bedingungen bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0.7 bis 0.8 vermehrt. Der 300 ml Ansatz wurde in 50 ml Falcon-Röhrchen aufgeteilt und abzentrifugiert (3000 rpm, 10 min, 4 °C). Der Überstand wurde dekantiert und der Zelleniederschlag sofort auf Eis gestellt. Alle folgenden Arbeitsschritte wurden im Kühlraum (4 °C) durchgeführt. Die Bakterien (alle Mengenangaben beziehen sich auf einen 50 ml Ansatz) wurden vorsichtig in je 15 ml TfbI-Puffer resuspendiert und 10 min auf Eis gestellt. Nach erneuter Zentrifugation (wie oben) wurde der Niederschlag in 2 ml TfbII-Puffer aufgenommen, zügig zu 200 µl Aliquots abgefüllt und die Eppendorf-Gefäße sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Lagerung der kompetenten Bakterien erfolgte bei -80 °C. Die Transformationseffizienz betrug zwischen 0.7 und 2.0·10<sup>8</sup> Kolonien pro µg DNA-Plasmid.

#### TRANSFORMATION VON BAKTERIEN

SOC-Medium:

Trypton	10 g
Hefeextrakt	2,5 g
NaCl	0,25 g
H <sub>2</sub> O dd.	485 ml
autoklavieren	
1 M MgCl <sub>2</sub>	5 ml
1 M MgSO <sub>4</sub>	5 ml
2 M Glucose	5 ml
sterilfiltrieren	

Für jeden Transformationsansatz wurden 50 µl kompetenter E. coli XL1 blue Zellen auf Eis aufgetaut. Die zu transformierende DNA sowie 1 µl 2-Mercaptoethanol wurden zugegeben. Nach vorsichtigem Mischen wurde der Ansatz für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde im Wasserbad der Hitzeschock bei 42 °C für 45 Sekunden durchgeführt. Dann wurden die Bakterien sofort wieder für 2 Minuten auf Eis abgekühlt. Nach der Zugabe von 400 µl warmen SOC-Medium wurde für 60 min bei 37 °C und 200 rpm geschüttelt. Etwa 100 µl dieser Kultur wurden dann auf LB/Amp-Platten ausgestrichen. Die Platten wurden bei 37 °C über Nacht inkubiert.

### 2.2.2 Präparation und Analyse von DNA

#### ISOLIERUNG VON PLASMID-DNA AUS BAKTERIEN

Die Plasmid-DNA wurde aus Bakterien über Anionenaustauschersäulen isoliert. Es wurden Präparationen im "Mini"- und "Maxi"- Maßstab mit den Präparationskits und nach den Standardprotokollen von Qiagen durchgeführt. Für die Präparation im "Mini"-Maßstab wurden 3 ml, für die im "Maxi"-Maßstab 100 ml einer Übernachtskultur verwendet.

#### AUFTRENNUNG UND AUFREINIGUNG VON DNA

##### Elektrophoretische Auftrennung von DNA im Agarosegel

50 x TAE-Puffer:

Tris	242 g
Eisessig	57,1 ml
EDTA	37,2 g
NaOH	ad. pH 8
H <sub>2</sub> O	ad. 1000 ml

Auftragspuffer :

Tris/HCl pH 8	10mM
EDTA pH 8	50 mM
Glyzerin	50 %
Bromphenolblau	0,01 %

Die Agarose wurde in der gewünschten Konzentration mit 1x TAE Puffer aufgeschlämmt, im Mikrowellenherd aufgeköcht und gelöst. Nach dem Abkühlen auf 60 °C wurde die Lösung mit 0.5 g/ml Ethidiumbromid versetzt. Das Agarosegel wurde in einen Gelträger gegossen, mit einem entsprechenden Kamm bestückt und nach dem Erstarren in die entsprechende Gelapparatur eingesetzt. Die DNA-Proben wurden mit 0.2 Volumen Auftragspuffer versetzt und die Elektrophorese in TAE-Puffer mit 50 bis 100 V durchgeführt. Die DNA wurde anschließend durch die UV-Absorption des interkalierten Ethidiumbromids sichtbar gemacht. Parallel aufgetragene Größenmarker erlaubten eine Abschätzung der Länge der DNA-Fragmente.

### Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Zur Isolierung von DNA aus Agarosegelen und zur Aufreinigung von DNA (Entfernung von Enzymen und Umpufferung) wurden Spin-Kits verwendet. Die mit dem Skalpell ausgeschnittenen Gelstücke wurden hierzu mit 400  $\mu\text{l}$  Glasmilch-Puffer gemischt und bei 50 °C geschmolzen. Dann wurde die Suspension durch eine Reinigungssäule zentrifugiert. Die glasmilchgebundene DNA wurde einmal durch Zentrifugation mit 500  $\mu\text{l}$  Waschpuffer gewaschen und abschließend mit 50  $\mu\text{l}$  ultrafiltriertem Wasser eluiert.

### ENZYMATISCHE REAKTIONEN AN DNA

#### Restriktionsspaltung von DNA mit Endonukleasen

Die Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen wurde zur Überprüfung auf erfolgreiche Klonierung eingesetzt. Für eine vollständige Restriktion wurden dabei zwischen 0.5 und 8  $\mu\text{g}$  DNA mit 1 bis 30 U Enzym eingesetzt. Die Spaltung erfolgte über ein bis zwei Stunden bei vorgegebener Temperatur in 10 bis 100  $\mu\text{l}$  Gesamtvolumen. Die Reaktionsbedingungen wie erforderlicher Restriktionspuffer, Temperatur und Restriktionsaktivität wurden den Herstellerangaben entnommen. Die Kontrolle der Spaltung erfolgte durch Agarosegelelektrophorese.

#### Ligation von DNA-Fragmenten

Zur Klonierung von DNA-Fragmenten und Vektoren wurde T4-DNA-Ligase verwendet. Dabei wurde im allgemeinen etwa 100 ng eines aufgeschnittenen Vektors mit der dreifachen Menge des Insertfragmentes ligiert. Die Ligation wurde gewöhnlich mit 10 U Ligase in einem Gesamtvolumen von 10  $\mu\text{l}$  im Ligase-Puffer durchgeführt. Die Reaktion erfolgte über 4 h bei Raumtemperatur. Anschließend wurden 2  $\mu\text{l}$  des Ligationsansatzes direkt in kompetente Bakterien transformiert.

### DNA-Sequenzierung

Sequenzanalysen wurden von den Firmen MediGenomix (Martinsried) und Toplab (Martinsried) nach dem Kettenabbruch- und Fluoreszenzdetektionsverfahren durchgeführt.

### Polymerase Kettenreaktion (PCR)

#### Standard PCR-Ansatz:

Template-DNA (1:100)	1 µl
Primer A (100 pmol)	0,5 µl
Primer B (100 pmol)	0,5 µl
dNTPs (2mM)	4 µl
10x Thermopol-Puffer	5 µl
Vent-Polymerase	0,5 µl
H <sub>2</sub> O dd.	38,5 µl

Der chimäre Rezeptor (Eg) wurde durch Fusion der extrazellulären Domäne des murinen Erythropoetinrezeptors mit dem zytoplasmatischen Anteil von gp130 hergestellt (Hemmann U. et al., 1996). Mittels eines Standard PCR-Protokolls wurden XbaI (5') und BamHI (3') Schnittstellen sowie eine Kozak-Sequenz (5') eingefügt. Dieses Konstrukt wurde anschließend in den Expressionsvektor pcDNA3.1/myc-His inseriert. Die Polymerase-Kettenreaktion wurde auch zur Herstellung von mutierten Eg-Fusionsrezeptorproteinen eingesetzt. Mutationen wurden nur in den gp130-Anteil von Eg eingeführt, so dass über die EcoRI Schnittstelle (Fusionsstelle von EPOR und gp130) kloniert werden konnte. Es wurden Trunktations-, Deletions- und Punktmutationen hergestellt. Für die Herstellung von Deletionsmutationen wurden Primer eingesetzt, die partiell jeweils zur gegenüberliegenden Seite der Deletionsstelle komplementär waren (siehe Abbildung 7, folgende Seite). Zur Generierung von Trunktationsmutationen wurden Primer verwendet, die an die geplante Abbruchstelle banden und die außerdem die gewünschte Klonierungsschnittstelle enthielten. Die Herstellung von Punktmutationen erfolgte mittels komplementärer Primer, die in der Mitte die zu mutierenden Nukleotidsequenzen trugen. Als Polymerase zur Amplifikation wurde Vent-Polymerase von Stratagene (Heidelberg) eingesetzt. Mutierte Bereiche wurden über geeignete Restriktionsspaltungen in den gewünschten Vektor

umkloniert. Die als Template in die PCR-Reaktionen eingesetzten DNAs, sowie neu klonierte Fragmente wurden durch Sequenzierung überprüft.

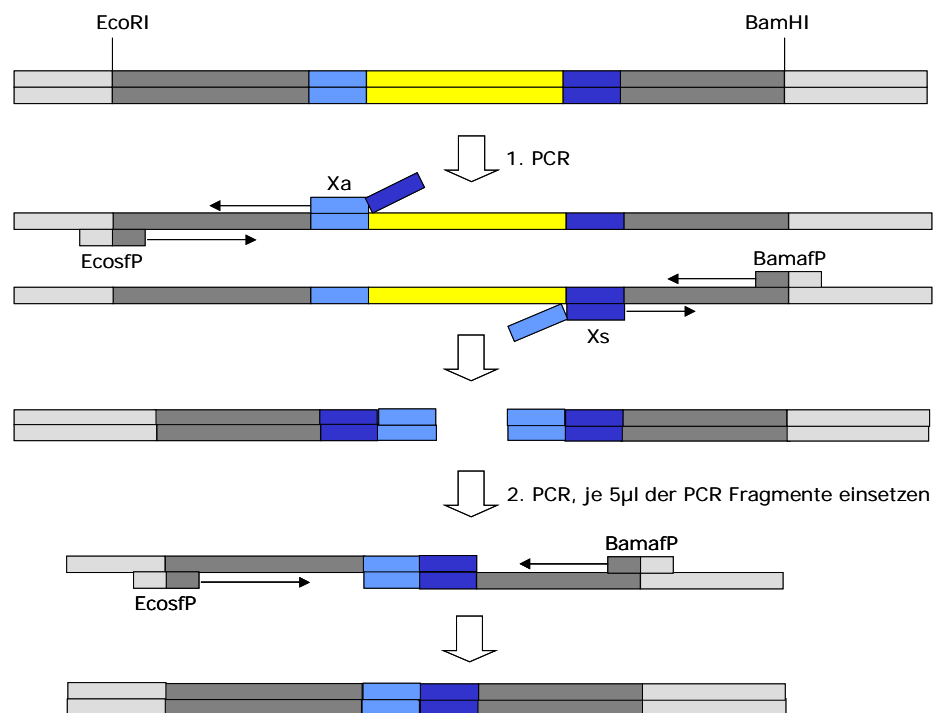


Abb. 7: Die Herstellung von internen Deletionsmutanten mittels partiell überlappenden Primern

### 2.2.3 Zellkultur

#### KULTIVIERUNG DER ZELLEN

Alle Zelllinien wurden grundsätzlich ohne Antibiotika gehalten. Dieses Verfahren hat den Vorteil, dass latente Kontaminationen sofort erkannt werden können.

Da viele Zelllinien, insbesondere auch die Baf-B03 Zellen, bekannt dafür sind, in der Kultur weiter zu mutieren, wurden regelmäßig Zellen von frischen Passagen eingefroren und etwa alle 10-12 Wochen neue Zellen aufgetaut.



## Baf-B03 Zellen

Kulturmedium:

RPMI 1640	
FCS	10 %
WEHI Überstand	10 %

Die Zellen wurden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Da Baf-B03 Zellen sehr schnell wachsen, war es nötig, sie alle zwei Tage 1:20 zu verdünnen.

## Cos-7 Zellen

Kulturmedium:

DMEM 4,5 g/l Glucose	
FCS	10 %

Die Zellen wurden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Alle zwei bis drei Tage wurden die Zellen 1:5 mit frischem Medium verdünnt. Dazu wurden die adhären wachsenden Zellen zunächst durch eine kurze Inkubation mit Trypsin abgelöst. Diese Suspension wurde dann in etwas Medium aufgenommen und abzentrifugiert. Dann wurde in einer neuen Kulturflasche etwas Medium vorgelegt und die ebenfalls mit frischem Medium resuspendierten Zellen entsprechend der gewünschten Verdünnung eingesät.

## Wehi-3B Zellen

Kulturmedium:

RPMI 1640	
FCS	10 %

Wehi-3B wurden in Kultur gehalten, da ihr Überstand Interleukin-3 enthält. Dieser Überstand wurde dem Medium für die IL-3 abhängigen Baf-B03 Zellen zugesetzt. Wehi-3B Zellen wachsen semiadhären, lassen sich aber durch bloßes abklopfen gut vom Flaschenboden lösen. Der Überstand dieser Zelllinie wurde in regelmäßigen Abständen geerntet, sterilfiltriert und sofort verwendet, oder bei –20 °C eingefroren.

### ZELLZAHL -UND VITALITÄTSBESTIMMUNG

Um exakte Zellmengen in Experimente einzusetzen wurde eine Zellzahl- und Vitalitätsbestimmung mittels Trypanblau-Färbung durchgeführt. Ansonsten wurde die Zahl und die Vitalität der Zellen durch Betrachtung im Lichtmikroskop abgeschätzt. Zur Bestimmung mittels Trypanblau-Färbung wurden 200  $\mu\text{l}$  aus der Zellkultur in eine 96-Loch-Platte überführt. Daraus wurden dann 50  $\mu\text{l}$  entnommen und mit 50  $\mu\text{l}$  0,5 % Trypanblau-Lösung gut gemischt. Von dieser Mischung wurden etwa 20  $\mu\text{l}$  in eine Neubauer-Zählkammer pipettiert. Die Auszählung der Zellen erfolgte unter dem Lichtmikroskop. Aus der Zahl der ausgezählten Zellen, dem Verdünnungsfaktor und dem Kammerfaktor lässt sich die Zellzahl berechnen. Die Vitalitätsrate ergibt sich aus dem Verhältnis der toten bzw. lebenden Zellen zur Gesamtzellzahl.

#### *2.2.4 Herstellung stabil und transient exprimierender Zelllinien*

### TRANSIENT EXPRIMIERENDE COS-7 ZELLEN

Die adhärent wachsenden Cos-7 Zellen wurden mittels Lipofektion transfiziert. Als Lipofektionsreagenz wurde DOTAP verwendet. Dabei wird der zu transfizierende Expressionsvektor so mit lipophilen Molekülen verpackt, dass er die Zellmembran durchdringen kann. Die transfizierte DNA wird dann episomal exprimiert, integriert also nicht ins Genom. Üblicherweise wurden die Expressionsvektoren für Hck und verschiedene Eg Mutanten co-transfiziert.

Zur Herstellung der Cos-7-Transfektanten wurde ein in unserem Labor etabliertes Vorgehen gewählt (Warmuth M. et al., 1997) Die Ansätze A (Expressionsvektor und Puffer) und B (DOTAP und Puffer) wurden getrennt in sterilen 2 ml Reaktionsgefäßen angesetzt, dann vereinigt und nach kurzem Schwenken 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. In der Zwischenzeit wurden 50 ml Röhrchen mit 30 ml Transfektionsmedium befüllt und das Medium aus den Kulturflaschen abgegossen. Nach Ablauf der 15 min Präinkubation wurde der DNA/DOTAP-Mix

mit dem Transfektionsmedium vermischt und in die Zellkulturflaschen überführt. Die Inkubation erfolgte über 18 Stunden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>.

### DNA-Ansätze und Transfektionsmedium

#### Einfachansatz:

A:  
50 µg DNA ad. 500 µl TP  
B:  
DOTAP 300 µl + 600 µl TP

#### Doppelansatz:

A:  
50 µg Rezeptor-DNA + 25 µg Hck-DNA  
ad. 750µl TP  
B:  
450µl DOTAP + 900 µl TP

#### Transfektionspuffer (TP):

HEPES 20 mM

#### Transfektionsmedium:

DMEM 1,0 g/l Glucose  
FCS 0,5 %  
Pen/Strep 50 U/ml

### STABIL EXPRIMIERENDE BAF-B03 ZELLEN

Bei der Elektroporation werden die Zellen mit den gewünschten Expressionsvektoren inkubiert und einem starken elektrischen Feld ausgesetzt, wodurch die Zellmembran kurzzeitig auch für Makromoleküle permeabel wird.

#### Vorbereitung

$1 \times 10^7$  Baf-B03 Zellen wurden zweimal mit kaltem PBS (ohne Calcium und Magnesium) gewaschen, und in 800 µl PBS resuspendiert. In einem 15 ml Röhrchen wurden 25 µg zirkulärer Expressionsvektor vorgelegt. Nach der Zugabe der Zellsuspension und leichtem Mischen erfolgte eine 10 minütige Inkubation auf Eis. Die Suspension wurde dann in eine sterile Elektroporationsküvette mit 0,4 cm Elektrodenabstand überführt.

### Elektroporation

Die Elektroporation erfolgte mit 950  $\mu\text{F}$  und 350 V, danach wurde die Küvette sofort für 10 Minuten auf Eis gekühlt. Anschließend wurden die Zellen mit etwas Medium in eine 25  $\text{cm}^2$  Kulturflasche mit 15 ml vorgewärmten Medium gespült.

### Selektion

Zunächst wurde die minimale Hemmkonzentration der Selektionsantibiotika bestimmt. Dazu wurden Baf-B03 Wildtyp Zellen mit verschiedenen Konzentrationen der Antibiotika inkubiert. Verwendet wurden Puromycin für die Selektion von Hck exprimierenden Zellen und Blastidicin für die Selektion von Zellen, welche die Rezeptormutanten trugen. Elektroporierte Zellen wurden für zwei Tage ruhen gelassen und dann mit 0,5  $\mu\text{g/ml}$  Puromycin und/oder 8  $\mu\text{g/ml}$  Blastidicin versetzt. Daraufhin begannen untransfizierte Zellen nach zwei bis drei Tagen abzusterben. Die Zellsuspension wurde dann durch Ficollisieren von den toten Zellen befreit und etwa eine Woche unter ständiger Selektion expandiert. Mittels Westernblot wurde schließlich auf Expression des Transgens geprüft. Bei positiver Expression der polyklonalen Zellen wurde zunächst ein Aliquot eingefroren.

Zur Etablierung monoklonaler Zellen wurden die polyklonalen Zellen in Mikrotiterplatten unter ständiger Selektion vereinzelt. Mittels Westernblot wurden dann hochgewachsene Kolonien auf Expression getestet. Es wurden jeweils vier gleichstark exprimierende Klone eingefroren. Für Experimente wurden immer mindestens zwei verschiedene Klone verwendet.

### FICOLL-DICHTEGRADIENTEN-ZENTRIFUGATION VON ZELLEN

Die Zellen wurden jeden Tag mittels Mikroskop auf Wachstum und Vitalität kontrolliert. Wenn die Vitalität der Zellen unter 70 % lag, wurden die lebenden Zellen von den toten durch eine Ficollbehandlung abgetrennt. Dazu wurden in einem 50 ml Falconröhrchen 10 ml Ficoll mit 20 ml der Zellkultur überschichtet. Nach dem Abzentrifugieren bei 400 g und ohne Bremse befinden sich die toten Zellen als Pellet am Gefäßboden, während die lebenden mit der Pipette vorsich-

tig aus der Interphase abgenommen werden können. Um die Zellen von dem überschüssigen Ficoll zu trennen, wurden sie einmal in PBS gewaschen und in 20-30 ml frischem Medium resuspendiert. Nach dieser Behandlung zeigten sich die Zellen gut erholt und wiesen Vitalitätsraten von über 90 % auf.

### *2.2.5 Hungern und Stimulieren der Zellen*

#### HUNGERN DER ZELLEN

##### Cos-7

Üblicherweise wurden konfluent bewachsene 175 cm<sup>2</sup> Kulturflaschen verwendet. Die Zellen wurden mittels Trypsin abgelöst und 5 min bei 200 g abzentrifugiert. Nach zweimaligen Waschen in PBS wurden die Zellen in 35 ml Hungermedium resuspendiert und in eine neue 175 cm<sup>2</sup> Kulturflasche gegeben. Die Inkubation mit dem Hungermedium betrug 18 h und erfolgte bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>.

##### Baf-B03

Die Zellen wurde zunächst so auf ein Volumen von 150 ml expandiert, dass die Zellzahl etwa ( $1 \times 10^6$  /ml) betrug. Diese Kultur wurde dann abzentrifugiert, zweimal mit PBS gewaschen und in 180 ml Hungermedium aufgenommen.

Hungermedium Cos-7:

DMEM 1,0 g/l Glucose  
FCS 0,5 %

Hungermedium Baf-B03:

RPMI 1640  
FCS 0,5 %

Die Inkubation in dem Hungermedium betrug 16 h und erfolgte bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>. Vor dem Hungern wurde durch Kontrolle mit dem Mikroskop sichergestellt, dass die Vitalität der Zellen bei etwa 90 % lag. Die Hungermedien enthielt nur 0,5 % FCS, dadurch sollte erreicht werden, dass der „Background“ an phosphorylierten Proteinen gesenkt wird.

#### STIMULIEREN DER BAF-B03 ZELLEN

Die Zellen wurden für 5 min bei 200 g und RT in 150 ml Gefäßen abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde zweimal mit PBS gewaschen, in 4 ml PBS resuspendiert, auf 37 °C erwärmt und gleichmäßig auf zwei Röhrchen verteilt. Zu einem der beiden Röhrchen wurden 160 µl EPO (40 U/ml) gegeben. Die anderen Zellen wurden auf Eis gestellt und dienten als unstimulierte Kontrolle. Die stimulierten Zellen wurden für 10 min bei 37 °C leicht geschwenkt und dann zum Abstoppen der Reaktion zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen, wobei jeweils 5 min bei 200 g und 4 °C abzentrifugiert wurde. Nach dem letzten Abzentrifugieren wurde das PBS möglichst komplett abgegossen. Die Zellen wurden dann permanent auf Eis gehalten, um jegliche enzymatische Aktivitäten zu minimieren.

### *2.2.6 Protein Analyse*

#### LYSE VON ZELLEN

Die Zusammensetzung des Lysispuffers und die Konzentration seiner Komponenten sind von entscheidender Bedeutung und sollten je nach Fragestellung immer optimiert werden. Ein wichtiger Faktor für die Stringenz eines Lysispuffers ist die Stärke des verwendeten Detergens. NP40 ist ein etwas stärkeres Detergens, kann aber in geringeren Konzentrationen verwendet werden und macht auch Membranproteine gut löslich. Die Funktionen der anderen Komponenten sind: Glycerin → Gefrierschutz, EDTA → Komplexierung von Mg<sup>2+</sup> und Mn<sup>2+</sup> und damit Inhibierung von Kinasen, NaCl → Osmolarität, Tris-Cl → pH-Puffer,

Natriumfluorid → Serin- und Threonin-Phosphataseinhibitor, und Phenylphosphat → Phosphataseinhibitor. Zusätzlich wurden dem Lysispuffer folgende Inhibitoren zugefügt: PMSF, Leupeptin, Aprotinin (Protease-Inhibitoren), sowie Na-Orthovanadat (Tyrosinphosphatase-Inhibitor). Abschließend ist zu sagen, dass alle Zelllysate auf Eis gehalten werden müssen, um Proteine und Proteinkomplexe zu schützen (Proteolyse, Dissoziation).

