

**Aus dem Biochemischen Institut der Medizinischen Fakultät  
An der Christian-Albrechts-Universität Kiel**

**Untersuchungen zur Site-III Interleukin-6-artiger Zytokine**

**Inauguraldissertation  
zur  
Erlangung der Doktorwürde  
der Medizinischen Fakultät  
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel**

**vorgelegt von**

**Wilhelm Sylvius Graf von Borries  
aus Heidelberg**

**Kiel, 2010**

1. Berichtstatter: \_\_Prof. Dr. Rose-John, Biochemisches Institut\_\_\_\_\_

2. Berichtstatter: \_\_Prof. Dr. Grötzinger, Biochemisches Institut\_\_\_\_\_

Tag der mündlichen

Prüfung: \_14.04.2011\_\_\_\_\_

Zum Druck genehmigt, Kiel,

den \_\_\_\_\_14.04.2011\_\_\_\_\_

gez. \_\_\_\_\_

## Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	3
Abkürzungsverzeichnis	5
1 Einleitung	8
1.1 Interleukin-6-artige Zytokine	8
1.1.1 Biologische Funktionen von IL-6	9
1.1.2 Pathophysiologie des IL-6	10
1.1.3 Struktur und Signaltransduktion	12
1.1.4 Transsignaling	13
1.1.5 Negative Regulation der Signaltransduktion	15
1.1.6 Lösliches gp130 als Antagonist zum Transsignaling	17
1.2 Struktur der Rezeptoren	18
2 Material und Methoden	22
2.1 Molekularbiologische Methoden	22
2.1.1 PCR-Ligations-PCR	22
2.1.2 DNA- Verdau durch Restriktionsendonukleasen	23
2.1.3 Dephosphorylierung von 5´-DNA Enden	23
2.1.4 Phosphorylierung von 5´-DNA Enden	24
2.1.5 DNA-Ligation	24
2.1.6 Die LR-Klonase Reaktion	24
2.1.7 DNA Fragmentanalyse mittels Agarosegelelektrophorese	25
2.1.8 Herstellung kompetenter Bakterien	26
2.1.9 Bakterientransformation	26
2.1.10 Plasmid DNA Präparation aus LB Schüttelkulturen	27
2.1.11 DNA Fällung	27
2.1.12 DNA Phenolextraktion	27
2.1.13 DNA Sequenzanalyse	28
2.1.14 Die Klonierung von IC15	28
2.1.15 Die Klonierung von CIR2	32
2.1.16 Die Klonierung von CIR2 <sup>Δ</sup> Ig	36
2.1.17 Bakterienstämme	36
2.1.18 Plasmide und cDNAs	36
2.1.19 Enzyme	36
2.2 Proteinbiochemische Methoden	37
2.2.1 Säugerzellen	37
2.2.2 Zellkulturmaterialien	37
2.2.3 Proteinexpression in E. coli Bakterienzellen	37
2.2.4 Proteinaufreinigung aus E. coli Bakterienzellen	38
2.2.5 Aufkonzentrierung von Proteinlösungen mittels Zentrifugalfiltrerröhrchen	38
2.2.6 Größenausschlusschromatographie	38
2.2.7 Stabile Transfektion von BaF/3-Zellen	38
2.2.8 Proliferationsversuche mit BaF/3-Zellen	39
2.2.9 Transiente Transfektion von HepG2 Zellen	39
2.2.10 Stimulation von HepG2-Zellen	39
2.2.11 Transiente Transfektion von COS-7-Zellen	39
2.2.12 Kontrolle der transienten COS-7 Transfektion	40
2.2.13 Metabolische Markierung von Proteinen mit [ <sup>35</sup> S]	40
2.2.14 Radiochemikalien	40
2.2.15 Immunpräzipitation	41
2.2.16 Natriumdodecylsulfat Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	42
2.2.17 Proteingelfärbung mit Silber	43
2.2.18 Proteingelfärbung mit Coomassie-Brilliant-Blue	44

---

2.2.19	Intensivierende Fluorographie	44
2.2.20	Röntgenfilme	44
2.2.21	CD-Spektroskopie	44
2.2.22	Chemikalien	45
3	Ergebnisse	46
3.1	Phosphorylierung des OSMR auf HepG2-Zellen durch IC7	46
3.2	Etablierung einer stabilen BaF/3-Zelllinie mit gp130, IL-6R und OSMR	47
3.3	Stimulationsversuche mit BaF/3-[gp130,IL-6R,OSMR] (GIOR-) Zellen und BaF/3-[gp130, IL-6R, LIFR] (GIRL-) Zellen	50
3.4	Stimulationsversuche mit BaF/3 [gp130, RILLIF $\Delta$ 2] Zellen	52
3.5	Klonierung der IL-6/CNTF Chimäre IC15	53
3.6	Expression von IC15 in E. coli Bakterienzellen	55
3.7	Größenausschlusschromatographie von IC15	56
3.8	CD-Spektroskopische Untersuchung von IC15	57
3.9	Die Klonierung der Rezeptorchimären CIR2 und CIR2 $\Delta$ Ig	58
3.10	Expression der Rezeptorchimären CIR2 und CIR2 $\Delta$ Ig in COS-7-Zellen	58
3.11	Coexpression von CIR2 und CIR2 $\Delta$ Ig mit gp130 und LIFR in COS-7-Zellen	59
3.12	Transfektion der Rezeptorchimären CIR2 und CIR2 $\Delta$ Ig in BaF/3-Zellen	60
4	Diskussion	61
5	Zusammenfassung	66
6	Literaturverzeichnis	67
7	Anhang	92
7.1	Danksagungen	92
8	Lebenslauf	93

## Abkürzungsverzeichnis

A	Ampere
anti-PY	Antikörper gegen phosphoryliertes Tyrosin
AP	Alkalische Phosphatase
AP-1	Activator Protein 1
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BaF/3-Zellen	murine Prä-B-Zelllinie
bp	Basenpaare
Bq	Becquerel
BSA	Bovine Serum Albumin, Rinderserumalbumin
CBM	Zytokinbindendes Modul
cDNA	Complementary DNA
Ci	Curie
CLC	Cardiotrophin-Like Factor
CLF	Cytokine -like Factor
CNTF	Ciliary Neurotrophic Factor
COS-7-Zellen	Nierenzellen der grünen Meerkatze
cpm	Counts per minute, radioaktive Entladungen pro Minute
CRP	C-reaktives Protein
CT-1	Cardiotrophin-1
DEAE	Diethylaminoethyl
DMEM	Dulbecco' s Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FCS	Fetal calf serum

---

FNIII	Fibronektin-Typ-III
g	Gramm
GFP	Green Fluorescent Protein
GH	Growth Hormone (humanes Wachstumshormon)
GIOR-Zellen	BaF/3-Zellen mit gp130, IL-6R, OSMR
GIRL-Zellen	BaF/3-Zellen mit gp130, IL-6R, LIFR
gp130	Glykoprotein 130
h	Stunde
HepG2-Zellen	Humane Hepatom Zelllinie
HHV-8	Humanes Herpesvirus-8
Ig	Immunoglobulin
IL	Interleukin
IL-6	Interleukin-6
IL-6R	Interleukin-6-Rezeptor
IL-8	Interleukin-8
IL-11	Interleukin-11
IL-11R	Interleukin-11-Rezeptor
IL-12	Interleukin-12
IL-23	Interleukin-23
IL-27	Interleukin-27
IL-31	Interleukin-31
IP	Immunpräzipitation
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid
Jak	Januskinase
kDa	Kilodalton
LIF	Leukemia Inhibitory Factor
LIFR	Leukemia Inhibitory Factor-Rezeptor
m	Milli
min	Minute
n	Nano
NF	Nuclear Factor

---

NMR	Nuclear Magnetic Resonance
NNT-1	Novel Neurotrophin-1
OD	Optische Dichte
OSM	Oncostatin M
OSMR	Oncostatin M-Rezeptor
p	Pico
PBS	Phosphate buffered Saline, Phosphatpuffer
PCR	Polymerasekettenreaktion
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PKC	Proteinkinase C
PNK	Polynukleotidkinase
RNA	Ribonukleinsäure
RNAase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
s	Sekunde
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
sCNTFR	Löslicher CNTF-Rezeptor
sIL-6R	Löslicher IL-6-Rezeptor
SN	Supernatant, Überstand
SOCS	Suppressor of Cytokine Signalling
STAT	Signal Transducer and Activator of Transcription
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TEMED	NNNN'-Tetramethyldiamin
TNF $\alpha$	Tumour Nekrose Faktor $\alpha$
U	Unit
UV	Ultraviolett
V	Volt
vIL-6	Virales Interleukin-6
$\mu$	Mikro

# 1 Einleitung

Zytokine sind lösliche, 120-200 Aminosäuren lange, tetrahelikale Proteine, welche als interzelluläre Botenstoffe wirken und an Rezeptoren der Immunglobulin-Familie binden (Rose-John, 2002). Sie moderieren verschiedene wichtige Prozesse im Immunsystem (Hurst, et al., 2001), im Nervensystem (Bolin, et al., 1995, Hirota, et al., 1996, Klein, M. A., et al., 1997, März, et al., 1999), wie auch bei der embryonalen Entwicklung (O'Shea, et al., 2002, Rose-John, 2002).

Im Allgemeinen werden Zytokine erst auf einen bestimmten Stimulus hin synthetisiert (Heinrich, et al., 1998) und nur ausnahmsweise in intrazellulären Granula oder der extrazellulären Matrix (ECM) gespeichert. Zytokine können autokrin oder parakrin wirken (Leonard, et al., 2000). Grundsätzlich sind sie bei Gesunden in sehr geringen Konzentrationen im Serum vorhanden und entfalten ihre Wirkung daher meist nur lokal (Simpson, et al., 1997). Man unterscheidet zwischen zwei Gruppen von Zytokinen: Typ-I-Zytokine (Interleukine und Colony Stimulating Factors (CSFs)) und Typ-II-Zytokine (Interferone) (Leonard, et al., 2000, Ozaki, et al., 2002, Sprang, et al., 1993). Erythropoietin (EPO), Growth Hormone (GH), Thrombopoietin und Prolaktin sind keine klassischen Zytokine, haben aber eine ähnliche Struktur und Signalisierungsmechanismen wie Typ-I-Zytokine. Das Grundverständnis für die Typ-I-Zytokin-Rezeptorinteraktionen basiert daher auch auf Vergleichen mit dem Growth Hormone (de Vos, et al., 1992). Viele Zytokine haben pleiotrope und überlappende Wirkungen, (Leonard, 1994, Metcalf, 1993) was sich einerseits aus der Fähigkeit einiger Zytokine, über verschiedene Rezeptorkomplexe zu signalisieren erklärt. Andererseits besitzen auch einige Rezeptoren die Möglichkeit, mit verschiedenen Zytokinen zu interagieren (Metcalf, 1993, Ozaki, et al., 2002).

## 1.1 Interleukin-6-artige Zytokine

Die Familie der Interleukin-6-artigen Zytokine stellt eine Gruppe neuro- und hämatopoetischer Zytokine dar, zu denen Interleukin-6 (IL-6), Interleukin-11 (IL-11), Ciliary Neurotrophic Factor (CNTF), Leukaemia Inhibitory Factor (LIF), Oncostatin M (OSM), Cardiotrophin-1 (CT-1) (Heinrich, et al., 2003), Cardiotrophin-like Cytokine (CLC) (Elson, et al., 2000, Heinrich, et al., 2003, Senaldi, et al., 1999), Interleukin-27 (IL-27) (Lucas, et al., 2003, Pflanz, et al., 2004, Pflanz, et al., 2002, Trinchieri, et al., 2003), Interleukin-31 (IL-31) (Dillon, et al., 2004) und Neuropoietin (NPN) gehören (Derouet, et al., 2004). Bei Neuropoietin handelt es sich um ein bei der Maus vorkommendes Zytokin. Zudem existiert ein, durch das humane Herpesvirus-8 (HHV-8) kodiertes, virales Interleukin-6 (vIL-6), welches ein IL-6-Analogon darstellt (Chow, et al., 2001, Molden, et al., 1997, Moore, et al., 1996, Neipel, et al., 1997).

Allen Mitgliedern der IL-6-Familie gemeinsam ist die für hämato- und neuropoetische Zytokine typische „4-Helix-Bündel“-Struktur. Hierbei sind die A- und B- sowie die C- und D-Helix jeweils über eine lange Schleife verbunden, B- und C-Helix hingegen durch eine kurze Schleife. Dies führt zur charakteristischen „up-up-down-down“-Orientierung der Helices (s. Abbildung 1). Die dreidimensionale Struktur von IL-6 wurde sowohl röntgenkristallographisch (Boulanger, et al., 2003, Somers, et al., 1997) als auch durch Magnetresonanz-(NMR)-Spektroskopie gelöst (Xu, et al., 1997).

Eine weitere Gemeinsamkeit der Interleukin-6-artigen Zytokine liegt in der Bildung multimerer Rezeptorkomplexe. In diesen ist stets das 130 kD große Glykoprotein gp130 enthalten. Gp130 wird auch als  $\beta$ -Rezeptor bezeichnet und ist auf allen Körperzellen vorhanden (Grötzinger, 2002, Grötzinger, et al., 1999).

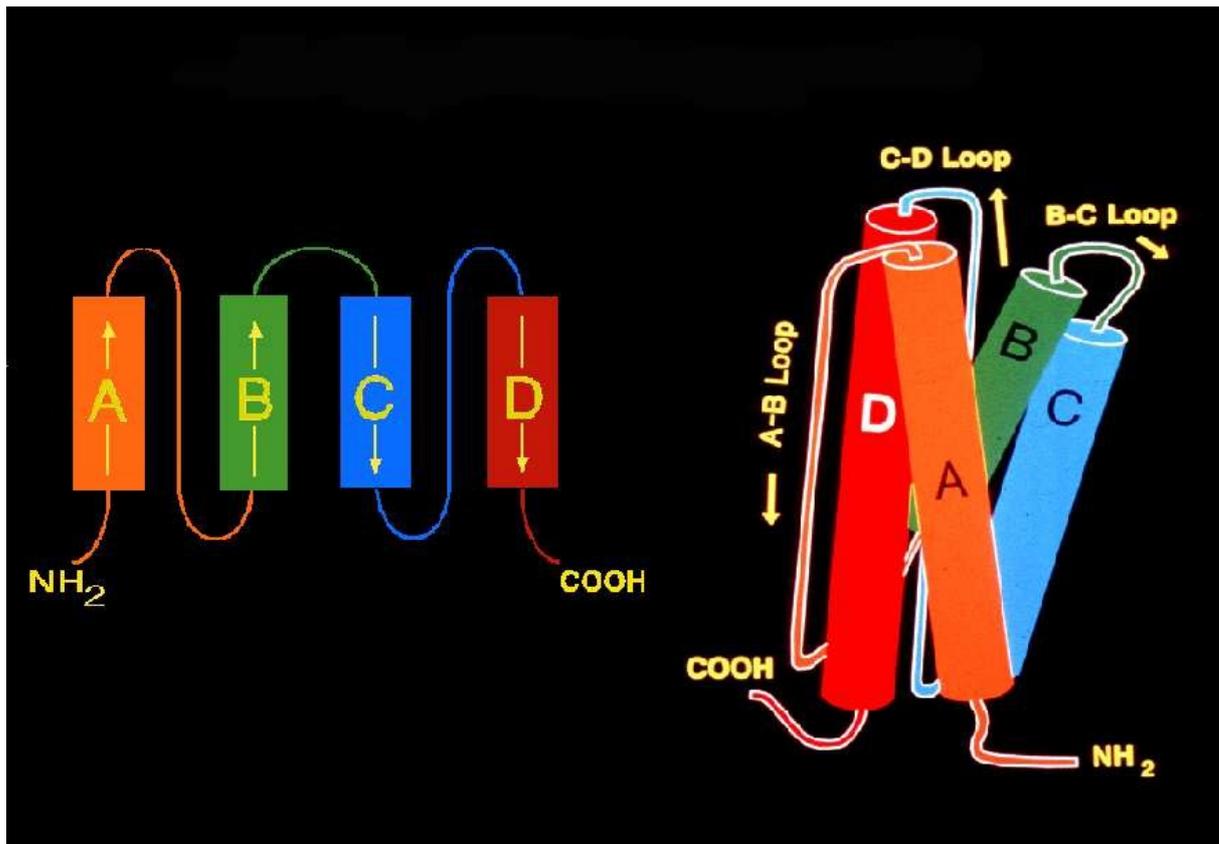


Abbildung 1. Schematische Darstellung der „4-Helix-Bündel-Zytokine“. Die Helices sind mit A, B, C und D angegeben. Sie zeigen die typische „up-up-down-down“ Topologie. Rechts im Bild ist die räumliche Orientierung der Helices dargestellt.

### 1.1.1 Biologische Funktionen von IL-6

Interleukin-6 kann von verschiedenen Zellen synthetisiert werden. Hierzu gehören Monozyten, Makrophagen, Endothelzellen, Fibroblasten, Chondrozyten, Synoviozyten, Osteoblasten, Kupfferzellen und glatte Muskelzellen. Stimulatoren für die IL-6 Synthese sind unter anderem IL-1 (Sironi, et al., 1989, Van Damme, et al., 1987), Tumor-Nekrose-Faktor- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) (Kohase, et al., 1986) und Lipopolysaccharid (LPS) (Harre, et al., 2002). Inhibitoren der IL-6 Synthese sind, neben weiteren, IL-4, IL-10 und Glucocorticoide (Heinrich, et al., 1998).

IL-6 besitzt, wie die anderen Mitglieder der Interleukin-6-Familie, ein pleiotropes Wirkungsmuster (Taga, Tetsuya, et al., 1997). Verständlich wird diese Eigenschaft durch die Möglichkeit des sogenannten Transsignaling (s. Kapitel 1.1.4.). Dies bedeutet, dass IL-6 in der Lage ist, Zellen die selbst keinen membranständigen IL-6R besitzen, über einen löslichen IL-6R zu aktivieren.

Alle Mitglieder der IL-6-Familie, insbesondere IL-6 selbst, sind Induktoren der hepatischen Akute-Phase-Reaktion (Benigni, et al., 1996, Gabay, et al., 1999, Heinrich, et al., 2003). Darüber hinaus kommt ihnen eine wichtige Funktion in der Hämatopoese (Audet, et al., 2001, Fischer, et al., 1997, Peters, Malte, et al., 1998), der Neuroentwicklung und -regeneration (Elson, et al., 2000), der Regulation des Immunsystems (Galandrini, et al., 1991, Ming, et al., 1989) sowie der Kardiogenese zu (Pennica, et al., 1995). Des Weiteren spielen IL-6, IL-11 und LIF eine Rolle im Knochenstoffwechsel (Sims, et al., 2004, Udagawa, et al., 1995).

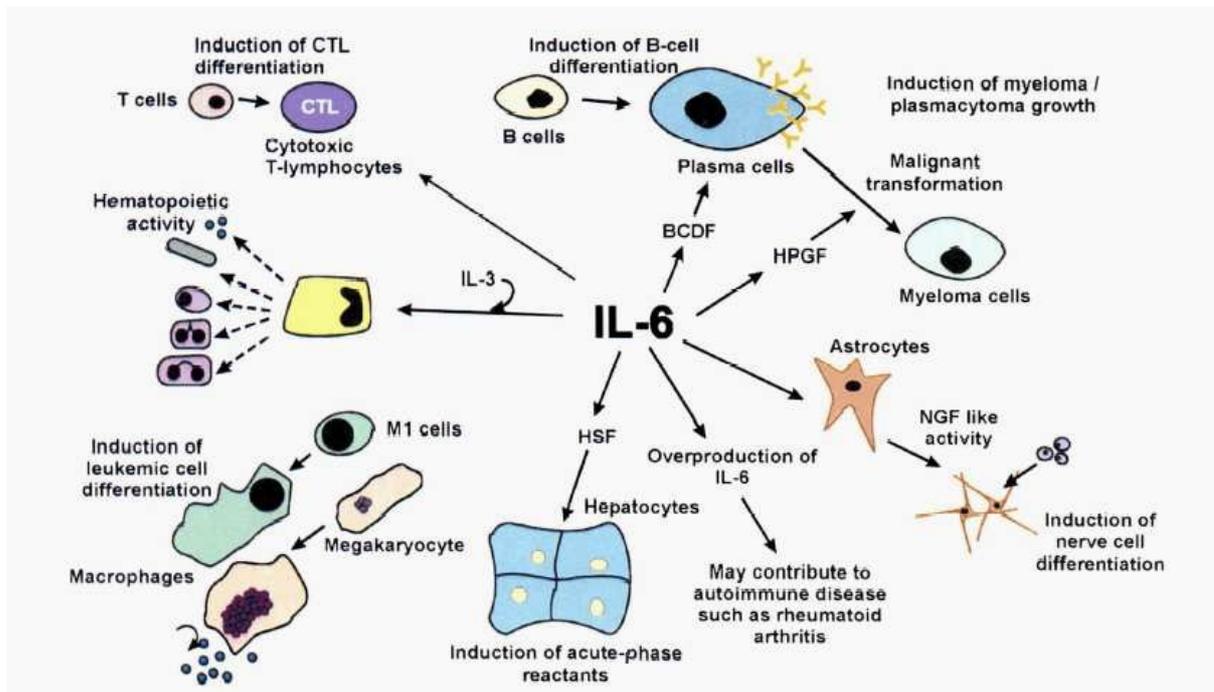


Abbildung 2. Überblick über einige der biologischen Funktionen von IL-6. (Entnommen aus Simpson, et al., 1997.)

### 1.1.2 Pathophysiologie des IL-6

Eine überraschende Vielzahl von Krankheiten ist mit der Familie der IL-6-artigen Zytokine eng verknüpft, was durch die Möglichkeit des Transsignaling verständlich wird. Hierzu gehören unter anderem das Multiple Myelom, der Morbus Crohn, die Rheumatoide Arthritis wie auch einige andere, vornehmlich Autoimmunerkrankheiten. Neuerdings finden sich zahlreiche Hinweise für eine Rolle von IL-6 im Zusammenhang mit soliden Tumoren, insbesondere dem Prostatakarzinom (Lee, et al., 2003, Nelson, et al., 2003, Zerbini, et al., 2003, Zoran Culig, 2005), dem Kolonkarzinom (Atreya, et al., 2005, Becker, et al., 2005, Clinchy, et al., 2007, Grivennikov, et al., 2009, Jones, Simon A., et al., 2005, Klouche, Mariam, et al., 2004), dem Nichtkleinzelligen Bronchialkarzinom (Dalwadi, et al., 2005, Gao, et al., 2007, Grivennikov, et al., 2008, Yeh, et al., 2006), dem hepatozellulären Karzinom (Naugler, et al., 2007, Prieto, 2008) sowie dem Mammakarzinom (Lieblein, et al., 2008, Sansone, et al., 2007, Studebaker, et al., 2008). Damit weisen alle der weltweit häufigsten malignen Tumoren Veränderungen der IL-6 abhängigen Biologie auf, die anscheinend ursächliche oder mindestens prognostische Bedeutung haben.

Tabelle 1 gibt eine Übersicht über Erkrankungen, bei denen sich veränderte Serumspiegel von IL-6 finden. (Ausführliche Darstellung der Pathophysiologie in: Kallen, K.J., et al., 1997, Kallen, K.J., et al., 1999b, Kallen, K.J., et al., 2002).