### Verwendete Lysispuffer und Reagenzien

Lysispuffer:		Glycerin	15 %
NP 40	0,5 %	Zusätzlich pro Milliliter Lysispuffer:	
EDTA	1 mM	PMSF	10 µl
Tris-Cl pH 7,4	50 mM	NaVO <sub>4</sub>	10 µl
Natriumfluorid	1 mM	Aprotinin	5 µl
NaCl	150 mM	Leupeptin	2 µl

### Durchführung der Zellyse

Die zum Zellpellet gegebene Menge des eisgekühlten Lysispuffers war genau so bemessen, dass jeweils  $2,5 \times 10^6$  Zellen in 10 µl Puffer lysiert wurden. Das erste Durchmischen erfolgte durch zweimaliges auf- und abpipettieren mit einer blauen Pipettenspitze, danach wurden die Proben 25 min bei 4 °C rotiert. Schließlich wurde das Lysat durch Abzentrifugieren für 15 min bei 4 °C und 14000 rpm von unlöslichen Anteilen wie größeren Membranteilen und nukleären Bestandteilen getrennt. In dem klaren Lysat sollten sich jetzt nur noch die zytosolischen und membranären Zellproteine befinden. Im Allgemeinen wurde für Experimente frisches Lysat hergestellt. Bei einigen Experimenten wurde das Lysat bei -80 °C eingefroren und später verwendet.

### BESTIMMUNG DER PROTEINKONZENTRATION

Zur Bestimmung des Proteingehaltes der Lysate wurde ein Proteinassay nach Bradford durchgeführt. Dazu wurde eine Standardkurve nach dem Protokoll von Bio-Rad erstellt und Verdünnungen der Lysate mit dem Farbreagenz vermischt.

Der Proteingehalt wurde dann nach photometrischer Messung der Blaufärbung bei 595 nm bestimmt.

Für Westernblots wurden pro Ansatz 100 µg, für Immunpräzipitationen 800 µg Gesamtprotein verwendet.

#### SDS-PAGE UND WESTERNBLOT

Durch die Zugabe von SDS erfolgt die Auftrennung von Proteinen im elektrischen Feld nicht nach ihrer Ladung, sondern nach ihrem Molekulargewicht, über Gelfiltrationseffekte (verschieden konzentrierte Gele). SDS bindet dabei mit seinem hydrophoben Alkylrest in einer konstanten Rate (1 SDS/2 Aminosäuren) so an Proteine, dass die intrinsische Proteinladung durch die Sulfatgruppe des SDS maskiert wird.

Zusätzlich wurde die Technik der *disc*-Elektrophorese (*discontinuous* pH) angewandt. Hierbei wird mit zwei unterschiedlichen Gelen, bei unterschiedlichen pH-Werten gearbeitet. Nach der Beschleunigung und Konzentrierung der Proteine im Sammelgel erfolgt ein „Auflaufen“ an der Grenzschicht Sammelgel-Trenngel. Dies hat zur Folge, dass die Banden schärfer begrenzt sind und besser aufgetrennt werden.

#### Herstellen der Polyacrylamidgele

Zwei Glasplatten (für 8 x 10 cm große Gele) wurden mit 70 % Ethanol gereinigt und mit Spacern und Klammern versehen im Gelständer fixiert. Die Reagenzien wurden in der oben angegebenen Reihenfolge blasenfrei vermischt und vorsichtig zwischen die zwei fast waagrecht gehaltenen Glasplatten laufen gelassen. Der Zwischenraum wurde bis etwa 2 cm unter den Rand der kleineren Platte gefüllt. Schließlich wurde alles auf die selbe Weise mit etwas Wasser überschichtet und für mindestens eine Stunde zum Polymerisieren stehen gelassen. Die Wasserschicht über dem auspolymerisierten Trenngel wurde abgegossen. Nach zweimaligen ausspülen mit Wasser wurde der Zwischenraum bis zur Oberkante der kleineren Glasplatte blasenfrei mit Sammelgel gefüllt.



Acrylamid/Bisacrylamid-Mix  
(40 %)

APS 10 %:

10%-ige Lösung von APS in  
dd H<sub>2</sub>O, die aliquotiert und bei  
-20 °C gelagert wird

4x Tris-Cl/SDS pH 8,8:

dd H <sub>2</sub> O	300 ml
Tris	91 g
SDS	2 g
mit HCl pH 8,8 einstellen	
dd H <sub>2</sub> O	ad. 500 ml
→ mit 0,45 µm Filter filtrieren	

4x Tris-CL/SDS pH 6,8:

dd H <sub>2</sub> O	40 ml
Tris	6,05 g
SDS	0,4 g
mit HCl pH 6,8 einstellen	
dd H <sub>2</sub> O	ad. 100 ml
→ mit 0,45 µm Filter filtrieren	

Trenngel 7 %:

Acrylamid/Bis. (40 %)	875 µl
4xTris-Cl/SDS pH 8,8	1,25 ml
dd H <sub>2</sub> O	2,7 ml
TEMED	17 µl
APS 10%	7 µl

Trenngel 10 %:

Acrylamid/Bis. (40 %)	1,25 ml
4x Tris-Cl/SDS pH 8,8	1,25 ml
dd H <sub>2</sub> O	2,5 ml
TEMED	17 µl
APS 10%	7 µl

Sammelgel:

Acrylamid/Bis. (40 %)	150 µl
4x Tris-Cl/SDS pH 6,8	0,4 ml
dd H <sub>2</sub> O	1 ml
TEMED	2 µl
APS 10%	8,5 µl

Dann wurde ein vorher mit 70 % Ethanol gereinigter Kamm (10 Zähne) so eingesteckt, dass keine Blasen entstanden. Nach etwa 20 min wurde der Kamm entfernt, die Taschen mit Elektrophorese-Puffer ausgespült und das Gel in der Elektrophoresekammer befestigt.

### Laden und Starten des Gels

2x Probenpuffer:

4x Tris-Cl/SDS pH 6,8	12,5 ml
SDS 10%	20 ml
β-ME	2 ml
Glycerin	20 ml
Bromphenolblau	1 mg
dd H <sub>2</sub> O	45,5 ml

5x Elektrophoresepuffer:

Tris	15,1 g
Glycin	72 g
SDS	5 g
dd H <sub>2</sub> O	ad. 1000 ml

Rainbow-Marker (Mix aus angefärbten, rekombinanten Proteinen):

250 kD	blau
160 kD	rot
105 kD	grün
75 kD	gelb
50 kD	violett
35 kD	blau
30 kD	orange
25 kD	grün
15 kD	blau
10 kD	rot

Die Lysate oder IPs wurden 1:1 mit Probenpuffer versetzt und zur vollständigen Reduktion für 5 min auf 100 °C erhitzt. Parallel wurde immer eine Bahn mit 5 µl

Proteinmarker beladen. Das Laden des Gels und der Gellauf fanden bei 4 °C im Kühlraum statt. Der Gellauf erfolgte bei 100-125 V.

### Transfer (Westernblot)

#### Transferpuffer:

Tris	24,22 g	
Glycin	115,3 g	
Methanol		1600 ml
dd H <sub>2</sub> O	ad. 8000 ml	

Nach der elektrophoretischen Auftrennung der Proteine wurden diese zur weiteren Handhabung auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert. Dazu wurde zunächst eine Nitrocellulose-Membran auf die Größe des Gels zugeschnitten, kurz in dd H<sub>2</sub>O geschwenkt und dann in Transferpuffer gelagert. Ebenso wurden zwei Schwämme und zwei Whatman 3 MM-Papierstücke der Größe des Gels in Transferpuffer eingeweicht. Wenn die blaue Farbmarker-Bande am unteren Rand der Glasplatte angelangt war, wurde der Gellauf beendet und das Sammelgel abgeschnitten. In einer Transferkassette wurden die Komponenten in folgender Reihenfolge blasenfrei (ausrollen mit Pipette) aufeinandergelegt: Schwamm, Whatman, Gel, Nitrocellulose, Whatman, Schwamm. Die Kassette wurde geschlossen und in der mit Puffer gefüllten Transferkammer so befestigt, dass die Membran auf der Seite der Anode war. Der Transfer lief unter Rühren bei 4 °C (Kühlraum) und 100 V für etwa eine Stunde.

### Blocken der Membran

#### 10x TBST:

1 M Tris-Cl pH 8	100 ml
5 M NaCl	300 ml
Tween 20	5 ml
dd H <sub>2</sub> O	ad. 1000ml

#### Blocking-Solutions für ECL:

MP	1 g
1x TBST	ad. 40 ml
oder	
BSA	1 g
1x TBST	ad. 40 ml

Da Antikörper auch unspezifisch an verschiedene Materialien binden können, ist es notwendig, alle Stellen der Membran, an denen keine Zellproteine gebunden haben, mit einem „inerten“ Protein zu blockieren. Nach der Transferlaufzeit wurde die Membran aus der Kammer genommen und bei Raumtemperatur für 2 h in einer Plastikschaale mit Blocking-Solution geschüttelt. Danach wurde sie einmal mit 1x TBST gespült und einmal für 5 min in 1x TBST geschüttelt, um überschüssige Blocking-Solution wegzuwaschen. Wenn eine Inkubation mit unterschiedlichen Antikörpern durchgeführt werden sollte, wurde die Membran an den entsprechenden Stellen mit einem Skalpell geschnitten.

#### Antikörper-Inkubation

Die meisten der verwendeten primären Antikörper wurden in einer 1:1000 Verdünnung, die sekundären Antikörper in 1:3000 Verdünnungen jeweils in Blocking-Solution eingesetzt.

Die Membran wurde in ein Falconröhrchen eingerollt, so dass die Proteinseite nach innen zeigte. Die Inkubation erfolgte in dem Röhrchen mit 3 ml der Antikörperlösung für 1-2 Stunden auf einem Taumelrolleninkubator. Dann wurde die Membran zunächst viermal mit TBST gewaschen, bevor der zweite Antikörper ebenfalls in dem Röhrchen für 30 min inkubiert wurde. Die Detektion der Proteine erfolgte nach erneutem viermaligen Waschen.

#### Detektion der Proteine

Die Detektion der Proteine erfolgte mittels Chemilumineszenz. Dabei wird durch die an die sekundären Antikörper gebundene Peroxidase die Oxidation eines Diacylhydrazids katalysiert. Bei dieser Reaktion entstehen Stickstoff und Licht, dass Schwärzungen auf einem aufgelegten Film erzeugt.

Die ECL-Lösungen wurden 1:1 gemischt (2 + 2 ml für eine etwa 8 x 10 cm große Membran). Die Membran wurde mit einem Papiertuch gut getrocknet und in einer Plastikschaale mit der Detektionslösung übergossen. Nach einer Minute wurde der Blot entnommen, auf einem Papiertuch getrocknet und mit der Proteinseite nach oben auf ein mit Kunststoff beschichtetes Papier gelegt. Das Ganze

wurde mit einer Frischhaltefolie blasenfrei abgedeckt und in einer Filmkassette für 2-60 Sekunden mit einem Film exponiert. Nach der Entwicklung des Films erscheinen Antikörper-Bindungsstellen als schwarze Banden. Die Markerpositionen wurden von der Membran auf den entwickelten Film mit einem Foliestift übertragen.

#### Strippen der ECL-Blots

Stripping-Solution:

Tris-Cl pH 6,7	3,78 g
SDS	10 g
β-ME	3,5 ml
dd H <sub>2</sub> O	ad. 500 ml

Bei der ECL-Methode ist es möglich, die Membran mehrfach (bis zu dreimal) einer Immundetektion zu unterziehen. Bei dem sogenannten „Strippen“ werden zunächst sowohl die sekundären, als auch die primären Antikörper von der Membran entfernt. Danach ist die Inkubation mit weiteren Antikörpern möglich.

Die Membran wurde im Wasserbad bei 50 °C für 30 min in Stripping-Solution geschüttelt, dann mit 1x TBS einmal gespült und zweimal für 10 min gewaschen. Schließlich wurde erneut geblockt und mit Antikörpern inkubiert wie oben angegeben.

#### IMMUNPRÄZIPITATION

Mit Hilfe der Immunpräzipitation ist es möglich, einzelne Proteine oder Proteinkomplexe aus Zelllysaten zu isolieren. Der entscheidende Punkt hierbei ist, dass man Antikörper verwendet, die an polymere Trägersubstanzen (Beads) wie Sepharose oder Agarose gekoppelt sind und dadurch abzentrifugierbar werden. Die Kopplung kann entweder kovalent, über Anti-Immunglobulin-Serum, oder über Protein A oder Protein G erfolgen. Die Proteine A und G sind bakteriellen Ursprungs und haben die Eigenschaft, Immunglobuline über deren Fc-Teil zu binden. Wenn der Antigen-Antikörper Komplex an die Beads gebunden hat, werden diese gewaschen, um ungebundene und unspezifisch gebundene Proteine

zu entfernen. Die Immunpräzipitate werden dann zur weiteren Analyse einer SDS-PAGE unterzogen.

### Preclearing der Lysate

IP-Waschpuffer NP 40:

NP 40	0,1-0,3 %
EDTA	1 mM
Tris-Cl pH 7,4	50 mM
Natriumfluorid	1 mM
NaCl	150 mM
Glycerin	15 %

Durch das Preclearing der Lysate werden falsche Ergebnisse aufgrund von unspezifischen Bindungen an die Beads minimiert.

Zunächst wurden die Beads zweimal mit IP-Waschpuffer gewaschen, wobei immer kurz in der Tischzentrifuge abzentrifugiert wurde. Jede IP wurde mit 100 µl dieser Beads versetzt und 2 h auf der Drehscheibe bei 4 °C inkubiert. Dann wurden die Beads wie vorher abzentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt.

### Inkubation der Antikörper und Beads

Zu den Überständen wurden die Antikörper gegen das zu präzipitierende Protein gegeben. Die jeweiligen Mengen können dem Kapitel Ergebnisse entnommen werden. Die Inkubation erfolgte für zwei Stunden bei 4 °C auf einem Rotor. Pro Ansatz wurden dann 100 µl Beads zugegeben, die vorher wie oben gewaschen wurden. Die Inkubation erfolgte bei 4 °C für 2 h auf dem Rotor.

### Durchführung der Peptidkontrollen

Die Antikörper wurden für zwei Stunden mit einem den Antikörper blockierenden Peptid bei Raumtemperatur inkubiert, bevor die Immunpräzipitationen wie beschrieben angesetzt wurden.

### Waschen der Immunpräzipitate

Um die IPs von unspezifisch gebundenen Proteinen zu reinigen, wurden diese viermal mit je 500  $\mu$ l IP-Waschpuffer gewaschen. Dazu wurden die Beads für jeweils etwa 40 Sekunden mit der Tischzentrifuge abzentrifugiert.

### Trennung der Antigen-Antikörper-Protein A/G Komplexe

Nach dem quantitativen Abnehmen des letzten Überstands wurden die Beads mit 30  $\mu$ l Waschpuffer überschichtet. Nach der Zugabe von 10  $\mu$ l 4x Probenpuffer zu Präzipitaten wurden die Ansätze gut gevortext und für 5 min auf 100 °C erhitzt. Die Durchführung der SDS-PAGE und des Westernblots erfolgte anschließend wie oben beschrieben.

### *IN VITRO* KINASE ASSAYS

Zur Bestimmung der Aktivität von Hck wurden nicht radioaktive Kinase Assays durchgeführt (Bosco M.C. et al., 2000).

#### Kinasepuffer:

NP 40	0,1 %
HEPES pH 7,3	50 mM
NaCl	100 mM
Mg Cl <sub>2</sub>	1 mM
MnCl <sub>2</sub>	3 mM

Dazu wurde zunächst Hck aus stimulierten und unstimulierten Baf-B03 Zellen präzipitiert. Die IP-Reaktionen wurden nach dem Waschen in einem Kinasepuffer resuspendiert und anschließend für 15 min mit 15  $\mu$ M Mg/ATP versetzt und bei 37 °C geschüttelt. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 4x Probenpuffer und Erhitzen auf 100 °C abgestoppt. Nach Auftrennung auf dem SDS-Gel wurde die Autophosphorylierung von Hck durch Immunoblot mit dem anti-Phosphotyrosin Antikörper PY20 ermittelt.

### *2.2.7 Proliferations-Assays*

Zwei Tage vor dem Einsetzen in die Proliferations-Assays wurden die Baf-B03 Zellen in gleiche Konzentrationen in Kulturflaschen ausgesät. Danach wurden die Zellen gezählt und zweimal mit PBS gewaschen. Die Proliferations-Assays wurden in RPMI 1640 Medium, das 10 % FCS, aber kein IL-3 enthielt, durchgeführt. Mikrotiterplatten wurden mit  $5 \times 10^3$  Baf-B03 Zellen pro Loch befüllt. Dreifachansätze von monoklonalen Baf-B03 Zellen wurden dann mit rekombinantem EPO oder IL-3 in den angezeigten Konzentrationen stimuliert. Für einige Versuche wurde auch zusätzlich  $10 \mu\text{M}$  PP2, ein Inhibitor, der spezifisch Src-Kinasen blockiert, zugegeben. Nach der Inkubation der Platten bei  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  für 72 Stunden erfolgte die Bestimmung der Zellproliferation entweder durch Messung des  $^3\text{H}$ -Thymidineinbaus oder durch Zählen der Zellen unter dem Lichtmikroskop nach Trypanblau-Färbung. Der Einbau von  $^3\text{H}$ -Thymidin wurde wie folgt bestimmt: Nach der Stimulation mit Wachstumsfaktoren wurden die Zellen mit  $0.5 \mu\text{Ci}$   $^3\text{H}$ -Thymidin pro Loch für sechs Stunden gepulst. Dann wurde der Einbau durch Einfrieren der Platten bei  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  gestoppt. Schließlich wurden die Ansätze wieder aufgetaut, die Zellen aus den Platten geerntet und das radioaktive Signal mit einem automatischen  $\beta$ -Szintillationszähler gemessen.

### 3. ERGEBNISSE

#### 3.1 Sequenz –und Strukturanalyse von gp130

Zunächst erfolgte eine detaillierte Analyse der Aminosäuresequenz des zytoplasmatischen Anteils von gp130. Dabei wurde besonderes Augenmerk auf potentielle Bindungsbereiche für Hck gelegt.

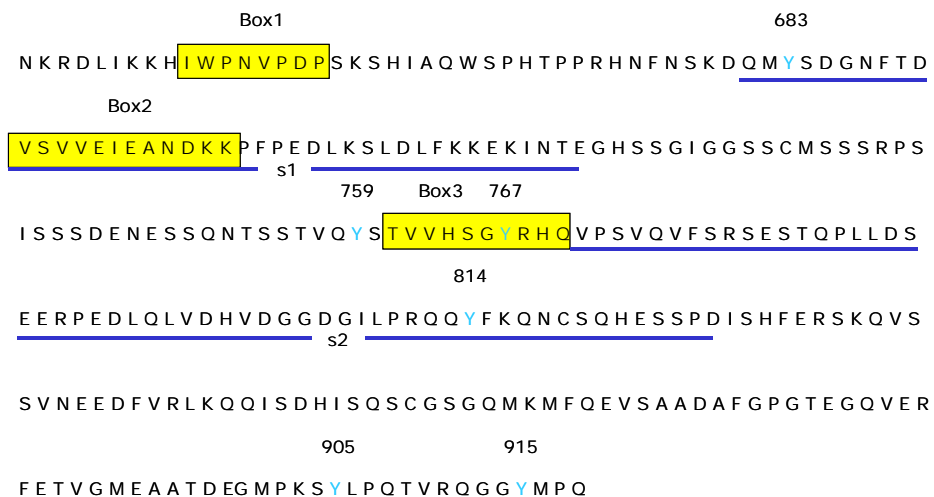


Abb. 8: Sekundärstruktur der zytoplasmatischen Domäne von gp130.

Die Lage der Zytokin-Rezeptor-Homologiedomänen (Box 1-3, gelb), sowie der beiden identifizierten Bereiche mit einem hohen Anteil an negativ geladenen Aminosäuren (s1 und s2, dunkelblau unterstrichen) ist angegeben. Die in der zytoplasmatischen Domäne von gp130 enthaltenen Tyrosine sind hellblau markiert und mit ihrer Aminosäureposition gekennzeichnet.

Folgende Regionen der zytoplasmatischen Domäne von gp130 wurden als potentielle Hck-Bindungsdomäne identifiziert:

1. Die Homologiedomänen, Box 1-3.
2. Die Tyrosinreste, als geeignete Bindungsstellen für die SH2 Domäne von Src-Kinasen (Pawson T. and Gish G.D., 1992; Songyang Z. et al., 1993).



3. Zwei Bereiche mit einem auffallend hohen Anteil (10 von 42 bzw. 9 von 41) an negativ geladenen Aminosäuren, die wir als „saure Domäne“ s1 und s2 bezeichneten. Die Bindung von Src-Kinasen an ähnliche Domänen wurde für die Interaktion von Lck an den IL-2 Rezeptor (Hatakeyama M. et al., 1991) und für die Bindung von Fyn an den IL-7 Rezeptor gezeigt (siehe dazu auch Abb.25, Seite 83) (Venkitaraman A.R. and Cowling R.J., 1992).

### 3.2 Mutation von gp130

Die folgende Tabelle zeigt eine Übersicht aller Mutationen, die in gp130 eingeführt wurden. In den folgenden Abschnitten erfolgt zusätzlich die graphische Darstellung der jeweils relevanten Mutanten.

Trunkationen	Deletionen	Punktmutationen	Andere
t 650	d 681-721	Y683F	DDM = d771-827 + YY759/767FF
t 685	d 771-827	Y759F	
t 702	d 771-811	Y767F	
t 710	d 820-827	Y814F	
t 722	d 812-827	Y905F	
t 770	d 812-819	Y915F	
t 775		YY759/767FF	
t 828			

Abb 9: Mutationen von gp130

Die Zahlen entsprechen Aminosäurepositionen an denen Mutationen eingeführt wurden. t = Trunkation, d = Deletion, Y = Tyrosin, F = Phenylalanin.

Die Mutationen wurden mit den im Methodenteil beschriebenen PCR-Techniken hergestellt. Alle Mutationen wurden in das Fusionsmolekül Eg, bestehend aus der extrazellulären Domäne des Erythropoetin-Rezeptors (EPOR) und der zytoplasmatischen Domäne von gp130 eingeführt (siehe Material und Methoden) (Hemmann U. et al., 1996). Als erstes wurde das Ausgangskonstrukt (Eg in pSVL) (Hemmann U. et al., 1996) in den Expressionsvektor pc DNA3.1 myc/His umkloniert (siehe Material und Methoden, 2.2.2). Dies geschah mittels PCR. In die Primer wurden Schnittstellen für die Restriktionsenzyme XbaI (5') und BamHI (3') eingefügt. Beide Enzyme schneiden die DNA mit überhängenden Enden, so dass immer gerichtet kloniert werden konnte und die Klonierungen auch sehr zuverlässig funktionierten. Mutationen wurden nur in den gp130-Anteil von Eg eingeführt, so dass über die EcoRI Schnittstelle (Fusionsstelle von EPOR und gp130) kloniert werden konnte. Die mutierten Fragmente wurden dann mit einem mit EcoRI und BamHI verdauten Expressionsvektor, in den bereits Eg inseriert war (pcDNA3.1 myc/His-Eg), ligiert.

Da der Erythropoetin-Rezeptor im Gegensatz zum IL-6R als Homodimer funktionsfähig ist, musste zur Rezeptorexpression nur eine DNA transfiziert werden. Die Zellen wurden daher mit Erythropoetin stimuliert, um das gp130 vermittelte Signal zu untersuchen. Diese Vorgehensweise hatte den zusätzlichen Vorteil, dass mögliche Effekte von endogen exprimierten gp130 ausgeschlossen werden konnten. Die für Eg und seine mutierten Varianten codierenden cDNAs wurden in den Expressionsvektor pcDNA3 (myc/His) für die Expression in Cos-7 Zellen, und in den Vektor pcDNA6 (V5/His) für die Expression in Baf-B03 Zellen kloniert (siehe Methoden). Diese Vektoren enthielten C-terminal die in Klammern angegebenen Expressions-Tags. Da durch viele der Mutationen die Epitope der käuflichen anti-gp130 Antikörper entfernt wurden, war die Verwendung von Expressions-Tags nötig. Die besten Ergebnisse wurden dabei mit den Antikörpern gegen das His-Tag und das V5-Tag erzielt, so dass diese standardmäßig verwendet wurden.

### 3.2.1 Analyse der verschiedenen gp130 Mutanten

Die erfolgreiche Mutation von gp130 wurde stets auf DNA- und Proteinebene sorgfältig kontrolliert. Die folgenden zwei Abbildungen zeigen Ergebnisse am Beispiel einiger Trunktations- und Deletionsmutaten. Die Überprüfung der DNA erfolgte durch Sequenzierung (Medigenomix, Toplab) und durch Restriktionsverdau. Die Überprüfung der Proteinexpression wurde mittels Westernblot durchgeführt.

#### ÜBERPRÜFUNG VON DNA-KONSTRUKTEN

Die Überprüfung von neu klonierten DNA-Fragmenten erfolgte im Agarosegel nach Restriktionsverdau mit XbaI und BamHI (Abb. 10). Die DNA-Fragmente wurden dabei mit Ethidiumbromid sichtbar gemacht.

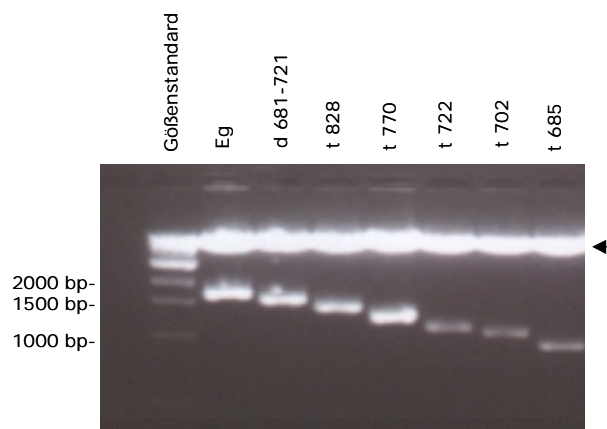


Abb. 10: Kontrolle von Klonierungen durch Restriktionsverdau

Die Abbildung zeigt die Kontrolle einiger gp130 Mutationen im Ethidiumbromid-Agarosegel. Die hier kontrollierten c-DNAs sind oben angegeben. Das jeweilige Insert wurde durch einen Restriktionsverdau mit XbaI und BamHI aus dem Expressionsvektor herausgeschnitten und elektrophoretisch aufgetrennt. Die Größenstandards sind links angegeben. Die Lage des Vektors pc DNA 3.1 myc/His ist markiert (Pfeil).

Der Expressionsvektor (pcDNA3.1 myc/His) hat eine Größe von etwa 6500 bp und ist im Gel zu sehen (obere Bande). Die Länge des EPOR-Anteils beträgt immer 750 bp. Das Laufverhalten der verschiedenen gp130-Mutanten resultiert

somit aus den in gp130 eingebrachten Mutationen. Die Länge der Inserts entsprach in allen Fällen den Berechnungen.

#### ÜBERPRÜFUNG DER PROTEINEXPRESSION

Nach der Kontrolle im Agarosegel wurden die DNA-Konstrukte zusätzlich durch Sequenzierung überprüft. Anschließend wurde die Plasmid-DNA richtiger Klone isoliert, transient in Cos-7 Zellen oder stabil in Baf-B03 Zellen exprimiert. Die Kontrolle der Proteinexpression erfolgte mittels Immunoblot gegen das angefügte His-Tag (Abb. 11). Um das Laden gleicher Proteinmengen zu gewährleisten, wurde die Gesamtproteinkonzentration der Zelllysate mit einem Bradford-Proteinassay bestimmt (siehe Material und Methoden). Alle Rezeptorproteine wurden etwa gleich stark exprimiert (siehe auch folgende Abbildungen). Der Antikörper gegen das His-Tag zeigte eine Kreuzreaktion gegen zwei Proteine von etwa 75 kD (siehe z.B. auch Abb.17 C), die in Cos-7 Zellen exprimiert werden und möglicherweise viele Histidine enthalten. Häufig wurden Doppel- oder Dreifachbanden detektiert. Dies geht konform mit Ergebnissen der Arbeitsgruppe von Friedemann Horn, aus der das ursprüngliche Konstrukt stammt (persönlicher Kontakt mit Birgit Heesel). Diese Mehrfach-Banden deuteten darauf hin, dass unterschiedlich glykosylierte Formen der Rezeptorproteine vorlagen.

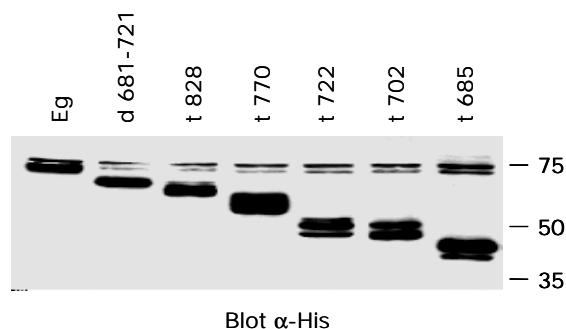


Abb. 11: Expression von mutierten gp130-Proteinen in Cos-7 Zellen

Cos-7 Zellen wurden mittels Lipofektion transient mit den Expressionsvektoren für die angegebenen Trunktations- und Deletionsmutanten von gp130 transfiziert. Die Detektion der Proteinexpression erfolgte mittels Immunoblot mit einem spezifischen Antikörper gegen das C-terminal angefügte His-Tag. Die Lage der Proteinmarker ist angegeben.

### 3.3 Die Eingrenzung der Hck-Bindungsdomäne von gp130

Um die Hck-Bindungsdomäne in gp130 zu identifizieren, wurden zunächst verschiedene von gp130-Mutanten zusammen mit einem Expressionsvektor für wt Hck (pcDNA3 Hck) in Cos-7 Zellen transfiziert. Lysate von co-transfizierten Zellen wurden dann in Co-Immunpräzipitationen untersucht. Dazu wurden Hck-IPs mit einem anti His-tag Antikörper inkubiert, um Komplexe von Hck mit den unterschiedlichen Rezeptormutanten zu detektieren.

#### *3.3.1 Verwendung von gp130 Trunkations- und Deletionsmutationen*

Zuerst wurden Trunkations- und Deletionsmutanten von gp130 verwendet, um eine erste Eingrenzung der Hck-Bindungsdomäne zu erreichen. Die Abbildung 12 zeigt die zunächst hergestellten und verwendeten gp130-Mutanten. Sowohl die verschiedenen Rezeptormutanten, als auch Hck wurden in co-transfizierten Zellen vergleichbar stark exprimiert (Abb. 13 C und D). Ebenso wurde Hck in allen Spuren gleichmäßig präzipitiert (B). Um die Spezifität des anti-Hck Antikörpers zu ermitteln, wurde dieser vor der Immunpräzipitation (IP) mit einem blockierenden Peptid inkubiert. Dies führte zu einer vollständigen Unterbrechung der Präzipitation von Hck und belegte die Spezifität des verwendeten Antikörpers (A, B, Spuren 1). Die Detektion von co-präzipitierten Rezeptormutanten zeigte, dass die C-terminale Trunkation bei Aminosäure 770 (t 770) zu einem deutlichen Verlust der Hck Assoziation führte (Abb. 13 A, Spur 5). Wurde gp130 jedoch weiter C-terminal trunziert (t 882), war die Hck Co-Präzipitation vergleichbar stark wie mit wt gp130 (Eg) (Spuren 2 und 4). Da bei IPs ein Grossteil des Hck Proteins unspezifisch an die Protein A-Beads band, war es nicht möglich, die Hck/gp130 Interaktion mittels anti-His-IP und Hck-Blot zu zeigen.

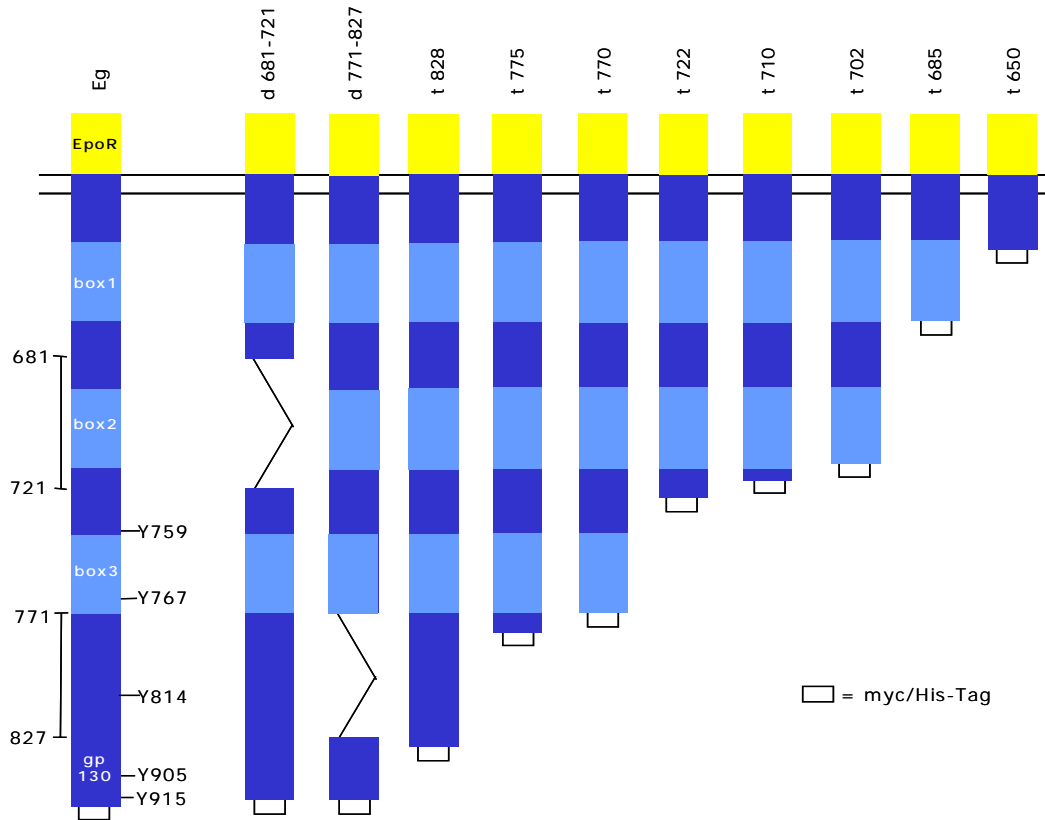


Abb. 12: gp130 Trunktions- und Deletionsmutanten des Experimentes aus Abb. 13.

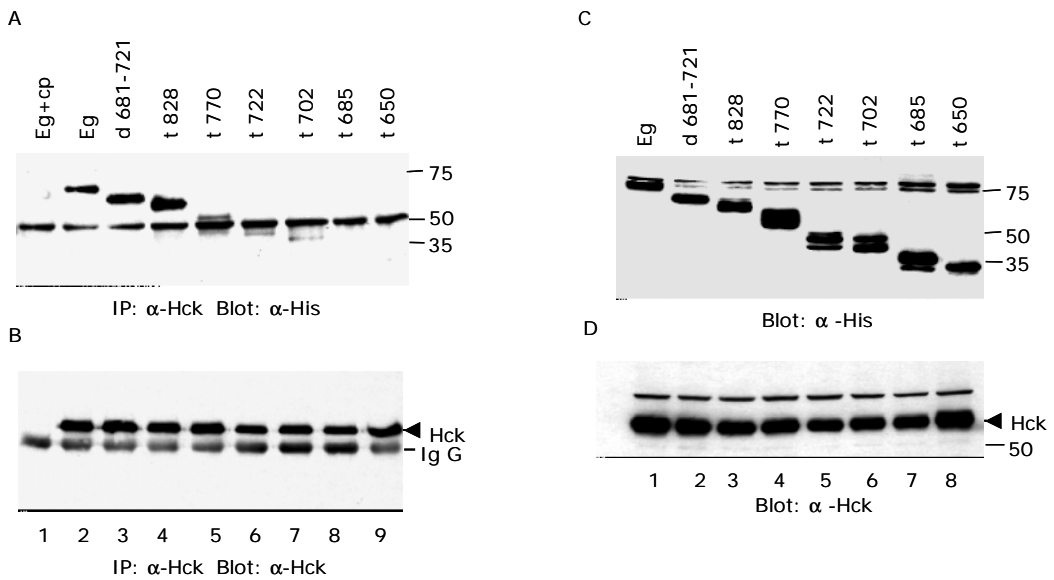


Abb. 13: Hck bindet an den C-terminalen Bereich von gp130.

Verschiedene gp130-Mutanten wurden zusammen mit wt Hck in Cos-7 Zellen exprimiert. Die Expression der rekombinanten Proteine wurde im Westernblot mit spezifischen Antikörpern gegen das His-tag zur Detektion der gp130-Mutanten (C), beziehungsweise Hck (D) kontrolliert. Die Assoziation von Hck mit gp130 wurde durch Präzipitation von Hck mit anschließenden Im-

munoblot mit anti-His Antikörper untersucht (A). Parallel dazu wurden Aliquots der Hck-IPs auf ein zusätzlichem Gel aufgetragen und mit Anti-Hck Antikörper geblottet, die gleichmäßige Präzipitation von Hck zu zeigen. Die Interaktion von Hck mit gp130 wurde durch die Präinkubation mit einem den Hck Antikörper blockierenden Peptid aufgehoben (Spuren 1 und 2 A, B). Die Lage der Proteinstandards und der Ig G Banden sind angegeben.

Zusammenfassend zeigten die Ergebnisse, dass eine mögliche Hck-Bindungsdomäne zwischen den Aminosäuren 770 und 828 von gp130 lag.

Der Bereich zwischen den Aminosäuren 770 und 828 enthält kein klassisches Src-Kinasen Bindungsmotiv (siehe Einleitung). Allerdings entspricht diese Domäne genau dem als s2 bezeichneten Bereich und weist einen hohen Anteil an negativ geladenen Aminosäuren auf. Eine weitere solche Domäne (s1) befindet sich weiter N-terminal in gp130 (681-721). Die Ergebnisse mit den Trunktationsmutanten (Abbildung 13) ließen den Schluss zu, dass s1 keine Rolle bei der Hck/gp130 Interaktion spielt. Dennoch wurden Deletionsmutanten für beide Bereiche, s1 und s2 (d 681-771 und d 771-827), hergestellt (Abb. 12). Cos-7 Zellen wurden jeweils mit den Mutanten und Hck co-transfiziert. Die Assoziation von Hck mit d 681-721 war genauso stark wie mit wt gp130 (Abb 13 A, Spuren 2, 3). Die interne Deletion der Aminosäuren 771-827 (d 771-827) führte jedoch zu einer Abnahme der Hck Assoziation um etwa 90 % (Abb. 15 A, Spur 2, 3). Um die Hck-Bindungsdomäne weiter einzugrenzen, wurden zusätzliche Mutationen hergestellt. Es schien möglich, dass eine bekannte Bindungsstelle für STAT3, das Tyrosin 814 (Y814), das innerhalb der Hck-Bindungsdomäne liegt (Gerhartz C. et al., 1996; Hemmann U. et al., 1996), an der Bindung von Hck an gp130 beteiligt war. Um diese Frage zu klären, wurden zunächst Deletionsmutanten hergestellt, die entweder Y814 enthielten (d 812-827 und d 812-819) oder N-terminal (d 771-811) beziehungsweise C-terminal (d 820-827) davon lagen (Abb. 14). Diese Deletionsmutanten wurden anschließend wieder zusammen mit Hck in Cos-7 Zellen exprimiert (Abb.15 C, D). Nach der Immunpräzipitation von Hck (B) wurde wiederum mit anti-His Antikörper geblottet, um Hck/gp130 Komplexe zu detektieren (A).

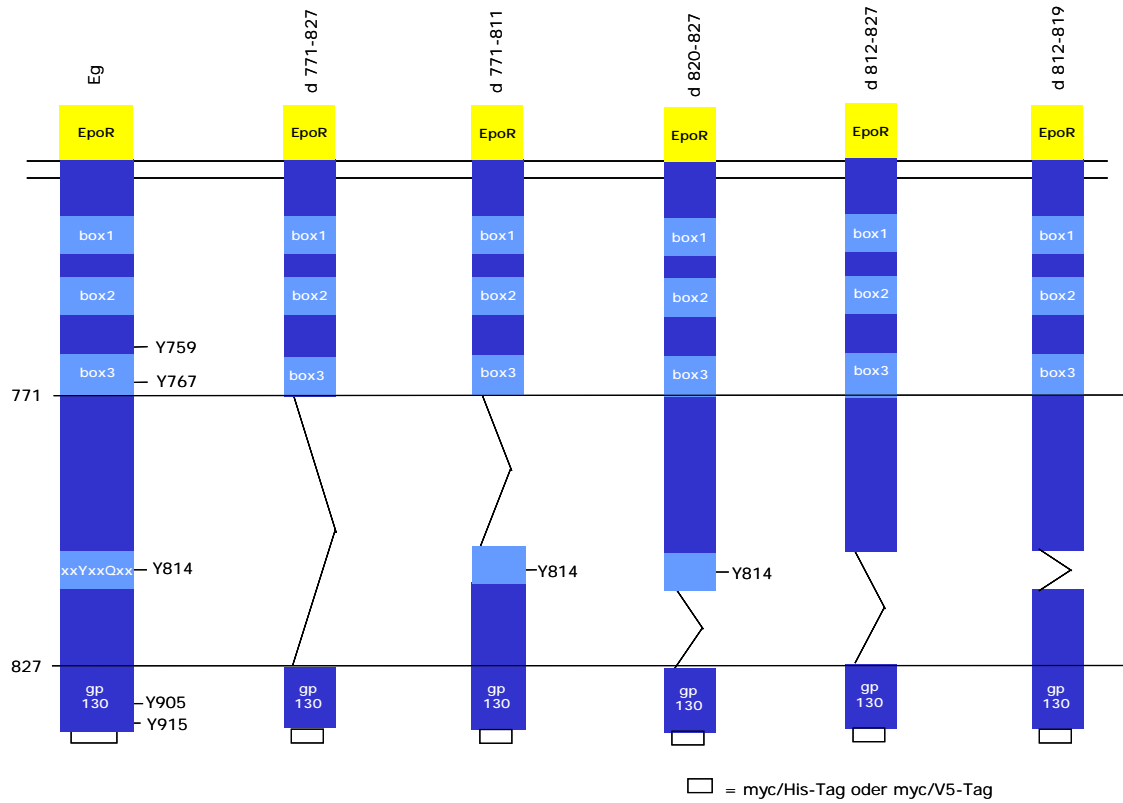


Abb. 14: Deletionsmutanten zur Eingrenzung der Hck-Bindungsdomäne

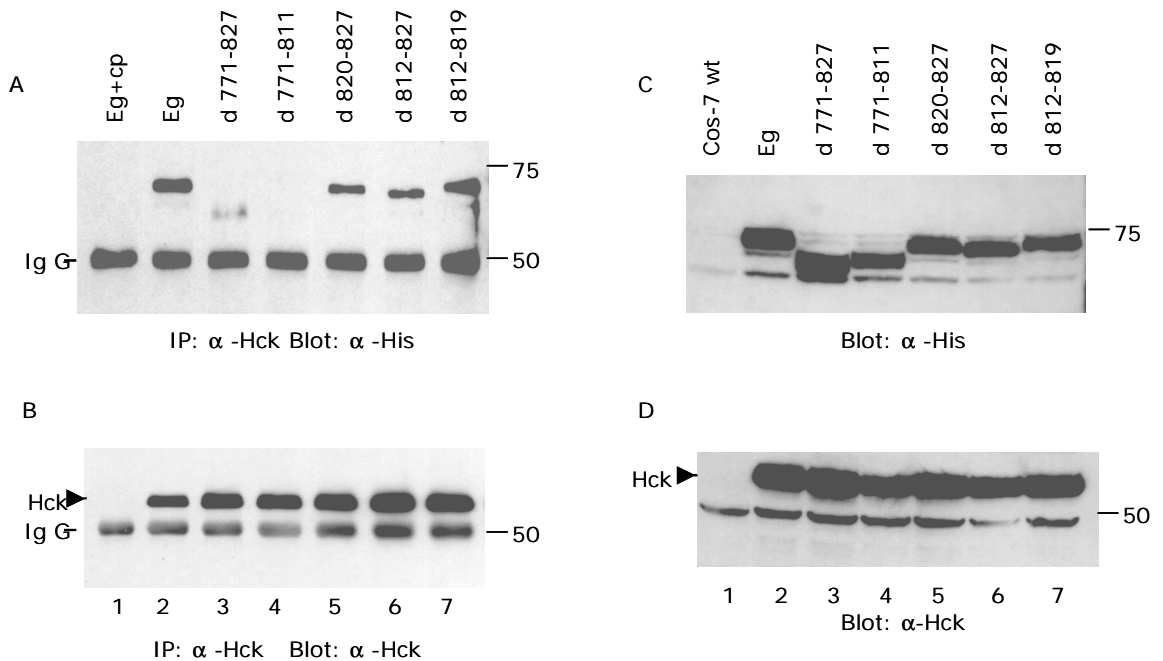


Abb. 15: Die Deletion einer 41 Aminosäuren lange „saure Domäne“ unterbricht die Assoziation von Hck mit gp130.

Der Bereich zwischen den Aminosäuren 771 und 827 wurde weiter eingegrenzt, um die STAT3-Bindungsstelle Y814 auszuschließen. (C und D). Kontrolle der Expression von Hck und der



gp130-Mutanten durch Immunoblot mit den spezifischen Antikörpern. Als interne Kontrolle wurde zusätzlich ein Lysat von Cos-7 wt Zellen aufgetragen (C, D, Spur 1). Hck-IPs wurden mit anti-His Antikörper geblottet (A), dann gestrippt und mit anti-Hck Antikörper geblottet (B). Zur Kontrolle der IPs wurde die Hck Assoziation durch Preinkubation mit einem spezifischen Peptid blockiert (A, B, Spur 1). Die Lage von Hck und den Proteinmarkern ist angegeben.

In diesem Experiment führte die interne Deletion der Aminosäuren 771-811 (d 771-811) zu einem kompletten Abbruch der Hck Bindung an gp130 (Abb. 15 A, Spur 4). Im Gegensatz dazu war die Bindung von Hck an die Mutanten d 812-827, d 812-819 und d 820-827 vergleichbar mit der Bindung von Hck an wt gp130 (Abb. 15 A, Spuren 2, 5-7). Diese Ergebnisse ließen den Schluss zu, dass die Bindung von Hck über einen 41 Aminosäuren großen Bereich im C-Terminus von gp130 vermittelt wurde. Die Bindung erfolgte dabei unabhängig von der STAT3 Bindungsstelle Y814.