<b>Tabelle 1 : Übersicht über potenziell IL-6 abhängige Erkrankungen oder pathophysiologische Zustände</b>	
Multipl. Myelom (Plasmozytom)	(Hideshima, et al., 2004, Klein, B, et al., 1995)
Morbus Castelman	(Belec, et al., 1999, Staskus, et al., 1999)
Kaposi Sarkom	(Aoki, et al., 1999, Staskus, et al., 1999)
POEMS Syndrom	(Belec, et al., 1999, Kallen, K. J. , et al., 1997)
Primäre Erguss Lymphome	(Staskus, et al., 1999)
Morbus Crohn	(Atreya, et al., 2000, Hosokawa, et al., 1999, Jostock, et al., 2001, Yamamoto, et al., 2000)
Experimentelle Autoimmune Enzephalitis (EAE)	(Mendel, et al., 1998)
Mesangial-proliferierende Glomerulonephritis	(Horii, et al., 1989)
Rheumatoide Arthritis	(Choy, et al., 2002, Sugimoto, et al., 2005)
Morbus Still, juvenile rheumatoide Arthritis	(Choy, et al., 2002, Fishman, et al., 1998)
Osteoporose	(Hayashi, et al., 2002, Manolagas, et al., 1995)
Morbus Paget	(Hoyland, et al., 1994)
Kardiale Ischämie	(Kukielka, et al., 1995)
Wasting Syndrom von Tumor- und HIV-infizierten Patienten bzw. Patienten mit chronischen Erkrankungen	(Cahlin, et al., 2000, Emilie, et al., 1994, Inui, 1999, Kotler, 2000, Poli, et al., 1990)
Sepsis	(Riedemann, et al., 2003, Waage, et al., 1989)
Prostatakarzinom	(Giri, et al., 2001, Lee, et al., 2003, Nelson, et al., 2003, Qiu, et al., 1998, Ueda, et al., 2002, Zerbini, et al., 2003, Zoran Culig, 2005)
Systemische Sklerose	(Hasegawa, et al., 1999)
Mixed Connective Tissue Disease	(Kawaguchi, et al., 1999)
Nichtkleinzelliges Bronchialkarzinom (NSCLC)	(Dalwadi, et al., 2005, Gao, et al., 2007, Grivennikov, et al., 2008, Yeh, et al., 2006)
Kolonkarzinom	(Atreya, et al., 2005, Becker, et al., 2004, Becker, et al., 2005, Clinchy, et al., 2007, Grivennikov, et al., 2009, Jones, Simon A., et al., 2005, Klouche, Mariam, et al., 2004)
Mammakarzinom	(Lieblein, et al., 2008, Sansone, et al., 2007, Studebaker, et al., 2008)

### 1.1.3 Struktur und Signaltransduktion

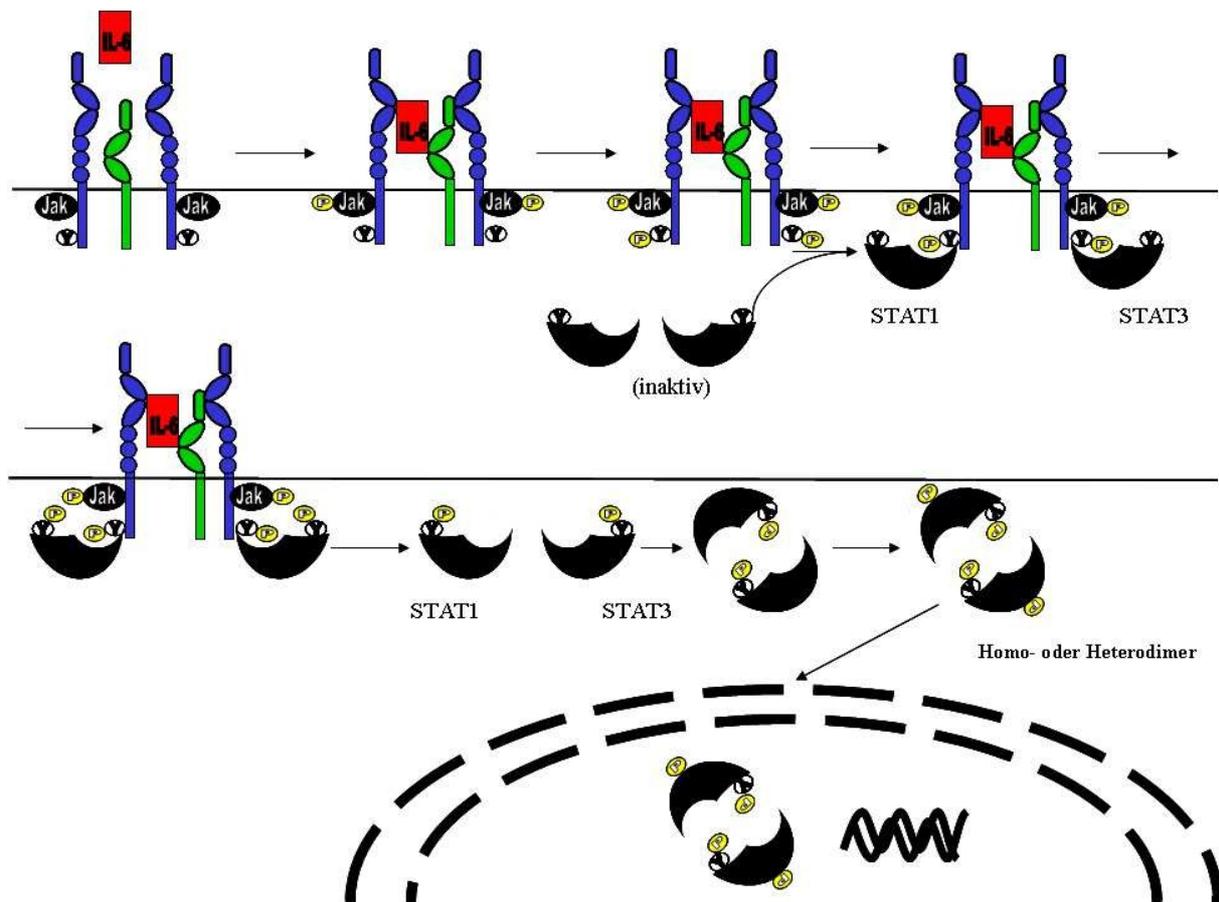
In Abhängigkeit vom jeweiligen Zytokin wird die intrazelluläre Signalkaskade entweder über ein gp130-Homodimer (IL-6, IL-11) oder ein Heterodimer aus gp130 und LIF-Rezeptor (LIFR) (LIF, OSM, CNTF, CT-1, NNT-1) aktiviert. OSM kann darüber hinaus auch ein aktives Heterodimer aus gp130 und OSM-Rezeptor (OSMR) formen.

Zur Bildung eines aktiven Rezeptorkomplexes benötigen IL-6, IL-11, CNTF, CLC und CT-1 einen spezifischen  $\alpha$ -Rezeptor, der selbst nicht an der Signaltransduktion beteiligt ist (Taga, T., et al., 1989). Erst durch die Bindung an den  $\alpha$ -Rezeptor wird bei diesen Zytokinen die Rekrutierung der beiden  $\beta$ -Rezeptoren und konsekutiv die Signaltransduktion ermöglicht. In Analogie zu IL-12 (Gubler, et al., 1991, Wolf, et al., 1991), IL-23 (Oppmann, et al., 2000) und IL-27 (Lucas, et al., 2003, Pflanz, et al., 2002, Trinchieri, et al., 2003) lassen sich die zuletzt genannten Zytokine daher auch als heterodimere Zytokine oder „composite cytokines“ verstehen. Hierbei entspricht IL-6 der Untereinheit p35 von IL-12 bzw. p19 von IL-23. Der IL-6R entspricht p40 von IL-12 (Kalai, et al., 1997). Für die genannten Zytokine gilt, dass die jeweilige Zytokineinheit allein keine biologische Aktivität aufweist. Erst durch die Interaktion zwischen Zytokineinheit und Rezeptoreinheit entsteht der biologisch aktive Komplex. Im Gegensatz zu den oben genannten Zytokinen benötigen LIF, OSM und vIL-6 keinen  $\alpha$ -Rezeptor. Sie können die  $\beta$ -Rezeptoren direkt rekrutieren (Chow, et al., 2001, Heinrich, et al., 2003, Heinrich, et al., 1998, Molden, et al., 1997). Tabelle 2 gibt einen Überblick über die Interleukin-6-artigen Zytokine und die von ihnen verwendeten Rezeptoren.

<b>Tabelle 2: Interleukin-6-artige Zytokine mit den jeweils zugehörigen Rezeptoren.</b>			
<b>Zytokin</b>	<b><math>\alpha</math>-Rezeptor</b>	<b><math>\beta_1</math>-Rezeptor</b>	<b><math>\beta_2</math>-Rezeptor</b>
IL-6	IL-6R	gp130	gp130
IL-11	IL-11R	gp130	gp130
CNTF	CNTFR	gp130	LIFR
CLC	CLF oder CNTFR	gp130	LIFR
Neuropoietin	CNTFR	gp130	LIFR
CT-1	CT-1R	gp130	LIFR
OSM	-	gp130	LIFR oder OSMR
LIF	-	gp130	LIFR
IL-27	-	gp130	WSX-1/TCCR
IL-31		IL-31RA = gp130 like Receptor (Diveu, et al., 2004)	OSMR
vIL-6	-	gp130	gp130

Die Dimerisierung der  $\beta$ -Rezeptoren führt zur Autophosphorylierung und Aktivierung der konstitutiv an die  $\beta$ -Rezeptoren gebundenen Januskinasen (JAK1, JAK2, TYK2). Die Januskinasen phosphorylieren Tyrosinreste des  $\beta$ -Rezeptors, wodurch es zur Bindung der Transkriptionsfaktoren

STAT1 und STAT3 (Signal Transducer and Activator of Transcription) kommt. Auch diese werden durch die Januskinasen phosphoryliert und somit aktiviert. Die aktivierten STAT Faktoren translozieren zum Zellkern, wo sie nach Bindung an Cytokine Responsive Elements (CREs) die Aktivität ihrer Zielgene modulieren (s. Abbildung 3) (Heinrich, et al., 2003, Heinrich, et al., 1998, Stahl, et al., 1994). Die Phosphorylierung der  $\beta$  Rezeptoren löst außerdem die Aktivierung der MAP-Kinase (Mitogen Activated Protein Kinase) aus (Heinrich, et al., 2003, Heinrich, et al., 1998). Durch die MAP-Kinase und die Januskinasen werden NF-IL-6 (Nuclear Factor IL-6) und AP-1 (Activator Protein-1) aktiviert. Diese kooperieren mit diversen anderen Transkriptionsfaktoren (Heinrich, et al., 2003, Heinrich, et al., 1998, Stephanou, et al., 1998).



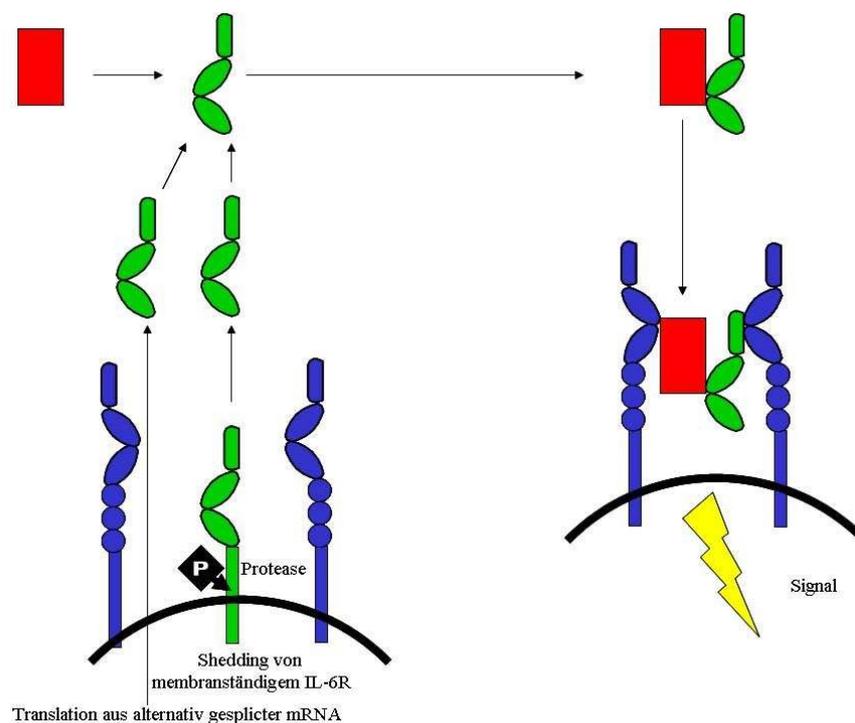
**Abbildung 3. IL-6 abhängige Signaltransduktion über gp130/Jak/STAT. IL-6 bindet zunächst an den  $\alpha$ -Rezeptor, anschließend werden die beiden  $\beta$  Rezeptoren (gp130) rekrutiert. Die Dimerisierung der  $\beta$  Rezeptoren führt zur Autophosphorylierung und Aktivierung der an sie gebundenen Januskinasen (Jak). Diese wiederum phosphorylieren Tyrosinreste des  $\beta$  Rezeptors, wodurch es zur Bindung der Transkriptionsfaktoren STAT1 bzw. STAT3 kommt. Auch diese werden von den Januskinasen phosphoryliert und somit aktiviert. Die aktivierten STAT-Faktoren bilden Homo- oder Heterodimere und translozieren zum Zellkern, wo sie die Aktivität ihrer Zielgene modulieren.**

#### 1.1.4 Transsignaling

Der membranständige IL-6R wird lediglich auf einer kleinen Anzahl von Zellen exprimiert. Dies sind im Wesentlichen Hepatozyten, Neutrophile Granulozyten, Monozyten/Makrophagen und einige Lymphozyten (Yamasaki, et al., 1988). Gp130 ist dagegen auf allen Zellen vorhanden. Neben der Möglichkeit, über den membranständigen  $\alpha$ -Rezeptor zu binden, hat IL-6 auch noch die Fähigkeit Zellen, die keinen IL-6R exprimieren, über einen löslichen IL-6R (sIL-6R) zu stimulieren (s. Abbildung 4). Dieser Vorgang wird als „Transsignaling“ bezeichnet (Rose-John, et al., 1994)

und bedeutet einen Unterschied zu vielen löslichen Zytokinrezeptoren, die als Antagonisten zu ihrem Zytokin wirken. Weitere agonistisch wirksame lösliche Rezeptorformen sind unter anderem auch für den IL-11R (Baumann, et al., 1996) sowie den CNTFR (Davis, et al., 1993) bekannt.

Erst durch die Möglichkeit des Transsignaling wird die enorme Vielfalt der IL-6 abhängigen physiologischen- wie auch pathophysiologischen Prozesse verständlich (Jones, Simon A., et al., 2005, Kallen, K. J., 2002). So kommt es zum Beispiel über Transsignaling zur Aktivierung glatter Muskelzellen, obwohl diese normalerweise nicht durch IL-6 stimulierbar sind. Dieser Prozess spielt eine mögliche Rolle bei Vaskulitiden, Atherosklerose oder der Transplantatabstoßung, also in Entzündungsreaktionen, bei denen das Gefäßsystem eine entscheidende Rolle spielt (Klouche, M., et al., 1999).



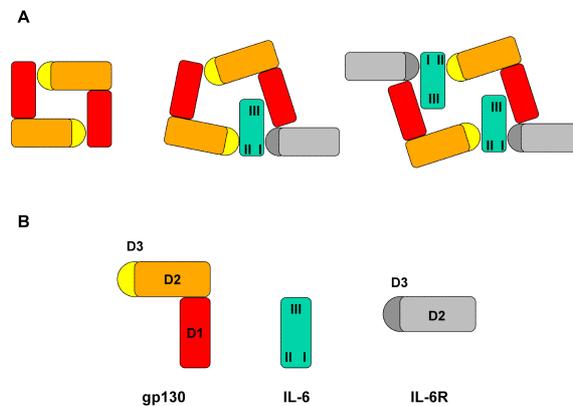
**Abbildung 4.** Die Abbildung zeigt das so genannte „Transsignaling“. Hierdurch können Zellen stimuliert werden, die selbst über keinen membranständigen IL-6-Rezeptor verfügen. Der lösliche IL-6R kann entweder von der Zelloberfläche abgespalten werden („Shedding“) oder durch alternatives Splicing erzeugt werden.

Der sIL-6R entsteht entweder durch alternatives Splicing oder durch proteolytische Spaltung von der Zelloberfläche. Die proteolytische Spaltung wird u.a. durch Proteinkinase C (PKC) Aktivierung beeinflusst. Der durch alternatives Splicing entstandene sIL-6R wird auch als DS-sIL-6R bezeichnet, der durch proteolytische Spaltung als PS-sIL-6R (Jones, Simon A., et al., 2001). Beide Formen kommen abhängig vom Alter, dem entzündlichen Zustand und dem Stadium einer Erkrankung in unterschiedlicher Menge im Serum vor (Jones, S. A., et al., 2002).

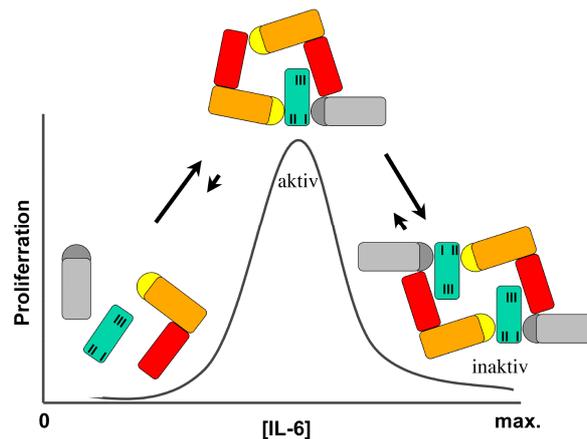
### 1.1.5 Negative Regulation der Signaltransduktion

Als Indiz für die enorme Wirkungsstärke der Zytokinstimulation steht dieser ein umfangreicher Mechanismus zur Antagonisierung entgegen. Die negative Regulation der Signaltransduktion von IL-6 wird auf unterschiedlichen Ebenen und über verschiedene Mechanismen realisiert: Erstens auf extrazellulärer Ebene, zweitens auf Membranebene und zuletzt auch im Bereich der intrazellulären Signaltransduktion.

Die Bildung des Rezeptorkomplexes scheint, ähnlich wie bei Insulin (De Meyts, 1994), eine selbstinhibitorische Wirkung als Antwort auf einen Überschuss von IL-6 zu haben. Einer Hypothese nach wird bei niedrigen Konzentrationen von IL-6 ein aktiver tetramerer Komplex gebildet, während hohe Konzentrationen zur Bildung eines inaktiven Hexamers führen (s. Abbildung 5.) (Grötzinger, et al., 1999, Kallen, K. J., 2002, Schroers, et al., 2005).

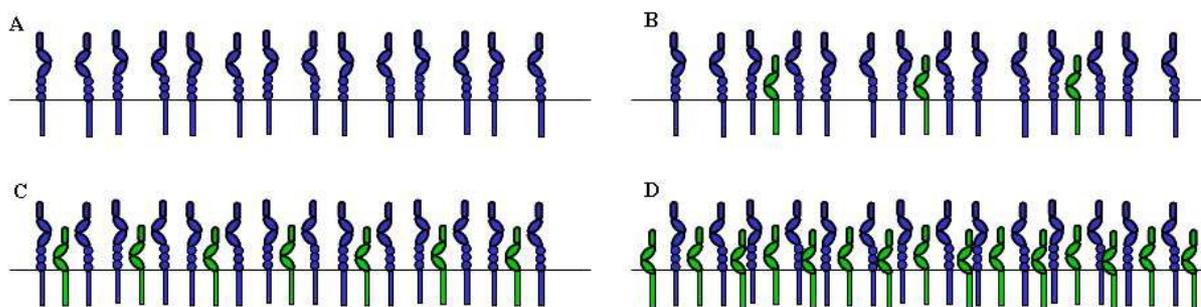


**Abbildung 5. Modell des Tetramer-Hexamer Übergangs des IL-6-Rezeptorkomplexes.** (A) Modell der Interaktion des IL-6/IL-6R-Komplexes mit gp130. Voraussetzung des Modells ist ein symmetrisches, präformiertes gp130-Homodimer in der Plasmamembran (links). An dieses bindet zunächst nur ein IL-6/IL-6R-Komplex, wodurch ein Tetramer gebildet wird (Mitte). Dieses bindet dann einen weiteren IL-6/IL-6R-Komplex, wodurch ein Hexamer entsteht (rechts). Die drei NH<sub>2</sub>-terminalen gp130 Domänen sind rot (D1, Ig-artige Domäne), gelb (D2) und orange (D3) markiert. Die beiden Domänen des IL-6R-CBM sind hellgrau (D2) und dunkelgrau dargestellt (D3). IL-6 ist grün markiert. Die Rezeptor-Bindungs epitope (Site I-III) des IL-6-Rezeptors sind mit I, II und III gekennzeichnet. (B) Darstellung der für gp130, IL-6 und IL-6R benutzten Symbole. (Abbildung übernommen aus Grötzinger, et al., 1999).



**Abbildung 6. Bildung eines tetrameren oder hexameren IL-6-Rezeptorkomplexes in Abhängigkeit von der IL-6 Konzentration.** Die Kurve ist eine schematische Darstellung der von Aarden (Aarden, 1989) gefundenen Beziehung zwischen der Proliferation muriner B9-Zellen und der verwendeten Konzentration von IL-6. Die Symbole wurden wie in Abbildung 5. verwendet. (Abbildung übernommen aus Grötzinger, et al., 1999) .

Außerdem bestimmt das Verhältnis zwischen IL-6R und der Anzahl der auf der Zelloberfläche exprimierten gp130 Moleküle, ob eine Zelle durch IL-6 stimulierbar ist oder nicht: Man geht davon aus, dass gp130 auf allen Zellen vorkommt und die Expression keiner wesentlichen Regulation unterliegt (Taga, Tetsuya, et al., 1997). Der IL-6R dagegen wird nur auf bestimmten Zellen exprimiert und seine Expression wird von Glucocorticoiden reguliert (Rose-John, et al., 1990). Das Verhältnis von gp130 zu IL-6R kann somit von Zelltyp zu Zelltyp unterschiedlich sein. Zellen, die keinen membranständigen IL-6R besitzen, können nur durch die Kombination aus IL-6 und dem löslichen IL-6R (sIL-6R) stimuliert werden. Eine Stimulation durch IL-6 allein ist nicht möglich. Beispiele hierfür sind hämatopoetische Vorläuferzellen (Peters, M., et al., 1997), Endothelzellen (Romano, et al., 1997), neuronale Zellen (März, et al., 1998) und Osteoklasten (Yasuda, et al., 1998). Die IL-6-abhängige Stimulierbarkeit von Zellen, die weniger IL-6R als gp130 exprimieren, kann durch sIL-6R gesteigert werden. Beispiele für solche Zellen sind Hepatozyten und Plasmazytomzellen. Auf Zellen, die IL-6R und gp130 in ausgeglichenem Verhältnis exprimieren, ergibt sich keine Veränderung durch Zugabe von sIL-6R. Schließlich wäre auch eine Hemmung durch sIL-6R denkbar, wenn auf der Zellmembran relativ mehr IL-6R als gp130 exprimiert würden, da dann vermehrt inaktive Komplexe mit lediglich einem gp130 entstehen würden (s. Abbildung 7) (Peters, Malte, et al., 1998).



**Abbildung 7.** Das Verhältnis zwischen gp130 und IL-6R auf der Zelloberfläche bestimmt, ob eine Zelle durch IL-6 stimulierbar ist. (A) Ohne IL-6R ist eine Stimulation durch IL-6 alleine nicht möglich. Diese Zellen sind jedoch durch IL-6/sIL-6R stimulierbar. (B) Die Stimulierbarkeit von Zellen, die relativ weniger IL-6R als gp130 exprimieren, kann durch IL-6/sIL-6R gesteigert werden. (C) Bei Zellen, die gp130 und IL-6R in ausgeglichenem Verhältnis exprimieren, ergibt sich kein Unterschied durch Zugabe von sIL-6R. (D) Auch wäre eine Hemmung durch sIL-6R denkbar, wenn relativ mehr IL-6R als gp130 exprimiert würde.

Durch gp130-abhängige Internalisierung des IL-6R kommt es zur Verminderung der Rezeptordichte (Dittrich, et al., 1996, Heinrich, et al., 1998). Die Dephosphorylierung stellt einen Mechanismus zur Inaktivierung der STAT-Faktoren dar (Haspel, et al., 1999, Heinrich, et al., 1998, ten Hoeve, et al., 2002). Zudem wurde die Entdeckung eines als PIAS3 (Protein Inhibitor of Activated STAT3) bezeichneten Proteins beschrieben (Chung, et al., 1997). Dieses blockiert die Bindung von aktiviertem STAT3 an DNA und verhindert die STAT3 abhängige Genaktivierung. Vermutlich existieren auch für die anderen STAT-Faktoren solche spezifischen Proteine (Liu, et al., 1998). Ein weiterer Mechanismus der negativen Rückkopplung besteht in der IL-6-abhängigen Expression der Suppressor-Of-Cytokine-Signalling Proteine (SOCS). Diese auch als Jak-Binding-Proteins (JAB) oder STAT-induced-STAT-inhibitors (SSIs) bezeichneten Faktoren stellen eine Familie von negativen Rückkopplungsinhibitoren dar, da ihre Transkription von IL-6 bzw. LIF induziert wird. Sie inhibieren die Tyrosinphosphorylierung von gp130, STAT1 und STAT3 (Heinrich, et al., 2003, Ilangumaran, et al., 2004, Wormald, et al., 2004).

### 1.1.6 Lösliches gp130 als Antagonist zum Transsignaling

Die durch den Komplex aus IL-6 und sIL-6R vermittelte Signalübertragung wird durch eine lösliche Form des gp130 (sgp130) kompetitiv antagonisiert (Müller-Newen, et al., 1998). Bemerkenswerterweise inhibiert sgp130 aber nicht die über den membranständigen IL-6R zustandekommende Wirkung (Jostock, et al., 2001). Der IL-6-Spiegel im Serum ist bei Gesunden kaum nachweisbar (<1pg/ml) und erreicht bei manchen Krankheiten einen um das 1000-fache erhöhten Spitzenwert von bis zu 5 ng/ml. Dies liegt in einem Bereich der maximalen Aktivität von IL-6 bei in vitro Versuchen (Kallen, K. J., 2002). Die Normalwerte von sIL-6R im Plasma liegen zwischen 75 und 80 ng/ml bei gesunden Testpersonen (Honda, et al., 1992, Montero-Julian, 2001) und sind bei zahlreichen Erkrankungen erhöht (Jones, S. A., et al., 2002). Allerdings steigen die Plasmaspiegel von sIL-6R und sgp130 zwischen Gesunden und Kranken lediglich ungefähr um den Faktor 2 (Gustot, et al., 2005, Montero-Julian, 2001). Einfache physikalisch-chemische Überlegungen zeigen, dass selbst bei sehr hohen IL-6-Spiegeln (5 ng/ml) über 98 % der IL-6/sIL-6R Komplexe als inaktive Komplexe mit sgp130 vorliegen (Kallen, K. J., 2002).

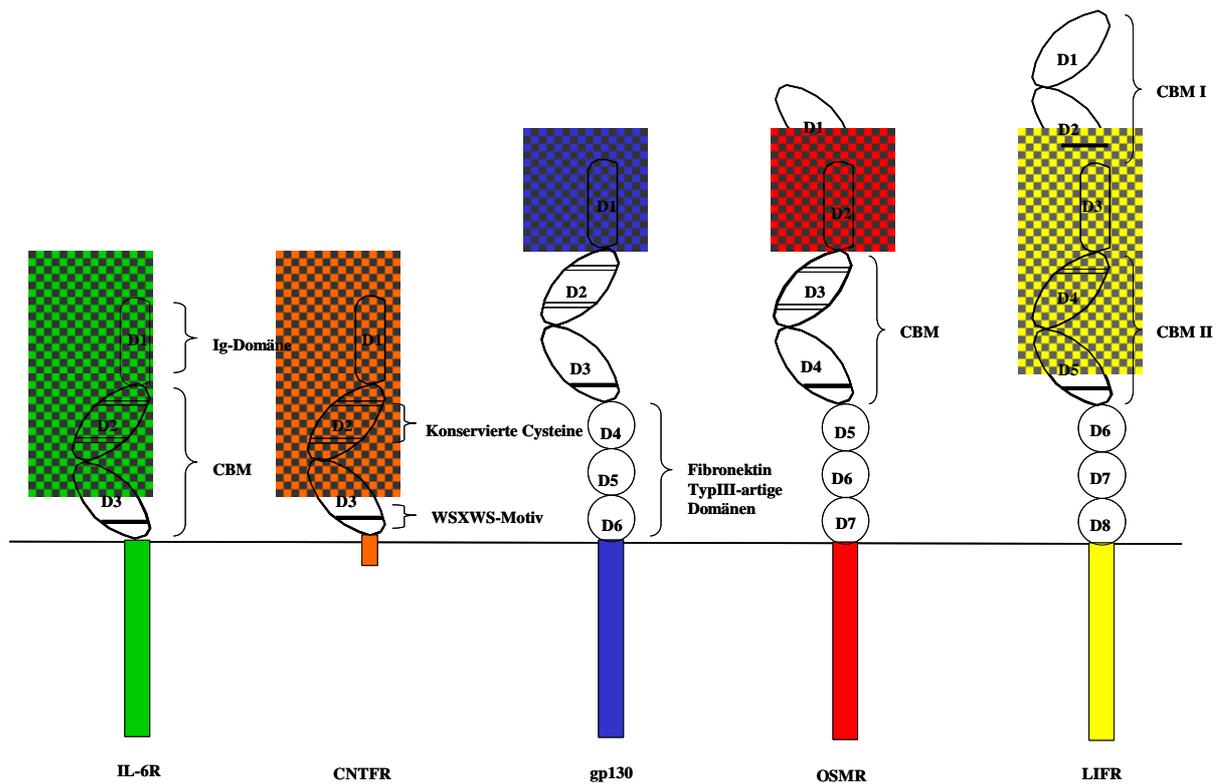
## 1.2 Struktur der Rezeptoren

Die  $\alpha$ -Rezeptoren von IL-6, IL-11 und CNTF gehören zur Superfamilie der hämatopoetischen Rezeptoren. Sie bestehen aus zwei Fibronectin-Typ-III (FNIII)-artigen Domänen, die die Kriterien der Zytokinrezeptor-Homologie-Region erfüllen: die N-terminale Domäne (D2) weist vier konservierte Cysteine, die C-terminale (D3) ein WSXWS (Trp-Ser-beliebig-Trp-Ser)-Motiv auf (Bazan, 1990a, 1990b, Idzerda, et al., 1990). Domäne-2 (D2) und 3 (D3) bilden das Zytokinbindende Modul (CBM). Das Zytokinbindende Modul stellt die minimale und ausreichende Struktur für viele Zytokinrezeptoren dar.

Wie für den IL-6-  $\alpha$ -Rezeptor (gp 80) gezeigt werden konnte, ist die C-terminale Domäne D3 für ca. 90 % der Bindungsaktivität verantwortlich. Allerdings vermag diese Domäne allein nicht den  $\alpha$ -Rezeptor zu ersetzen, da es zwar zur Bindung, nicht aber zur Signaltransduktion kommt (Özbek et al. 1998). Somit scheint D2 eine essentiell wichtige Rolle bei der Initiierung des aktiven Rezeptorkomplexes zuzukommen. Eine dritte, Ig-artige Domäne (D1), befindet sich N-terminal. Sie ist für das Zustandekommen eines funktionellen Rezeptorkomplexes nicht wichtig (Yawata, et al., 1993), spielt aber für die Stabilisierung des Rezeptors während des intrazellulären Transportes sowie für das so genannte Shedding eine Rolle (Vollmer, et al., 1999).

Die  $\beta$ -Rezeptoren der IL-6-artigen Zytokine (gp130, LIFR, OSMR) besitzen ebenfalls eine Ig-Domäne und ein zytokinbindendes Modul (CBM). Darüber hinaus verfügen sie, im Gegensatz zu den  $\alpha$ -Rezeptoren, über drei weitere FNIII-artige Domänen zwischen dem C-terminalen CBM und der Transmembranregion sowie eine zytoplasmatische Domäne mit sieben Tyrosinresten in konservierten Sequenzmotiven, die Box 1-3 genannt werden (Grötzinger, et al., 1999, Heinrich, et al., 1998).

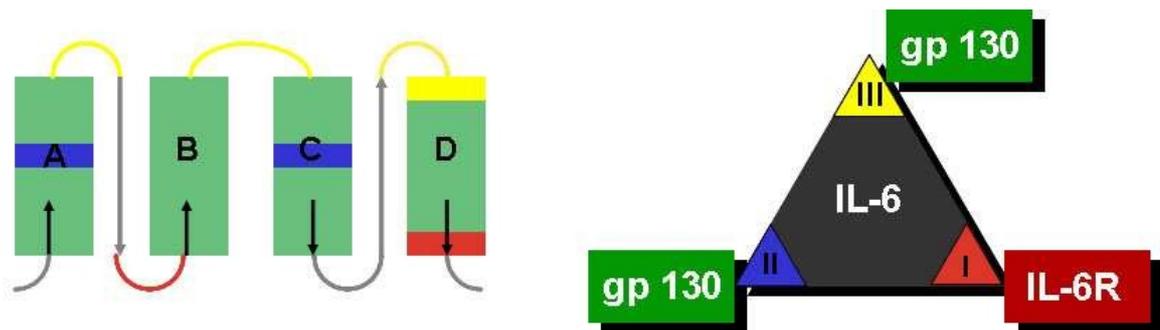
Die drei membran-proximalen FNIII-artigen Domänen der  $\beta$ -Rezeptoren sind nicht an der Signaltransduktion beteiligt. Mutationen oder Austausch mit anderen FNIII-artigen Domänen können aber zum Verlust ihrer Aktivität führen (Hammacher, et al., 2000, Kurth, et al., 2000). Der LIFR verfügt über ein zweites CBM, NH<sub>2</sub>-terminal der Ig-artigen Domäne. Der OSMR hingegen hat lediglich eine zusätzliche Domäne mit WSXWS-Motiv am NH<sub>2</sub>-Terminus (Grötzinger, et al., 1999).



**Abbildung 8.** Die Abbildung zeigt die verschiedenen Rezeptoren der IL-6-Familie. Die Ig-artigen Domänen sind kariert. Die Fibronektin-Typ-III-artigen Domänen sind als Kreise dargestellt. Die horizontalen Linien in den CBMs stellen die konservierten Cysteine (dünne Doppel-Linien) bzw. das WSXWS-Motiv (dicke Linien) dar.

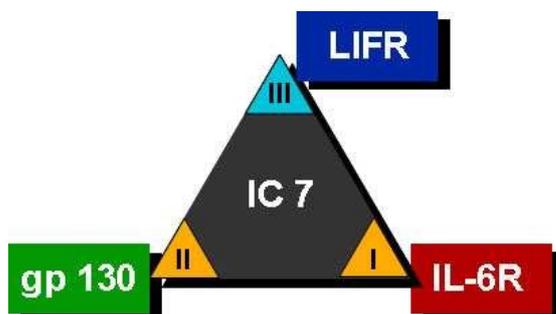
Extensive Mutationsstudien mit IL-6, CNTF und LIF zeigten, welche Epitope dieser Zytokine welche Untereinheiten der Rezeptorkomplexe kontaktieren (Aasland, et al., 2002, Aasland, et al., 2003, Ehlers, et al., 1995, Ehlers, et al., 1994, Ehlers, et al., 1996, van Dam, et al., 1993).

Die Bindung eines spezifischen  $\alpha$ -Rezeptors über Site-I ist bei verschiedenen Zytokinen der IL-6-Familie Voraussetzung für die Rekrutierung der beiden  $\beta$ -Rezeptoren. Site-II dient in allen IL-6-artigen Zytokinen zur Rekrutierung von gp130. Über Site-III kommt es, abhängig vom Zytokin, zur Bindung eines weiteren gp130 oder alternativen  $\beta$ -Rezeptors (LIFR, OSMR) (Grötzinger et al. 1997). Interessanterweise wird die Bindung zwischen Site-III und dem LIFR bzw. gp130 hauptsächlich über die Ig-artige Domäne realisiert, während die Bindung zwischen gp130 und Site-II vor allem über das Zytokinbindende Modul zustande kommt. Die Bindung von LIF an den LIFR konnte 2007 von Huyton et al. röntgenkristallographisch dargestellt werden (Huyton, et al., 2007). Site-III vermittelt demnach einen wichtigen Teil der Spezifität der IL-6-artigen Zytokine.



**Abbildung 9.** Links abgebildet ist ein Balkenmodell von IL-6. Die Bindungsepitope sind wie folgt markiert: Site-I orange, Site-II blau, Site-III gelb. Site-III ist wiederum in die 3 Bereiche A, B und C unterteilt: Teil A entspricht dem Anfang der AB-Schleife, Teil B der BC-Schleife, Teil C dem Ende der CD-Schleife und einem Teil der D-Helix. Rechts im Modell ist die Bindung zwischen den einzelnen Epitopen und den jeweiligen Rezeptoren dargestellt.

Wie in einer früheren Arbeit gezeigt werden konnte, stellt dieses spezifitätvermittelnde Bindungsepitop ein potenziell austauschbares Modul dar: IC7 ist ein auf IL-6 basierendes Designerzytokin. Durch den Austausch der Site-III von IL-6 gegen die Site-III von CNTF entstand ein neues Zytokin mit veränderten Eigenschaften: IC7 bindet weiterhin an den IL-6R, bildet aber im Gegensatz zu IL-6 ein aktives Heterodimer aus gp130 und LIFR (s. Abbildung 9).



**Abbildung 10.** IC7 bindet an den IL-6R und bildet ein aktives Heterodimer aus gp130 und LIFR.

Auf Zellen, die den IL-6R sowie gp130 und LIFR exprimieren, hat IC7 eine vergleichbare Aktivität zu IL-6. Dagegen ist es nicht aktiv auf Zellen, die zwar gp130, aber keinen IL-6R bzw. keinen LIFR exprimieren. Dies steht in Analogie zu CNTF, das für volle Aktivität auf die Präsenz seines spezifischen  $\alpha$ -Rezeptors wie auch des spezifischen  $\beta$ -Rezeptors (LIFR) angewiesen ist. Zellen, die lediglich CNTFR und gp130 exprimieren, sind durch CNTF nicht stimulierbar (Kallen, K. J., et al., 1999a). Somit scheint Site-III von CNTF ein LIFR-spezifisches Bindungsepitop darzustellen, das auf IL-6 übertragbar ist. Im Unterschied zu den anderen, über ein Heterodimer aus LIFR und gp130 signalisierenden Zytokinen der IL-6-Familie, kann OSM zusätzlich ein alternatives Heterodimer aus gp130 und OSMR bilden. Dies zeigt, dass die Bindung zwischen Site-III und dem  $\beta$ -Rezeptor nicht notwendigerweise absolut spezifisch ist.

Fragestellung:

In der vorliegenden Arbeit sollte geklärt werden, ob mit der Übertragung der Site-III von CNTF auf IL-6 auch deren Spezifität gegenüber dem LIFR erhalten bleibt. Eine Spezifitätserweiterung gegenüber weiteren  $\beta$ -Rezeptoren erschien aufgrund der oben ausgeführten experimentellen

Befunde im Bereich des Möglichen. Ferner sollten die Faktoren, die die Spezifität der Bindung zwischen Liganden und Rezeptoren der IL-6-Familie bestimmen, weiter analysiert werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Molekularbiologische Methoden

#### 2.1.1 PCR-Ligations-PCR

Die Klonierung der Konstrukte IC15 sowie CIR2 mittels PCR-Ligations-PCR wurde nach dem Protokoll von Ali und Steinkasserer (Ali, et al., 1995) durchgeführt.

Sämtliche Reaktionen wurden in 250 µl Reaktionsgefäßen in einem Gesamtvolumen von 50 µl wässriger Lösung nach folgendem Schema durchgeführt:

1-5	ng	Template (DNA)
250	µM	sense Primer
250	µM	antisense Primer
je 12,5	pmol	der vier Desoxynukleotide
5	µl	10-fach Polymerase Puffer
1	U	Polymerase
ad 50	µl	H <sub>2</sub> O

Mit diesem Ansatz wurden 25 Reaktionszyklen nach folgendem Programm durchgeführt:

Schritt	Zeit	Temperatur
Erste Denaturierung	300 s	95 °C
Primer Hybridisierung	45 s	47-63 °C
DNA-Strangsynthese	45 s	72 °C
Denaturierung	45 s	95 °C
Letzte DNA-Strangsynthese	180 s	72 °C

Hierbei wurde die Hybridisierungstemperatur der einzelnen Reaktionen nach den verwendeten Oligonukleotiden variiert.

**Verwendete PCR-Primer:**

Template DNA	Name des Primers	Primer in sense Richtung	Primer in antisense Richtung
CNTF	SB100		5'-cat ccc atc cgc aga gtc c-3'
CNTF	SB200	5'-cca gtg gca agc act gat c-3'	
CNTF	SB300		5'-acg aag gtc atg gat gg-3'
CNTF	SB400		5'-tcg ctc tgc ctc ggt cag-3'
IL-6	SB500	5'-ctg gtg aaa atc atc act gg-3'	
IL-6	SB600		5'-cta cat ttg ccg aag agc-3'
IL-6R	SB700	5'- gga atc ttg cag cct gat c-3'	
CNTFR	SB800		5'-gaa ctc gtc aaa ggt gat ag-3'
pSVL	SB900	5'-gct cta aac cgg atc gat c-3'	
	pCDM8-rp		5'-cca cag aag taa ggt tcc tt -3'
	T7 Forward	5'-taa tac gac tca cta tag gg-3'	
CNTFR	SB101	5'-gct caa cgg ctc tca gct gg-3'	
IL-6R	SB201		5'-ctg gca tct ggt cgg ttg tgg-3'
CNTFR	SB101	5'-gct caa cgg ctc tca gct gg-3'	

**2.1.2 DNA- Verdau durch Restriktionsendonukleasen**

Alle Restriktionsverdaus doppelsträngiger DNA wurden mit dem vom Hersteller beigegebenen, für das Enzym spezifischen Puffer, bei 37 °C für 1-12 Stunden nach folgendem Schema durchgeführt.

0,1 – 5 µg	DNA
20 mM	Spermidin
s.o.	Restriktionsendonuklease
1/10 des Endvolumens	10-fach konzentrierter Reaktionspuffer
ad H <sub>2</sub> O auf 20 - 50 µl	Gesamtvolumen

Für einen vollständigen Verdau wurden dabei die Enzymmenge und die Inkubationsdauer so gewählt, dass das Produkt aus Enzymaktivität (units) und Zeit (h) größer oder gleich dem 10-fachen der DNA-Menge (µg) war.

**2.1.3 Dephosphorylierung von 5'-DNA Enden**

Vor der Ligation zweier DNA-Fragmente zu einem zirkulären Plasmid wurde das jeweils längere mit Alkalischer Phosphatase (CIAP, Fermentas), am 5'-Ende dephosphoryliert, um eine Religation zu verhindern:

1-2	µg	DNA
1	U	Alkalische Phosphatase
10	µl	10-fach konzentrierter AP-Puffer
ad 100	µl	H <sub>2</sub> O

Temperatur 37 °C, Zeit: 30 Minuten.

Anschließend wurde die Alkalische Phosphatase, durch Erhitzung der Probe auf 85 °C für 15 Minuten, inaktiviert.

### 2.1.4 Phosphorylierung von 5'-DNA Enden

Da DNA-Ligasen phosphorylierte 5'-Enden für eine Ligation benötigen, wurden für die weiteren Klonierungsschritte die 5'-Enden der PCR-Fragmente mittels T4-Polynukleotidkinase (PNK) phosphoryliert.

0,5	µg	PCR-DNA
5	U	T4-PNK
3	µl	10-fach PNK-Puffer
3	µl	ATP (20 mM)
ad 30	µl	H <sub>2</sub> O

Der Ansatz wurde 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die DNA durch Zugabe von zweifachem Volumen Ethanol und 1/10 Volumen 3 M Natrium-Acetat für 2 Stunden bei -20 °C gefällt. Anschließend wurde der Ansatz bei 13.000 rpm abzentrifugiert, zweimal mit 70 % Ethanol gewaschen, bei 37 °C getrocknet und in 250 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen.

### 2.1.5 DNA-Ligation

Dephosphorylierte Vektoren und phosphorylierte Inserts wurden durch ein Agarosegel aufgetrennt und aus demselben ausgeschnitten. Die DNA wurde dann unter Verwendung des QIAEX-Kits (Fa. Qiagen, Hilden) nach Anleitung des Herstellers aus dem Gel extrahiert.

Die Ligrationsreaktionen wurden nach folgendem Schema angesetzt:

100	ng	Vektor- DNA
in 3-5-fachem Überschuss zur Vektor DNA		Insert-DNA
1	µl	10-fach Ligationpuffer
10	U	T4-DNA-Ligase
ad 10	µl	H <sub>2</sub> O

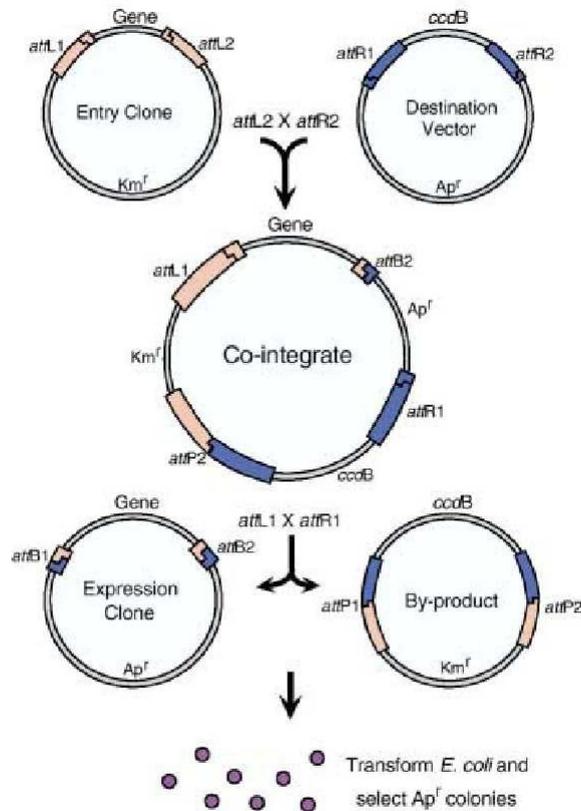
Als Kontrolle diente ein Ansatz ohne Insert-DNA. Für Vektoren, die mit nur einem Enzym geschnitten wurden, dienten drei Ansätze ohne Insert-DNA als Kontrolle: einer ohne Enzymzusatz, einer mit Ligase sowie einer mit Ligase und Polynukleotidkinase. Erstere durften als Negativkontrollen keine Kolonien liefern. Letzterer diente als Positivkontrolle. Die Inkubation der Ligationansätze erfolgte bei 22 °C für 2 Stunden bzw. bei 16 °C für 12 Stunden.

### 2.1.6 Die LR-Klonase-Reaktion

Die LR-Klonase-Reaktion ist eine Rekombinationsreaktion aus einem Ausgangs-Klon und einem Ziel-Vektor, die durch verschiedene Rekombinationsenzyme vermittelt wird. Ziel ist die Herstellung eines Expressionsvektors. Hierbei wird die Zielsequenz nicht mittels Restriktionsendonuklease-Schnittstellen, sondern über  $\lambda$ Phagen-spezifische Schnittstellen ausgeschnitten und ligiert. Dieses Rekombinationssystem wird natürlicherweise von  $\lambda$ Bakteriophagen benutzt, um zwischen lytischem und lysogenem Zyklus zu wechseln. Die Rekombinationsstellen attL1 und attR1 bzw. attL2 und attR2 rekombinieren und bilden ein Co-Integrat. Die Co-Integrate werden dann durch eine zweite Rekombinationsreaktion zu zwei Tochtermolekülen aufgelöst. Diese haben die gleiche Struktur, unabhängig welches Paar von Rekombinationsstellen (attL1 und attR1 oder attL2 und attR2) zuerst miteinander reagiert, um das Co-Integrat zu bilden. Durch Transformation des Rekombinations-Mix in kompetente E. coli-Bakterien und Inkubation in ampicillinhaltigem Medium werden die Expressionsklone

selektioniert. Nur die Plasmide ohne *ccdB*-Gen (welches für ein für *E. coli* toxisches Protein codiert) und Ampicillin-Resistenz führen zu Kolonien (s. Abbildung 11).

Mittels der oben beschriebenen Reaktion wurden die Vektoren CIR2-pENTR-1A und CIR2 $\Delta$ Ig-pENTR-1A in die Vektoren p409, pDCC- und pIRES umklontiert (in der Arbeitsgruppe vorhandene Vektoren).



**Abbildung 11.** Die Abbildung zeigt schematisch die LR-Klonase Reaktion. Erläuterungen s. Text. (Entnommen aus Instruction Manual Gateway™ Cloning Technology, Invitrogen BV, Groningen, Niederlande).

### 2.1.7 DNA Fragmentanalyse mittels Agarosegelelektrophorese

Zur Auftrennung von DNA Fragmenten wurden horizontale Agarosegele (0,5 – 2 % Agarose, 0,5 x TBE-Puffer) verwandt. Diese Gele wurden anschließend in einer Ethidiumbromidlösung [0,5 µg/ml] gefärbt. Das Ethidiumbromid interkaliert in DNA-Doppelsträngen und kann durch UV-Licht sichtbar gemacht werden.

Vor dem Auftragen der DNA-Lösung wurde diese mit 1/6 Volumen 6-fach DNA-Probenpuffer versetzt. Die Elektrophorese erfolgte bei 110 V und 400 mA in 0,5-fach TBE Puffer. Zur Längenbestimmung wurden Standardlösungen der Firma Roche bzw. Fermentas verwendet.

**0,5-fach TBE Puffer**

Tris-Base	0,54 %
Bohrsäure	0,215 %
EDTA pH 8,0	1 mM
In H <sub>2</sub> O	

**DNA-Probenpuffer**

Ficoll	10 %
SDS	1 %
TBE	0,6 %
Bromphenolblau	0,01 %

**2.1.8 Herstellung kompetenter Bakterien****LB-Medium**

NaCl	5	g/l
Hefe Extrakt	5	g/l
Bactotrypton	10	g/l
Tris/HCl pH 8,0	10	mM
MgSO <sub>4</sub>	1	mM
Vitamin B1 1 %	1	ml

Eine dicht gewachsene 100 ml Bakterien-Schüttelkultur wurde auf eine OD<sub>600</sub> von 0,02 in 500 ml LB-Medium verdünnt und bei 37 °C bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,3 inkubiert. Diese Bakteriensuspension wurde 15 Minuten auf Eis abgekühlt und für 5 Minuten mit 4.000 \*g bei 4 °C pelletiert. Das Bakterienpellet wurde in 125 ml einer 4 °C kalten 50 mM CaCl<sub>2</sub> resuspendiert und erneut 20 Minuten auf Eis gekühlt. Nach einem zweiten 5-minütigen Zentrifugationsschritt bei 4.000 \*g wurde das Pellet in 25 ml 50 mM CaCl<sub>2</sub> mit 50 % Glycerol aufgenommen. Die Bakterien wurden schließlich zu je 500 µl aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C bis zum Gebrauch gelagert.