### *3.3.2 Verwendung von gp130 Punktmutanten*

In der Nähe des identifizierten Hck-Bindungsmotivs liegen weitere Bindungsstellen für wichtige Signalmoleküle der gp130-Signaltransduktion. So bindet Shp-2 an Y759 und STAT3 an Y767. Deshalb wurden zusätzlich zu den Deletionsmutanten Punktmutationen in diese Bindungsstellen von gp130 eingeführt. Dabei wurde jeweils das Tyrosin gegen ein Phenylalanin entweder einzeln (Y759F, Y767F) oder doppelt (YY759/767FF) ausgetauscht. Außerdem wurde eine gp130-Mutante hergestellt, die sowohl YY 759/767FF, als auch d 771-827 enthielt (DDM) (Abb. 16). Als interne Kontrollen wurde auch die Trunktionsmutanten t 770 und t 650 mitgeführt. Die gp130-Mutanten wurden analog zu den vorherigen Experimenten auf ihre Interaktion mit Hck untersucht. Die Expression von Hck und der gp130-Mutanten wurde wieder im Westernblot kontrolliert (Abb. 17. C, D). Hck wurde aus allen Ansätzen gleichmäßig präzipitiert (B). Die Kontrolle der Hck/gp130 Interaktion zeigte, dass Hck mit Y759F, Y767F und YY 759/767FF gleich stark assoziiert war wie mit wt gp130 (17 A, Spuren 2-5).

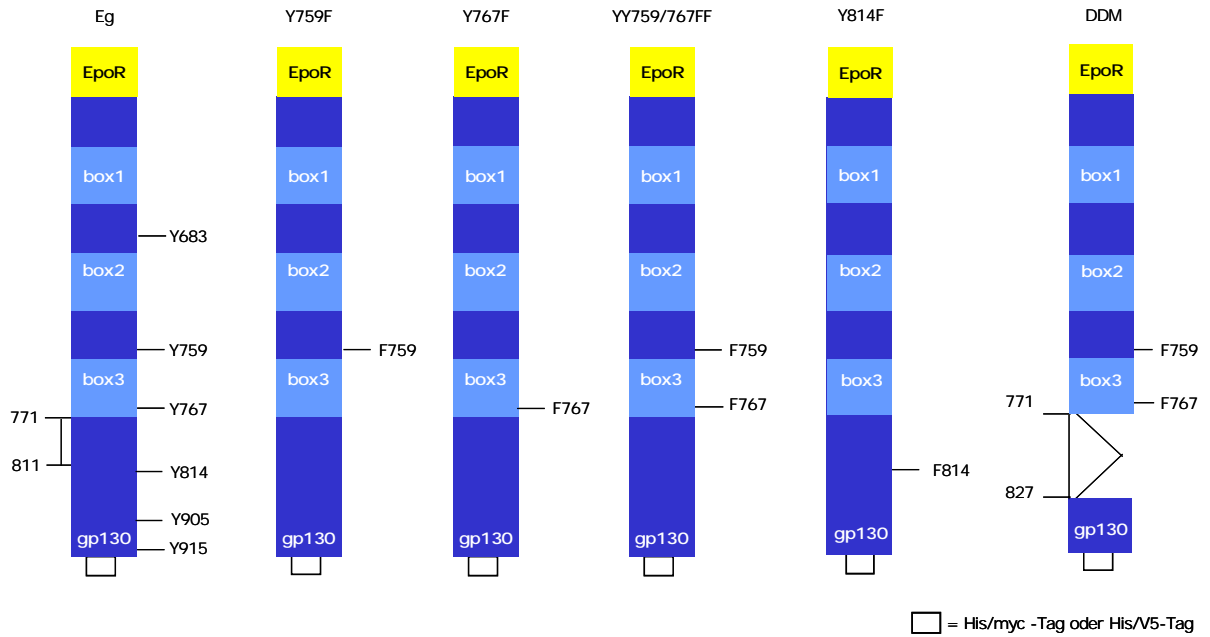


Abb. 16: gp130 Punktmutanten

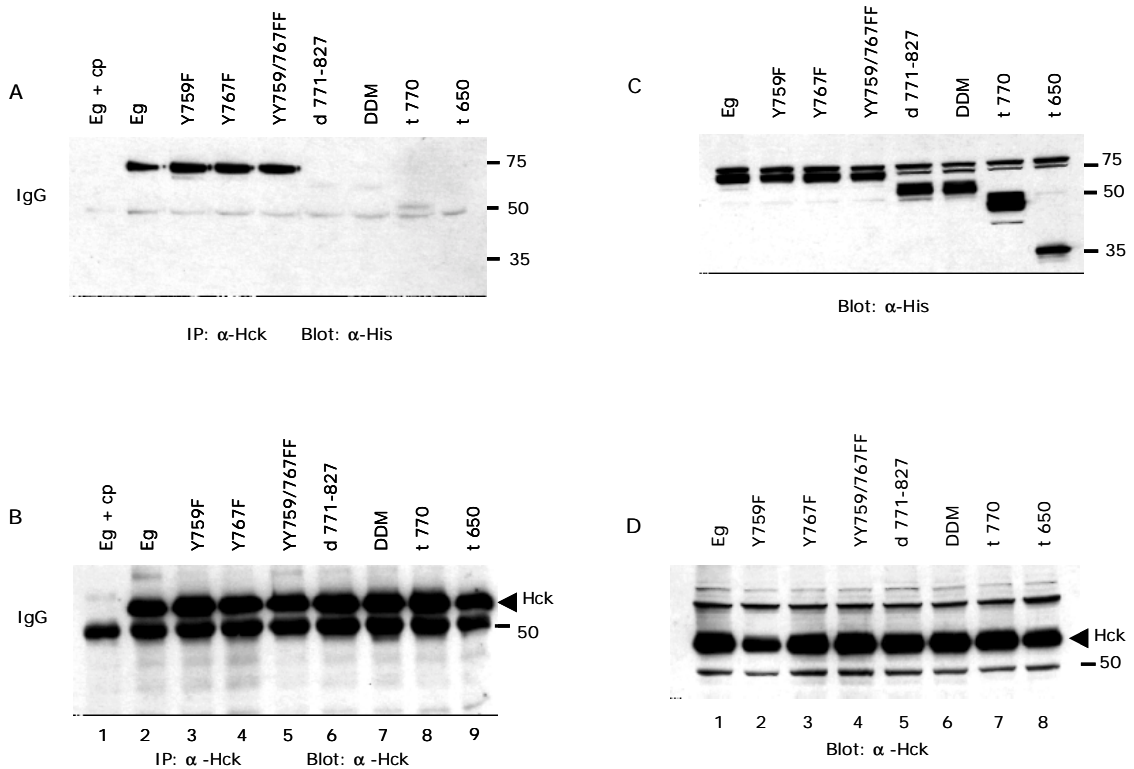


Abb. 17: Hck assoziiert mit gp130 unabhängig von Y759 und Y767.

Die angegebenen gp130-Mutanten wurden zusammen mit wt Hck cDNA in Cos-7 Zellen exprimiert. Die Kontrolle der Expression von Hck und der Rezeptormutanten erfolgte durch Immunoblot mit den spezifischen Antikörpern (C,D). Hck-IPs wurden mit anti-His Antikörper inkubiert (A), dann gestrippt und mit anti-Hck Antikörper geblottet (B). Zur Kontrolle der IPs wurde die Hck Assoziation durch Präinkubation mit einem spezifischen Peptid blockiert (A, B, Spur 1). Die Lage von Hck und den Proteinmarkern ist angegeben.

Im Gegensatz dazu war die Assoziation von Hck mit d 771-827, DDM und t 770 um etwa 90 % schwächer als mit wt gp130 (Abb. 17, Spuren 2, 6-8). Die schwache Bindung (etwa 10 %) von Hck an diese gp130-Mutanten ließ vermuten, dass in gp130 weiter N-terminal noch eine zusätzliche Interaktionsdomäne für Hck lag. Die Hck/gp130-Interaktion wurde jedoch mit der kleineren Deletionsmutante d 771-811 vollkommen unterbunden (Abb. 15 A, Spur 4). Diese Ergebnisse könnten dadurch erklärt sein, dass durch die Mutationen d 771-827, DDM und t 770 hervorgerufene strukturelle Änderungen ein normalerweise unzugängliches Bindungsmotiv in gp130 freilegt wurde. Die Ergebnisse aus 3.3.1 und 3.3.2 zeigten, dass Hck unabhängig von der STAT3 Interaktion mit Y767 und Y814 und unabhängig von der Shp-2 Bindung an Y759 mit gp130 assoziiert war. Die Hck-Bindungsdomäne ist eine Domäne mit einem hohen Anteil an negativen Ladungen und liegt zwischen den Aminosäuren 771 und 811 von gp130. In Analogie zu dem Lck-Bindungsmotiv in der IL-2R  $\beta$ -Kette wurde dieser Bereich als „saure Domäne“ von gp130 bezeichnet.

### 3.4 Durch die Hck/gp130 Interaktion vermittelte biologische Effekte

Um die funktionelle Bedeutung der Hck/gp130 Interaktion zu untersuchen, wurden stabile Transfektanten der IL-3-abhängigen Zelllinie Baf-B03 hergestellt. Dazu wurden die gp130-Mutanten in den Expressionsvektor pcDNA6 (V5/His) kloniert. Stabil exprimierende Zellen wurden anschließend mittels Elektroporation generiert. Die Selektion von positiven Zellklonen erfolgte dabei durch Zugabe von Blasticidin. Die Detektion der über diesen Vektor transfizierten Konstrukte erfolgte mittels spezifischer Antikörper gegen das Expressionstag V5 im Westernblot. Die folgenden Untersuchungen wurden mit Doppeltransfektanten der gp130-Mutanten und Hck durchgeführt, wobei zur Transfektion der wt-Hck cDNA der Expressionsvektor pDpuro verwendet wurde (siehe Methoden). Die Selektion der positiv transfizierten Klone erfolgt dann mit Blasticidin und Puromycin (für Hck).

### 3.4.1 Die Aktivierung von Hck

Zunächst wurde untersucht, welchen Effekt der Wegfall der Hck-Bindungsdomäne von gp130 auf die Aktivität von Hck hat. Dazu wurden nicht-radioaktive *in vitro* Kinase-Assays durchgeführt (siehe Methoden) (Bosco M.C. et al., 2000).

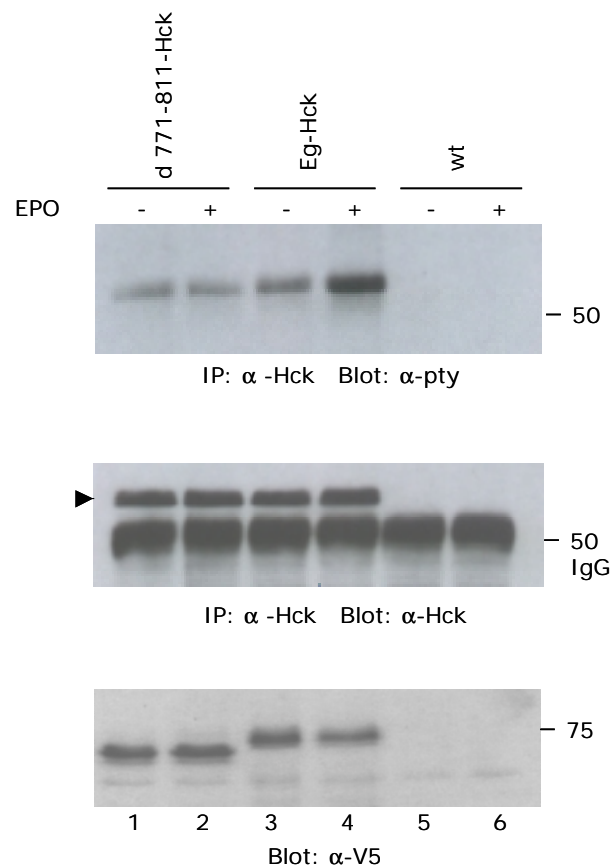


Abb. 18: Die stimulationsabhängige Aktivierung von Hck ist bei der Mutante d 771-811 aufgehoben.

Baf-B03 Zellen wurden mit den Expressionsvektoren für Hck und für Eg beziehungsweise d 771-811 stabil transfiziert. Diese Zellen und untransfizierte Baf-B03 Zellen (wt) wurden dann entweder mit 40 U/ml EPO (+) oder mit Medium (-) stimuliert. Die Aktivität von Hck wurde anschließend mittels eines Tyrosin-Kinase-Assays bestimmt. Dazu wurde Hck (Pfeilmarkierung) aus den Lysaten immunpräzipitiert und für 15 min mit 15  $\mu$ M Mg/ATP inkubiert. Nach der elektrophoretischen Auftrennung wurde die Autophosphorylierung der aktiven Hck Kinase durch Blotten mit dem anti-Phosphotyrosin Antikörper PY 20 bestimmt (oberer Blot). Aliquots der Reaktion wurden zur Kontrolle der Hck-IP mit anti-Hck Antikörper geblottet (Mitte). Die Expression von Eg und d 771-811 in den verwendeten Zellen wurde durch einen Westernblot mit anti-V5 Antikörper kontrolliert (Unten).

Die Ausgangsphosphorylierung in d 771-811 Transfektanten war reproduzierbar etwas schwächer als in Eg exprimierenden Baf-B03 Zellen (Abb. 18 oben, Spuren 1, 3). Die Stimulation von d 771-811 Transfektanten erhöhte den Phosphorylierungszustand von Hck allerdings nicht (Spuren 1, 2). Im Gegensatz dazu führte die Stimulation von Eg exprimierenden Baf-B03 Zellen mit EPO zu einer deutlichen Autophosphorylierung von Hck (Abb. 18 oben, Spuren 3, 4). Die gleichmäßige Präzipitation von Hck wurde im Westernblot mit anti-Hck Antikörper bestätigt (Abb. 18, mittlerer Blot). Die vergleichbare Expression der gp130-Mutanten Eg und d 771-811 wurde durch Inkubation mit anti-V5 Antikörper kontrolliert (unterer Blot). Dieses Ergebnis zeigte, dass der chimäre EPO/gp130-Rezeptor Hck aktivieren konnte und dass die Deletion der Hck-Bindungsdomäne die stimulationsabhängige Aktivierung von Hck deutlich reduzierte.

### *3.4.2 Die Aktivierung von STAT3*

Als Nächstes wurde untersucht, welchen Einfluss die Deletion der Hck-Bindungsdomäne auf die Aktivierung von STAT3 hat. Zur kompletten Aktivierung von STAT3 ist seine Phosphorylierung an Tyrosin 705 (Y705) und an Serin 727 (S727) nötig (Wen Z. et al., 1995; Zhang X. et al., 1995). Die verwendeten Baf-B03 Transfektanten exprimierten endogenen STAT3 (Abb. 19 A) sowie Hck (C) und die gp130-Mutanten (B) in gleichen Mengen. Dann wurde STAT3 aus stimulierten und unstimulierten Baf-B03 Zellen präzipitiert (Abb. 19, D-F). Anschließend wurden die Präzipitate mit einem Antikörper gegen Phosphotyrosin (E) und mit einem spezifischen Antikörper gegen STAT3, welches an S727 phosphoryliert ist, inkubiert (F). Wie in Abbildung 19 D zu sehen, wurde STAT3 gleichmäßig präzipitiert (Spuren 1-6), wobei die Präzipitation durch ein blockierendes Peptid komplett aufgehoben wurde (Spur 7). Im Vergleich zu wt gp130 (Abb. 19 D und E, Spuren 1 und 2) führte weder die Deletion der Hck-Bindungsdomäne (Spuren 3 und 4) noch die Punktmutation an Position 814 (Spuren 5 und 6) zu einer signifikanten Veränderung in der STAT3-Tyrosin- und Serin-Phosphorylierung. Die STAT3-Phosphorylierung blieb auch in Zellen, die

Y814F exprimierten, unverändert. Dies kann dadurch erklärt werden, dass STAT3 in gp130 außer Y814 auch die Tyrosine Y767, Y905 und Y915 als Bindungsstellen besitzt (Gerhartz C. et al., 1996). Diese Tyrosine könnten die fehlende STAT3-Bindungsstelle funktionell ersetzen. Zusammengefasst zeigten diese Ergebnisse, dass die Aktivierung von STAT3 unabhängig von der Hck-Bindung an gp130 war, da die Deletion der Hck-Bindungsdomäne die durch EPO induzierte STAT3-Phosphorylierung nicht veränderte.

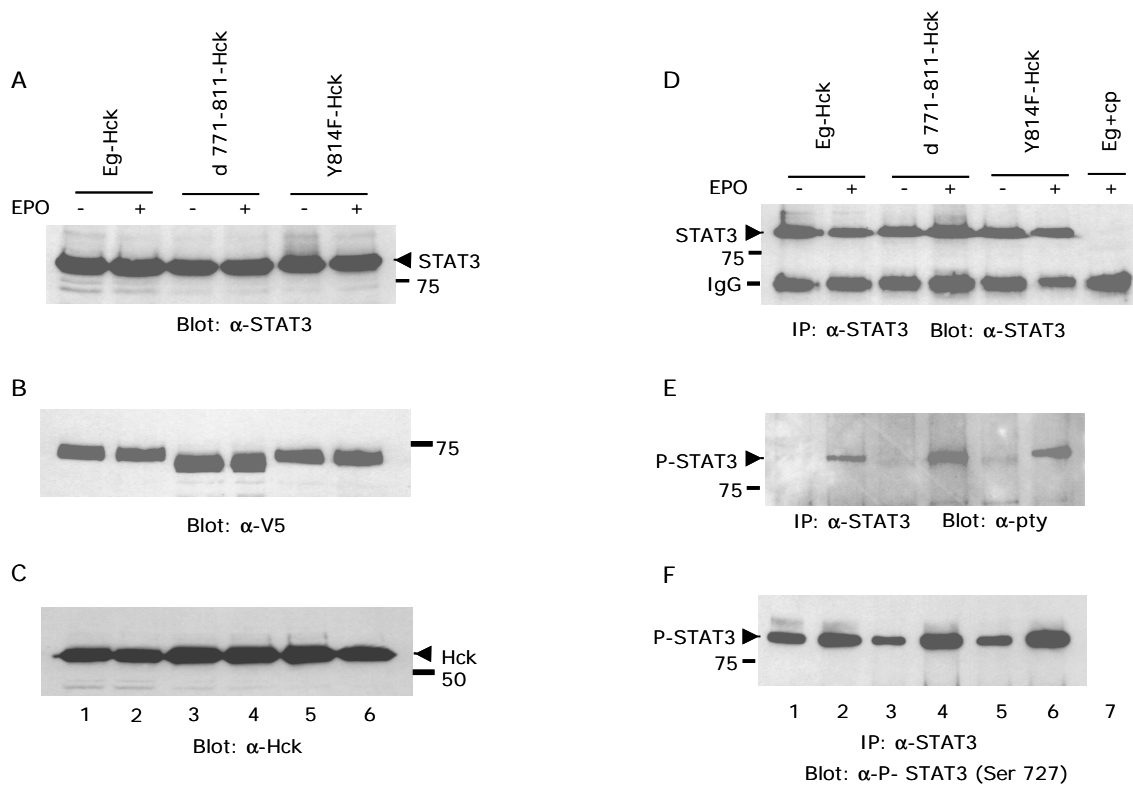


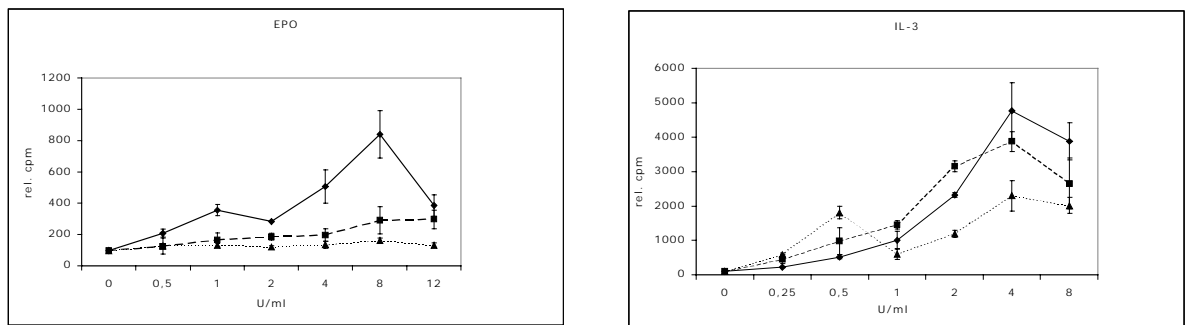
Abb. 19: Die Deletion der Hck Bindungsdomäne hat keinen Einfluss auf den Aktivierungszustand von STAT3

Baf-B03 Zellen wurden mit den cDNAs für Hck, sowie für Eg, Y814F oder d 771-811 transfiziert. Vor der Lyse wurden die Zellen entweder mit Medium (-) oder mit EPO (+) stimuliert. Die Kontrolle der Expression von endogenem STAT3 (A), den gp130-Mutanten (B) und Hck (C) erfolgte im Westernblot mit den spezifischen Antikörpern. Dann wurde STAT3 immunpräzipitiert (rechte Seite). Die IPs wurden mittels Immunoblot mit anti-STAT3 Antikörper kontrolliert, zusätzlich wurde auch ein blockierendes Peptid gegen den verwendeten STAT3 Antikörper eingesetzt (D, Spur 7). Um den Phosphorylierungszustand von STAT3 zu testen, wurden die STAT3 IPs schließlich mit einem anti-Phosphotyrosin Antikörper (PY99) (E), sowie mit einem Antikörper gegen STAT3, das an S727 phosphoryliert ist (F), inkubiert.

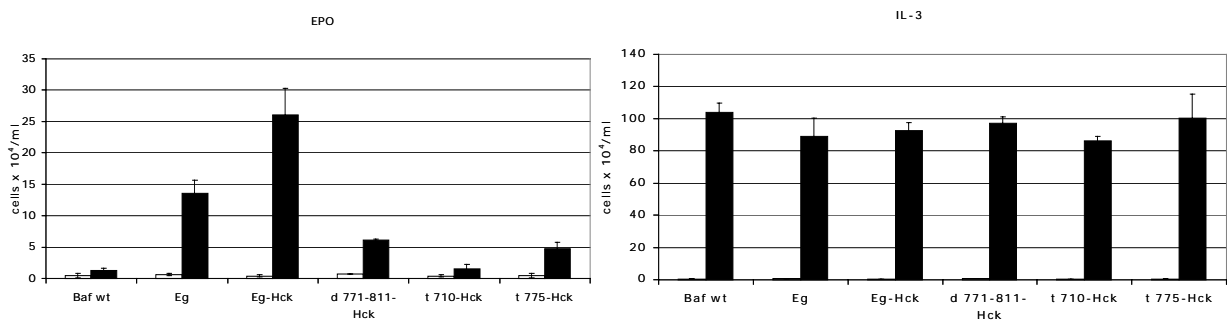
### 3.4.3 Untersuchung des Zellwachstums

Da IL-6 ein zentraler Wachstumsfaktor für das Plasmazytom ist, wurde als nächstes untersucht, ob die Deletion der Hck-Bindungsdomäne zu einem veränderten Zellwachstum führt. Auch für diese Untersuchungen wurden Baf-B03 Transfektanten verwendet. Die Kontrolle der Expression der rekombinanten Proteine in den verwendeten Zellklonen erfolgte im Westernblot mit den spezifischen Antikörpern. Alle Klone exprimierten die unterschiedlichen gp130-Mutanten (Abb. 20 D, oben) und Hck (unten) vergleichbar stark. Da Baf-B03 Zellen IL-3-abhängig sind, wurde die maximale Stimulation des Zellwachstums durch Zugabe von IL-3 getestet (Abb. 20 C, rechte Spalte). Für die Proliferations-Assays wurden Baf-B03 Zellen in 96-Loch Platten mit IL-3-freiem Medium kultiviert und für 72 Stunden mit den angegebenen Mengen EPO (linke Spalte) oder IL-3 stimuliert. Das Zellwachstum wurde dann entweder durch die Inkorporation von  $H^3$ -markiertem Thymidin (A) oder durch Auszählen der Zellen unter dem Mikroskop (B und C) bestimmt. Um die optimalen Bedingungen zur Stimulation der Zellen zu finden, wurde zunächst eine Konzentrations-Kinetik erstellt. Das maximale Zellwachstum konnte durch die Stimulation mit 8 U/ml EPO beziehungsweise 4 U/ml IL-3 induziert werden. Die maximale Stimulation von Eg exprimierenden Baf-B03 Zellen durch IL-3 lag etwa vier- bis fünfmal höher als die durch EPO. Zellen die Eg, d 771-811 oder nur den Vektor exprimierten, reagierten vergleichbar auf die Stimulation mit IL-3 (Abb. 20 und B, rechte Spalte). Die Deletion der Hck Bindungsdomäne (d 771-811) führte zu einem etwa vier- bis fünfmal niedrigerem Zellwachstum nach EPO-Stimulation im Vergleich zu wt gp130 (Eg) (A und B, linke Spalte). Allerdings reagierten auch die d 771-811 transfizierten Zellen mit erhöhtem Wachstum, wenn sie mit EPO stimuliert wurden. Dies ließ den Schluss zu, dass außer Hck noch andere Proteine an der Regulation des Zellwachstums beteiligt waren. Wildtyp Baf-B03 Zellen (B) und solche, die nur mit dem Expressionsvektor transfiziert wurden (A), zeigten jedoch kein verstärktes Wachstum nach Stimulation mit EPO.

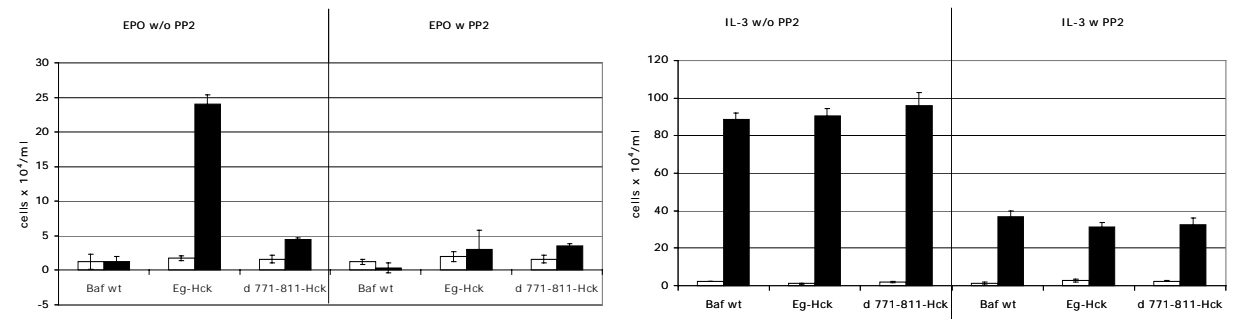
A



B



C



D

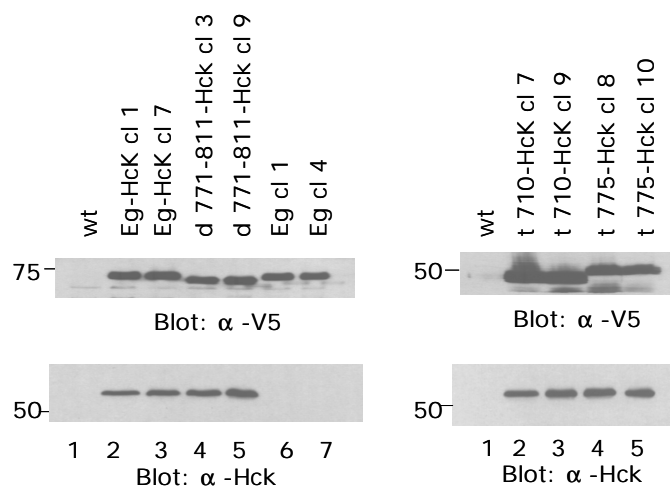


Abb.20: Die Deletion der Hck Bindungsdomäne führt zu vermindertem Zellwachstum.



Klonale Baf-B03 Zellen wurden in Zellproliferations-Assays eingesetzt. A. Stabil mit Eg (◆), d 771-811 (■) oder dem Expressionsvektor (pcDNA6 V5/His) alleine (▲) transfizierte Zellen wurden in 96-Loch Mikrotiterplatten kultiviert. Pro Loch wurden  $5 \times 10^3$  Zellen eingesetzt und mit den angegebenen Konzentrationen EPO (links) oder IL-3 (rechts) für 48 Stunden stimuliert. Dreifachansätze wurden dann für sechs Stunden mit  $^3\text{H}$ -Thymidin inkubiert. Nach osmotischer Zellyse wurde die aufgenommene Radioaktivität mit einem  $\beta$ -Szintillations Zähler bestimmt. Angegeben ist der Mittelwert der Ereignisse von zwei unabhängigen Klonen. Die Standardabweichungen sind eingezeichnet. B. Baf-B03 Zellklone wurden mit 8 U/ml EPO, 4 U/ml IL-3 (schwarz) oder mit Medium (weiß) für 72 Stunden stimuliert. Nach Färbung der lebenden Zellen wurden die Zellzahlen unter dem Mikroskop bestimmt. Dreifachansätze von zwei unabhängigen Klonen wurden untersucht. C. Baf-B03 Klone wurden für 72 Stunden mit 8 U/ml EPO, 4 U/ml IL-3 (schwarz) oder Medium (weiß) inkubiert. Die Zellen wurden mit 10  $\mu\text{mol}$  PP2 (w PP2) oder ohne (w/o PP2) kultiviert. Nach Färbung der lebenden Zellen wurden die Zellzahlen unter dem Mikroskop bestimmt. Dreifachansätze von zwei unabhängigen Klonen wurden untersucht. D. Die Expression der rekombinanten Proteine in den verwendeten Klonen wurde im Westernblot kontrolliert. Lysate der Klone wurden mit anti-V5 Antikörper zur Detektion der gp130-Mutanten (oberer Blot), oder mit anti-Hck Antikörper inkubiert.

Die beobachteten Unterschiede im Wachstum zwischen Eg und d 771-811 exprimierenden Zellen können dabei nicht auf klonale Unterschiede der Zellen zurückgeführt werden, da IL-3 das Wachstum beider Zellen etwa um den Faktor 180 stimulierte (von 5000 auf ca.  $90 \times 10^4$  Zellen/ml)(Abb.20 B, rechte Spalte). Zudem wurden die Experimente mit mindestens drei unabhängigen Klonen durchgeführt. Zellen, die C-terminal trunke Rezeptormutanten exprimierten (Abb. 20 B, linke Spalte, T 775 und T 710), zeigten die gleiche Abnahme des EPO induzierten Zellwachstum wie d 771-811 Transfektanten. Der Unterschied in der Zellproliferation lag im Vergleich zu Eg exprimierenden Zellen bei einem etwa 5-fach verringertem Wert (Abb. 20 B, linke Spalte). In Versuch B wurde außerdem Zellen eingesetzt, die Eg alleine oder Eg und Hck exprimierten. Interessanterweise zeigten die co-transfizierten Zellen ein fast doppelt so hohes Zellwachstum nach Stimulation mit EPO als die einfach-transfizierten Zellen (B, linke Spalte). Dieses Ergebnis weist zusätzlich auf eine Funktion von Hck bei der Vermittlung von gp130-induzierten Signalen hin. *Im Gegensatz* zu früheren Daten (Fukada T. et al., 1996; Murakami M. et al., 1991) zeigten die Ergebnisse dieser Experimente, dass die membran-proximale Region von gp130 (bis Aminosäure 775) *nicht* ausreicht um das Zellwachstum zu induzieren. Um die funktionelle Bedeutung von Hck bei dem gp130-vermittelten Zellwachstum weiter zu untersuchen, verwendeten wir den Src-Kinasen Inhibitor PP2 (Hanke J.H. et al.,

1996). Die durch EPO induzierte Proliferation von Eg exprimierenden Zellen wurde in Gegenwart von PP2 etwa um den Faktor fünf gesenkt (Abb. 20 C, linke Spalte). Da das Wachstum von d 771-811 exprimierenden Zellen nicht zusätzlich gesenkt wurde (C), wirkte PP2 in den Baf-B03 Zellen sehr wahrscheinlich hauptsächlich auf Hck oder seine Substrate. Sowohl wt Baf-B03 Zellen als auch Eg/Hck oder d 771-811/Hck exprimierende Zellen zeigten in Gegenwart von PP2 eine ähnliche Verringerung im Zellwachstum nach IL-3 Stimulation (Abb. 20 C, rechte Spalte). Dieses Resultat bestätigt frühere Untersuchungen, die zeigten, dass Src-Kinasen auch an der IL-3-Signaltransduktion beteiligt sind (Anderson S.M. and Jorgensen B., 1995).

Zusammengefasst wiesen diese Ergebnisse darauf hin, dass die Deletion der Hck-Bindungsdomäne zu einem deutlich geringern Zellwachstum nach Stimulation von gp130 führte. Ebenso führte die Inkubation der Zellen mit dem Src-Kinasen Inhibitor PP2 zu einem verringertem Zellwachstum. Dies legt nahe, dass die Kinaseaktivität von Hck nötig war, um Wachstumssignale der durch gp130-induzierten Signalkaskade zu vermitteln.

### 3.5 Durch Hck vermittelte Signalwege

Die bisher erzielten Ergebnisse wiesen darauf hin, dass die Hck/gp130 Interaktion eine wichtige Rolle in bei der Übermittlung von Wachstumssignalen hat. In weiteren Experimenten wurde deshalb untersucht, welche zytoplasmatischen Signalmoleküle durch diese Interaktion reguliert wurden. Dabei lag der Fokus auf Signalwegen, die zum Zellwachstum beitragen.

Da bereits gezeigt wurde, dass IL-6 Zellwachstum über die Ras/MAPK-Kaskade induziert (Ogata A. et al., 1997), konzentrierten wir uns auf Signalmoleküle, die in dieser Kaskade eine Rolle spielen. Zum einen untersuchten wir daher die Aktivierung der MAPK (Erk) in Abhängigkeit der Hck/gp130 Interaktion, zum anderen die

Regulation der Tyrosinkinase RAFTK/Pyk2 (Related focal adhesion kinase). Frühere Untersuchungen zeigten, dass aktivierte Pyk2 die Erk Aktivität inhibiert

(Zhao J. et al., 2000). Zudem wurde gezeigt, dass Pyk2 mit Src-Kinasen interagiert (Blaukat A. et al., 1999; Dikic I. et al., 1996). Außerdem war die durch Dexamethason induzierte Phosphorylierung von Pyk2 nach Stimulation von Plasmozytomzellen mit IL-6 aufgehoben. Diese Dephosphorylierung führte zu einer deutlichen Reduktion der Apoptose dieser Zellen (Chauhan D. et al., 1999).

### *3.5.1 Die Regulation von Pyk2*

Zur Analyse des Aktivierungszustandes von Pyk2 wurden wt Baf-B03 Zellen und Transfektanten, die Hck und Eg beziehungsweise Hck und d 771-811 exprimierten, verwendet. Die Kontrollexperimente zeigten die gleiche Expression von endogenem Pyk2 und den rekombinanten Proteinen Eg, d 771-811 und Hck in allen verwendeten Zellen (Abb. 21, untere drei Blots). Lysate der Baf-B03 Zellen wurden anschließend mit Antikörpern spezifisch für Pyk2, das an den Tyrosinen Y402 oder Y579 phosphoryliert ist, geblottet (Abb. 21, obere zwei Blots). In Eg-Hck exprimierenden Zellen war Pyk2 nach Stimulation mit EPO an Y402 um etwa den Faktor fünf schwächer phosphoryliert (Spuren 3 und 4, oberster Blot). Dies lässt auf eine Inaktivierung von Pyk2 schließen, da Y402 die Auto-Phosphorylierungsstelle von Pyk2 ist (Schlaepfer D.D. and Hunter T., 1996). Zusätzlich wurde auch eine etwa doppelte Abnahme der Phosphorylierung an Y597 von Pyk2 detektiert (Spuren 3 und 4, zweiter Blot). Dieses Ergebnis wies auf die Aktivierung einer Tyrosinphosphatase für Pyk2 nach Stimulation in Eg exprimierenden Zellen hin. Dagegen war die Phosphorylierung der Tyrosine 402 und 597 in d 771-811-Hck Zellen nicht signifikant verändert (Spuren 5 und 6, obere zwei Blots). Die Doppelbanden, die in diesen Blots zu sehen sind, gehen konform mit Ergebnissen anderer Arbeiten und waren vermutlich auf die differentielle Phosphorylierung von Pyk2 zurückzuführen (Blaukat A. et al., 1999; Tang H. et al., 2000). Zusammengefasst zeigten diese Ergebnisse, dass der Hck/gp130-Komplex die Aktivierung einer Phosphatase für Pyk2 induzierte.

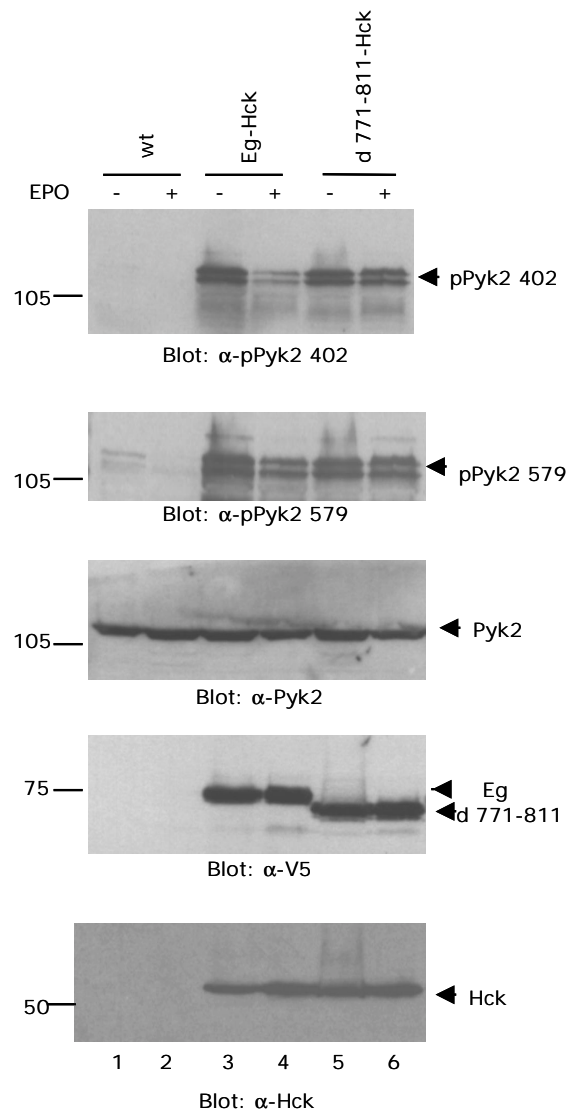


Abb. 21: Die Dephosphorylierung von Pyk2 wird durch die Unterbrechung der Hck/gp130 Interaktion aufgehoben.

Baf-B03 Zellen wurden mit den Expressionsvektoren für Eg (Spuren 3 und 4) oder d 771-811 (Spuren 5 und 6) und Hck transfiziert. Als interne Kontrolle wurden untransfizierte Baf-B03 Zellen (wt) mitgeführt (Spuren 1 und 2). Nach der Stimulation mit Medium (-) oder EPO (+) wurden Zelllysate elektrophoretisch aufgetrennt. Nach dem Transfer wurden die Membranen mit Antikörpern gegen phosphoryliertes Pyk2 (obere zwei Blots) oder verschiedenen Kontrollantikörpern (untere Blots) inkubiert.

### *3.5.2 Die Regulation von Erk*

Ergebnisse aus den Vorarbeiten zeigten eine stimulationsabhängige Interaktion zwischen Erk und Hck (siehe 1.7). Zudem scheinen sowohl Src-Kinasen als auch Pyk2 bei der Aktivierung von Erk eine Rolle zu spielen (Abram C.L. and Courtneidge S.A., 2000; Blaukat A. et al., 1999). Da IL-6 den Ras/MAPK-Signalweg aktivieren kann (Ogata A. et al., 1997; Neumann C., 1996), wurde der Aktivierungszustand von Erk in Eg und d 771-811 exprimierenden Baf-B03 Zellen untersucht (Abb.22). Die Kontrolle im Immunoblot mit normalem Erk-Antikörper zeigte, dass Erk1 und Erk2 in Eg-Hck und d 771-811-Hck exprimierenden Baf-B03 Zellen vergleichbar stark exprimiert wurden (Abb. 22, untere Blots). Erk war in beiden Transfektanten im unstimulierten Zustand vergleichbar schwach aktiviert (linke Spuren, obere zwei Blots). Die Stimulation von Eg-Hck exprimierenden Zellen mit EPO induzierte eine etwa fünffache Zunahme der Erk1/2 Aktivität nach 15 Minuten. Die maximale Aktivierung von Erk in diesen Zellen erfolgte somit zum gleichen Zeitpunkt wie die Aktivierung von Hck (Abb.18). Im Gegensatz dazu zeigten d 771-811 exprimierende Zellen nur maximal eine Verdoppelung der Erk Aktivität im gleichen Zeitraum (Abb.22, obere Blots). Nach 20 minütiger Stimulation begann die Erk Aktivierung in Eg-Hck Transfektanten wieder leicht abzunehmen, wohingegen sie sich in d 771-811 Transfektanten zwischen 0 und 10 Minuten verdoppelte, um dann bis Minute 20 etwa auf dem gleichen Niveau zu bleiben. (Abb. 22, obere zwei Blots). Diese Resultate wiesen daraufhin, dass auch andere Signalwege zur Aktivierung von Erk beitragen. Die Interaktion von Hck mit gp130 schien dabei jedoch wichtig für die volle Aktivierung von Erk.

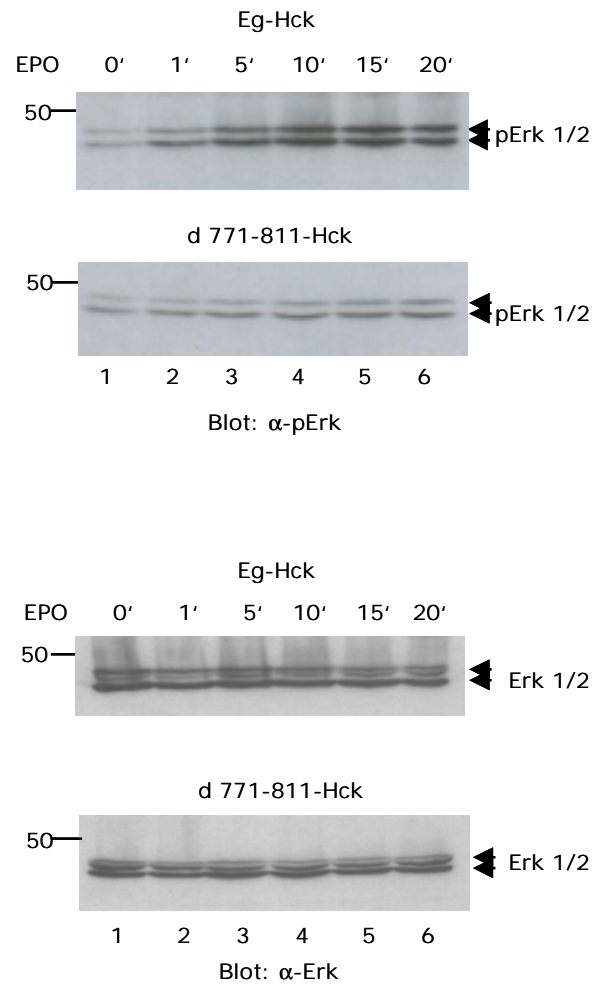


Abb. 22: Der Hck/gp130 Komplex vermittelt die Aktivierung von Erk.

Baf-B03 Transfektanten wurden für die angegebenen Zeiten mit 40 U/ml EPO stimuliert. Lysate der Zellen wurden in Westernblots mit Antikörpern gegen aktivierte Erk-Kinase 1/2 (obere Blots) inkubiert. Die Expression von Erk wurde mit einem normalen anti-Erk Antikörper (untere Blots) kontrolliert.

## 4. DISKUSSION

### 4.1 Diskussion der Versuchsergebnisse

Interleukin-6 ist der wichtigste Wachstumsfaktor für das Multiple Myelom (1.2.2) (Hallek M. et al., 1998; Kawano M. et al., 1988; Kishimoto T., 1989; Kishimoto T. et al., 1995; Klein B., 1995; Klein B. and Bataille R., 1992; Klein B. et al., 1995; Taga T. et al., 1989; Zhang X.G. et al., 1989). Die molekularen Mechanismen, mittels derer IL-6 das Zellwachstum stimuliert, sind bisher jedoch nicht genau bekannt. Die Bindung von IL-6 an den IL-6R induziert die Aktivierung von Janus-Kinasen und STAT Proteinen (Lütticken C. et al., 1994; Narazaki M. et al., 1994; Stahl N. et al., 1994). Jedoch reagieren Plasmazytomzellen auf IL-6 mit verstärktem Wachstum unabhängig davon, ob sie Janus-Kinasen exprimieren oder nicht. Dagegen korreliert die Aktivierung der MAPK mit erhöhtem Zellwachstum (Ogata A. et al., 1997). Die Unterbrechung der Shp-2/gp130 Interaktion führte dagegen zu einem deutlich geringeren Zellwachstum (Kim H., 1999; Ogata A. et al., 1997). Ergebnisse aus Vorarbeiten zeigten, dass auch die Src-Kinasen Hck, Fyn und Lyn durch IL-6 aktiviert werden (Hallek M. et al., 1997). Zusammengefasst legen diese Befunde nahe, dass IL-6 außer Janus-Kinasen und STAT Proteinen noch andere wichtige Signalproteine aktiviert, die möglicherweise auch an der Vermittlung von Wachstumssignalen beteiligt sind. In dieser Arbeit wurden Signalwege näher charakterisiert, die das Zellwachstum steuern und somit für die molekulare Pathogenese des Multiplen Myeloms von Bedeutung sein könnten.

Die Untersuchungen zur Identifizierung der Hck-Bindungsdomäne von gp130 zeigten, dass die Src-Kinase Hck an eine „saure Domäne“ zwischen den Aminosäuren 771 und 811 von gp130 bindet. Die interne Deletion dieser Domäne (d 771-811) führte zu einem kompletten Abbruch der Hck/gp130 Interaktion. Die „saure Domäne“ lag C-terminal des Box3-Motivs von gp130. In Übereinstim-

mung mit diesem Ergebnis fanden Ernst und Mitarbeiter, dass die Trunkation des C-terminalen Teils von gp130 einschließlich des Box3 Motivs die Aktivierung von Hck in murinen embryonalen Stammzellen (ES) verhinderte (Ernst M. et al., 1999). Im Widerspruch zu den Ergebnissen dieser Dissertation war jedoch das Zellwachstum im Vergleich zu wt gp130 exprimierenden Zellen nicht verringert. Die „sauren Domänen“ von humanem und murinem gp130 sind bis auf eine Aminosäure identisch. Daher ist die wahrscheinlichste Erklärung für die unterschiedlichen Ergebnisse, dass Hck in ES Zellen andere Aufgaben hat als in Baf-B03 Zellen. So könnten Hck abhängige Signalwege das Wachstum von Baf-B03 Zellen fördern, aber die Differenzierung von ES Zellen abschwächen (Ernst M. et al., 1999).