**2.1.9 Bakterientransformation****Agarplatten**

Agar	1,5 %
Ampicillin	100 µg/ml
Kanamycin	50 µg/ml
in LB-Medium	

Kompetente Bakterien wurden mit Plasmid DNA transformiert, indem 100 µl der aufgetauten Bakteriensuspension mit 1 ng des zu transfizierenden Plasmids gründlich vermischt wurden. Dieser Ansatz wurde für 30 Minuten auf Eis gekühlt, für 90 Sekunden auf 42 °C erhitzt und dann unter Zugabe von 300 µl LB-Medium für 45 Minuten bei 37 °C inkubiert. Dieser Ansatz wurde mit 4.000 \*g für 3 Minuten zentrifugiert, der Überstand verworfen und in 100 ml LB-Medium resuspendiert. Die Suspension wurde auf Agarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden einzelne Bakterienkolonien von der Platte gepickt und in 2 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin, bzw. 50 µg/ml Kanamycin, bei 37 °C zu dichtem Wachstum inkubiert.

### 2.1.10 Plasmid-DNA Präparation aus LB-Schüttelkulturen

Lösung 1		Lösung 2		Lösung 3	
50 mM	Glukose	0,2 M	NaOH	3 M	Natriumacetat pH 4,8
10 mM	EDTA	1 %	SDS		
25 mM	Tris-Base	pH			
	8,0				
4 mg/ml	Lysozym				

Zur Gewinnung der DNA aus 2 ml Bakterienkulturen wurden diese bei 10.000 \*g für 2 Minuten pelletiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 100 µl von Lösung 1 resuspendiert. 200 µl von Lösung 2 wurden dazugegeben und der Ansatz vorsichtig gemischt. Schließlich wurden Lösung 3 sowie 1 µl RNase (10 mg/ml) zugegeben, sorgfältig durchmischt und für 20 Minuten bei Zimmertemperatur inkubiert. Der Ansatz wurde anschließend bei 10.000 \*g für 5 Minuten zentrifugiert, der Überstand abgenommen, mit 1 ml Ethanol versetzt und für 5 Minuten bei Zimmertemperatur inkubiert. Die dabei ausgefallene DNA wurde bei 20.000 \*g für 15 Minuten pelletiert, zweimal mit 70 % Ethanol gewaschen, bei 37 °C getrocknet und in 20 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen. Mit der so gewonnenen DNA konnten Restriktionsfragmentanalysen durchgeführt werden. Um DNA in größeren Mengen zu gewinnen, wurde Plasmid-DNA aus 500 ml LB-Medium Schüttelkulturen nach dem Protokoll von Sambrook et al. (Sambrook J., 1989) gewonnen.

### 2.1.11 DNA Fällung

DNA wurde mit 1/10 des Volumens 3 M Na-Acetat und 2/3 des Volumens Ethanol versetzt und dann bei – 20 °C für 1 Stunde gelagert. Die DNA wurde durch 20-minütige Zentrifugation mit 10.000 \*g bei 4 °C pelletiert. Danach wurde die DNA zweimal mit 70 % Ethanol gewaschen, bei Raumtemperatur getrocknet und in H<sub>2</sub>O aufgenommen. Anschließend wurde die Konzentration der DNA-Lösung durch Messung der Absorption bei 260 nm photometrisch bestimmt.

### 2.1.12 DNA Phenolextraktion

Um die DNA von Proteinverunreinigungen zu trennen, wurde eine Phenolextraktion durchgeführt. Hierzu wurden zu 500 µl DNA/Protein Lösung 500 µl mit H<sub>2</sub>O gesättigtes Phenol gemischt und die DNA-enhaltende wässrige Oberphase nach 2 minütiger Zentrifugation bei 10.000 \*g abgenommen. Die DNA-H<sub>2</sub>O-Lösung wurde anschließend mit Phenol/Chloroform, dann mit Chloroform extrahiert. Schließlich wurde die DNA aus der letzten Oberphase gefällt.

### 2.1.13 DNA Sequenzanalyse

Die DNA-Sequenz der hergestellten Konstrukte wurde mit einem automatischen Sequenziergerät der Firma Applied Bio Systems GmbH, Weiterstadt (ABI Prism<sup>®</sup> 310 Genetic Analyzer) analysiert. Hierzu wurde die zu sequenzierende DNA mittels vier verschiedener, an dNTPs gekoppelten, Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Da für jedes dNTP ein eigener Farbstoff verwendet wurde, konnte die Sequenzierreaktion in einem einzigen Gefäß und einer einzigen Elektrophorese durchgeführt werden. Die Fluoreszenzfarbstoffe wurden während der Elektrophorese von einem im Gerät befindlichen Laser angeregt und gemessen. Die Auswertung der Signale und Umsetzung auf eine entsprechende DNA-Sequenz erfolgte automatisch.

Die Sequenzierreaktion wurde nach folgendem Schema durchgeführt:

0,5-1	µg	Template (DNA)
3,2	pmol	sense Primer
2	µl	Premix (Big Dye Terminator Fa. Applied Biosystems)
ad 10	µl	H <sub>2</sub> O

Mit diesem Ansatz wurden 25 Reaktionszyklen nach folgendem Programm durchgeführt:

Schritt	Zeit	Temperatur
Erste Denaturierung	300 s	96 °C
Primer Hybridisierung	20 s	55 °C
DNA-Strangsynthese	240 s	60 °C
Denaturierung	30 s	96 °C

### 2.1.14 Die Klonierung von IC15

Als Ausgangsprodukt für die Klonierung von IC15 diente das Konstrukt IC7 im Vektor pRSET-5d (Kallen, K. J., et al., 1999a). In diesem wurde der restliche für die AB-Schleife kodierende Teil von IL-6 durch den korrespondierenden Teil von CNTF ersetzt. Hierzu erfolgte eine PCR mit den Primern T7 Fwd und SB 100 auf dem Vektor IC7-pRSET-5d sowie eine PCR mit den Primern SB 200 und SB 300 auf dem Vektor CNTF-pRSET-5d. Die hieraus gewonnenen DNA-Fragmente wurden ligiert und es erfolgte eine Ligations-PCR mit den Primern T7 Fwd und SB 400. Das hieraus entstandene DNA-Fragment wurde wiederum mit einem DNA-Fragment aus einer PCR mit den Primern SB 500 und SB 600 auf dem Vektor CNTF-pRSET-5d ligiert. Die nunmehr zweite Ligations-PCR erfolgte mit den Primern T7 Fwd und SB 600 (s. Abbildung 12). Das aus der zweiten Ligations-PCR erhaltene DNA-Fragment wurde über eine Xba I-Schnittstelle in den Vektor IC7-pRSET-5d hineinkloniert (s. Abbildung 13). Als Testverdau diente der Restriktionsverdau der Vektor-DNA mit den Enzymen Bcl I und Hind III, der bei dem Konstrukt IC15-pRSET-5d ein 363 bp langes DNA-Fragment hervorbrachte. Im Gegensatz dazu führte der gleiche Restriktionsverdau bei IC7-pRSET-5d nicht zur Fragmentierung des Vektors, da hier keine Hind III-Schnittstelle vorhanden ist. Die Richtigkeit der Sequenz wurde anschließend durch Sequenzierung des Produktes bestätigt.

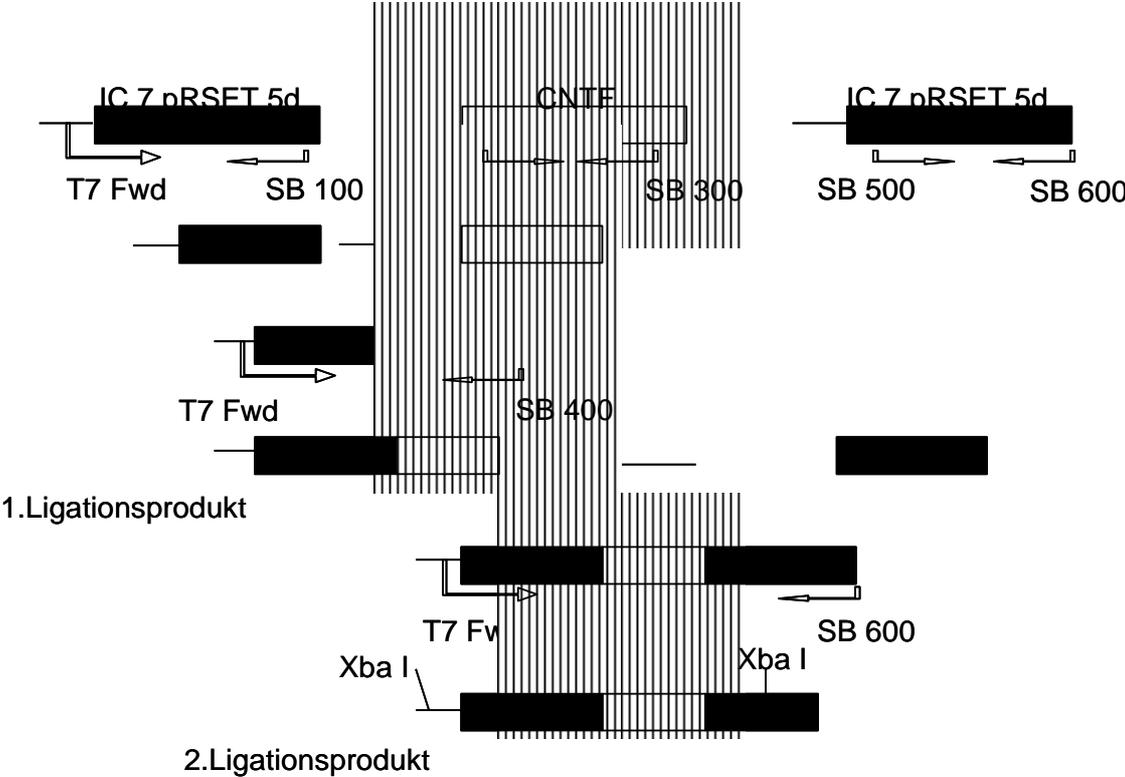
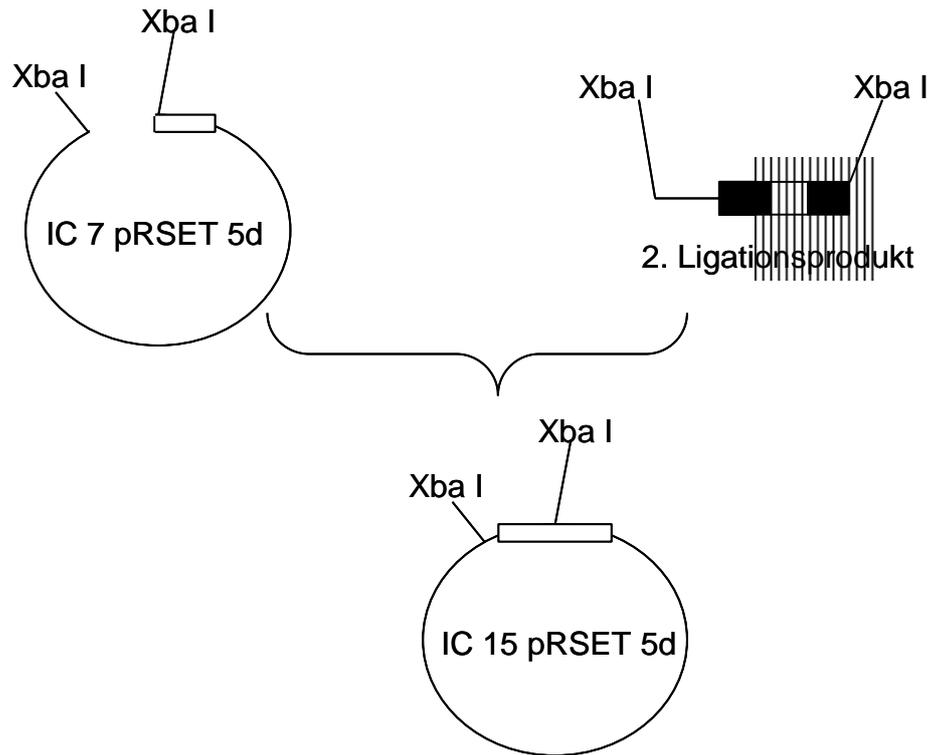


Abbildung 12. Die Abbildung zeigt schematisch die PCR- und Ligationsschritte zur Konstruktion von IC15. Die Primer sind jeweils in Leserichtung angegeben.



**Abbildung 13.** Die Abbildung zeigt die Klonierungsstrategie für IC15. Das Ligationsprodukt der PCR-Ligations-PCR wurde mit XbaI geschnitten und in den Vektor pRSET-5d eingebracht.

IC 7 cDNA		
1	ATG CCA GTA CCC CCA GGA GAA GAT TCC AAA GAT GTA GCC GGC CCA CAC AGA CAG CCA CTC ACC TCT TCA GAA CGA	75
1	M P V P P G E D S K D V A A P H R Q P L T S S E R	25
76	ATT GAC AAA CAA ATT CGG TAC ATC CTC GAC GGC ATC TCA GCC CTG AGA GAA TCC TAT GTG AAG CAT CAG GGC CTG	150
26	I D K Q I R Y I L D G I S A L R E S Y V K H Q G L	50
151	AAC AAG AAC ATC AAC CTG GAC TCT GCG GAT GGG ATG AAC AAC CTG AAC CTT CCA AAG ATG GCT GAA AAA GAT GGA	225
51	N K N I N L D S A D G M N N L N L P K M A E K D G	75
226	TGC TTC CAA TCT GGA TTC AAT GAG GAG ACT TGC CTG GTG AAA ATC ATC ACT GGT CTT TTG GAG TTT GAG GTA TAC	300
76	C F Q S G F N E E T C L V K I I T G L L E F E V Y	100
301	CTA GAG TAC CTC TTA GAA GAC CAG CAG GTG CAT TTT ACC CCA ACC GAA GGT GAC TTC CAT CAA GCT ATA AGA GCT	375
101	L E Y L L E D Q Q V H F T P T E G D F H Q A I R A	125
376	GTG CAG ATG ACT ACA AAA GTC CTG ATC CAG TTC CTG CAG AAA AAG GCA AAG AAT CTA GAT GCA ATA ACC ACC CCT	450
126	V Q M S T K V L I Q F L Q K K A K N L D A I T T P	150
451	GAC CCA ACC ACA AAT GCC AGC CTG CTG ACG AAG CTG GGA GAT GGT GGT CTC TTT GAG AAG AAG CTG TGG GGC CTA	525
151	D P T T N A S L L T K L G D G G L F E K K L W G L	175
526	AAG GTG CTG GGC AGC TTT AAG GAG TTC CTG CAG TCC AGC CTG AAG GCT CTT CGG CAA ATG TAG	600
176	K V L R S F K E F L Q S S L R A L R Q M *	196
CNTF- cDNA		
1	ATG GCT TTC ACA GAG CAT TCA CCG CTG ACC CCT CAC CGT CGG GAC CTC TGT AGC CGC TCT ATC TGG CTA GCA AGG	75
1	M A F T E H S P L T P H R R D L C S R S I W L A R	25
76	AAG ATT CGT TCA GAC CTG ACT GCT CTT ACG GAA TCC TAT GTG AAG CAT CAG GGC CTG AAC AAG AAC ATC AAC CTG	150
26	K I R S D L T A L T E S Y V K H Q G L N K N I N L	50
151	GAC TCT GCG GAT GGG ATG CCA GTG GCA AGC ACT GAT CAG TGG AAT GAG CTG ACC GAG GCA GAG CGA CTC CAA GAG	225
51	D S A D G M P V A S T D Q W S E L T E A E R L Q E	75
226	AAC CTT CAA GCT TAT CGT ACC TTC CAT GAT TTG TTG GCC AAG CTC TTA GAA GAC CAG CAG GTG CAT TTT ACC CCA	300
76	N L Q A Y R T F H V L L A R L L E D Q Q V H F T P	100
301	ACC GAA GGT GAC TTC CAT CAA GCT ATA CAT ACC CTT CTT CTC CAA GTC GCT GCC TTT GCA TAC CAG ATA GAG GAG	375
101	T E G D F H Q A I H T L L L Q V A A F A Y Q I E E	125
376	TTA ATG ATA CTC CTG GAA TAC AAG ATC CCC CGC AAT GAG GCT GAT GGG ATG CCT ATT AAT GAT GGA GAT GGT GGT	450
126	L M I L L E Y K I P R N E A D G M P I N V G D G G	150
451	CTC TTT GAG AAG AAG CTG TGG GGC CTA AAG GTG CTG CAG GAG CTT TCA CAG TGG ACA GTA AAG TCC ATC CAT GAC	525
151	L F E K K L W G L K V L Q E L S Q W T V R S I H D	175
526	CTT GAT TTC ATC TCT TCT CAT CAG ACT GGG ATC CCA GCA CGT GGG AAG CAT TAT ATT GCT AAC AAC AAG AAA ATG	600
176	L R F I S S H Q T G I P A R G S H Y I A N N K K M	200
601	TAG	603
201	*	201

Abbildung 14. DNA-Sequenzen von IC 7 und CNTF. Der aus IC 7 entfernte und durch CNTF ersetzte Teil ist gelb markiert.

### 2.1.15 Die Klonierung von CIR2

Als Ausgangsprodukt für die Klonierung von CIR2 dienten der IL-6R im Vektor pENTR-1A sowie der CNTFR im Vektor pSVL. Zunächst wurde eine PCR mit CNTFR im Vektor pSVL und den Primern SB 900 und SB 800 sowie eine PCR mit dem IL-6R im Vektor pENTR-1A und den Primern SB 700 und pCDM8rp durchgeführt. Die hieraus gewonnenen DNA-Fragmente wurden ligiert und in einer Ligations-PCR mit den Primern SB 101 und SB 201 amplifiziert (s. Abbildung 15). Der IL-6R im Vektor pENTR-1A wurde mit den Restriktionsendonukleasen Sal I und Msc I geöffnet. Dieser Teil wurde durch ein mittels der beiden Restriktionsendonukleasen Xho I und Xcm I aus dem CNTFR im Vektor pSVL dargestelltes DNA-Fragment ersetzt. Dies war möglich, da die Restriktionsendonukleasen Sal I und Xho I bzw. Msc I und Xcm I jeweils gleiche Überhänge haben. Das so klonierte CIR2 Zwischenprodukt in pENTR-1A wurde wiederum mit den Restriktionsendonukleasen Sac II und Sac I verdaut. Schließlich wurde das so ausgeschnittene DNA-Fragment durch ein mit den gleichen Enzymen geschnittenes Stück aus dem PCR-Ligations-PCR-Produkt ersetzt. Als Test für die erfolgreiche Klonierung diente der Verdau mit Xba I, der für den Vektor CIR2-pENTR-1A ein 1524 bp großes Insert ergibt, für CIR2 Zwischenprodukt in pENTR-1A dagegen ein 1850 bp großes Insert. Schließlich wurde die Sequenz von CIR2 durch Sequenzierung bestätigt.

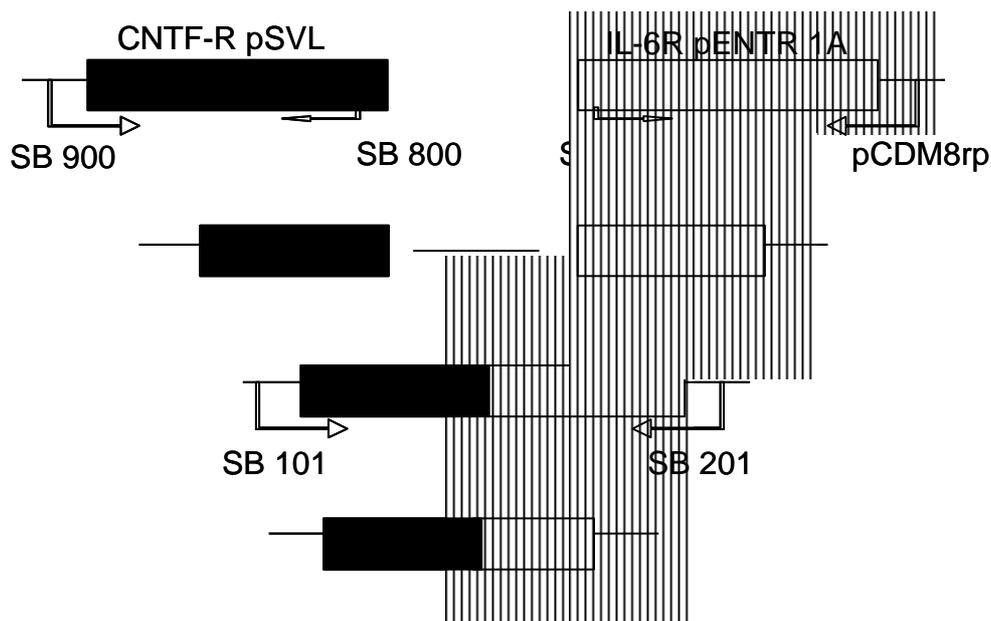
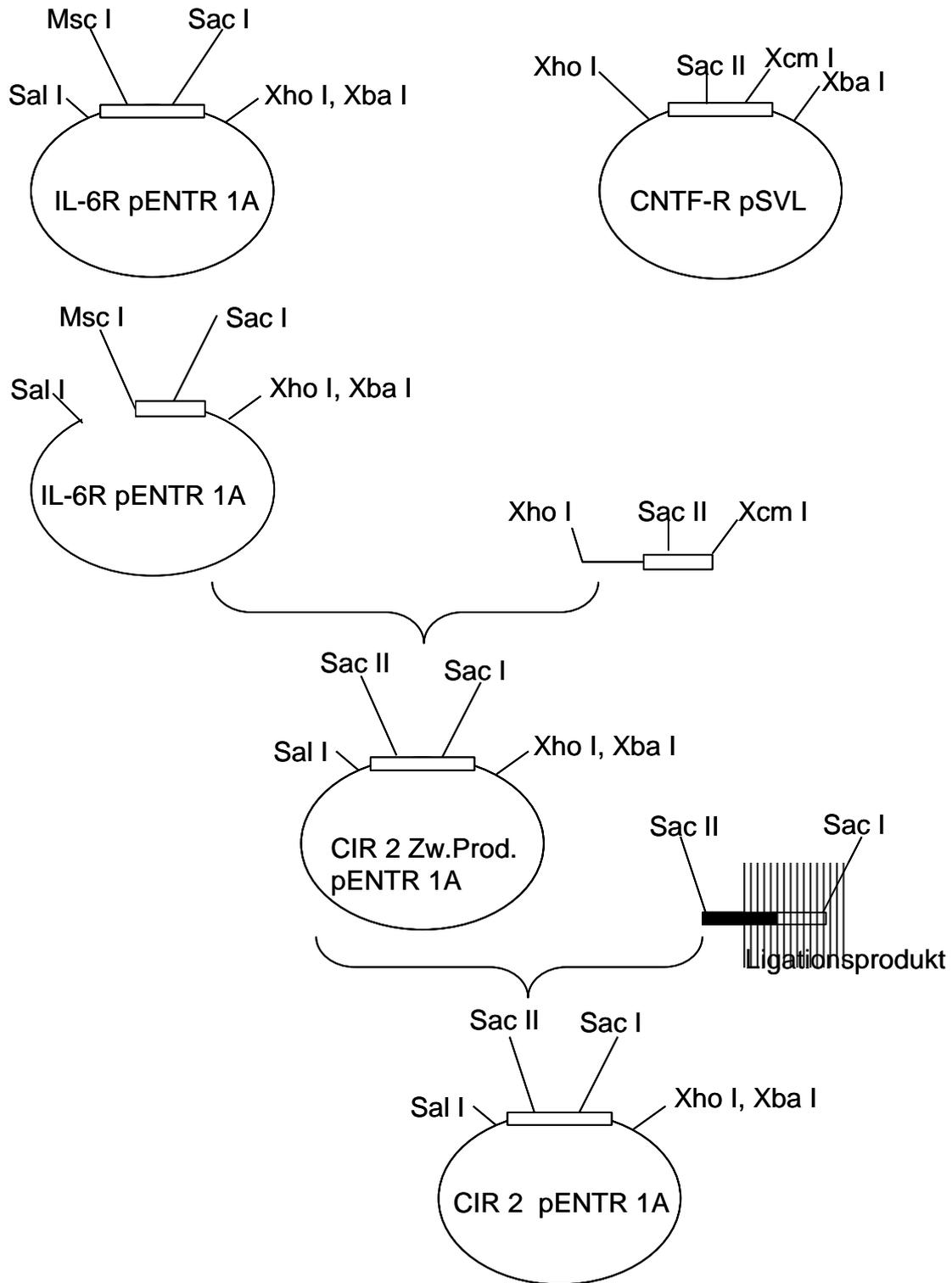


Abbildung 15. Zeigt schematisch die PCR-Ligations-PCR. Die Primer sind jeweils in Leserichtung angegeben.



**Abbildung 16.** Die Abbildung zeigt die Klonierungsstrategie von CIR2. Der IL-6R im Vektor pENTR 1A wurde mit den Restriktionsenzymen Sal I und Msc I geöffnet und das Fragment durch ein mittels XhoI und Msc I gewonnenes Fragment ersetzt. Dieses Zwischenprodukt wurde dann mit Sac II und Sac I geöffnet und mit dem durch gleiche Enzyme gewonnenen Stück des Ligationsproduktes geschlossen.