Die Hck-Bindungsdomäne von gp130 enthält zwei Motive, die für die Internalisierung des IL-6 Rezeptors von Bedeutung sind. Ein Serin an Position 782 und ein di-Leucin Motiv (L786, L787) (Dittrich E. et al., 1996; Gibson R.M. et al., 2000). Neuere Arbeiten zeigten, dass sowohl die Aktivierung als auch die Beendigung gp130 vermittelter Signale unabhängig von der gp130-Endozytose sind (Thiel S. et al., 1998; Thiel S. et al., 2000). In diesem Zusammenhang kann auch über eine Rolle von Hck spekuliert werden, da die Inhibition der Endozytose von CD4 in Lymphozyten abhängig von der Interaktion von CD4 mit der Src-Kinase Lck zu sein scheint (Pelchen-Matthews A. et al., 1992). Der genaue Mechanismus der gp130 Internalisierung sollte daher weiter aufgeklärt werden.

Ebenso bedarf der Mechanismus der Bindung von Hck an gp130 weiterer Untersuchungen. Die Interaktionen von Src-Kinasen mit anderen Signalproteinen werden meist durch die SH2 und SH3 Domänen (siehe 1.5.2) der Src-Kinasen vermittelt. So bindet beispielsweise Src mit seiner SH3 Domäne an Fak (focal adhesion kinase) (Thomas J.W., 1998). Sowohl die Interaktion von Lyn und Blk mit Syk als auch die Bindung von Hck an die  $\beta$ -Kette des IL-3 Rezeptors werden durch die SH2 Domänen der Src-Kinasen vermittelt (Aoki Y. et al., 1995; Burton E.A., 1997). Die in dieser Arbeit identifizierte Hck-Bindungsregion enthält allerdings keine SH2- oder SH3-Konsensus Motive für Src-Kinasen. Das auffälligste Merkmal dieser Region war ihr relativ hoher Anteil an negativ geladenen Aminosäuren (9 von 41). Eine ähnlich „saure Domäne“ vermittelt die Bindung von Lck an die  $\beta$ -Kette des IL-2 Rezeptors. Da diese Interaktion durch die SH1 Do-



mäne von Lck vermittelt wurde, wird derzeit weiter untersucht, ob die SH1 Domäne von Hck an die „saure Domäne“ von gp130 bindet. Die Ergebnisse aus den Experimenten zur Eingrenzung der Hck-Bindungsdomäne könnten die Existenz einer Hck Bindungsstelle N-terminal der identifizierten Region von 771-811 implizieren. Bei der Untersuchung der Rezeptormutanten t 770, t 722 und t 702 wurde eine schwache Restbindung von Hck festgestellt. Die Region von 702-770 enthält zwei Tyrosine (Y759, Y767), die als potentielle Bindungsmotive für Hck in Frage kamen. Allerdings war die Bindung von Hck an die inaktivierenden Punktmutanten Y759F, Y767F und YY759/767FF gleich stark wie an wt gp130. Und die Interaktion von Hck mit der Dreifach-Mutante DDM (d 771-827 plus Y759F und Y767F) war ähnlich stark wie mit d 771-827 alleine (< 10 % von wt gp130). Da die Interaktion von Hck mit der Mutante d 771-811 komplett unterbrochen war, ist es wahrscheinlich, dass durch die Deletion des Bereiches 771-827 in der Struktur von gp130 Änderungen hervorgerufen wurden, die eine un-spezifische Bindung ermöglichten.

Die fünf C-terminalen Tyrosine (Y759, 767, 814, 905, and 915) von gp130 sind Bindungsstellen für wichtige Signalproteine. Y759 vermittelt die Bindung von Shp-2 und die IL-6 induzierte Aktivierung der MAPK (Ogata A. et al., 1997). Y767, Y814, Y905, und Y915 vermitteln die Aktivierung von STAT3 und STAT1 bindet an Y905 und Y915 (Gerhartz C. et al., 1996). Es wurde bereits gezeigt, dass Y759 alleine nicht ausreicht um das IL-6 vermittelte Zellwachstum zu induzieren (French J.D., 1998). Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass die Aktivierung der Src-Kinase Hck wichtig für die Übermittlung von Wachstums-signalen ist und fügen so einen neuen Aspekt für gp130 vermittelte Effekte hinzu. Baf-B03 Transfektanten, die d 771-811 exprimierten wiesen nach Stimulation von gp130 ein etwa vierfach reduziertes Wachstum im Vergleich zu wt gp130 exprimierenden Zellen auf. Außerdem wurde das Zellwachstum durch die Behandlung von wt gp130 Zellen mit dem Src-Kinasen Inhibitor PP2 auf das Basalniveau gesenkt. Dagegen hatte PP2 keinen Effekt auf d 771-811 exprimierende Baf-B03 Zellen. Interessanterweise waren sowohl das durch EPO induzierte Zellwachstum als auch die Aktivierung von Erk in d 771-811 Transfektanten nicht vollkommen unterbrochen. Dies lässt die Vermutung zu, dass auch andere Proteine wie beispielsweise Janus-Kinasen und STATs an der Übermittlung von

Wachstumssignalen in Baf-B03 Zellen beteiligt waren. Unterstützt wird diese Hypothese dadurch, dass die Aktivierung von STAT3 durch die interne Deletion der Hck-Bindungsstelle nicht blockiert wurde (3.4.2). Nicht konform gehen die erzielten Ergebnisse mit früheren Resultaten, die zeigten, dass die membrannahe Region bis zur Aminosäure 775 von gp130 ausreicht, um das Zellwachstum zu induzieren (Fukada T. et al., 1996; Murakami M. et al., 1991). Baf-B03 Zellen, die die Trunktionsmutante t 775 exprimierten, reagierten jedoch nicht mit einem erhöhtem Wachstum auf die Stimulation von gp130. Neuere Untersuchungen schlagen vor, dass diese Unterschiede durch Störungen in der Proteinstruktur und den Verlust von wichtigen Bindungsstellen bei großen gp130-Trunktationen hervorgerufen werden (Schmitz J. et al., 2000).

Die Ergebnisse zeigen einen stimulationsabhängigen Rückgang der Phosphorylierung von Pyk2 in wt gp130 aber nicht in d 771-811 Transfektanten. Das legt nahe, dass eine Pyk2-Tyrosinphosphatase durch den gp130/Hck-Komplex aktiviert wird. Die Dephosphorylierung von Pyk2 blockiert die durch Dexamethason induzierte Apoptose in Plasmazytomzellen (Chauhan D. et al., 1999). Die Hck-abhängige Dephosphorylierung von Pyk2 bekommt zusätzliche Bedeutung durch die Annahme, dass Src-Kinasen apoptotische Signale blockieren (Schlessinger J., 2000). Nach neueren Befunden scheint Pyk2 ein Substrat für die Tyrosinphosphatase Shp-2 zu sein, deren Bindungsstelle an gp130 direkt neben der Hck-Bindungsdomäne liegt (Tang H. et al., 2000). Die Aktivierung von Erk durch die Hck/gp130 Interaktion bestätigt die vermutete Bedeutung von Src-Kinasen für die Aktivierung des Ras/MAPK-Signalwegs (Abram C.L. und Courtneidge S.A., 2000; Neumann C., 1996). Hck könnte innerhalb eines Proteinkomplexes bestehend aus gp130/Hck/Shp-2/Pyk2 Bindungsstellen für Grb2 in Shp-2 und/oder Pyk2 phosphorylieren, und so die Aktivierung von Erk ermöglichen (Avraham H. et al., 2000; Schlaepfer D.D. und Hunter T., 1996). Im direkten Gegensatz zu der strukturell mit Pyk2 verwandten Fak inhibiert Pyk2 die Erk Aktivität (Zhao J. et al., 2000). Die Dephosphorylierung der Autophosphorylierungsstelle (Y402) von Pyk2 weist darauf hin, dass Pyk2 in wt gp130 exprimierenden Baf-B03 Zellen inaktiv ist. Dies lässt den Schluss zu, dass Pyk2 in dem Signalweg vor Erk lokalisiert ist (Schlaepfer D.D. and Hunter T., 1996). Ein alternativer Signalweg, der zur Aktivierung von Erk führen könnte, beinhaltet die

---

Proteine gp130, Hck, Shc und Grb2. Die Interaktion von Shc und Grb2 mit Hck konnte in vorhergehenden Untersuchungen der Arbeitsgruppe bereits gezeigt werden (eigene Beobachtungen) und (Neumann C., 1996).

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse, dass gp130-induzierte Signalwege durch Hck reguliert werden, indem es wichtige Bindungsstellen für Proteine wie Grb2 oder Shp-2 schafft, oder Adaptormoleküle wie Shc aktiviert. Auf Basis der Befunde wurde ein Modell dieser Signalwege entwickelt (4.2).

## 4.2 Modell der Rolle von Hck in der Signaltransduktion von Interleukin-6

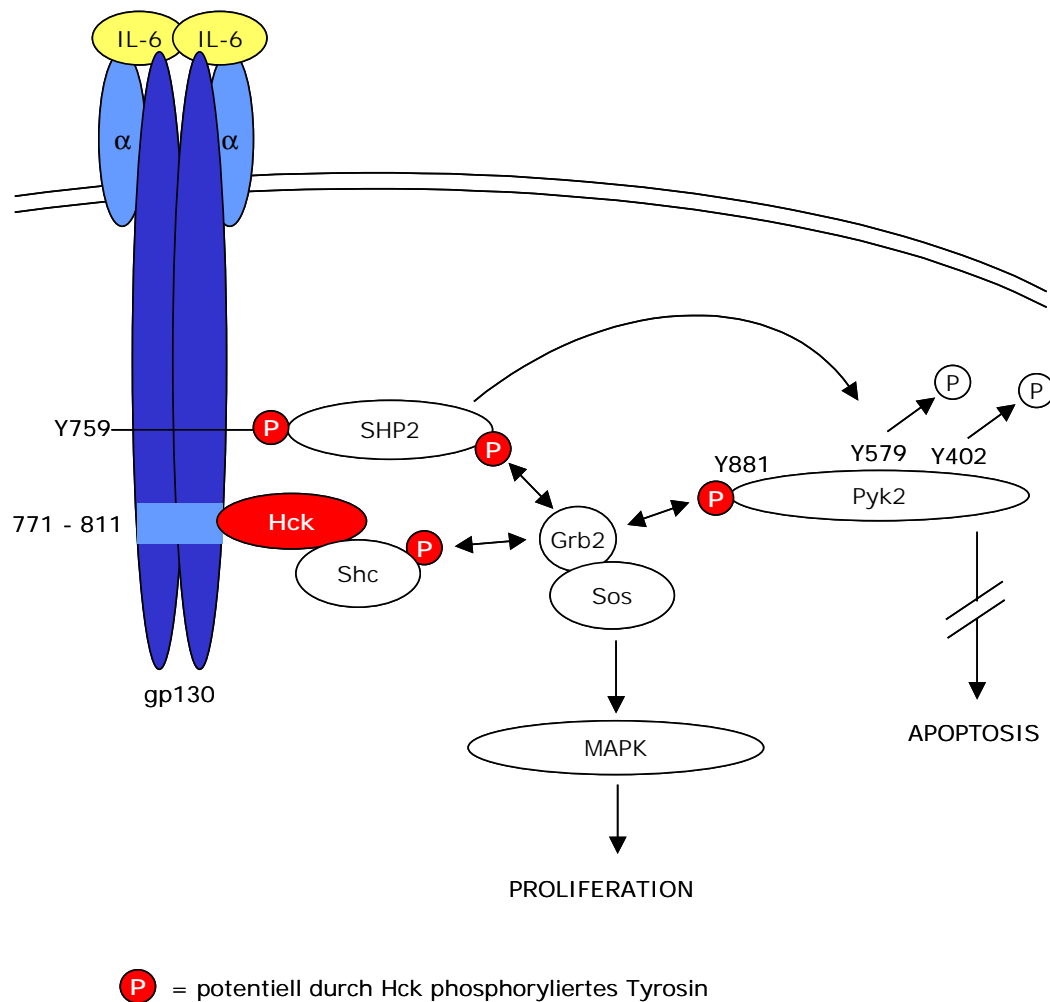


Abb. 23: Die Rolle von Hck für die Signaltransduktion von Interleukin-6.

Hck assoziiert konstitutiv mit der „sauren Domäne“ zwischen den Aminosäuren 771 und 811 von gp130. Die Bindung von IL-6 an den IL-6 Rezeptorkomplex induziert die Aktivierung von Hck durch noch nicht genau bekannte Signalmechanismen. Hck ist dann in der Lage, mit Adaptorproteinen wie Shc zu interagieren und Tyrosine in Substratproteinen zu phosphorylieren. So könnten beispielsweise Bindungsmotive für Shp-2 in gp130 und/oder für Grb2 in Shp-2, Shc und Pyk2 aktiviert werden. Die Rekrutierung von Grb2 in den Signalkomplex leitet in den Ras-MAPK Signalweg ein, da Grb2 stabil mit Sos, einem GDP/GTP-Austauschfaktor für Ras, verbunden ist. Die Aktivierung der MAPK (Erk) resultiert schließlich in einem gesteigertem Wachstum der Zellen. Die Aktivierung von Shp-2 führt zur Dephosphorylierung von Pyk2 an den Tyrosinen Y579 und Y402. Dadurch wird das Zellwachstum gefördert, da diese Deaktivierung von Pyk2 zusätzlich die Aktivierung von MAPK verstärkt und zu einem Block von apoptotischen Signalen führt.

### 4.3 Funktionelle Bedeutung der Versuchsergebnisse und Perspektiven

Wie bereits in der Einleitung erwähnt, wurde die Bedeutung von Src-Kinasen für die Signaltransduktion von IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-7, IL-12, GM-CSF und G-CSF gezeigt (Anderson S.M. and Jorgensen B., 1995; Corey S.J. et al., 1994; Ernst M., 1994; Hallek M. et al., 1997; Janas M.L. et al., 1999; Minami Y. et al., 1993; Pignata C. et al., 1995; Venkitaraman A.R. und Cowling R.J., 1992) gezeigt. Die Gemeinsamkeit der Bindungsregionen für Lck mit dem IL-2R und Fyn mit dem IL-7R liegt dabei in deren hohem Anteil an negativ geladenen Aminosäuren (Hatakeyama M. et al., 1991, Venkitaraman A.R., 1992). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die Interaktion von Hck mit der IL-6R  $\beta$ -Kette, gp130, ebenfalls über eine „saure Domäne“ vermittelt wird. Die Deletion der Hck-Bindungsdomäne von gp130 führte außerdem zu einer signifikanten Abschwächung der Aktivierung von Erk und deutlich verringertem Zellwachstum. Daher deuten die Resultate darauf hin, dass die Beteiligung von Hck ein weiteres wichtiges mitogenes Signal zusätzlich zu der bereits beschriebenen Aktivierung von Shp-2/Grb2/Erk (Fukada T. et al., 1996) für gp130 vermittelte Effekte liefert.

Die bisherigen Ergebnisse weisen daraufhin, dass ein für gp130 neuer Bindungsmechanismus mit der Src-Kinase Hck entdeckt wurde. Die Bindung wird dabei nicht über die klassischen Motive wie Phosphotyrosine oder PXXP-Motive, sondern über eine „saure Domäne“ vermittelt. Da dieser Bindungsmechanismus bisher nur in zwei weiteren Fällen beschrieben wurde (s.o.), könnten diese Bindungsstellen relativ spezifische Angriffspunkte für therapeutische Maßnahmen sein. Die genetische Unterbrechung der Hck/gp130-Interaktion führte zu einem signifikant verringertem Zellwachstum. Daher könnten Reagenzien, welche die Interaktion von Hck mit gp130 blockieren, mögliche Therapeutika für Erkrankungen, die durch die erhöhte Aktivierung von gp130 charakterisiert sind, wie beispielsweise für das Plasmozytom sein. Auch um solche blockierenden Substanzen gezielt entwickeln zu können, wird derzeit der genaue molekulare

Mechanismus der Hck/gp130 Interaktion weiter von uns Aufgeklärt. So sind jetzt unter anderem folgende Frage zu beantworten:

- Welche Aminosäuren innerhalb der „sauren Domäne“ sind essentiell für die Bindung von Hck ?
- Welche Domäne von Hck interagiert mit gp130 ?
- Ist die Interaktion von Hck wirklich direkt, wie es alle bisherigen Ergebnisse suggerieren ?
- Welche anderen Src-Kinasen binden an gp130 ?

Zur Klärung dieser offenen Fragen werden derzeit in Zusammenarbeit mit Christian Miksch aus der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Steglich an der LMU partiell überlappende Peptide der „sauren Domäne“ hergestellt. Diese werden in Kürze in Blockierungsexperimente eingesetzt, um die Hck/gp130 Interaktion zu unterbinden. Die erzielten Resultate werden dann auch helfen, die Hck-Bindungsdomäne weiter einzugrenzen. Die Peptide sind unter anderem mit Biotin gekoppelt und können so in Bindungsstudien eingesetzt werden. Diese können dann Aufschluss darüber geben, ob die Hck/gp130 Interaktion direkt ist oder durch andere Proteine vermittelt wird. Dies ist eine Frage, die auch bei den bereits beschriebenen Interaktionen von Src-Kinasen mit den Rezeptoren für IL-2 und IL-7 noch ungeklärt ist. Zusätzlich wird mit diesen Peptiden untersucht welche Domäne von Hck mit gp130 interagiert. Dazu werden zunächst Hck-Mutanten mit deletierter SH1-, SH2- oder SH3-Domäne verwendet. In klassischen Bindungsstudien mit Src-Kinasen enthaltenden Zellysaten kann dann zudem festgestellt werden, welche anderen Mitglieder der Src-Kinase Familie an die „saure Domäne“ von gp130 binden können.

Ebenso wie der molekulare Mechanismus der Bindung von Src-Kinasen an „saure Domänen“, müssen auch die zytoplasmatischen Signalkaskaden weiter untersucht werden, die durch diese Interaktion aktiviert werden. Die Abbildung 23 (S.79) zeigt unser derzeitiges Modell dieser Kaskaden. In weiteren Versuche soll nun beispielsweise untersucht werden welche Signalwege durch Hck und welche durch Shp-2 vermittelt werden. Unter anderem werden dazu geeignete Zelllinien (z.B. Baf-B03) mit gp130 Mutanten transfiziert, denen entweder die Shp-2-

Bindungsstelle (Y759F), die Hck-Bindungsdomäne (d 771-811), oder beide Bindungsmotive (Y759F/d771-811) fehlen (Abb. 24).

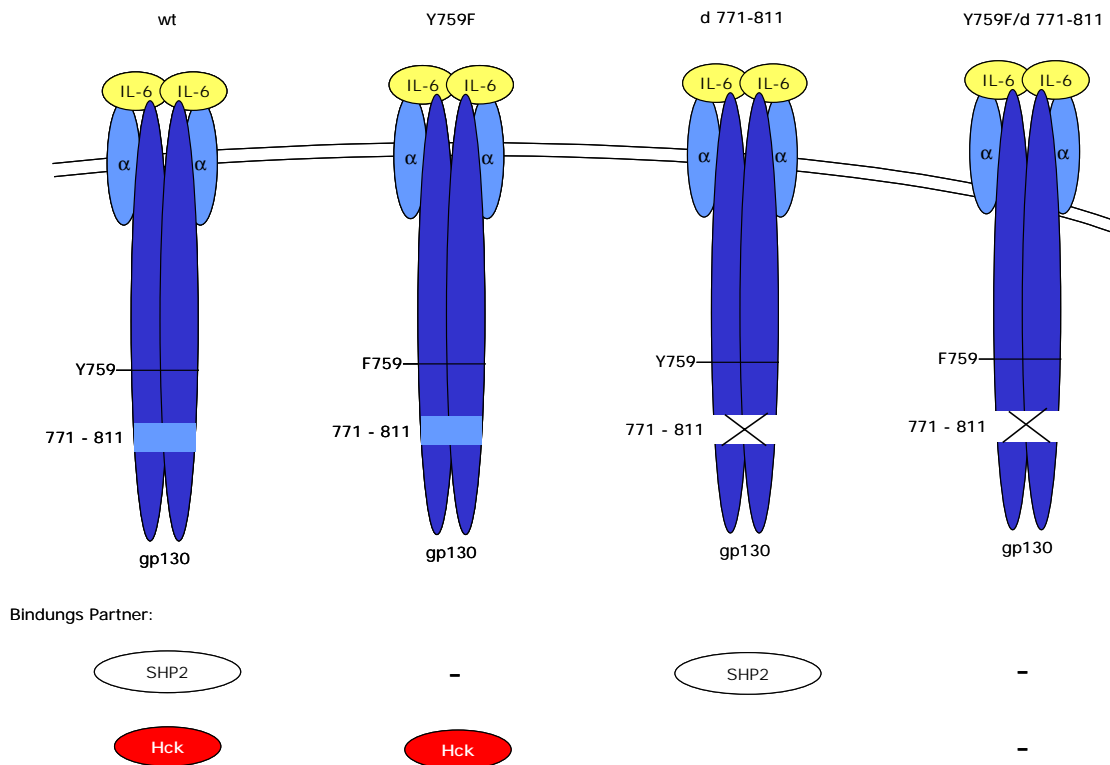


Abb. 24: gp 130- Mutanten zur Analyse der durch Hck und Shp-2 aktivierten Signalkaskaden

An den gp130 Wildtyp (wt) bindet sowohl Shp-2 als auch Hck. Y759F kann nicht mehr Shp-2 binden und aktivieren und d 771-811 kann nicht mehr Hck binden und aktivieren. Die Doppelmutante (Y759F/d 771-811) sollte in beiden Signalen negativ sein.

Nach Stimulation der einzelnen Transfektanten können dann physiologische Prozesse wie Zellwachstum oder Apoptose untersucht werden. Außerdem wird die spezifische Aktivierung von Signalproteinen und Transkriptionsfaktoren in diesen Zellen analysiert.

Interessanterweise werden der IL-2R, der IL-7R und gp130 alle der gleichen Zytokinrezeptorfamilie (Klasse I Rezeptoren) zugeordnet (Bazan J.F., 1990). Für alle Mitglieder dieser Familie, IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IL-7, GM-CSF und G-CSF, wurde, wie oben angeführt, die Beteiligung von Src-Kinasen an der Signaltransduktion beschrieben. Eine mögliche Beteiligung von „sauren Domänen“ an der Bindung von Src-Kinasen an weitere Bindungspartner, innerhalb und außerhalb der Klasse I Rezeptorfamilie, kann nach genauerer Identifizierung der für die In-

teraktion wichtigen Aminosäuren untersucht werden. Die „saure Domäne“ im IL-2R $\beta$ , die Bindungsdomäne für Lck, ist hochkonserviert zwischen verschiedenen Spezies (Kono T. et al., 1990). Ein sieben Aminosäuren großer Bereich dieser Domäne weist eine Homologie von 57 % zur Hck-Bindungsdomäne in gp130 auf (Abb. 24 blaue Markierung). Ein weiterer wichtiger Befund ergab sich aus Sequenzvergleichen der zytoplasmatischen Domäne von Wachstumsfaktorrezeptoren mit der „sauren Domäne“ von gp130. Besonders interessant ist dabei ein Bereich in der Inter-Kinasedomäne von Flk-1 (VEGFR2, vascular endothelial growth factor receptor 2), der eine Homologie von 60 % zur „sauren Domäne“ von gp130 aufweist (Abb. 25).

MOLEKÜL	SEQUENZ	ANTEIL von E und D	HOMOLOGIE
gp130	VPSVQVFSRSE <b>STOPLLDSEERPED</b> LQLVDHVDGGDGILPR	22 %	
IL-2R $\beta$	QQDKVPEPASLSSNHSLSLTSCTFNQGYFFHLPDALEIEACQVYFTDPY <b>SEEDPDE</b> GVAGAPT <b>SSPOPL</b>	16 %	57 %
Flk-1	NEFVPHYKTKGARFRQGDYVGAIPVDLKRRLDSITSSQSSASSGVFEKSLSD <b>VEEEEAPED</b> LYKDF	20 %	60 %

Abb. 25: Sequenzvergleich der sauren Domäne von gp130 mit der sauren Domäne von IL-2R $\beta$  und der Inter-Kinasedomäne von Flk-1 (VEGFR2).

Es wurde auch bereits gezeigt, dass die Src-Kinasen Src, Yes, und Fyn an Flk-1 binden, wobei das Bindungsmotiv hier noch unklar ist (Eliceiri B.P. et al., 1999; He H. et al., 1999; Ortega N. et al., 1999). Im Zusammenhang mit dem Plasmozytom scheint eine weitere Untersuchung von Flk-1 besonders interessant, da IL-6 neben dem Wachstum von Plasmozytomzellen unter anderem auch deren Produktion von vascular endothelial growth factor (VEGF) induziert (Cohen T. et al., 1996). VEGF seinerseits induziert die erhöhte Produktion von IL-6 durch Knochenmarkszellen (Bellamy et al., 1999). Auf diese Weise könnte ein sich selbst verstärkender Kreislauf entstehen (Dankbar B. et al., 2000), der optimale Wachstumsbedingungen für die Plasmozytomzellen schafft. Daher werden wir in Analogie zu den Untersuchungen an gp130 analysieren, ob die Interaktion der Src-Kinasen mit Flk-1 über die oben definierte Region erfolgt. In der folgenden Abbildung sind die molekulare Interaktionen unter Beteiligung von Src-Kinasen schematisch dargestellt (Abb.26).



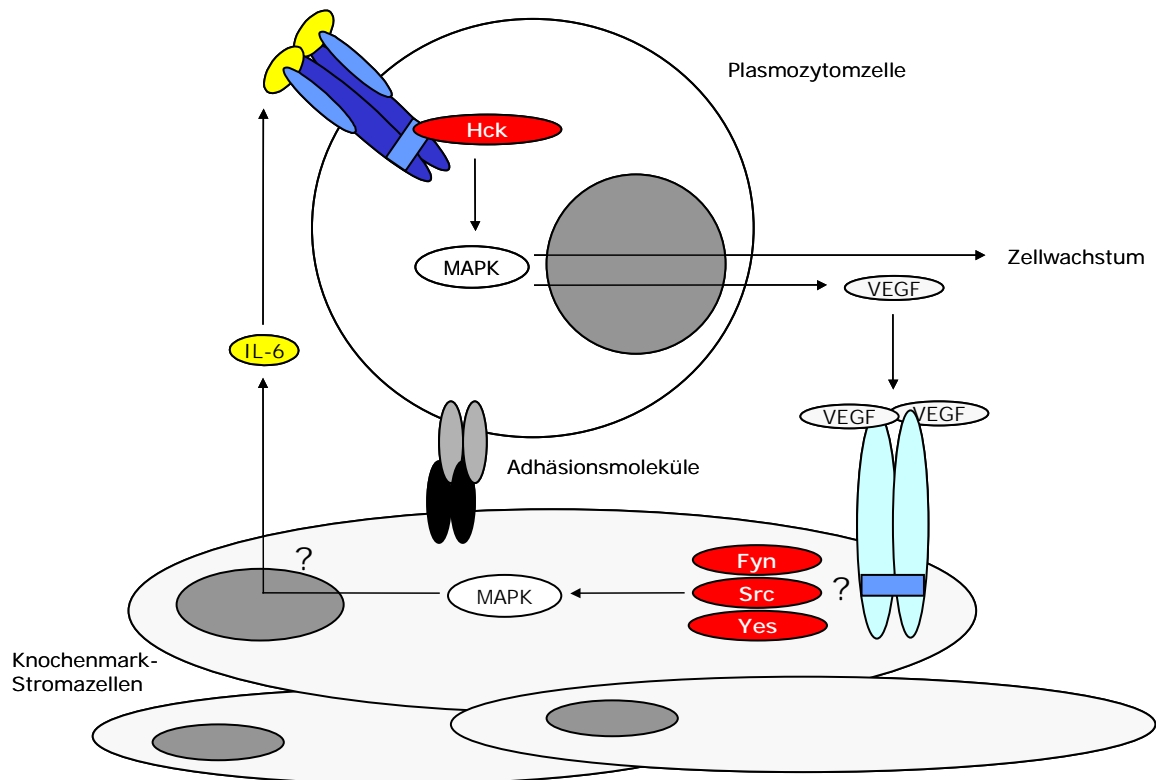


Abb. 26: Modell der Beteiligung von Src-Kinasen an der Pathogenese des Plasmazytoms.

Die Plasmazytomzelle bindet über Adhäsionsmoleküle (schwarz/grau) an Stromazellen des Knochenmarks. Durch den Austausch von IL-6 (gelb) und VEGF (hellgrau) zwischen Plasmazytomzellen und Stromazellen entsteht ein sich positiv regulierender Kreislauf, der zum Wachstum des Plasmazytoms beiträgt. Die Assoziation von Src-Kinasen (rot) wurde sowohl am IL-6 Rezeptor (blau) als auch am VEGFR (hellblau) nachgewiesen. Die Aktivierung der MAPK scheint für die Produktion von IL-6 und VEGF wichtig zu sein. Insbesondere die mit Fragezeichen versehenen Signalwege werden derzeit weiter untersucht.

## 5. ZUSAMMENFASSUNG

IL-6 spielt eine entscheidende Rolle für die Entstehung vieler Krankheiten, insbesondere des Plasmozytoms. Über die molekularen Mechanismen die daran beteiligt sind, lagen allerdings bisher wenig Daten vor. Aufgrund eigener Vorarbeiten war bekannt, dass IL-6 die Src-Kinasen Hck, Fyn und Lyn aktiviert. Ziel dieser Arbeit war es, genauere Erkenntnisse über die genauen Mechanismen dieser Aktivierung zu gewinnen.

Mittels Mutationsanalysen wurde eine „saure Domäne“ zwischen den Aminosäuren 771 und 811 von gp130 als Bindungsregion für die Src-Kinase Hck identifiziert. Dieses Bindungsmotiv wurde bisher noch nicht für gp130 beschrieben. Die Bindung von Hck an gp130 war unabhängig von den benachbarten Bindungsstellen für Shp-2 (Y759) und STAT3 (Y767, Y814). In faktor-abhängig wachsenden Baf-B03 Zellen resultierte die Deletion der Hck-Bindungsdomäne (d 771-811) in einem deutlich reduzierten Wachstum nach Stimulation von gp130. Die Aktivität der Src-Kinase Hck war in d-771-811 Transfektanten im Vergleich zu wt gp130 exprimierenden Zellen (Eg) deutlich reduziert. In d 771-811 exprimierenden Zellen war außerdem die Aktivierung von Erk sowie die Deaktivierung und Dephosphorylierung von Pyk2 unterbrochen. Daher scheint der Signalweg an dem Hck beteiligt ist einen wesentlichen Einfluss auf die Vermittlung von Wachstumssignalen, die über gp130 stimuliert werden, zu besitzen. Zur Zeit werden die weiteren Signale untersucht, die durch über den Hck/gp130-Komplex vermittelt werden.

Da IL-6 der ein wesentlicher Wachstumsfaktor in der Entstehung des Plasmozytoms und die Expansion von frühen hämatopoetischen Vorläuferzellen ist, sollen diese Untersuchungen zur Identifizierung krankheits-relevanter Signalproteine oder -domänen führen. Diese Signalproteine würden dann wichtige Ziele für eine molekular definierte Therapie des Plasmozytoms darstellen.

## 6. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A	
A	Ampère
Abb.	Abbildung
A-Beads	an Sepharose gekoppeltes Protein A von <i>S. aureus</i>
α-	Anti-
ad.	aufgefüllt zu
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosin Tri-Phosphat
B	
β-ME	2-Mercaptoethanol
Bp	Basenpaare
BSA	Rinder Serum Albumin
C	
°C	Grad Celsius
CaCl <sub>2</sub>	Calciumchlorid
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
Ci	Curie
CIS	Cytokine inducible SH2 containing protein
cm	Zentimeter
CNTF	Ciliary Neurotrophic Factor
CO <sub>2</sub>	Kohlendioxid
csk	C-terminale Src-Kinase
CT-1	Cardiothropin-1
D	
d	Deletion
dd	doppelt destilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
dNTP	Desoxynukleotid
DOTAP	N-[1-(2,3-Dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammoniummethlylsulfat
E	
ECL	Enhanced Chemiluminiscence
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
Eg	Fusionsprotein aus der extrazellulären Domäne des EPOR und der zytoplasmatischen Domäne von gp130
EPO	Erythropoeitin
EPOR	Erythropoeitin-Rezeptor

Erk (= MAPK)	Extracellular regulated kinase
F	
FCS	Fötale Kälberserum
FGFR	Fibroblast growth factor receptor
Flk-1	Fetal liver kinase 1
G	
[ $\gamma$ - <sup>33</sup> P]ATP	am $\gamma$ -Phosphor mit [ <sup>33</sup> P] markiertes Adenosintriphosphat
g	Gramm oder Erdbeschleunigung
G-Beads	an Sepharose gekoppeltes Protein G von <i>Streptococcus sp.</i>
G-CSF	Granulocyte colony-stimulating factor
GM-CSF	Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
gp	Glykoprotein
Grb2	Growth factor receptor binding protein 2
H	
h	Stunden
Hck	Hematopoetic cell kinase
HEPES	(N-[2-Hydroxyethyl]piperazin-N'-[2-ethansulfonylsäure])
HHV	Humanes Herpesvirus
HRP	Meerrettich-Peroxidase
I	
I	Stromstärke
Ig	Immunglobulin
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IP	Immunpräzipitation
J	
Jak	Janus-Kinase
K	
KCl	Kaliumchlorid
KOAc	Kaliumacetat
kD	Kilodalton
kB	Kilobasen
L	
l	Liter
LB	Luria Broth Medium
LIF	Leukaemia Inhibitory Factor
M	
M	Molar
m	Milli-
$\mu$	Mikro-

MDCK	Madin-Darby Canine Kidney
MM	multiples Myelom
MAPK (= Erk)	mitogen activated protein kinase
M-CSF	Macrophage colony-stimulating factor
MEK	MAP Kinase Kinase
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
MgSO <sub>4</sub>	Magnesiumsulfat
min	Minuten
MnCl <sub>2</sub>	Manganchlorid
MOPS	3-((N-Morpholino)propansulfonylsäure)
N	
n	Nano-
NaCl	Natriumchlorid
NaHCO <sub>3</sub>	Natiumhydrogencarbonat
NaOH	Natriumhydroxid
NaVO <sub>4</sub>	Natrium-orthovanadat
NF	nukleärer Faktor
NGF	Nerve growth factor
NP 40	Nonidet P-40
O	
OSM	Oncostatin M
P	
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Saline
PDGF	Platelet-derived growth factor
pH	$-\log_{10}[\text{H}^+]$
PMSF	Phenylmethansulfonsäurefluorid
PP2	Pyrazolo-Pyrimidin 2
R	
R	Ohm
-R	-Rezeptor
RAFTK/Pyk2	Related focal adhesion kinase
Rb	Retinoblastom
rpm	Umdrehungen pro Minute
RTK	Rezeptor Tyrosin Kinase
S	
SDS	Natriumdodecyl-sulfat
SCF	Stem cell factor
SH	Src-homology
Shc	Src homology and collagen
Shp-2	Src homology 2 domain containing protein tyrosinphosphatase
SOCS	Suppressor of cytokine signaling
Sos	Son of sevenless

---

SRE	Serum responsive element
STAT	signaltransducer and activator of transcription
T	
t	Trunkation
TBS	Tris-gepufferte Saline
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin
TGF	Transforming growth factor
TNF	Tumor necrosis factor
Tris	Tris(Hydroxymethyl)Aminomethan
Tris-Cl	Trislösung mit durch Salzsäure eingestelltem pH-Wert
V	
V	Volt
VEGF	Vascular endothelial growth factor
W	
WB	Westernblot
X	
X	beliebige Aminosäure
Y	
Y	Tyrosin

---

## 7. LITERATURVERZEICHNIS

Abram C.L., and Courtneidge S.A. (2000). Src family tyrosine kinases and growth factor signaling. *Exp Cell Res* 254, 1-13.

Adachi T., Pazdrak K., Stafford S., and Alam R. (1999). The mapping of the Lyn kinase binding site of the common beta subunit of IL-3/granulocyte-macrophage colony-stimulating factor/IL-5 receptor. *J Immunol* 162, 1496-501.

Anderson S.M., and Jorgensen B. (1995). Activation of src-related tyrosine kinases by IL-3. *J Immunol* 155, 1660-70.

Aoki Y., Kim Y.T., Stillwell R., Kim T.J., and Pillai S. (1995). The SH2 domains of Src family kinases associate with Syk. *J Biol Chem* 270, 15658-63.

Avraham H., Park S.Y., Schinkmann K., and Avraham S. (2000). RAFTK/Pyk2-mediated cellular signalling. *Cell Signal* 12, 123-33.

Bakkus M.H., Van Riet I., De Greef C., Van Camp B., and Thielemans K. (1995). The clonogenic precursor cell in multiple myeloma. *Leuk Lymphoma* 18, 221-9.

Bazan J.F. (1990). Structural design and molecular evolution of a cytokine receptor superfamily. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 6934-6938.

Begemann H., Rasetter J. (1993). *Klinische Hämatologie*, Rasetter J., ed. (Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag).

Bellamy, W.T., Richter, L., Frutiger, Y., and Grogan, T.M. (1999). Expression of vascular endothelial growth factor and its receptors in hematopoietic malignancies. *Cancer Res* 59, 728-33.

Berger L.C., Hawley T.S., Lust J.A., Goldman S.J., Hawley R.G., (1994). Tyrosine phosphorylation of JAK-TYK kinases in malignant plasma cell lines growth-stimulated by interleukins 6 and 11. *Biochem Biophys Res Commun* 202, 596-605.

Blaukat A., Ivankovic-Dikic I., Gronroos E., Dolfi F., Tokiwa G., Vuori K., and Dikic I. (1999). Adaptor proteins Grb2 and Crk couple Pyk2 with activation of specific mitogen-activated protein kinase cascades. *J Biol Chem* 274, 14893-901.

Bolen J.B., Rowley R.B., Spana C., and Tsygankov A.Y. (1992). The Src family of tyrosine protein kinases in hemopoietic signal transduction. *Faseb J* 6, 3403-9.

Bolen J.B., Thompson P.A., Eiseman E., and Horak I.D. (1991). Expression and interactions of the Src family of tyrosine protein kinases in T lymphocytes. *Adv Cancer Res* 57, 103-49.

Bosco M.C., Curiel R.E., Zea A.H., Malabarba M.G., Ortaldo J.R., and Espinoza-Delgado I. (2000). IL-2 signaling in human monocytes involves the phosphorylation and activation of p59hck. *J Immunol* 164, 4575-85.



Boulton T.G., Stahl N., Yancopoulos G.D., (1994). Ciliary neurotrophic factor/leukemia inhibitory factor/interleukin 6/oncostatin M family of cytokines induces tyrosine phosphorylation of a common set of proteins overlapping those induced by other cytokines and growth factors. *J Biol Chem* 269, 11648-55.

Burton E.A., Hunter S., Wu S.C., and Anderson S.M., (1997). Binding of Src-like Kinases to the  $\beta$ -Subunit of the Interleukin-3 Receptor. *J. Biol. Chem.* 272, 16189-16195.

Castell J.V., Gomez-Lechon M.J., David M., Hirano T., Kishimoto T., and Heinrich P.C. (1988). Recombinant human interleukin-6 (IL-6/BSF-2/HSF) regulates the synthesis of acute phase proteins in human hepatocytes. *FEBS Lett* 232, 347-50.

Chauhan D., Hideshima T., Pandey P., Treon S., Teoh G., Raje N., Rosen S., Krett N., Husson H., Avraham S., Kharbanda S., and Anderson C.K. (1999). RAFTK/PYK2-dependent and -independent apoptosis in multiple myeloma cells. *Oncogene* 18, 6733-40.

Chauhan D., Kharbanda S., Ogata A., Urashima M., Teoh G., Robertson M., Kufe D.W., and Anderson K. C. (1997). Interleukin-6 inhibits Fas-induced apoptosis and stress-activated protein kinase activation in multiple myeloma cells. *Blood* 89, 227-34.

Cohen T., Nahari D., Cerem L.W., Neufeld G., and Levi B.Z. (1996). Interleukin 6 induces the expression of vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem* 271, 736-41.

Corey S.J., Burkhardt A.L., Bolen J.B., Geahlen R.L., Tkatch L.S., and Tweardy D.J. (1994). Granulocyte colony-stimulating factor receptor signaling involves the formation of a three-component complex with Lyn and Syk protein- tyrosine kinases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 4683-7.

Dankbar B., Padro T., Leo R., Feldmann B., Kropff M., Mesters R.M., Serve H., Berdel W.E., and Kienast J. (2000). Vascular endothelial growth factor and interleukin-6 in paracrine tumor-stromal cell interactions in multiple myeloma. *Blood* 95, 2630-6.

Daum G., Eisenmann-Tappe I., Fries H.W., Troppmair J., and Rapp U.R. (1994). The ins and outs of Raf kinases. *Trends Biochem Sci* 19, 474-80.

David-Pfeuty T., Bagrodia S., and Shalloway D. (1993). Differential localization patterns of myristoylated and nonmyristoylated c-Src proteins in interphase and mitotic c-Src overexpresser cells. *J Cell Sci* 105, 613-28.

De Franceschi L., Fumagalli L., Olivieri O., Corrocher R., Lowell C.A., and Berton G. (1997). Deficiency of Src family kinases Fgr and Hck results in activation of erythrocyte K/Cl cotransport. *J Clin Invest* 99, 220-7.

de Vos G. (2000). Zur Rolle der Aktivierung von Src-Kinasen durch IL-6 in Plasmazytomzellen. *Med. Klinikum Innenstadt der Universität München (München: Ludwig-Maximilians-Universität).*

Dikic I., Tokiwa G., Lev S., Courtneidge S.A., and Schlessinger J. (1996). A role for Pyk2 and Src in linking G-protein-coupled receptors with MAP kinase activation. *Nature* 383, 547-50.

Dittrich E., Haft C.R., Muys L., Heinrich P.C., and Graeve L. (1996). A di-leucine motif and an upstream serine in the interleukin-6 (IL-6) signal transducer gp130 mediate ligand-induced endocytosis and down-regulation of the IL-6 receptor. *J Biol Chem* 271, 5487-94.

Eliceiri B.P., Paul R., Schwartzberg P.L., Hood J.D., Leng J., and Cheresch D.A. (1999). Selective requirement for Src kinases during VEGF-induced angiogenesis and vascular permeability. *Mol Cell* 4, 915-24.

Ernst M., Novak U., Nicholson S.E., Layton J.E., and Dunn A.R. (1999). The carboxyl-terminal domains of gp130-related cytokine receptors are necessary for suppressing embryonic stem cell differentiation. Involvement of STAT3. *J Biol Chem* 274, 9729-37.

Ernst M., Gearing D.P., and Dunn A.R. (1994). Functional and Biochemical Association of Hck with the LIF/IL-6 Receptor Signal Transducing Subunit gp130 in Embryonic Stem Cells. *Embo J* 13, 1574-1584.

French J.D., Tschumper R.C., Isaacson J.A., Nygren E., Jelinek D.F. (1998). Dissection of the signaling requirements of IL-6-stimulated myeloma cell growth: *Blood* 92, Abstract No. 2802.

Fukada T., Hibi M., Yamanaka Y., Takahashi-Tezuka M., Fujitani Y., Yamaguchi T., Nakajima K., and Hirano T. (1996). Two signals are necessary for cell proliferation induced by a cytokine receptor gp130: involvement of STAT3 in anti-apoptosis. *Immunity* 5, 449-60.

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. *J Biol Chem* 271, 12991-12998.

Gibson R. M., Schiemann W.P., Prichard L.B., Reno J.M., Ericsson L.H., and Nathanson N.M. (2000). Phosphorylation of human gp130 at ser-782 adjacent to the Di-leucine internalization motif. Effects on expression and signaling. *J Biol Chem* 275, 22574-82.

Gluzman Y. (1981). SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. *Cell* 23, 175-82.

Gu H., Griffin J.D., and Neel B.G. (1997). Characterization of Two SHP-2-associated Binding Proteins and Potential Substrates in Hematopoietic Cells. *J. Biol. Chem.* 272, 16421-16430.

Hallek M., Bergsagel, P.L., and Anderson K. C. (1998). Multiple myeloma: increasing evidence for a multistep transformation process. *Blood* 91, 3-21.

Hallek M., Neumann C., Schäffer M., Danhauser-Riedl S., von Bubnoff N., de Vos G., Druker B.J., Yasukawa K., Griffin J.D., and Emmerich, B. (1997). Signal transduction of interleukin-6 involves tyrosine phosphorylation of multiple cytosolic proteins and activation of Src-family kinases Fyn, Hck, and Lyn in multiple myeloma cell lines. *Exp Hematol* 25, 1367-77.

Hanke J.H., Gardner J.P., Dow R.L., Changelian P.S., Brissette W.H., Weringer E.J., Pollok B.A., and Connelly P.A. (1996). Discovery of a novel, potent, and Src family-selective tyrosine kinase inhibitor. Study of Lck- and FynT-dependent T cell activation. *J Biol Chem* 271, 695-701.

Hatakeyama M., Kono T., Kobayashi N., Kawahara A., Levin S.D., Perlmutter R.M., and Taniguchi T. (1991). Interaction of the IL-2 receptor with the src-family kinase p56 lck: Identification of a novel intermolecular association. *Science* 252, 1523-1528.

He H., Venema V.J., Gu X., Venema R.C., Marrero M.B., and Caldwell R.B. (1999). Vascular endothelial growth factor signals endothelial cell production of nitric oxide and prostacyclin through flk-1/KDR activation of c-Src. *J Biol Chem* 274, 25130-5.

Helfgott D.C., May L.T., Stoeber Z., Tamm I., and Sehgal P.B. (1987). Bacterial lipopolysaccharide (endotoxin) enhances expression and secretion of beta 2 interferon by human fibroblasts. *J Exp Med* 166, 1300-9.

Hemann U., Gerhartz., Heesel B., Sasse J., Kurapkat G., Grötzinger J., Wollmer A., Zhong Z., Darnell Jr. J.E., 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. *J Biol Chem* 271, 12999-13007.

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, 1149-57.

Hideshima T., Chauhan D., Teoh G., Raje N., Treon S.P., Tai Y.T., Shima Y., and Anderson K.C. (2000). Characterization of signaling cascades triggered by human interleukin-6 versus Kaposi's sarcoma-associated herpes virus-encoded viral interleukin 6. *Clin Cancer Res* 6, 1180-9.

Ibelgaufts H. (1995). *Dictionary of Cytokines* (Weinheim: Verlag Chemie).