CNTF-R cDNA		
201	AAGAGTGGTCTGGAGGGAGGGAGGACATGG ATG TGC TTG GTG TGT GGC CAG TGG TGA AGAG ATG GCT GCT CCT GTC CCG	281
1	M C L V C G Q W * M A A P V P	5
282	TGG GCC TGC TGT GCT GTG CTT GCC GCC GCC GCC GCA GTT GTC TAC GCC CAG AGA CAC AAT CCA CAG GAG GCA CCC	356
7	W A C C A V L A A A A A V U Y A Q R H S P Q E A P	31
357	CAT GTG CAG TAC GAG CGC CTG GGC TCT GAC GTG ACA CTG CCA TGT GGG ACA GCA AAC TGG GAT GCT GCG GTG ACG	431
32	H V Q Y E R L G S D V T L P C G T A N W D A A V T	56
432	TGG CGG GTA AAT GGG ACA GAC CTG GCC CTT GAC CTG CTC AAC GGC TCT CAG CTG GTG CTC CAT GGC CTG GAA CTG	506
57	W R V N G T D L A P D L L N G S Q L V L H G L E L	81
507	GGC CAC AAT GGC CTC TAC GCC TGC TTC CAC CGT GAC TCC TGG CAC CTG GGC CAC CAA GTC CTG CTG CAT GTG GGC	581
82	G H S G L Y A C F H R D S W H L R H Q V L L H V G	106
582	TTG CCG CCG CGG GAG CCT GTG CTC AGC TGC CGC TCC AAC ACT TAC CCC AAG GGC TTC TAC TGC AGC TGG CAT CTG	656
107	L P P R E P V L S C R S N T Y P K G F Y C S W H L	131
657	CCC ACC CCG ACC TAC AAT CCC AAC ACC TTC AAT GTG ACT GTG CTG CAT GGC TCC AAA AAT ATG GTC TGT GAG AAG	731
132	P T P T Y I P N T F N V T V L H G S K I M V C E K	156
732	GAC CCA GGC CTC AAG AAC GGC TGC CAC AAT CGC TAC ATG CAC CTG TTC TCC ACC ATC AAG TAC AAG GTC TCC ATA	806
157	D P A L K N R C H I R Y M H L F S T I K Y K V S I	181
807	AAT GTC AGC AAT GGC CTG GGC CAC AAT GGC ACA GCT ATC ACC TTT GAC GAG TTC ACC AAT GTG AAG CTT GAT CCT	881
182	S V S N A L G H N A T A I T F D E F T I V K P D P	206
882	CCA GAA AAT GTG GTA GCC GGG CCA GTG CCC AGC AAC CCT CGC CGG CTG GAG GTG ACG TGG CAG ACC CCC TGG ACC	956
207	P E N V V A R P V P S N P R R L E V T W Q T P S T	231
957	TGG CTT GAC CTT GAG TCT TTT CTT CTC AAG TTC TTT CTG CGC TAC CGA CCC CTC ATC CTG GAC CAG TGG CAG CAT	1031
232	W P D P E S F P L K F F L R Y R P L I L D Q W Q H	256
1032	GTG GAG CTG TCC GAC GGC ACA GCA CAC ACC ATC ACA GAT GCT TAC GCC GGG AAG GAG TAC AAT ATC CAG GTG GCA	1106
257	V E L S D G T A H T I T D A Y A G K E Y I I Q V A	281
1107	GCC AAG GAC AAT GAG AAT GGG ACA TGG AAT GAC TGG AGC GTA GCC GCC CAC GCT ACG CCC TGG AAT GAG GAA CCG	1181
282	A K D N E I G T W S D W S V A A H A T P W T E E P	306
1182	CGA CAC CTC ACC ACG GAG GCC CAG GCT GCG GAG ACC ACG ACC AGC ACC ACC AGC TCC CTG GCA CCC CCA CCT ACC	1256
307	R H L T T E A Q A A E T T T S T T S S L A P P P T	331
1257	ACG AAG ATC TGT GAC CCT GGG GAG CTG GGC AGC GGC GGG GGA CCC TCG GCA CCC TTC TTG GTC AGC GTC CCC ATC	1331
332	T K I C D P G E L G S G G G P S A P F L V S V P I	356
1332	ACT CTG GCC CTG GCT GCC GCT GCC GCC ACT GCC AGC AAT CTC TTG ATC TGA GCCCGGCACCCCC	
357	T L A L A A A A A T A S S L L I *	

Abbildung 17. DNA-Sequenz des CNTFR. Die in CIR2 enthaltene Sequenz ist gelb markiert.

IL-6R cDNA		TGG TAG CCGAGGAGGAGC ATG CTG GCC GTC GGC TGC	455
		* M L A V G C	6
456	GCG CTG CTG GCT GCC CTG CTG GCG GCG CCG GGA GCG GCG CTG GCC CCA AGG CCG TGC CCT GCG CAG GAG GTG GCA		530
7	A L L A A L L A A P G A A L A P R R C P A Q E V A		31
531	AGA GGC GTG CTG ACC AGT CTG CCA GGA GAC AGC GTG ACT CTG ACC TGC CCG GGG GTA GAG CCG GAA GAC AAT GCC		605
32	R G V L T S L P G D S V T L T C P G U E P E D N A		56
606	ACT GTT CAC TGG GTG CTC AGG AAG CCG GCT GCA GGC TCC CAC CCC AGC AGA TGG GCT GGC ATG GGA AGG AGG CTG		680
57	T V H W V L R K P A A G S H P S R W A G M G R R L		81
681	CTG CTG AGG TCG GTG CAG CTC CAC GAC TCT GGA AAC TAT TCA TGC TAC CCG GCC GGC GGC CCA GCT GGG ACT GTG		755
82	L L R S V Q L H D S G N Y S C Y R A G R P A G T V		106
756	CAC TTG CTG GTG GAT GTT CCC CCG GAG GAG CCC CAG CTC TCC TGC TTC GGG AAG AGC CCC CTC AGC AAT GTT GTT		830
107	H L L V D V P P E E P Q L S C F R K S P L S N V V		131
831	TGT GAG TGG GGT CTT CCG AGC AAT CCA TCC CTG ACG ACA AAG GCT GTG CTC TTG GTG AGG AAG TTT CAG AAC AGT		905
132	C E W G P R S T P S L T T K A V L L V R K F Q N S		156
906	CCG GCC GAA GAC TTC CAG GAG CCG TGC CAG TAT TCC CAG GAG TCC CAG AAG TTC TCC TGC CAG TTA GCA GTC CCG		980
157	P A E D F Q E P C Q Y S Q E S Q K F S C Q L A V P		181
981	GAG GGA GAC AGC TCT TTC TAC ATA GTG TCC ATG TGC GTC GCC AGT AGT GTC GGG AGC AAG TTC AGC AAA ACT CAA		1055
182	E G D S S P Y I V S H C V A S S V G S K F S K T Q		206
1056	ACC TTT CAG GGT TGT GGA ATC TTG CAG CTT GAT CCG CTT GCC AAC ATC ACA GTC ACT GCC GTG GGC AGA AAC CCC		1130
207	T F Q G C G I L Q P D P P A N I T U T A U A R N P		231
1131	CGC TGG CTC AGT GTC ACC TGG CAA GAC CCC CAC TCC TGG AAC TCA TCT TTC TAC AGA CTA CCG TTT GAG CTC AGA		1205
232	R W L S V T W Q D P H S W N S S F Y R L R F E L R		256
1206	TAT CCG GCT GAA CCG TCA AAG ACA TTC ACA ACA TGG ATG GTC AAG GAC CTC CAG CAT CAC TGT GTC ATC CAC GAC		1280
257	Y R A E R S K T F T T W M V K D L Q H H C V I H D		281
1281	GCC TGG AGC GGC CTG AGG CAC GTG GTG CAG CTT CGT GCC CAG GAG GAG TTC GGG CAA GGC GAG TGG AGC GAG TGG		1355
282	A W S G L R H V U Q L R A Q E E F G Q G E W S E W		306
1356	AGC CCG GAG GCC ATG GGC ACG CCT TGG ACA GAA TCC AGG AGT CCT CCA GCT GAG AAC GAG GTG TCC ACC CCC ATG		1430
307	S P E A M G T P W T E S R S P P A E N E U S T P M		331
1431	CAG GCA CTT ACT ACT AAT AAA GAC GAT GAT AAT AIT CTC TTC AGA GAT TCT GCA AAT GCG ACA AGC CTC CCA GTG		1505
332	Q A L T T N K D D D N I L F R D S A N A T S L P V		356
1506	CAA GAT TCT TCT TCA GTA CCA CTG CCG ACA TTC CTG GTT GCT GGA GGG AGC CTG GCT TTC GGA ACG CTC CTC TGC		1580
357	Q D S S S V P L P T F L V A G G S L A F G T L L C		381
1581	ATG GCC AIT GTT CTG AGG TTC AAG AAG ACG TGG AAG CTG CCG GCT CTG AAG GAA GGC AAG ACA AGC ATG CAT CCG		1655
382	I A I V L R F K K T W K L R A L K E G K T S M H P		406
1656	CCG TAC TCT TTG GGG CAG CTG GTC CCG GAG AGG CCT CGA CCC ACC CCA GTG CTT GTT CCT CTC ATC TCC CCA CCG		1730
407	P Y S L G Q L V P E R P R P T P V L V P L I S P P		431
1731	GTG TCC CCG AGC AGC CTG GGG TCT GAC AAT ACC TCG AGC CAC AAC CGA CCA GAT GCC AGG GAC CCA CCG AGC CCT		1805
432	V S P S S L G S D N T S S H N R P D A R D P R S P		456
1806	TAT GAC ATC AGC AAT ACA GAC TAC TTC TTC CCC AGA TAG CTGGCTGGGTGGCACCAGCAGCCTGGACCTGTGG ATG ACA AAA		1888
457	Y D I S N T D Y F F P R *	M T K	3

Abbildung 18. DNA-Sequenz des IL-6R. Die in CIR2 enthaltene Sequenz ist gelb markiert.

### 2.1.16 Die Klonierung von CIR2 $\Delta$ Ig

Zur Klonierung von CIR2 $\Delta$ Ig wurde der Vektor CIR2-pENTR-1A mit den Restriktionsendonukleasen Sma I und Sac II geöffnet und durch ein mit den gleichen Enzymen gewonnenes, 207 bp großes, Insert aus CIR1  $\Delta$ Ig-pESK ersetzt. Als Test für die erfolgreiche Klonierung diente der Verdau mit Xba I, welcher im Falle von CIR2 ein 1524 bp großes Insert lieferte, im Gegensatz dazu ein 1275 bp großes Insert bei CIR2 $\Delta$ Ig.

### 2.1.17 Bakterienstämme

Es wurden Zellen der folgenden E. coli –Stämme verwandt:

<b>E. coli</b>	<b>Verwendungszweck</b>
DH5 $\alpha$	Klonierung und Amplifikation
BL21-LysS	Expression von IC15 in pRSET-5d

### 2.1.18 Plasmide und cDNAs

Sämtliche Klonierungs- und Expressionsversuche wurden in den Vektoren pCDM8, pENTR-1A, pDCC-, p409, pRSET-5d (Invitrogen BV, Groningen, Niederlande), pSVL (Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH, Freiburg) und pIRES (BD Biosciences, Heidelberg) durchgeführt.

### 2.1.19 Enzyme

Sämtliche Restriktionsenzyme wurden von den Firmen MBI Fermentas GmbH (St.Leon-Rot) bzw. New England Biolabs GmbH (Bad Schwalbach/Taunus) erworben. Die Alkalische Phosphatase sowie die Polynukleotidkinase stammten von MBI Fermentas GmbH (St.Leon-Rot). Deep Vent Polymerase und T4-DNA-Ligase wurden von New England Biolabs GmbH (Bad Schwalbach/Taunus) bezogen. Die Sequenzierreaktionen wurden mit einem Sequenzierkit der Firma Applied Biosystems GmbH (Weiterstadt) durchgeführt.

## 2.2 Proteinbiochemische Methoden

### 2.2.1 Säugerzellen

Die Zellen wurden bei 37 °C in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre mit 5 %-iger Kohlendioxidsättigung kultiviert.

**COS-7-Zellen** sind Nierenzellen der grünen Meerkatze. Sie wurden zur Expression der Rezeptorkonstrukte eingesetzt.

**HepG2-Zellen** entstammen einer humanen Hepatom Zelllinie. Nach Stimulation durch Zytokine werden sie zur Produktion von Akute-Phase-Proteinen angeregt. Diese Reaktion entspricht der physiologischen Reaktion von Leberzellen während einer Entzündungsreaktion.

**BaF/3** ist eine murine Prä-B-Zelllinie, die in Abhängigkeit von IL-3 zum Wachstum angeregt werden kann. Durch Transfektion von Zytokinrezeptor-cDNA und anschließende Selektion mit dem entsprechenden Zytokin, das die Funktion von IL-3 als Wachstumsfaktor übernimmt, können stabile Zelllinien hergestellt werden.

Für die Experimente wurden bereits etablierte BaF/3- Zelllinien verwendet, die entweder gp130 und IL-6R oder gp130, IL-6R und LIFR bzw. gp130 und das Konstrukt RILLIF $\Delta$ 2 exprimierten.

### 2.2.2 Zellkulturmaterialien

Die Zelllinien wurden, falls nicht anders angegeben, in DMEM-Medium der Firma PAA Laboratories (Linz, Österreich), versetzt mit 10 % FCS, 60  $\mu$ g/ml Penicillin und 100  $\mu$ g/ml Streptomycin, kultiviert.

### 2.2.3 Proteinexpression in E. coli Bakterienzellen

Die im pRSET-5d Vektor vorliegende, für IC15 kodierende cDNA wurde in E. coli-BL21-LysS exprimiert. Zuerst musste der Vektor in BL21-LysS-Zellen transformiert werden (Stratagene GmbH, Heidelberg). Hierzu wurden mehrere BL21-LysS-Kolonien in 200  $\mu$ l TFB suspendiert, mit 100 ng der zu transformierenden Plasmid DNA vermischt und 10 Minuten auf Eis gekühlt. Nach dem Erhitzen des Ansatzes auf 42 °C für 90 Sekunden, wurde dieser auf einer LB-Agarplatte mit 50  $\mu$ g/ml Ampicillin ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte die Proteinexpression. Hierzu wurden die, durch den ampicillinhaltigen Agar selektionierten, für das transformierte Konstrukt positiven, BL21-LysS-Kolonien gepickt und in je 100 ml LB-Ampicillin (50  $\mu$ g/ml) Vorkulturen bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,5 bei 37 °C inkubiert. Diese wurden bei 4.000 \*g für 10 Minuten pelletiert, einmal mit PBS-Puffer gewaschen und schließlich auf 500 ml LB-Ampicillin (50  $\mu$ g/ml) Schüttelkulturen zu einer OD<sub>600</sub> von 0,05 verdünnt. Bei einer OD<sub>600</sub> von 0,4-0,5 wurde die Kultur durch Zugabe von 0,4 mM IPTG (Isopropylthiogalactosid) zur Expression angeregt. IPTG ist ein chemisches Analog der Laktose, welches durch die  $\beta$ -Galactosidase nicht gespalten werden kann. Es wird als Induktor beim lac-Operon verwendet, da es an den lac-Repressor bindet und ihn inaktiviert. Es dient dazu, die Expression von Genen, die in den E. coli lac-Operon inkloniert wurden, zu verstärken. Nach einem Wachstum von 4 Stunden wurden die Bakterien bei 4.000 \*g für 10 Minuten pelletiert.

### 2.2.4 Proteinaufreinigung aus E. coli Bakterienzellen

Das Pellet (s. 2.2.3) wurde in PBS-Puffer pH 7,4 resuspendiert. Durch dreimaliges Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff, mit anschließendem Auftauen und viermaligem durchlaufen einer French<sup>®</sup> Press bei 1500-2000 psi, wurde die Bakterienmembran zerstört.

Die French<sup>®</sup> Press erzeugt in einem Stahlzylinder einen Druck von bis zu 40.000 psi, wobei auch der intrazelluläre Druck ansteigt. Durch den plötzlichen Druckabfall, bei passieren eines kleinlumigen Auslassventils, werden die Zellmembranen der Bakterien durch den hohen Druckgradienten rupturiert.

Das Protein IC15 wurde, nach dem Zentrifugieren der Suspension mit 9.000 \*g und Umpufferung in Tris-HCl-50-mM-pH-7,4, mittels Größenausschlusschromatographie aus dem Überstand gewonnen. Zur Kontrolle der Expression wurden nach jedem Schritt Proben genommen und auf 12,5 %-igen SDS-Polyacrylamidgelen analysiert.

### 2.2.5 Aufkonzentrierung von Proteinlösungen mittels Zentrifugalfiltrerröhrchen

Zur Aufkonzentrierung der aus dem Überstand gewonnenen Proteinlösung wurde ein Zentrifugalfiltrerröhrchen (Centriprep YM-10) der Firma Millipore GmbH (Schwalbach) benutzt. Dieses Röhrchen besteht aus einer äußeren Kammer, die mit einer zentralen Kammer über eine Filtermembran verbunden ist. Die zu konzentrierende Lösung wird in die äußere Kammer gefüllt, bevor die zentrale, etwas höher stehende Kammer eingesetzt wird. Durch den in der Zentrifuge erzeugten Druck auf die Wassersäule äquilibriert sich der Spiegelstand in der inneren und äußeren Kammer, wobei das Wasser durch die, für die Proteine undurchlässige, Filtermembran gepresst wird.

### 2.2.6 Größenausschlusschromatographie

Die Größenausschlusschromatographie beruht auf der unterschiedlichen Verteilung von Molekülen zwischen einem Gelkompartiment und dem umgebenden Medium.

Die Probe wird auf eine Säule mit porösen Kügelchen aufgetragen, welche aus einem unlöslichen, aber stark hydratisierten Polymer bestehen. Kleine Moleküle können in die Kügelchen eindringen, große dagegen nicht. Somit verteilen sich die kleinen Moleküle sowohl in der wässrigen Lösung innerhalb der Kügelchen als auch zwischen denselben. Große Moleküle hingegen bleiben auf das wässrige Medium zwischen den Kügelchen beschränkt. Daraus folgt, dass große Moleküle die Säule schneller verlassen, weil ihnen nur ein kleines Volumen zugänglich ist.

IC15 wurde, gelöst in Tris-HCl-50-mM-pH-7,4, auf der Superdex-75-Säule der Firma Amersham Biosciences Europe GmbH (Freiburg) aufgetrennt. Die hierbei gewonnenen Fraktionen wurden automatisch bei 260- und 280 nm gemessen und anschließend gesammelt. Dadurch war es möglich, die einzelnen Proteinfractionen als solche zu erkennen und Rückschlüsse auf etwaige DNA-Verunreinigungen zu ziehen.

Die gesammelten Fraktionen wurden zur weiteren Untersuchung auf ein 15 %-iges SDS-Gel aufgetragen und zusätzlich im CD-Spektrometer gemessen.

### 2.2.7 Stabile Transfektion von BaF/3-Zellen

Um BaF/3-Zellen zu generieren, die neben dem IL-6R und gp130 auch OSMR exprimieren, wurden BaF/3-[gp130, IL-6R]-Zellen mit dem OSMR stabil transfiziert. Hierzu wurden 5x10<sup>6</sup> BaF/3-[gp130, IL-6R]-Zellen zusammen mit 30 µg linearisierter OSMR-Plasmid-DNA (Expressionsvektor p409) bei 0°C in 400 µl RPMI-Medium mit 10 % FCS aufgenommen und unter

Vermeidung von Luftblasenbildung in eine Elektroporationsküvette gegeben. Nach einer Ruhezeit von 5 Minuten, wurden die Zellen mit dem Elektroporationsgerät (Gene Pulser, Bio-Rad Laboratories GmbH, München) bei einer Kapazität von 960  $\mu\text{F}$  und unter einer Spannung von 250 Volt elektroporiert. Dann wurden die Zellen in je 5 ml Medium mit 10 ng/ml OSM aufgenommen und in Zellkulturflaschen bei 37 °C kultiviert. Die transfizierten Zellen wurden regelmässig unter dem Mikroskop inspiziert. Sobald die Zellzahl zunahm, wurden die Zellen mit RPMI gewaschen und erneut bei 37 °C in RPMI/10%-FCS inkubiert und mit 10 ng/ml OSM stimuliert. Kontrollzellen wurden ohne OSM inkubiert um auszuschliessen, dass die Zellen zytokinunabhängig geworden waren.

### 2.2.8 Proliferationsversuche mit BaF/3-Zellen

BaF/3-Zellen wurden bei 150 \*g pelletiert, dreimal mit PBS gewaschen und anschließend gezählt. Die Zellen wurden dann so in DMEM/10%-FCS Medium resuspendiert, dass sich eine Konzentration von etwa 5.000/50  $\mu\text{l}$  ergab und mit 50  $\mu\text{l}$ /Loch auf einer 96-Loch-Platte ausgesät. Hierzu wurden die zu testenden Zytokine in ansteigenden Dosierungen hinzugegeben. Die so behandelten Platten wurden über drei Tage bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden 0.25  $\mu\text{Ci}$ /Loch [ $^3\text{H}$ ]-Methyl-Thymidin hinzugegeben und über weitere 4 Stunden inkubiert. Die Zellen wurden nachher in einem Cell-Harvester (Inotech, Dottikon, Schweiz) auf Glasfaserfilter (Printed Filtermat A, Wallac, Turku, Finnland) geerntet. Diese Glasfaserfilter wurden schließlich in Szintillatorflüssigkeit (Betaplate 1450 Scint, Wallac, Turku, Finnland) getränkt und der Thymidineinbau im Liquid Scintillation & Luminescence Counter 1450 Microbeta (Wallac, Turku, Finnland) gemessen.

### 2.2.9 Transiente Transfektion von HepG2-Zellen

Am Tag vor der Transfektion wurden die HepG2-Zellen auf 20 cm<sup>2</sup> Kulturschalen so gesplittet, dass sie zum Zeitpunkt der Transfektion eine Konfluenz von 20-50 % besaßen. 60 Minuten vor Beginn der Transfektion wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und anschließend in DMEM + Glucose bei 37 °C weiter inkubiert. 10-20  $\mu\text{g}$  DNA wurden in 62  $\mu\text{l}$  einer 2 M  $\text{CaCl}_2$ -Lösung aufgenommen, mit 500  $\mu\text{l}$  2-fach HBS versetzt und mit 10 ml Medium (DMEM + Glucose) gut durchmischt. Die Mischung wurde auf zwei 20 cm<sup>2</sup> Kulturschalen verteilt und für weitere 12 Stunden inkubiert. Danach wurde das Transfektionsmedium entfernt, die Zellen zweimal gewaschen und in DMEM-Nut-Mix-F12-Medium aufgenommen.

### 2.2.10 Stimulation von HepG2-Zellen

HepG2-Zellen wurden so auf 96 Loch Platten ausgesät, dass sie am nächsten Tag zu etwa 80 % konfluent waren. Nun wurde das Medium gegen FCS-freies Medium ausgetauscht und die Zellen für weitere 5 Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Zytokine, verdünnt in FCS-freiem Medium, zugegeben und für weitere 10 Minuten bei 37 °C inkubiert. Schließlich wurden die Zellen in Lysepuffer aufgenommen und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Zur Lyse der Zellen wurden diese auf Eis aufgetaut und dann für eine Stunde bei 4 °C rotiert. Schließlich wurde eine Immunpräzipitation mit gegen phosphorylierte Tyrosinreste gerichteten Antikörpern durchgeführt (s. 2.2.15).

### 2.2.11 Transiente Transfektion von COS-7-Zellen

Zur Transienten Transfektion von COS-7-Zellen wurde die Dimethylsulfoxid-(DMSO)-Methode angewandt (Mc Mahan et al. 1991). Dazu wurden, am Vortag gesplittete, COS-7-Zellen bei 60-80 % Konfluenz zweimal mit PBS ( $\text{NaCl}$ : 140 mM,  $\text{KCl}$ : 2,7 mM;  $\text{Na}_2\text{PO}_4$  6,5 mM;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ :

1,5 mM) gewaschen und mit 5 ml 75  $\mu$ M Chloroquin-haltigem DMEM/10%-FCS-Medium überschichtet. In die Kulturschalen wurden die Transfektionsansätze, bestehend aus 5-13  $\mu$ g Plasmid DNA, 435  $\mu$ l DMEM/10%-FCS/75  $\mu$ M Chloroquin und 65  $\mu$ l DEAE-Dextran (4 mg/ml in PBS) langsam einpipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 4-6 Stunden bei 37 °C erfolgte ein DMSO-Schock. Hierzu wurden die Zellen für 4-6 Minuten bei Raumtemperatur in DMEM/10%-FCS mit 10 % DMSO inkubiert. Zuletzt wurden die Zellen zweimal vorsichtig mit PBS gewaschen und dann in DMEM/10%-FCS 12 Stunden bei 37 °C kultiviert. Am folgenden Tag wurde das Medium erneuert.

### 2.2.12 Kontrolle der transienten COS-7-Transfektion

Die Effizienz der transienten Transfektion in COS-7-Zellen wurde durch Transfektion des für das ‚grün fluoreszierendes Protein‘ (GFP) kodierenden Vektors pCDNA 3.1-GFP kontrolliert (erhalten von Dipl.-Biol. Björn Schuster). Je 5  $\mu$ g dieses Vektors wurden parallel zu den anderen Ansätzen nach der DMSO-Methode transfiziert. Nach 72-stündiger Kulturdauer wurde die Transfektionseffizienz unter dem Fluoreszenzmikroskop kontrolliert. Hieraus ergibt sich eine durchschnittliche Transfektionseffizienz von 50-60 %. Für die im pIRES-Vektor exprimierten Rezeptorkonstrukte konnte die Transfektionseffizienz direkt unter dem Fluoreszenzmikroskop bestimmt werden. Da es sich um einen bizystronischen Vektor handelt, unterliegt die Expression des grün fluoreszierenden Proteins wie auch die des zu exprimierenden Rezeptorkonstruktes, der Kontrolle des gleichen Promoters.

### 2.2.13 Metabolische Markierung von Proteinen mit [<sup>35</sup>S]

#### Lyse Puffer

5	ml	Tris-HCl 10 mM pH 7,4
2	g	Desoxycholsäure 0,4 %
60,5	ml	EDTA 60 mM
15	ml	SDS 0,3 % in H <sub>2</sub> O
5	g	Igepal 1 %
2	$\mu$ l	PMSF
40	$\mu$ l/ml	Protease-Inhibitor (Complete <sup>TM</sup> ; Fa. Boehringer, Mannheim), 1 Tabl./2 ml H <sub>2</sub> O

Nachdem durch das Fluoreszenzmikroskop eine effektive Transfektion nachgewiesen werden konnte, wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und das DMEM/10%-FCS Medium gegen ein FCS-freies Mangelmedium (ohne Methionin und Cystein) ausgetauscht. In diesem wurden die Zellen für 1 Stunde kultiviert. Anschließend wurde das Medium erneuert und 10 mCi/ml Trans-[<sup>35</sup>S]-Label ([<sup>35</sup>S] Methionin/Cystein) zugegeben. Die so behandelten Zellen wurden für 2 Stunden inkubiert. Anschließend wurde das radioaktive Medium gegen ein DMEM/10%-FCS Medium ausgetauscht und für weitere 2 Stunden inkubiert. Schließlich wurde das Medium abgenommen, zweimal mit PBS gewaschen und die Zellen in 1 ml Lysepuffer gelöst.

### 2.2.14 Radiochemikalien

Trans[<sup>35</sup>S]-Label wurde von ICN Biomedicals GmbH (Meckenheim) bezogen.

### 2.2.15 Immunpräzipitation

Folgende Antikörper kamen zu Anwendung:

Name des Antikörpers	Zielstruktur	Hersteller
6.2	IL-6R	(Stoyan, et al., 1993)
sc659	LIFR	Santa Cruz Biotechnology Inc. (Heidelberg)
	OSMR	Bereitgestellt von Hugues Gascan, Angers, Frankreich
sc655	gp130	Santa Cruz Biotechnology Inc. (Heidelberg)
#21320	STAT3	BD Biosciences (Heidelberg)
4G10	Anti-Phosphotyrosin Antikörper	Upstate Biotechnology (Lake Placid, New York)

Die in Lysepuffer gelösten Zellen wurden in flüssigem Stickstoff schockgefroren, anschließend bei 4 °C schonend aufgetaut, bei 10.000 \*g zentrifugiert und der Überstand jeweils in ein neues Röhrchen überführt. Hierzu wurden 100 µl Pansorbin hinzugegeben, um Proteine, die mit dem F<sub>C</sub>-Teil von Antikörpern reagieren, auszufällen und die Lösung bei 4 °C für 1 Stunde rotiert. Anschließend wurde mit 10.000 \*g für 2 Minuten zentrifugiert, der Überstand in ein neues Röhrchen überführt und jeweils 1 µg/ml des entsprechenden Antikörpers zugegeben, welcher bei 4 °C für 12 Stunden inkubiert wurde. Zur Fällung der Immunkomplexe wurde dann 100 µl gequollene Protein-A-Sepharose zugegeben und unter Rotation bei 4 °C für 1 Stunde inkubiert. Schließlich wurde die Protein-A-Sepharose mit den gebundenen Immunkomplexen bei 10.000 \*g abzentrifugiert, einmal mit PBS und einmal mit Lysepuffer gewaschen und dann in 30 µl Lämmli-Puffer aufgenommen. Durch Erhitzung auf 95 °C für 10 Minuten wurden die Proteine denaturiert und die Immunkomplexe von der Protein-A-Sepharose gelöst, welche dann bei 10.000 \*g abzentrifugiert wurde. Die Analyse der Proteine erfolgte durch Auftrennung von 15 µl des Überstandes auf einem 7,5 %-igen SDS-Gel und anschließende intensivierende Fluorographie.

### 2.2.16 Natriumdodecylsulfat Polyacrylamid Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

#### Lämmli-Puffer

Tris Base pH 6,8	100	mM
Dithiotreitol (DTT)	200	mM
SDS	4	%
Bromphenolblau	0,2	%
Glycerol	20	%

#### Acrylamidlösung

Acrylamid	30	%
Bisacrylamid	0,8	%

#### Elektrophoresepuffer

Tris Base pH 6,8	25	mM
Glycin	192	mM
SDS	0,1	%

#### Gelzusammensetzungen

	4 % Sammelgel		7,5 % Trenngel		10 % Trenngel		12,5 % Trenngel	
Tris/HCl 0,5M pH 6,8	2,5	ml						
Tris/HCl 1,5M pH 8,8	-		1,7	ml	1,9	ml	3	ml
SDS (10 % in H <sub>2</sub> O)	100	µl	67	µl	75	µl	120	µl
Acrylamidlösung	1,33	ml	1,7	ml	2,5	ml	5	ml
H <sub>2</sub> O	6,1	ml	3,3	ml	3	ml	3,75	ml
TEMED	50	µl	7	µl	3	µl	6	µl
APS (10 % in H <sub>2</sub> O)	10	µl	70	µl	75	µl	120	µl

Proteinlösungen wurden unter Verwendung von 7,5-12,5 %-igen Trenngelen und 4 %-igen Sammelgelen aufgetrennt. Die Proben zu je 10 µl wurden im Verhältnis 1:1 mit Lämmli-Puffer gemischt, für 5 Minuten bei 95 °C denaturiert und auf das Gel aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei 40-80 mA für 40-90 Minuten. Nach dem Lauf wurden die Proteine entweder mit Coomassie-Blau oder Silber gefärbt bzw. mit intensivierender Fluorographie sichtbar gemacht.

### 2.2.17 Proteingelfärbung mit Silber

<b>Fixierlösung I</b>		<b>Fixierlösung II</b>		<b>Färbelösung</b>	
Methanol	40 %	Ethanol	10 %	AgNO <sub>3</sub>	0,2g
Essigsäure in H <sub>2</sub> O	10 %	Essigsäure in H <sub>2</sub> O	15 %	in 100 ml H <sub>2</sub> O	
<b>Entwicklerlösung</b>		<b>Stopplösung</b>			
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	15,5g	Essigsäure	7 %		
Formaldehyd in 500 ml H <sub>2</sub> O	400 µl	in H <sub>2</sub> O			
<b>Reduktionslösung</b>					
Farmerscher Abschwächer 0,4 %					
in 100 ml H <sub>2</sub> O					

Das Polyacrylamidgel wurde nach erfolgter Elektrophorese für 5 Minuten in Fixierlösung I geschwenkt, dann für weitere 5 Minuten in Fixierlösung II. Nach fünfmaligem Waschen in 60 °C H<sub>2</sub>O für je 1 Minute wurde das Gel für 30 Sekunden in die Reduktionslösung getaucht und anschließend sechsmal mit 60 °C H<sub>2</sub>O gewaschen. Anschließend wurde es bei 20 °C für 12 Minuten in Färbelösung geschwenkt und für 2 Minuten in 20 °C H<sub>2</sub>O gewaschen. Das Gel wurde bis zur gewünschten Intensität der Proteinbanden in der Entwicklungslösung belassen. Durch Behandlung mit der Stopplösung ließ sich die Färbereaktion am gewünschten Punkt beenden.

### 2.2.18 Proteingelfärbung mit Coomassie-Brilliant-Blue

Färbelösung		Entfärbelösung	
Coomassie Brilliant Blue	0,25 g	Methanol	40 %
Methanol	45 ml	Essigsäure	10 %
Essigsäure	10 ml		
H <sub>2</sub> O	45 ml	in H <sub>2</sub> O	

Das Proteingel wurde nach erfolgter Elektrophorese für 1 Stunde in Färbelösung, die zugleich als Fixierlösung fungierte, gefärbt und dann für bis zu 24 Stunden entfärbt.

### 2.2.19 Intensivierende Fluorographie

Die SDS-Gele wurden nach der erfolgten Elektrophorese für 30 Minuten in 40 % Methanol/10 % Essigsäure fixiert, dann für weitere 30 Minuten in H<sub>2</sub>O gewaschen und schließlich für wiederum 30 Minuten im Szintillatior-Kit Amplify™ inkubiert. Danach wurde das Gel für eine Stunde in einer BioRad Gel Trocknungsanlage getrocknet und schließlich bei -70 °C für bis zu 48 Stunden auf einen Röntgenfilm aufgelegt.

Ein Szintillator ist eine Substanz, die, durch ionisierende Strahlung aktiviert, Licht emittiert. Dieses Prinzip macht sich die intensivierende Fluorographie zunutze. Im Falle von <sup>35</sup>S wird relativ niedrigerenergetische  $\beta$ -Strahlung abgestrahlt, welche die Probe kaum verlassen und den Film zu schwärzen vermag. Durch die Umsetzung der ionisierenden Strahlung in ultraviolettes Licht erfährt die Schwärzung des Filmes eine Zunahme um einen Faktor von ungefähr 10. Um die Empfindlichkeit des Filmes für das sehr schwache Licht zu erhöhen, wird dieser auf -70 °C heruntergekühlt. Da sich bei dieser geringen Temperatur Eiskristalle bilden, die das Gel zerstören und somit die Auflösung verschlechtern können, wird das Gel zuvor getrocknet.

### 2.2.20 Röntgenfilme

Röntgenfilme zur intensivierenden Fluorographie stammten von der Kodak GmbH (Stuttgart). Zur Anwendung kam das Modell Kodak Biomax MR.

### 2.2.21 CD-Spektroskopie

Die CD-Spektroskopie ist eine Methode, um strukturelle und sogar dynamische Informationen (Konformationsänderungen durch Ligandenbindung oder denaturierende Agenzien) über biologische Makromoleküle, insbesondere Proteine zu erhalten. Optisch aktive Substanzen zeichnen sich dadurch aus, dass links- und rechts- zirkular polarisiertes Licht verschieden stark absorbiert wird und sich mit verschiedener Geschwindigkeit ausbreitet. Dies ist dann der Fall, wenn das Molekül einen Chromophor in chiraler Umgebung besitzt. Im CD-Spektrometer wird links- und rechts- zirkular polarisiertes Licht erzeugt, welches die Testsubstanz durchläuft. Wird nun eine der beiden Komponenten unterschiedlich stark absorbiert, so resultiert in der Überlagerung der resultierenden Strahlung eine elliptische Polarisierung. Die Differenz der Extinktionskoeffizienten wird als Dichroismus bezeichnet. Das CD-Spektrum entsteht durch die Auftragung des Dichroismus als Funktion der Wellenlänge.

Hierbei ergeben sich charakteristische Kurven:

$\alpha$ -Helices besitzen je ein typisches Minimum bei 208 und 222 nm sowie ein Maximum bei 192 nm. Knäuelstrukturen dagegen haben bei 195 nm ein Minimum und ein Maximum bei 220 nm.

$\beta$ Faltblatt-Strukturen lassen sich im CD-Spektrometer etwas weniger gut beurteilen, da sie nicht so regelmäßig sind wie  $\alpha$ -Helices und weniger stark zum CD-Spektrum beitragen. Sie haben ein Minimum bei 216-218 nm und ein Maximum bei 195-200 nm.

CD-Banden von Proteinen erscheinen in zwei spektralen Regionen. In der Fern-UV- oder Amid-Region (170–250 nm) dominieren die Peptidbindungen, wohingegen CD-Banden in der Nah-UV-Region (250–300 nm) von den aromatischen Aminosäuren stammen. Zusätzlich erscheinen noch CD-Banden, die von Disulfid-Brücken stammen, im Bereich um 250 nm. Diese zwei Regionen geben unterschiedliche Information über die Proteinstruktur: CD-Banden in der Fern-UV-Region enthalten Information über die Peptidbindungen und Sekundärstrukturelemente von Proteinen. Sie werden häufig benutzt, um Änderungen in der Sekundärstruktur im Verlauf von strukturellen Übergängen (z.B. Proteinfaltung, Konformationsänderungen bei Bindung von Substrat) zu verfolgen.

IC15 wurde mit dem Gerät J-720 der Firma Jasco Labor- und Datentechnik GmbH (Groß-Umstadt), gelöst in Tris-HCl-50-mM-pH-7,4, im Bereich von 180-250 nm gemessen.

### 2.2.22 Chemikalien

Alle nicht näher bezeichneten Chemikalien wurden von den Firmen Sigma Chemie (Deisenhofen), Merck KGaA (Darmstadt), Serva Feinbiochemika (Heidelberg) und Carl Roth GmbH (Karlsruhe) bezogen. Das Szintillator-Kit für die intensivierende Fluorographie Amplify™ stammte von der Firma Amersham Pharmacia Biotech Europe GmbH (Freiburg).

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Phosphorylierung des OSMR auf HepG2-Zellen durch IC7

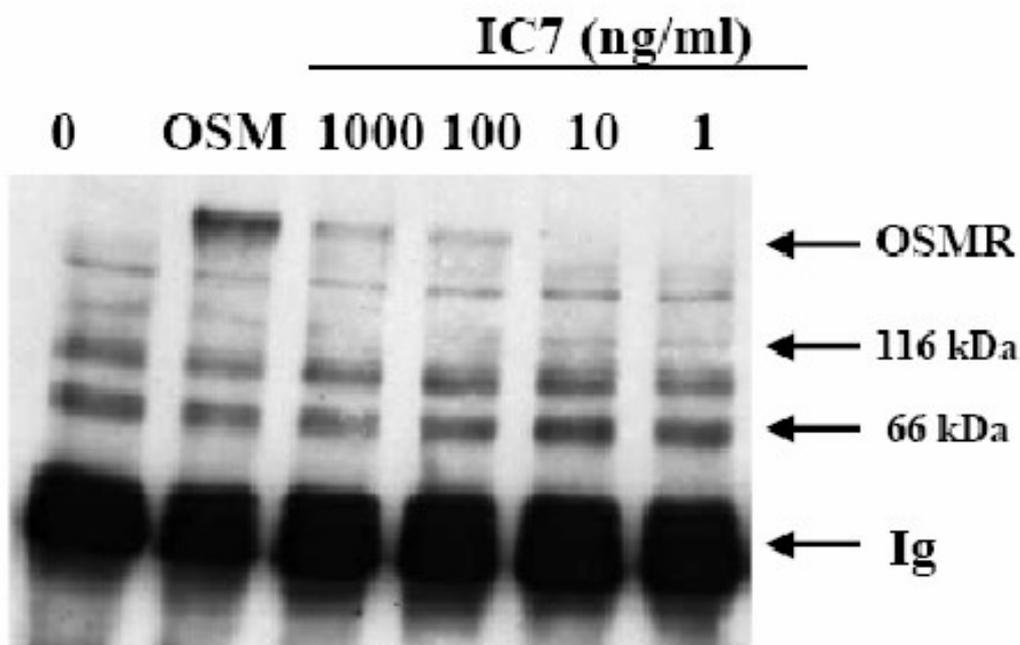
OSM kann über Site-III entweder den LIFR oder den OSMR aktivieren. CNTF und LIF aktivieren ebenfalls den LIFR über Site-III, allerdings sind beide Zytokine nicht in der Lage, den OSMR zu aktivieren. IC7 ist ein auf IL-6 basierendes Designerzytokin, auf welches das LIFR-Bindungssepitop von CNTF, also Site-III, übertragen wurde. Es sollte die Frage geklärt werden, ob die Spezifität der CNTF-Site-III gegenüber dem als  $\beta$ -Rezeptor agierenden LIFR in IC7 erhalten bleibt oder ob es durch den veränderten molekularen Kontext zu einer Promiskuität der CNTF-Site-III, ähnlich der Site-III von OSM kommt. Anders ausgedrückt, es sollte geklärt werden, ob die CNTF-Site-III in IC7 den OSMR aktivieren, das heißt phosphorylieren kann.

HepG2-Zellen exprimieren unter anderem gp130, IL-6R, LIFR und OSMR. Sie stellen daher ein geeignetes natürliches Zellsystem für Stimulationsversuche mit Zytokinen der IL-6-Familie dar. Um eine mögliche Aktivierung des OSMR durch IC7 zu untersuchen, wurden daher HepG2-Zellen mit IC7 stimuliert. Anschließend wurden die Zellen lysiert und eine Immunpräzipitation mit einem gegen den OSMR gerichteten Antikörper durchgeführt. Dieser Antikörper war erst einige Zeit zuvor entwickelt worden und machte somit den Versuch erst in dieser Form möglich. Danach wurde mit gegen phosphorylierte Tyrosinreste gerichteten Antikörpern geblottet. Hierbei zeigte sich eine dosisabhängige Phosphorylierung des OSMR (s. Abbildung 19). Obwohl die Phosphorylierung des OSMR schwächer als nach Behandlung mit OSM ist, spricht das Ergebnis für eine Aktivierung des OSMR durch IC7, das heißt durch Site-III von CNTF.

Dies steht jedoch im Gegensatz zum bisherigen Kenntnisstand, dass Site-III von CNTF, zumindest im molekularen Kontext von CNTF, nicht in der Lage ist, den OSMR zu aktivieren. Weiterhin wurde bislang angenommen, es handle sich beim OSMR um einen OSM-spezifischen  $\beta$ -Rezeptor (Mosley, et al., 1996). Beide Annahmen müssen auf Grund der hier gewonnenen Ergebnisse relativiert werden. Interessanterweise wurde, nach Fertigstellung der experimentellen Grundlagen dieser Arbeit, mit IL-31 ein weiteres Zytokin der IL-6-Familie bekannt, welches ebenfalls den OSMR aktiviert. Im Gegensatz zu allen anderen Familienmitgliedern ist hier gp130 aber kein Bestandteil des Rezeptorkomplexes (Dillon, et al., 2004).

Aufgrund der deutlich stärkeren Phosphorylierung des OSMR nach Stimulation von HepG2-Zellen durch OSM, sollte das Ergebnis dieses Versuches in einem anderen Zellsystem überprüft werden. Hierbei sollte gleichzeitig eine Aussage über die Stärke der durch IC7 zu erzielenden Aktivierung des OSMR ermöglicht werden.

Außerdem warf das Ergebnis die Frage nach der Ursache für das beobachtete Phänomen auf.



**IP: anti-OSMR, blot: anti P.Y**

**Abbildung 19.** HepG2-Zellen wurden mit steigenden Dosierungen von IC7 stimuliert. Anschließend wurde eine Immunpräzipitation mit anti-OSMR Antikörpern durchgeführt. Schließlich wurde mit gegen phosphorylierte Tyrosinreste gerichteten Antikörpern geblottet. Ab einer Schwellendosis von 10-100 ng kommt es zu einer eindeutigen Phosphorylierung des OSMR. Links im Bild zum Vergleich unbehandelte Zellen sowie Zellen, die mit 10 ng OSM stimuliert wurden. Das Ergebnis spricht für eine Aktivierung des OSMR durch IC7, was im Gegensatz zu bisherigen Erfahrungen steht.

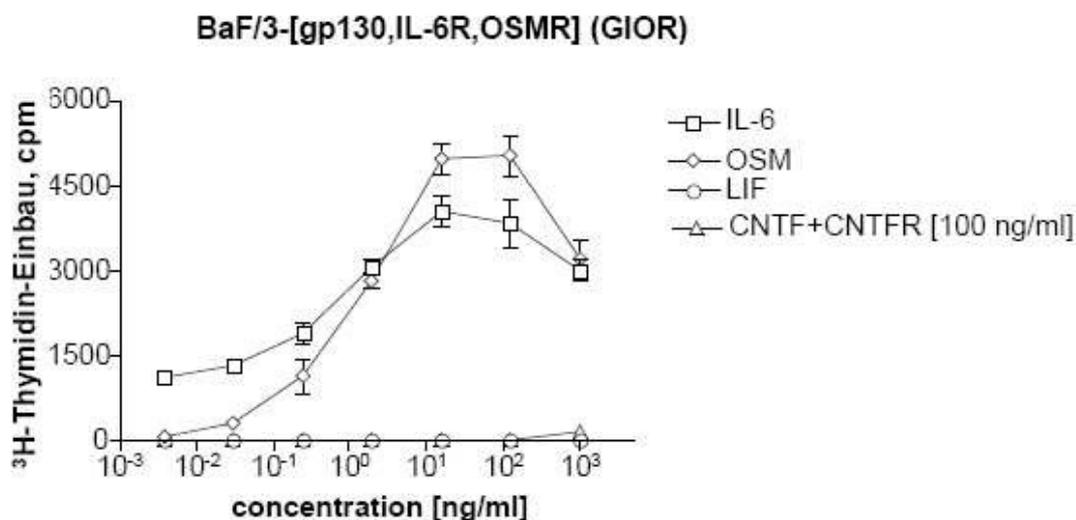
### 3.2 Etablierung einer stabilen BaF/3-Zelllinie mit gp130, IL-6R und OSMR

Da HepG2-Zellen alle klassischen signaltransduzierenden Rezeptoren der IL-6-Familie (gp130, LIFR, OSMR) exprimieren, besteht prinzipiell eine Konkurrenz verschiedener Rezeptoren um die Stimulation durch Zytokine wie z. B. OSM, die über unterschiedliche Rezeptorkomplexe zelluläre Aktivität auslösen können.

BaF/3-Zellen sind abhängig von IL-3. Steht dieses nicht zur Verfügung, gehen sie in Apoptose. Sie exprimieren natürlicherweise keinen der Rezeptoren der IL-6-Familie. Allerdings lassen sie sich durch stabile Transfektion von Rezeptoren der IL-6-Familie jedoch abhängig von der Stimulation durch Zytokine der IL-6-Familie machen. Auf diese Weise lassen sich artifizielle Zelllinien schaffen, in denen nur definierte Rezeptorkomplexe durch Zytokinstimulation aktiviert werden können. Möglicherweise störende Einflüsse durch andere Rezeptoren werden so ausgeschlossen.

Die bereits existierende BaF/3-[gp130, IL-6R]-Zelllinie (stabil mit gp130 und dem IL-6R transfiziert) wurde daher zusätzlich mit dem OSMR transfiziert, wie in 2.2.7 beschrieben. Die Zellen wurden anschließend mit OSM selektioniert, das heißt nur Zellen, die neben gp130 auch den OSMR exprimierten, erhielten einen anti-apoptischen Reiz. Die übrigen Zellen ohne OSMR starben im Verlauf ab. Die neu entstandene Zelllinie erhielt die Kurzbezeichnung GIOR-Zelllinie.

In Stimulationsversuchen mit unterschiedlichen Zytokinen der IL-6-Familie wurde gezeigt, dass die GIOR-Zellen sowohl mit OSM als auch mit IL-6 stimulierbar sind (s. Abbildung 20). Maximale Wirkung von OSM und IL-6 wurde ab einer Konzentration von ca 10 ng/ml beobachtet, was sehr gut mit der im Schrifttum beschriebenen Wirkung übereinstimmt. Die Dosis-Wirkungsbeziehung hat den für viele Zytokine typischen glockenförmigen Verlauf. Weder LIF noch die Kombination von CNTF und löslichem CNTFR (sCNTFR) entfalten eine Wirkung im untersuchten Konzentrationsbereich der Zytokine, der sich um mehr als einen Faktor  $10^5$  unterschied. Die Stimulierbarkeit der Zellen sowohl durch IL-6 als auch durch OSM beweist die gleichzeitige Expression von gp130, IL-6R und OSMR: IL-6 ist zur Signaltransduktion auf das Vorhandensein von gp130 und IL-6R angewiesen. OSM benötigt neben gp130 den OSMR.