Ihle J.N., Witthuhn B.A., Quelle F.W., Yamamoto K., Thierfelder W.E., Kreider B., and Silvennoinen O. (1994). Signaling by the cytokine receptor superfamily: JAKs and STATs. *Trends Biochem Sci* 19, 222-7.

Janas M.L., Hodkin P., Hibbs M., Tarlington D. (1999). Genetic evidence for Lyn as a negative regulator of IL-4 signaling. *J Immunol* 163, 4192-8.

Juge-Morineau N., Mellerin, M.P., Francois S., Rapp M.J., Harousseau J.L., Amiot M., and Bataille R. (1995). High incidence of deletions but infrequent inactivation of the retinoblastoma gene in human myeloma cells. *Br J Haematol* 91, 664-7.

Kawano M., Hirano T., Matsuda T., Taga T., Horii Y., Iwato K., Asaoku H., Tang B., Tanabe O., and Tanaka H. (1988). Autocrine generation and requirement of BSF-2/IL-6 for human multiple myelomas. *Nature* 332, 83-5.

Kim H., Hawley T.S., Hawley R.G., and Baumann H. (1998). Protein Tyrosine Phosphatase 2 (SHP-2) Moderates Signaling by gp130 but Is Not Required for the Induction of Acute-Phase Plasma Protein Genes in Hepatic Cells. *Mol Cell Biol* 18, 1525-1533.

Kim H., 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(8), 5326-5338.

Kishimoto T. (1989). The biology of interleukin-6. *Blood* 74, 1-10.

Kishimoto T., Akira S., Narazaki M., and Taga T. (1995). Interleukin-6 family of cytokines and gp130. *Blood* 86, 1243-54.

Klein B. (1995). Cytokine, Cytokine Receptors, Transduction Signals, and Oncogenes in Human Multiple Myeloma. *Semin. Hematol.* 32, 4-19.

Klein B., and Bataille R. (1992). Cytokine network in human multiple myeloma. *Hematol Oncol Clin North Am* 6, 273-84.

Klein B., Zhang X.G., Lu Z.Y., and Bataille R. (1995). Interleukin-6 in human multiple myeloma. *Blood* 85, 863-72.

Koike K., Nakahata T., Takagi M., Kobayashi T., Ishiguro A., Tsuji K., Naganuma K., Okano A., Akiyama Y., and Akabane T. (1988). Synergism of BSF-2/interleukin 6 and interleukin 3 on development of multipotential hemopoietic progenitors in serum-free culture. *J Exp Med* 168, 879-90.

Kono T., Doi T., Yamada G., Hatakeyama M., Minamoto S., Tsudo M., Miyasaka M., Miyata T., and Taniguchi T. (1990). Murine interleukin2 receptor  $\beta$  chain: Dysregulated gene expression in lymphoma line EL-4 caused by a promoter insertion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 1806-10.

Lowell C.A., Fumagalli L., and Berton G. (1996). Deficiency of Src family kinases p59/61hck and p58c-fgr results in defective adhesion-dependent neutrophil functions. *J Cell Biol* 133, 895-910.

Lu Z.Y., Zhang X.G., Rodriguez C., Wijdenes J., Gu Z.J., Morel-Fournier B., Harousseau J.L., Bataille R., Rossi J.F., and Klein B. (1995). Interleukin-10 is a proliferation factor but not a differentiation factor for human myeloma cells. *Blood* 85, 2521-7.

Lütticken C., Wegenka U.M., Yuan J., Buschmann J., Schindler C., Ziemiecki A., Harpur A.G., Wilks A.F., Yasukawa K., Taga, T., et al. (1994). Association of transcription factor APRF and protein kinase Jak1 with the interleukin-6 signal transducer gp130. *Science* 263, 89-92.

Mandelli F., Avvisati G., Amadori S., Boccadoro M., Gernone A., Lauta V.M., Marmont F., Petrucci M.T., Tribalto M., Vegna M.L., et al. (1990). Maintenance treatment with recombinant interferon alfa-2b in patients with multiple myeloma responding to conventional induction chemotherapy. *N Engl J Med* 322, 1430-4.

Martens A.S., Bode J.G., Heinrich P.C., and Graeve L. (2000). The cytoplasmatic domain of the interleukin-6 receptor gp80 mediates its basolateral sorting in polarized Madin-Darby canine kidney cells. *J Cell Sci* 113, 3593-3602.

Mellstedt H., Holm G., Pettersson D., and Peest D. (1982). Idiotype-bearing lymphoid cells in plasma cell neoplasia. *Clin Haematol* 11, 65-86.



Minami Y., Kono T., Yamada K., Kobayashi N., Kawahara A., Perlmutter R.M., and Taniguchi T. (1993). Association of p56lck with IL-2 receptor beta chain is critical for the IL-2-induced activation of p56lck. *Embo J* 12, 759-68.

Molina T.J., Bachmann M.F., Kundig T.M., Zinkernagel R.M., and Mak T.W. (1993). Peripheral T cells in mice lacking p56lck do not express significant antiviral effector functions. *J Immunol* 151, 699-706.

Muraguchi A., Hirano T., Tang B., Matsuda T., Horii Y., Nakajima K., and Kishimoto T. (1988). The essential role of B cell stimulatory factor 2 (BSF-2/IL-6) for the terminal differentiation of B cells. *J Exp Med* 167, 332-44.

Murakami M., Hibi M., Nakagawa N., Nakagawa T., Yasukawa K., Yamanishi K., Taga T., and Kishimoto T. (1993). IL-6-induced homodimerization of gp130 and associated activation of a tyrosine kinase. *Science* 260, 1808-10.

Murakami M., Narazaki M., Hibi M., Yawata H., Yasukawa K., Hamaguchi M., Taga T., and Kishimoto T. (1991). Critical cytoplasmic region of the interleukin 6 signal transducer gp130 is conserved in the cytokine receptor family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 11349-53.

Nada S., Okada M., MacAuley A., Cooper J.A., and Nakagawa H. (1991). Cloning of a complementary DNA for a protein-tyrosine kinase that specifically phosphorylates a negative regulatory site of p60c-src. *Nature* 351, 69-72.

Narazaki M., Witthuhn B.A., Yoshida K., Silvennoinen O., Yasukawa K., Ihle J.N., Kishimoto T., and Taga T. (1994). Activation of JAK2 kinase mediated by the interleukin 6 signal transducer gp130. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91, 2285-9.

Neri A., Baldini L., Trecca D., Cro L., Polli E., and Maiolo A. T. (1993). p53 gene mutations in multiple myeloma are associated with advanced forms of malignancy. *Blood* 81, 128-35.

Neri A., Murphy J.P., Cro L., Feriero D., Tarella C., Baldini L., and Dalla-Favera R. (1989). Ras oncogene mutation in multiple myeloma. *J Exp Med* 170, 1715-25.

Neumann C., Zehentmaier G., Danhauser-Riedl S., Emmerich B., Hallek M. (1996). Interleukin-6 induces tyrosine phosphorylation of the Ras activating protein Shc, and its complex formation with Grb2 in the human multiple myeloma cell line LP-1. *Eur J Immunol* 26, 379-384.

Nishizumi H., Taniuchi I., Yamanashi Y., Kitamura D., Ilic D., Mori S., Watanabe T., and Yamamoto T. (1995). Impaired proliferation of peripheral B cells and indication of autoimmune disease in lyn-deficient mice. *Immunity* 3, 549-60.

Noma T., Mizuta T., Rosen A., Hirano T., Kishimoto T., and Honjo T. (1987). Enhancement of the interleukin 2 receptor expression on T cells by multiple B-lymphotropic lymphokines. *Immunol Lett* 15, 249-53.

Ogata A., Chauhan D., Teoh G., Treon S. P., Urashima M., Schlossman R.L., and Anderson K. C. (1997). IL-6 triggers cell growth via the Ras-dependent mitogen-activated protein kinase cascade. *J Immunol* 159, 2212-21.

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.

Okada M., Nada S., Yamanashi Y., Yamamoto T., and Nakagawa H. (1991). CSK: a protein-tyrosine kinase involved in regulation of src family kinases. *J Biol Chem* 266, 24249-52.

Ortega N., Hutchings H., and Plouet J. (1999). Signal relays in the VEGF system. *Front Biosci.* 4, D 141-52.

Osborne J., Moore P.S., and Chang Y. (1999). KSHV-encoded viral IL-6 activates multiple human IL-6 signaling pathways. *Hum Immunol* 60, 921-7.

Pawson T. (1995). Protein modules and signaling networks. *Nature* 373, 573-579.

Pawson T., and Gish G.D. (1992). SH2 and SH3 Domains From Structure to Function. *Cell* 71, 359-362.

Pelchen-Matthews A., Boulet I., Littman D.R., Fagard R., and Marsh M. (1992). The protein tyrosine kinase p56lck inhibits CD4 endocytosis by preventing entry of CD4 into coated pits. *J Cell Biol* 117, 279-90.

Pignata C., Prasad K.V., Hallek M., Druker B., Rudd C.E., Robertson M.J., and Ritz J. (1995). Phosphorylation of src family lck tyrosine kinase following interleukin- 12 activation of human natural killer cells. *Cell Immunol* 165, 211-6.

Pilarski L.M., and Jensen G.S. (1992). Monoclonal circulating B cells in multiple myeloma. A continuously differentiating, possibly invasive, population as defined by expression of CD45 isoforms and adhesion molecules. *Hematol Oncol Clin North Am* 6, 297-322.

Portier M., Moles J.P., Mazars G.R., Jeanteur P., Bataille R., Klein B., and Theillet C. (1992). p53 and RAS gene mutations in multiple myeloma. *Oncogene* 7, 2539-43.

Portier M., Zhang X.G., Caron E., Lu Z.Y., Bataille R., and Klein B. (1993). gamma-Interferon in multiple myeloma: inhibition of interleukin-6 (IL-6)-dependent myeloma cell growth and downregulation of IL-6-receptor expression in vitro. *Blood* 81, 3076-82.

Preudhomme C., Facon T., Zandecki M., Vanrumbeke M., Lai J.L., Nataf E., Loucheux-Lefebvre M.H., Kerckaert J.P., and Fenaux P. (1992). Rare occurrence of P53 gene mutations in multiple myeloma. *Br J Haematol* 81, 440-3.

Resh M.D. (1996). Regulation of cellular signalling by fatty acid acylation and prenylation of signal transduction proteins. *Cell Signal* 8, 403-12.

Schäffer M. (1995). Untersuchungen zur Rolle von Src-Kinasen für die Kopplung des Interleukin-6-Rezeptorkomplexes an den Ras-Signalweg. In Fakultät für Biologie (München: Ludwigs-Maximilians-Universität).

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, 557-65.

Schlaepfer D.D., and Hunter T. (1996). Evidence for in vivo phosphorylation of the Grb2 SH2-domain binding site on focal adhesion kinase by Src-family protein-tyrosine kinases. *Mol Cell Biol* 16, 5623-33.

Schlessinger J. (2000). New roles for Src kinases in control of cell survival and angiogenesis. *Cell* 100, 293-6.

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.

Schwabe M., Cox G.W., Bosco M.C., Prohaska R., and Kung H.F. (1996). Multiple cytokines inhibit interleukin-6-dependent murine hybridoma/plasmacytoma proliferation. *Cell Immunol* 168, 117-21.

Schwarze M.M., and Hawley R.G. (1995). Prevention of myeloma cell apoptosis by ectopic bcl-2 expression or interleukin 6-mediated up-regulation of bcl-xL. *Cancer Res* 55, 2262-5.

Shi Z. Q., Lu W., and Feng G.S. (1998). The Shp-2 tyrosine phosphatase has opposite effects in mediating the activation of extracellular signal-regulated and c-Jun NH2-terminal mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem* 273, 4904-8.

Sicheri F., Moarefi I., and Kuriyan J. (1997). Crystal structure of the Src family tyrosine kinase Hck. *Nature* 385, 602-609.

Simpson R.J., Hammacher A., Smith D.K., Matthews J.M., Ward L.D. (1997). Interleukin-6: structure-function relationships. *Protein Sci* 6, 929-55.

Somers W., Stahl M., and Seehra J.S. (1997). 1.9 A crystal structure of interleukin 6: implications for a novel mode of receptor dimerization and signaling. *Embo J* 16, 989-97.

Songyang Z., Shoelson S.E., Chaudhuri M., Gish G., Pawson T., Haser W.G., King F., Roberts T., Ratnoffsky S., Lechleider R.J., Neel B.G., Birge R.B., Fajardo J.E., Chou M.M., Hanafusa H., Schaffhausen B., and Cantley L.C. (1993). SH2 Domains Recognize Specific Phosphopeptide Sequences. *Cell* 72, 767-778.

Sopreno E., Savino R., Ciapponi L., Paonessa G., Cabibbo A., Lahm A., Pulkki K., Sun R-X., Toniatti C., Klein B., and Ciliberto G. (1996). Human Interleukin-6 receptor Super-Antagonists with High Potency and Wide Spectrum on Multiple Myeloma Cells. *Blood* 87, 4510-4519.

Stahl N., Farugella T.J., Boulton T.G., Ip N.Y., Davis S., Witthuhn B.A., Quelle F.W., Silvennoinen O., Barberi G., Pellegrini S., Ihle J.N., and Yancopoulos G.D. (1994). Association and activation of Jak-Tyk kinases by CNTF-LIF-OSM-IL-6  $\beta$  receptor components. *Science* 263, 92-95.

Stein P.L., Lee H.M., Rich S., and Soriano P. (1992). pp59fyn mutant mice display differential signaling in thymocytes and peripheral T cells. *Cell* 70, 741-50.

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. *Curr. Biol.* 7, 697-700.

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, 573-81.

Taguchi T., Kiyokawa N., Sato N., Saito M., and Fujimoto J. (2000). Characteristic expression of Hck in human B-cell precursors. *Exp Hematol* 28, 349.

Takahashi-Tezuka M., Yoshida Y., Fukada T., Ohtani, T., Yamanaka, Y., Nishida K., Nakajima K., Hibi M., Hirano T., (1998). Gab1 acts as an adapter molecule linking the cytokine receptor gp130 to ERK mitogen-activated protein kinase. *Mol Cell Biol* 18, 4109-17.

Takai Y., Wong G.G., Clark S.C., Burakoff S.J., and Herrmann S.H. (1988). B cell stimulatory factor-2 is involved in the differentiation of cytotoxic T lymphocytes. *J Immunol* 140, 508-12.

Takishita M., and Kosaka M. (1995). Multiple myeloma: new evidence and insights from the immunoglobulin heavy chain gene and phenotypes. *Leuk Lymphoma* 19, 395-400.

Tanaka K., Takechi M., Asaoku H., Dohy H., and Kamada N. (1992). A high frequency of N-RAS oncogene mutations in multiple myeloma. *Int J Hematol* 56, 119-27.

Tang H., Zhao Z.J., Landon E.J., and Inagami T. (2000). Regulation of calcium-sensitive tyrosine kinase Pyk2 by angiotensin II in endothelial cells. Roles of Yes tyrosine kinase and tyrosine phosphatase SHP-2. *J Biol Chem* 275, 8389-96.

Taniguchi T. (1995). Cytokine signaling through nonreceptor protein tyrosine kinases. *Science* 268, 251-5.

Tanner J.W., Chen W., Young R.L., Longmore G.D., and Shaw A.S. (1995). The conserved box 1 motif of cytokine receptors is required for association with JAK kinases. *J Biol Chem* 270, 6523-30.

Taylor C.W., Grogan T.M., and Salmon S.E. (1990). Effects of interleukin-4 on the in vitro growth of human lymphoid and plasma cell neoplasms. *Blood* 75, 1114-8.

Terstegen L., Gatsios P., Bode J.G., Schaper F., Heinrich P.C., and Graeve L. (2000). The inhibition of interleukin-6-dependent STAT activation by mitogen-activated protein kinases depends on tyrosine-759 in the cytoplasmic tail of gp130. *J Biol Chem* 275, 18810-7.

Thiel S., Behrmann I., Dittrich E., Muys L., Tavernier J., Wijdenes J., Heinrich P.C., and Graeve L. (1998). Internalization of the interleukin 6 signal transducer gp130 does not require activation of the Jak/STAT pathway. *Biochem J* 330, 47-54.

Thiel S., Sommer U., Kortylewski M., Haan C., Behrmann I., Heinrich P. C., and Graeve L. (2000). Termination of IL-6-induced STAT activation is independent of receptor internalization but requires de novo protein synthesis. *FEBS Lett* 470, 15-9.

Thomas J.W., Ellis B., Boerner R.J., Knight W.B., Withe II G.C., Schaller M.D. (1998). SH2- and SH3-mediated Interactions between Focal Adhesion Kinase and Src. *J Biol Chem* 273, 577-583.



Venkitaraman A.R., and Cowling R.J. (1992). Interleukin 7 receptor functions by recruiting the tyrosine kinase p59fyn through a segment of its cytoplasmic tail. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 12083-7.

Vescio R.A., Cao J., Hong C.H., Lee J.C., Wu C.H., Der Danielian M., Wu V., Newman R., Lichtenstein A.K., and Berenson J.R. (1995). Myeloma Ig heavy chain V region sequences reveal prior antigenic selection and marked somatic mutation but no intracлонаl diversity. *J Immunol* 155, 2487-97.

Ward L.D., Hammacher A., Howlett G.J., Matthews J.M., Fabri L., Moritz R.L., Nice E.C., Weinstock J., and Simpson R.J. (1996). Influence of interleukin-6 (IL-6) dimerization on formation of the high affinity hexameric IL-6 receptor complex. *J Biol Chem* 271, 20138-44.

Warmuth M., Bergmann M., Prieß A., Häuslmann K., Emmerich B., and Hallek M. (1997). The Src-Kinase Hck interacts with Bcr-Abl by a kinase-independent Mechanism and phosphorylates the Grb2-binding Site of Bcr. *J Biol Chem* 272, 33260-33270

Warner N.L., Moore M.A., and Metcalf D. (1969). A transplantable myelomonocytic leukemia in BALB-c mice: cytology, karyotype, and muramidase content. *J Natl Cancer Inst* 43, 963-82.

Weinberg, R.A. (1995). The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* 81, 323-330.

---

Wen Z., Thong Z., and Darnell Jr. J.E. (1995). Maximal activation of transcription by Stat1 and Stat3 requires both tyrosine and serine phosphorylation. *Cell* 82, 241-250.

Xu W., Harrison S.C., and Eck M.J. (1997). Three-dimensional structure of the tyrosine kinase c-Src. *Nature* 385, 595-601.

Yu H., Chen J. K., Feng S., Dalgarno D.C., Brauer A.W., Schreiber S.L. (1994). Structural Basis for the Binding of Proline-Rich Peptides to SH3 Domains. *Cell* 76, 933-945.

Zhang X., Blenis J., Li H.C., Schindler C., and Chen-Kiang S. (1995). Requirement of serine phosphorylation for formation of STAT-promoter complexes. *Science* 267, 1990-1994.

Zhang X.G., Klein B., and Bataille R. (1989). Interleukin-6 is a Potent Myeloma-Cell Growth Factor in Patients With Aggressive Multiple Myeloma. *Blood* 74, 11-13.

Zhao J., Zheng C., and Guan J. (2000). Pyk2 and FAK differentially regulate progression of the cell cycle. *J Cell Sci* 113, 3063-3072.

## Michael Schäffer

Stauffenbergstrasse 7

80797 München

089 7099-414 (LABOR) 0177 4007716 (mobil)

## Persönliche Angaben

Familienstand: ledig

Staatsangehörigkeit: deutsch

Alter: 32

Geburtsort: 92431 Neunburg V.W.

Eltern: Inge Schäffer, Hausfrau; Peter Schäffer, Oberstleutnant a.D.

## Ausbildung

- 1974 - 1975 Grund- und Hauptschule Algenrodt  
55743 Idar-Oberstein
- 1975 - 1978 Grundschule Adelebsen  
37139 Adelebsen
- 1978 - 1980 Otto-Hahn-Gymnasium  
37081 Göttingen
- 1980 - 1983 Käthe-Kollwitz-Schule Hannover  
30655 Hannover
- 1983 - 1987 Gymnasium Hohenschwangau  
87645 Hohenschwangau  
Abschluss der schulischen Ausbildung mit dem Ablegen der Allgemeinen Hochschulreife.
- 1987 - 1995 Ludwig-Maximilians-Universität  
80539 München  
Zweijähriges Studium der Chemie. Anschließend fünfjähriges Studium der Biologie.  
Abschluss mit den Prüfungsfächern: Mikrobiologie, Biochemie, Immunologie und Anthropologie & Humangenetik.

11/95 Abschluss des Studiums der Biologie mit dem Diplom am 6. November 1995.  
Die Diplomarbeit mit dem Titel "Untersuchungen zur Koppelung des Interleukin 6-Rezeptorkomplexes mit dem Ras-Signalweg" wurde in der Arbeitsgruppe von Prof. Hallek erstellt.

1996 - 2000

### **Doktorarbeit**

Durchführung in der Arbeitsgruppe von Prof. Hallek. Titel: Eine neue Domäne der IL-6 Rezeptorkette, gp130, vermittelt Zellwachstum und die Aktivierung der Kinasen Hck und Erk

Während dieser Zeit Leiter ein eigenen Gruppe mit zwei bis drei Mitarbeitern

1996 - 1998

Klinikum Innenstadt der LMU-München  
80336 München

1998 - 2000

Forschungszentrum der GSF für Umwelt und Gesundheit  
81377 München

1987 - 1988

### **Wehrdienst**

Ableistung des Wehrdienstes in der Sportschule der Bundeswehr bei der 2. Sportlehrkompanie in Sonthofen.

### **Sprachkenntnisse**

Englisch, Französisch

### **Patente und Veröffentlichungen**

Hallek M., Neumann C., Schäffer M., Danhauser-Riedl S., von Bubnoff N., de Vos G., Druker B.J., Yasukawa K., Griffin J.D., Emmerich B. Signal Transduction of Interleukin-6 involves Tyrosine Phosphorylation of multiple cytosolic Proteins and Activation of Src-family Kinases Fyn, Hck, and Lyn in Multiple Myeloma Cell Lines. *Experimental Hematology* 25: 1367-1377 (1997)

Michael Schäffer, Michaela Schneiderbauer, Sascha Weidler, Markus Warmuth, Gabriele de Vos, and Michael Hallek. Signaling through a novel acidic domain of gp130 mediates cell proliferation and activation of Hck and Erk Kinase. (2000, eingereicht)

1999

Internationale Patentanmeldung Nr. 199 41 897.7:

Mittel zur Hemmung der Proliferation von Zellen des Multiplen Myeloms

### Tätigkeiten neben dem Studium

Von 1990 – 1999 Mitglied des A-Nationalkaders des Deutschen-Curling-Verbandes.

Besondere Erfolge:

Olympiateilnehmer 1988 und 1998

Europameister 1992 und 1997

Weltmeisterschaften 1994 3.Platz

Weltmeisterschaften 1995 3.Platz

Weltmeisterschaften 1997 2. Platz

- 1997 Ausgezeichnet mit dem „Silbernen Lorbeerblatt“ für besondere sportliche Leistungen.
- 1999/2000 CEO des Biotechnologie Start-Ups SiREEN. Teilnahme am Münchener Businessplan Wettbewerb, dabei prämiert in der 1. und 2. Stufe und nominiert in Stufe 3.
- 2000 Seit 10/2000 gefördert durch das Bayerischen Staatsministerium für Wissenschaft, Forschung und Kunst im Rahmen des Existenzgründer-Förderprogramms „Flügge“.