**Abbildung 20. Proliferation einer BaF/3 Zelllinie (GIOR) mit verschiedenen Zytokinen der IL-6-Familie:** Murine BaF/3-Zellen wurden mit gp130, IL-6R, OSMR und LIFR stabil transfiziert und mit verschiedenen Zytokinen stimuliert. IL-6 und OSM zeigen typische Aktivitätsmuster. Im Fall von sCNTFR/CNTF bzw. LIF zeigt sich dagegen keinerlei Aktivität, da der LIFR als Bindungspartner für Site-III nicht vorhanden ist. In einem parallel durchgeführten Experiment mit BaF/3-[gp130, LIFR] Zellen konnte die grundsätzliche Aktivität der gleichen Chargen von LIF bzw. CNTF/sCNTFR (Mensch) demonstriert werden (vgl. Abbildung 21). Hieraus folgt, dass weder LIF noch CNTF in der Lage sind, den OSMR zu aktivieren. Auch kann die Möglichkeit der Bildung eines aktiven Komplexes aus zwei gp130 und CNTF/sCNTFR bzw. LIF ausgeschlossen werden.

In Kontrollexperimenten mit BaF/3-[gp130, LIFR]-Zellen war zuvor eine wirksame Dosis des sCNTFR ermittelt worden (s. Abbildung 21). Bei einer konstant gehaltenen Konzentration von CNTF (100 ng/ml) wurde die Konzentration des löslichen CNTFR auf bis zu 500 ng/ml erhöht. Ab einer Konzentration von ca 100 ng/ml des löslichen CNTFR näherte sich die Proliferation der BaF-Zellen dem Maximalbereich an.

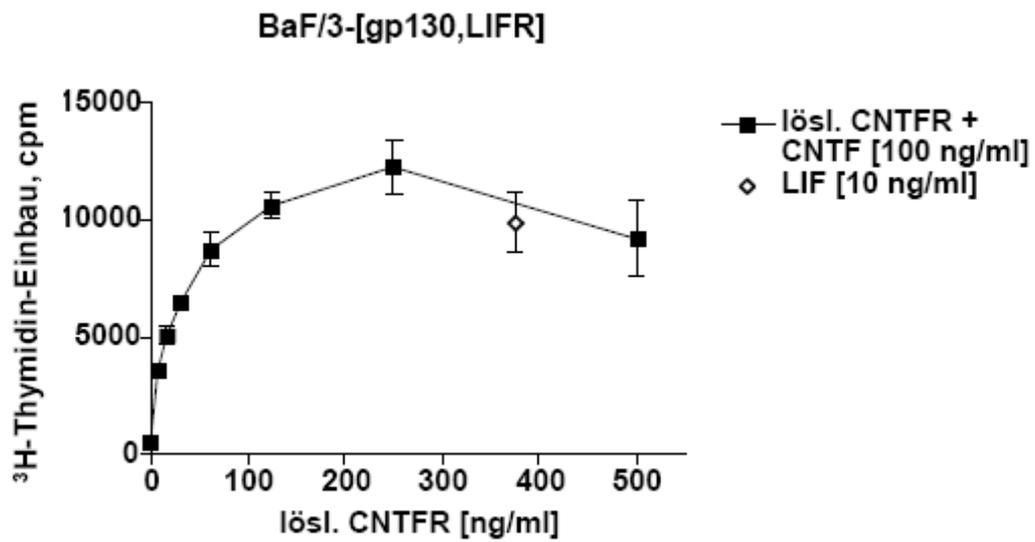


Abbildung 21. BaF/3-Zellen mit gp130 und LIFR wurden mit 10 ng/ml LIF bzw. 100 ng/ml CNTF stimuliert. Zur Optimierung des Verhältnisses von CNTF/sCNTFR wurde der lösliche CNTFR in steigender Dosierung zugegeben.

### 3.3 Stimulationsversuche mit BaF/3-[gp130,IL-6R,OSMR]- (GIOR)-Zellen und BaF/3-[gp130, IL-6R, LIFR]- (GIRL)-Zellen

Die neu etablierte GIOR-Zelllinie wurde mit LIF, OSM, IL-6 und den Designerzytokinen IC5 und IC7 stimuliert. IC5 enthält im Gegensatz zu IC7 nicht die komplette Site-III von CNTF: die BC-Schleife stammt von IL-6 (auch als Site-III-B bezeichnet), während Site-III-A (Anfang der AB-Schleife) und Site-III-C (Ende der CD-Schleife) von CNTF stammen (Kallen, K. J., et al., 1999a). Im Gegensatz zu IC7, das auf Zellen mit geeigneter Rezeptorausstattung so aktiv ist wie IL-6 und LIF, ist IC5 um den Faktor 100 weniger aktiv auf Zellen, die gp130, IL-6R und LIFR exprimieren (Kallen et al 1999).

Die Stimulation der GIOR-Zellen mit OSM zeigt einen typischen Verlauf mit Erreichen der maximalen Proliferation der Zellen zwischen 1 und 10 ng/ml (s. Abbildung 22), während die Zellen etwas sensibler auf Anregung mit IL-6 reagieren. Eine weitere Erhöhung der Konzentration von IL-6 und OSM auf über 100 ng/ml bringt keine weitere Steigerung der Proliferation, eher zeigt sich ein leichter Rückgang der Proliferation. Eine derartiger glockenförmiger Verlauf der Dosis-Wirkungskurve ist für viele Zytokine bekannt und wurde ebenfalls mehrfach für Zytokine der IL-6-Familie beschrieben (Kallen, K. J., et al., 1999a). Wie erwartet ist LIF nicht aktiv auf GIOR-Zellen, da diese nicht den LIFR exprimieren.

Genauso wie auf HepG2-Zellen erweist sich IC7 auf GIOR-Zellen aktiv. Allerdings wird Aktivität erst ab einer gewissen Schwellendosis beobachtet. Dann wird jedoch, bei steilem Anstieg, maximale Aktivität bei einer Konzentration erreicht, die ca. eine bis anderthalb Größenordnungen höher, als die von OSM ist. Überraschend zeigt IC5 eine mit IC7 identische Dosis-Wirkungsbeziehung. Bemerkenswert ist, dass sowohl IC5 als auch IC7 eine Tendenz zu supramaximaler Aktivität (im Vergleich zu OSM) aufweisen und erst bei einer Konzentration von 1000 ng/ml eine gewisse Abflachung der Dosis-Wirkungskurve zeigen.

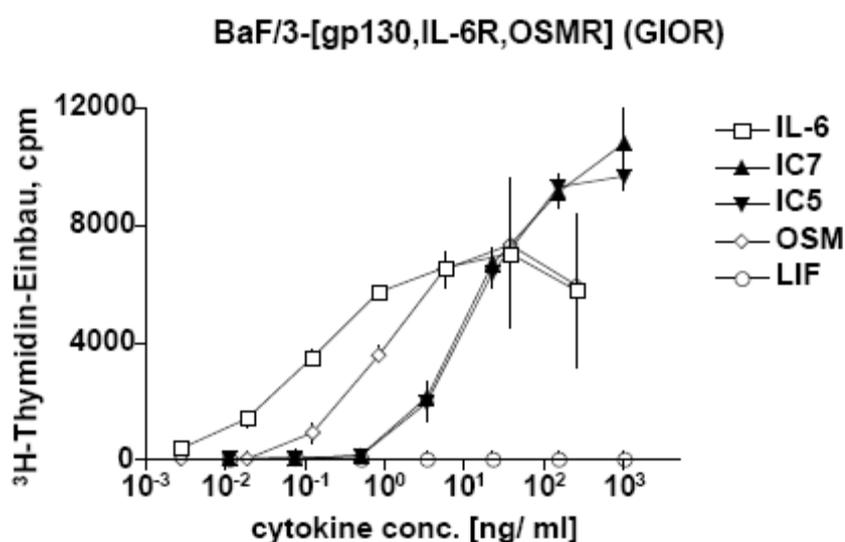


Abbildung 22. BaF/3-[gp130, IL-6R, OSMR] Zellen wurden mit verschiedenen Zytokinen der IL-6-Familie stimuliert. LIF zeigt keinerlei Aktivität. IC5 und IC7 sind ab einer Schwellendosis von 1-10 ng etwa gleich stark aktiv. Beide zeigen eine Tendenz zu supramaximaler Aktivität. Die Dosis-Wirkungsbeziehung von IL-6 und OSM beschreiben dagegen einen für Zytokine typischen glockenförmigen Verlauf.

Als Kontrolle wurden in einem Parallelansatz BaF/3-[gp130, IL-6R, LIFR] (GIRL-) Zellen mit IL-6, LIF, OSM, CNTF, IC5 und IC7 stimuliert.

IL-6, LIF und IC7 haben praktische gleiche Wirksamkeit, während OSM etwas stärker aktiv ist. Wie bereits zuvor beschrieben (Kallen, K. J., et al., 1999a), ist IC5 um einen Faktor 100 weniger aktiv als IL-6, LIF, IC7 und OSM (s. Abbildung 23). CNTF zeigt im Gegensatz zu GIRL-Zellen auf GIRL-Zellen, trotz Abwesenheit des CNTFR, bei höheren Dosen Aktivität. Eine Erklärung für dieses Phänomen wurde in der Bindung von CNTF an den humanen IL-6R gefunden, die dann die Bildung eines signalisierenden LIFR/gp130-Homodimers erlaubt (Schuster, et al., 2003).

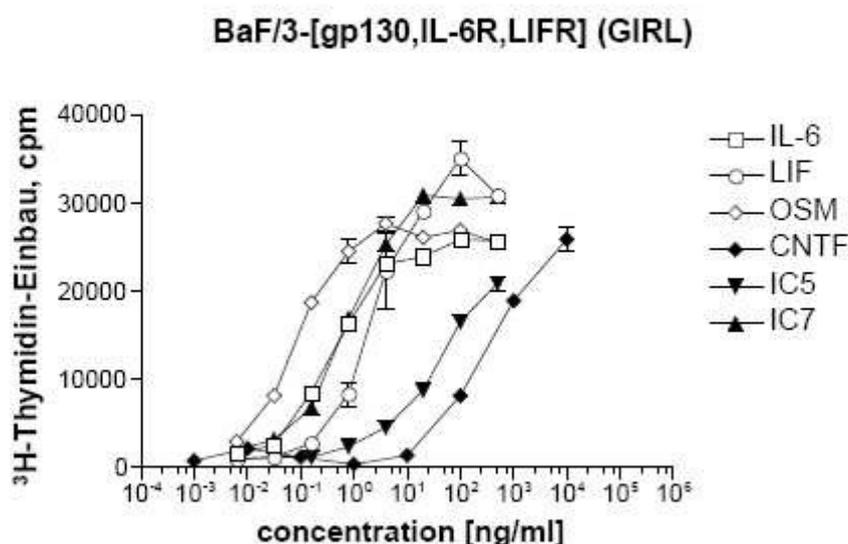
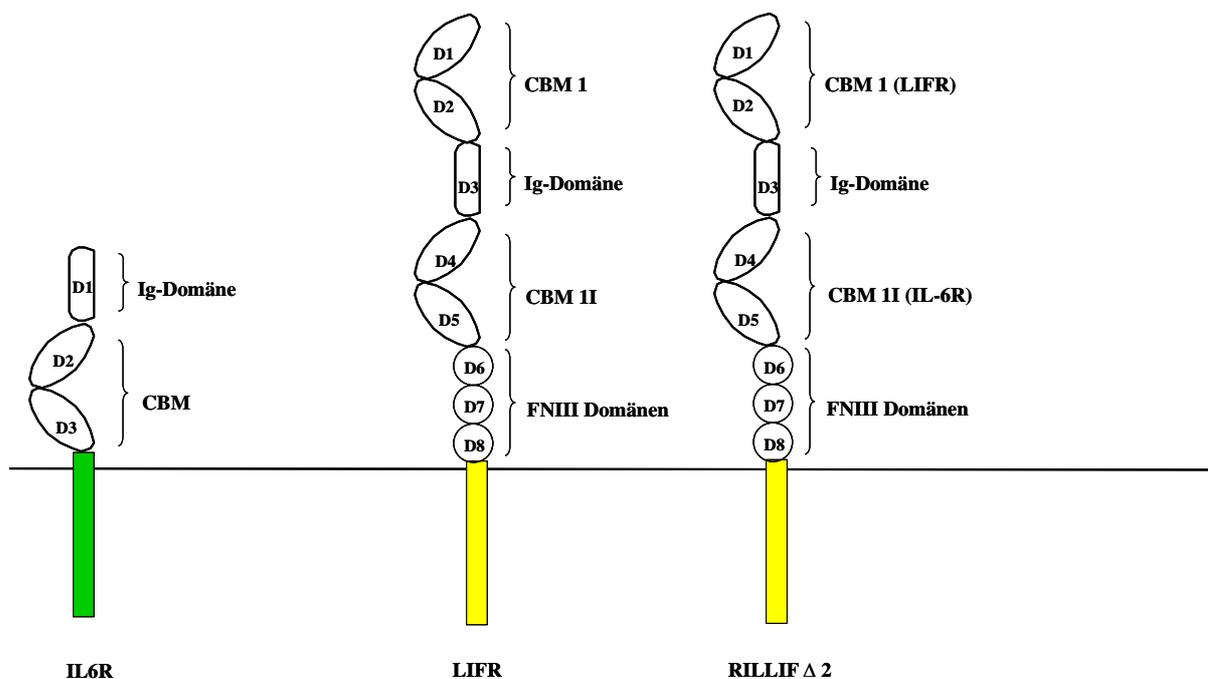


Abbildung 23. BaF/3-[gp130, IL-6R, LIFR]-Zellen wurden mit verschiedenen Zytokinen der IL-6-Familie sowie IC5 und IC7 stimuliert. IC7 zeigt eine um den Faktor 50-100 stärkere Aktivität als IC5. Ansonsten gleicht die Dosis-Wirkungsbeziehung der Chimären den übrigen verwendeten Zytokinen. Erstaunlicherweise ist CNTF in hoher Dosierung trotz fehlendem CNTFR aktiv. Dies wurde zwischenzeitlich durch Bindung von humanem CNTF an den humanen IL-6R erklärt (vgl. Schuster, et al., 2003).

### 3.4 Stimulationsversuche mit BaF/3-[gp130, RILLIF $\Delta$ 2]-Zellen

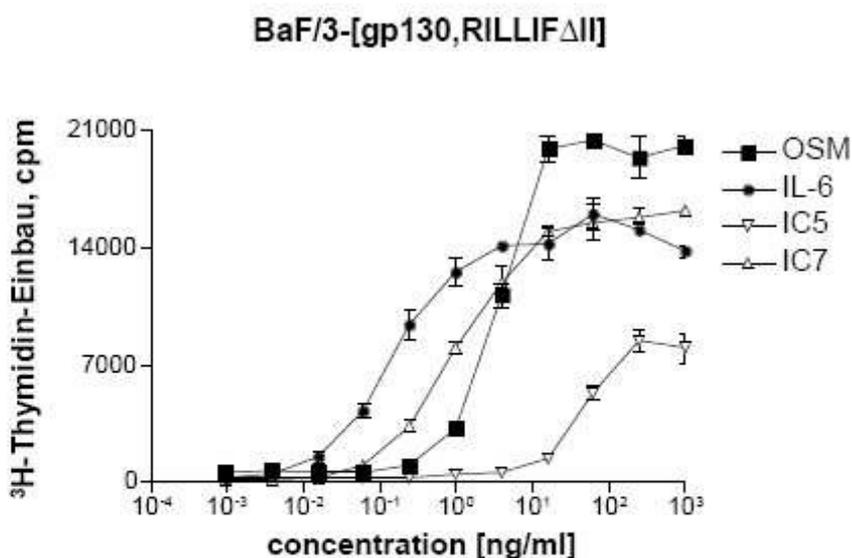
Die oben geschilderten Experimente zeigten, dass die CNTF-Site-III in einem von IL-6 stammenden Gerüst (IC7) über den OSMR zelluläre Aktivität auslösen kann, während sie dies als Bestandteil von CNTF nicht kann (s. Abbildung 20 und Abbildung 23). Ein weiterer interessanter Befund ist, dass IC5 und IC7 auf Zellen, die gp130 und OSMR als signalisierende  $\beta$ Rezeptoren exprimieren, gleich aktiv ist. Dagegen ist IC5 auf Zellen, die gp130 und LIFR als signalisierende  $\beta$ Rezeptoren exprimieren, wesentlich weniger aktiv (s. Abbildung 23). Im Vergleich zu LIFR hat der OSMR lediglich ein inkomplettes NH<sub>2</sub>-terminales zytokinbindendes Modul (s. Abbildung 8). Ferner hat IC5 im Gegensatz zu IC7 noch die BC-Schleife von IL-6 (Kallen 1999). Somit wäre eine verminderte Affinität von IC5 gegenüber dem LIFR denkbar, wodurch das Zustandekommen eines aktiven Rezeptorkomplexes erschwert würde.

Um diese Möglichkeit zu überprüfen, wurden IC5 und IC7 mit der Rezeptorchimäre RILLIF  $\Delta$ 2 getestet. RILLIF  $\Delta$ 2 ist ein Rezeptorkonstrukt, in dem das COOH-terminale Zytokinbindende Modul (CBM-II) des LIFR gegen das Zytokinbindende Modul des IL-6R ersetzt wurde (s. Abbildung 24) (Aasland, et al., 2002).



**Abbildung 24. Schematische Darstellung von RILLIF  $\Delta$ 2. Das Zytokinbindende Modul 2 (CBM-II) des LIFR (gelb) wurde gegen das Zytokinbindende Modul des IL-6R (grün) ausgetauscht.**

Auf Zellen, die neben gp130 die Rezeptorchimäre RILLIF  $\Delta$ 2 exprimieren, zeigen IL-6, IC7 und OSM jeweils ab einer Dosis von ungefähr 1 ng/ml maximale Aktivität (s. Abbildung 25). Dabei reagieren die Zellen etwas sensibler auf IL-6 und IC7 als auf OSM, während OSM etwas höhere maximale Aktivität zeigt. Hingegen bleiben sowohl die Aktivität als auch die auf GIRL-Zellen beobachtete Dosis-Wirkungsbeziehung von IC5 und IC7 erhalten. Das Experiment zeigt, dass RILLIF $\Delta$ 2 zugleich als  $\alpha$ - (IL-6, IC5, IC7) und  $\beta$ Rezeptor (OSM, IC5, IC7) fungieren kann. Das Fehlen der BC-Schleife von CNTF in IC5 verhindert anscheinend eine zu vollständiger Aktivität führende Interaktion mit den NH<sub>2</sub>-terminalen Domänen von RILLIF $\Delta$ 2.



**Abbildung 25.** BaF/3-[gp130, RILLIF  $\Delta$ II]-Zellen wurden mit OSM, IL-6, IC5 und IC7 stimuliert. Hierbei bleibt der deutliche Aktivitätsunterschied zwischen IC5 und IC7 erhalten. IL-6 und OSM sind ebenfalls aktiv.

### 3.5 Klonierung der IL-6/CNTF Chimäre IC15

Die N-terminale Domäne der, aus drei extrazellulären Domänen bestehenden,  $\alpha$ -Rezeptoren der IL-6-Familie ist nicht notwendig für die Bindung des Zytokins und die Initiierung eines aktiven Rezeptorkomplexes (s. 1.2). Für den IL-6R ist bekannt, dass die membranernahe, dritte Domäne des IL-6R 90 % zur Bindungsaffinität von IL-6 an seinen  $\alpha$ -Rezeptor beiträgt, jedoch alleine nicht hinreichend für die Bildung eines aktiven Rezeptorkomplexes mit gp130 ist (Özbek et al 1998). Die dritte Domäne berührt den C-terminalen Teil der D-Helix von IL-6, während die zweite Domäne an die AB-Schleife bindet. Die Interaktion zwischen der AB-Schleife des Zytokins und der zweiten Domäne des  $\alpha$ -Rezeptors könnte zur Stabilisierung der AB-Schleife des Zytokins und damit auch der Site-III führen, was einen Einfluß auf deren Funktionalität haben könnte. Zusätzlich könnte die im IL-6-Rezeptorkomplex beschriebene Interaktion zwischen  $\alpha$ -Rezeptor und dem an Site-III bindenden  $\beta$ -Rezeptor (Boulanger, et al., 2003) Einfluß auf die Funktionalität und Spezifität der Site-III haben.

Um den ersten Teil dieser Hypothese zu überprüfen, wurden anhand eines dreidimensionalen Computermodelles weitere Zytokin- und Rezeptorchimären entworfen. IC7 wurde mit der kompletten AB-Schleife von CNTF ausgestattet und als IC15 bezeichnet (s. Abbildung 26). Der IL-6R wurde um die beiden N-terminalen Domänen verkürzt. Diese wurden entweder durch die beiden entsprechenden Domänen des CNTFR (Rezeptorchimäre CIR2) oder nur durch die Domäne-2 des CNTFR (Rezeptorchimäre CIR2 $\Delta$ Ig) ersetzt (s. Abbildung 30).

Nach den oben ausgeführten Überlegungen würde die membranernahe Domäne der Rezeptorchimären den grössten Teil der Bindungsaffinität zur Verfügung stellen. Die vom CNTFR stammenden Domänen würden die von CNTF stammende AB-Schleife von IC15 stabilisieren. Bei

Richtigkeit des Modells würde das neue Designerzytokin IC15 in Kombination mit den  $\alpha$ -Rezeptorchimären in der Lage sein, ein signalisierendes Heterodimer aus gp130 und LIFR zu induzieren.

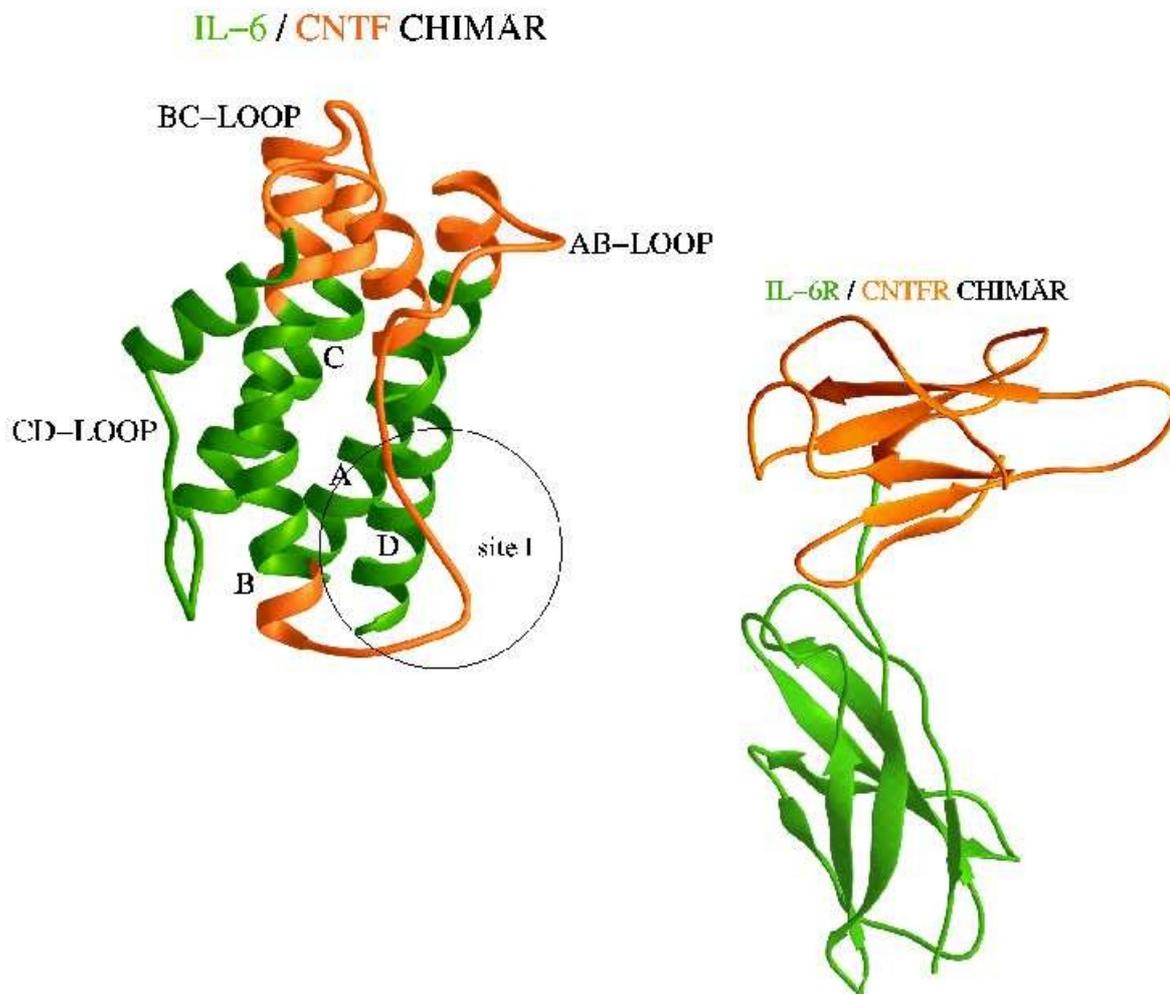


Abbildung 26. Dargestellt ist ein dreidimensionales Modell der Zytokinchimäre IC15 (links im Bild) sowie der Rezeptorchimäre CIR2. Die aus IL-6 bzw. IL-6R stammenden Teile sind in grün, die aus CNTF bzw. CNTFR stammenden Teile in orange gehalten. Durch den Kreis gekennzeichnet ist der zur Site-I gehörende Teil der AB-Schleife. Im Computermodell ergibt sich eine mögliche Interaktion zwischen der AB-Schleife (Kreis) und der Domäne-2 des Rezeptors (orange). Hierdurch kommt es möglicherweise zu einer Stabilisierung, die eine Rekrutierung von verschiedenen  $\beta$ Rezeptoren über Site-III ermöglicht.

### 3.6 Expression von IC15 in E. coli Bakterienzellen

IC15 wurde, wie in 2.1.14 beschrieben, kloniert, in E. coli Bakterien exprimiert und durch Zerstörung der Zellmembranen mittels French<sup>®</sup> Press aus dem Überstand gewonnen. Die vor und nach der Stimulation mit IPTG gewonnen Proben wurden auf ein 15 %-iges SDS-Gel aufgetragen und mittels Elektrophorese aufgetrennt. Hierbei zeigen sich Banden im Bereich von 21-23 kD, was der zu erwartenden Größe des Proteins entspricht (s. Abbildung 27 **Fehler! Verweisquelle konnte nicht gefunden werden.**).

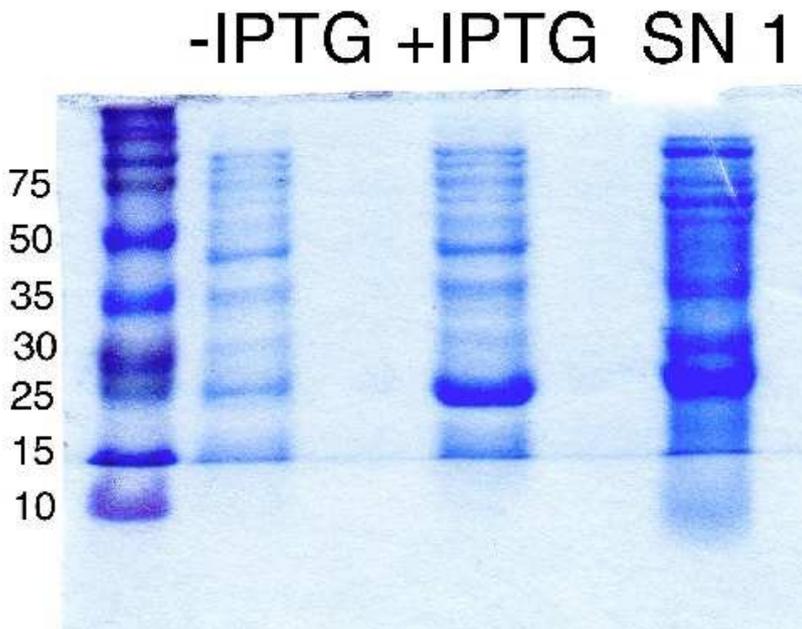
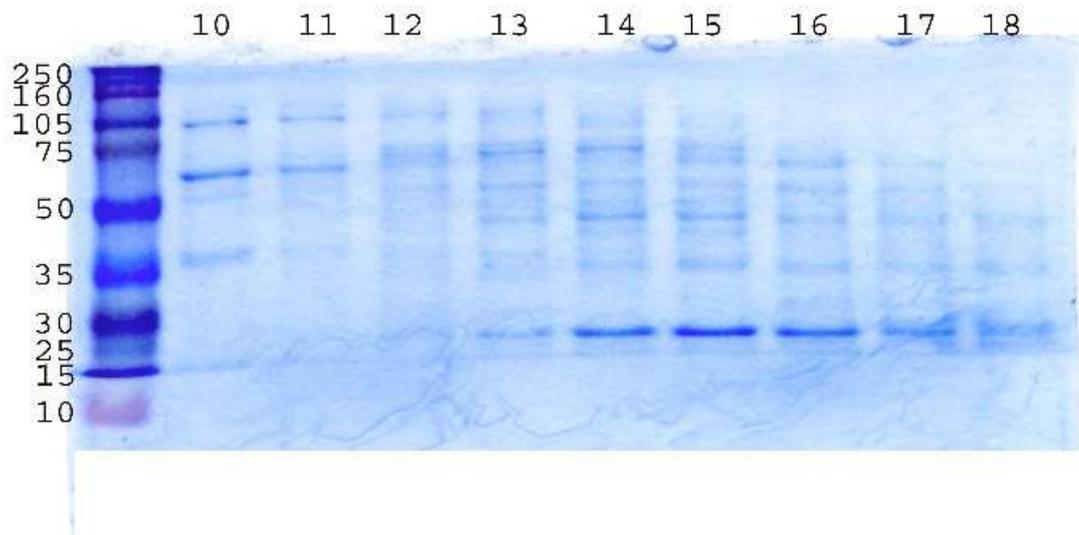


Abbildung 27. IC15 wurde in E. coli Bakterien exprimiert. Proben wurden vor und nach der Stimulation mit IPTG sowie aus dem ersten Überstand des Zell-Lysates (SN 1) genommen. Diese wurden mit Lämmli-Puffer angefärbt und auf ein 15 %-iges SDS-Gel aufgetragen. Nach Elektrophorese und Coomassie-Färbung zeigt sich bei etwa 20 KD eine Bande. Diese ist in der Probe nach Stimulation mit IPTG deutlich stärker. Bemerkenswerterweise findet sich IC15 also im Überstand. Dies spricht dafür, dass es nicht wie IL-6 in Form von Inclusionbodies ausfällt. Zum Größenvergleich links im Bild ein Längenstandard (Angaben in kD).

### 3.7 Größenausschlusschromatographie von IC15

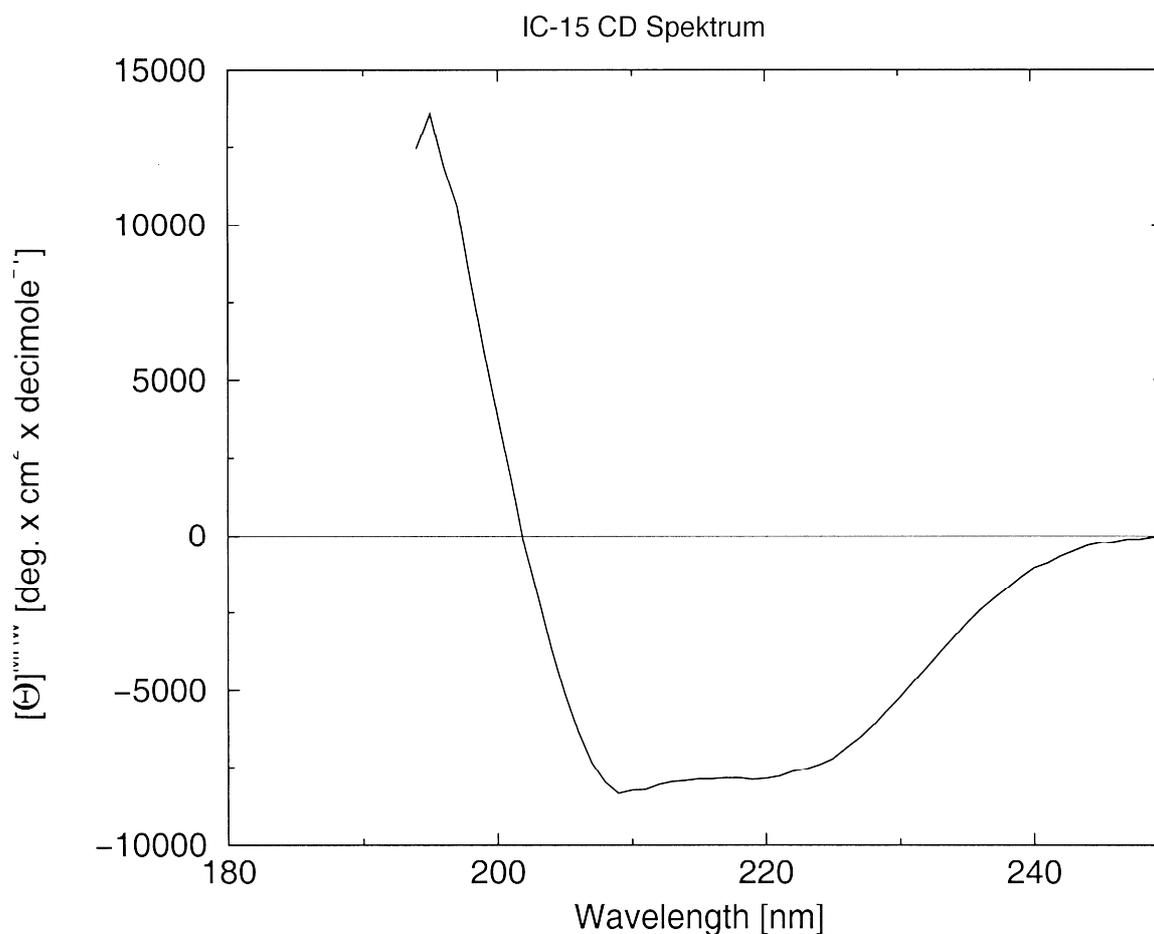
Durch Größenausschlusschromatographie wurde das zuvor mittels Centriprep® konzentrierte Protein aufgereinigt. Die photometrisch als Proteinfractionen erkannten Proben wurden anschließend, wie im vorherigen Abschnitt beschrieben, mit Lämmli-Puffer angefärbt und elektrophoretisch aufgetrennt. Auch hier zeigen sich Banden in der zu erwartenden Größe. Die stärkste Proteinfraction, Fraktion 15, wurde für die weiteren Experimente ausgewählt (s. Abbildung 28. ).



**Abbildung 28.** Die Abbildung zeigt die mittels Größenausschlusschromatographie gewonnenen Proteinfractionen. Diese wurden mittels Elektrophorese auf einem 15 %-igen SDS-Gel getrennt und anschließend mit Coomassie-Blau gefärbt. Zum Vergleich wurde ein Längenstandard mitaufgetragen. Die im Weiteren verwendete Fraktion 15 weist eine Größe von ca. 20 kD auf.

### 3.8 CD-Spektroskopische Untersuchung von IC15

Im CD-Spektrometer lassen sich strukturelle Informationen über Proteine gewinnen. Die Messung des durch Größenausschlusschromatographie aufgereinigten Proteins IC15 ergibt ein Spektrum mit einem Maximum bei 192 nm sowie zweier Minima bei 208- und 222 nm (Abbildung 29. ). Dieses, für  $\alpha$ -helikale Strukturen typische, Absorptionsmuster spricht für die korrekte Faltung des Proteins.



**Abbildung 29. CD-spektroskopische Aufnahme von IC15. Das charakteristische Maximum bei 192 nm sowie die beiden Minima bei 208- und 222 nm sprechen für eine  $\alpha$ -helikale Struktur und somit für die korrekte Faltung des Proteins.**

### 3.9 Die Klonierung der Rezeptorchimären CIR2 und CIR2 $\Delta$ Ig

Sowohl der IL-6- als auch der CNTF  $\alpha$ -Rezeptor bestehen aus drei Domänen. Die C-terminal gelegenen Domänen-2 (D2) und -3 (D3) bilden das Zytokinbindende Modul (CBM). D1 ist eine für die Funktion nicht essentielle, Ig-artige Domäne (Yawata et al. 1993). Durch Austausch der Domäne-2 des IL-6R gegen die korrespondierende des CNTFR entstand die Rezeptorchimäre CIR2 (s. Abbildung 30).

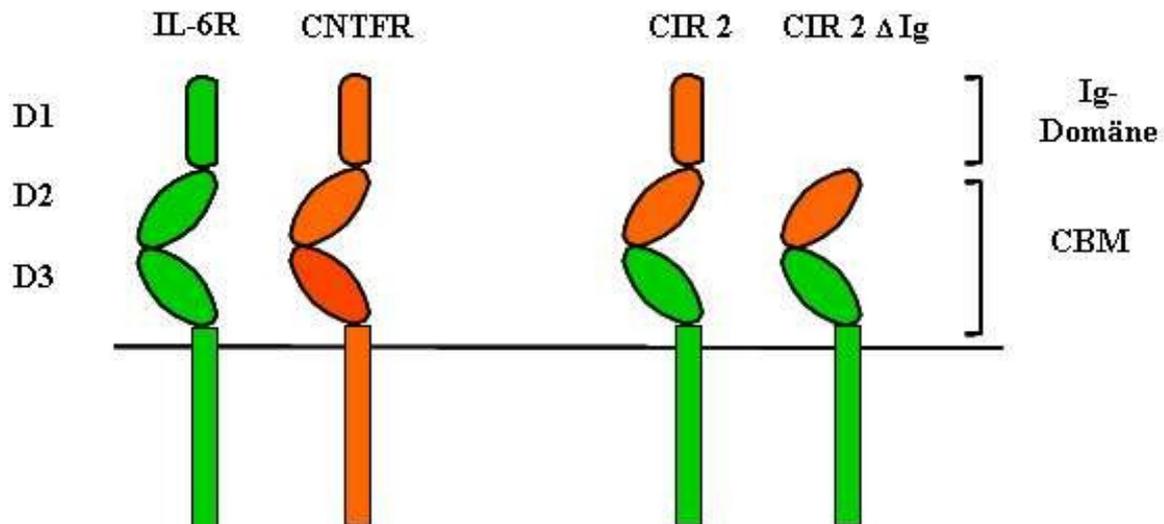


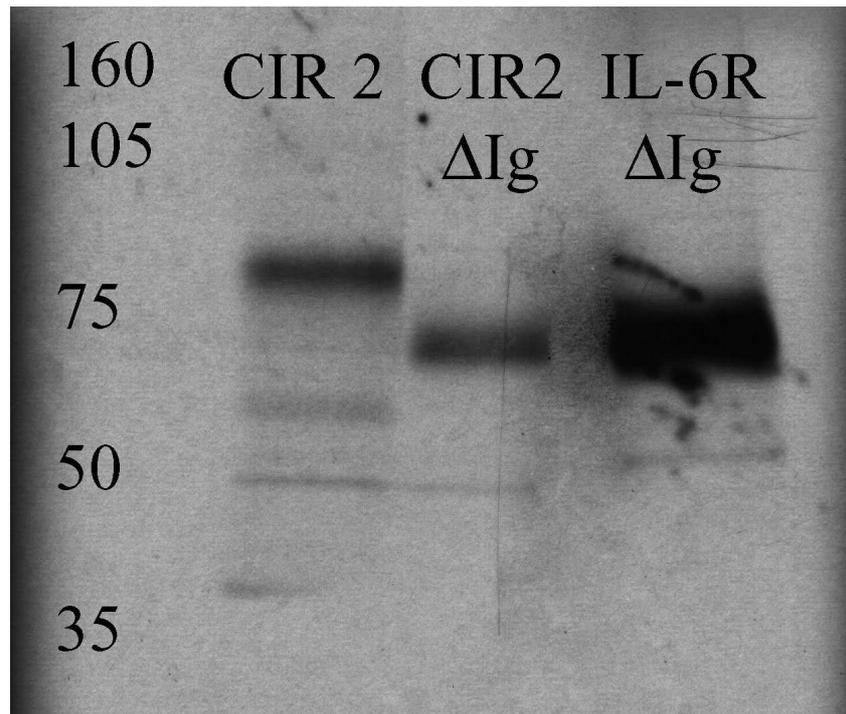
Abbildung 30. Schematische Darstellung des IL-6R (gelb), des CNTFR (orange) sowie der beiden Rezeptorchimären CIR2 und CIR2 $\Delta$ Ig.

Zunächst wurde aus IL-6R-pENTR-1A und CNTFR pSVL ein Ausgangsvektor für CIR2 kloniert, der als CIR2-Zwischenprodukt-pENTR-1A bezeichnet wurde (s. Abbildung 16). Mittels PCR-Ligations-PCR wurde ein geeignetes Stück DNA hergestellt, welches über Restriktionsschnittstellen in CIR2-Zwischenprodukt-pENTR-1A eingebracht werden konnte (s. Abbildung 16 bis 19). Die Richtigkeit der Sequenz von CIR2 wurde durch Sequenzierung bestätigt. In CIR2 $\Delta$ Ig wurde die Ig-artige Domäne eliminiert und das Signalpeptid von CNTFR direkt an die Domäne-2 angeschlossen. Mittels der LR-Klonase-Reaktion wurden die im pENTR-1A befindlichen Konstrukte schließlich in die Expressionsvektoren p409, pDCC- und pIRES umkloniert. Der Erfolg dieser Umklonierung konnte durch geeignete Testverdaus gezeigt werden.

### 3.10 Expression der Rezeptorchimären CIR2 und CIR2 $\Delta$ Ig in COS-7-Zellen

Die in den Vektoren p409, pDCC- und pIRES befindlichen Konstrukte wurden in COS-7-Zellen exprimiert und radioaktiv markiert. Durch Immunpräzipitation mit geeigneten Antikörpern, anschließender Auftrennung auf SDS-Gelen und intensivierender Fluorographie wurden die exprimierten Rezeptorkonstrukte sichtbar gemacht. Insgesamt wird das CIR2 $\Delta$ Ig-Konstrukt in allen Vektoren stärker exprimiert als das CIR2-Konstrukt (s. Abbildung 31. ).

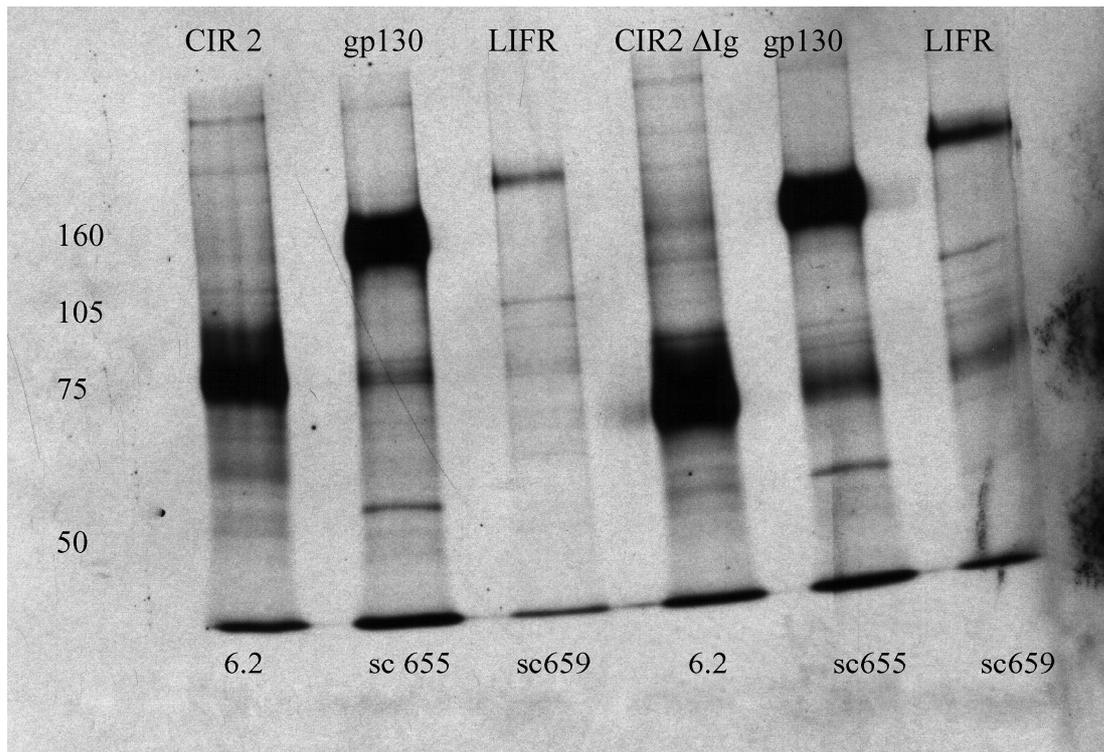
Der Ig-Domäne kommt eine wichtige Rolle beim intrazellulären Transport zu (Vollmer, et al., 1999). Möglicherweise liefert dies auch eine Erklärung für die unterschiedlich starke Expression. Ansonsten sprechen die Ergebnisse für die unterschiedlich starke Expressionskapazität der verwendeten Vektoren. Die stärkste Expression ergab sich bei Verwendung des Vektors p409. Dieser wurde daher als Expressionvektor für die anschließenden Experimente ausgewählt.



**Abbildung 31.** CIR2, CIR2  $\Delta$ Ig und IL-6R  $\Delta$ Ig, jeweils im Vektor p409, wurden in COS-7-Zellen exprimiert, radioaktiv markiert und schließlich mit dem Antikörper 6.2 aus dem Zell-Lysat präzipitiert. Anschließend wurden die Proben auf ein SDS-Gel aufgetragen und mittels Elektrophorese aufgetrennt. Die Banden wurden schließlich mittels intensivierender Fluorographie sichtbar gemacht. Links im Bild ist ein Längenstandard eingetragen (Angabe in kD).

### 3.11 Coexpression von CIR2 und CIR2 $\Delta$ Ig mit gp130 und LIFR in COS-7-Zellen

Um die Möglichkeit der Coexpression der Rezeptorchimären mit gp130 und LIFR zu überprüfen und die Bedingungen für spätere Versuche zu etablieren, wurden CIR2 und CIR2  $\Delta$ Ig jeweils zusammen mit gp130 und LIFR transfiziert. Alle Rezeptoren befanden sich hierbei im Expressionsvektor p409. Anschließend wurden die jeweiligen Rezeptoren mit den Antikörpern 6.2 (anti-IL6R), sc-655 (anti-gp130) und sc-659 (anti-LIFR) aus den Zell-Lysaten ausgefällt. Durch Auftrennung auf SDS-Gelen und intensivierende Fluorographie wurden die exprimierten Rezeptoren sichtbar gemacht. Dabei zeigen sich, jeweils im Vergleich zu einem Längenstandard, Banden in der zu erwartenden Größe (s. Abbildung 32. ). Auf diese Weise wurden Bedingungen gefunden, unter denen es zur Coexpression aller drei Rezeptoren kam.



**Abbildung 32.** CIR2 und CIR2  $\Delta$ Ig wurden jeweils zusammen mit gp130 und LIFR in COS-7-Zellen transfiziert und anschließend radioaktiv markiert. Als Expressionsvektor diente hierbei der Vektor p409. Eingesetzt wurden jeweils 5  $\mu$ g DNA. Anschließend wurden die Zellen lysiert und mit dem jeweils angegebenen Antikörper (anti-IL6R: 6.2; anti-gp130: sc655; anti-LIFR: sc659) präzipitiert. Nach elektrophoretischer Trennung auf einem SDS-Gel wurden die Banden mittels intensivierender Fluorographie sichtbar gemacht. Alle Rezeptoren werden exprimiert, wobei CIR2  $\Delta$ Ig eine stärkere Expression als CIR2 zeigt. LIFR wird am schwächsten exprimiert. Hierdurch konnte die Möglichkeit der Coexpression der Rezeptorchimären mit den  $\beta$ Rezeptoren gp130 und LIFR gezeigt werden. Zur Größenorientierung links ein Größenmarker (Angabe in kD).

### 3.12 Transfektion der Rezeptorchimären CIR2 und CIR2 $\Delta$ Ig in BaF/3-Zellen

Der Versuch, die Rezeptorchimären in BaF/3-[LIFR, gp130] Zellen zu transfizieren, scheiterte wiederholt. Die Schwierigkeiten hierbei resultierten möglicherweise aus einer Inkompatibilität der Wildtyprezeptoren mit den Rezeptorchimären.

## 4 Diskussion

Ziel der vorliegenden Arbeit war, die Interaktion zwischen Liganden und Rezeptoren IL-6-artiger Zytokine besser zu verstehen. Wichtig erschien diese Frage, weil ihre Beantwortung die Entwicklung spezifischer Inhibitoren bzw. Stimulatoren von Zytokinen der IL-6-Familie ermöglichen könnte. Bei der in der Einleitung aufgezeigten großen Bedeutung dieser Moleküle in der Pathophysiologie einer Vielzahl menschlicher Erkrankungen hätten derartige Modulatoren ein erhebliches therapeutisches Potenzial. Ein spezifischer Agonist bzw. Antagonist könnte die Form eines kleinen zirkulären Peptides oder chemischen Moleküls haben (Kallen, K. J., et al., 2000). So konnten Doyle et al. mit dem Agonisten SB-247464 zeigen, dass ein kleines Molekül in der Lage sein kann, einen Zytokinrezeptor selektiv zu binden und zu stimulieren. Hierbei handelt es sich um ein kleines Molekül, das den Granulocyte colony-stimulating factor receptor binden und aktivieren kann (Doyle, et al., 2003). Bei entsprechender Modifikation wäre zweifelsohne auch eine spezifische Inhibition realisierbar. Damit bestünde die Möglichkeit, die Komplexbildung wie auch die Immunogenität mit folglich Elimination des Agens zu umgehen (Kallen, K. J., 2002, Kallen, K. J., et al., 1997, Kallen, K. J., et al., 1999b). Sowohl die Komplexbildung als auch die Immunogenität hatten in der Vergangenheit erhebliche Probleme in der Etablierung von inhibitorisch wirksamen Therapieansätzen bereitet (Bataille, et al., 1995, Lu, et al., 1995, Wendling, et al., 1993).

Voraussetzung für die erfolgreiche Entwicklung eines solchen Agens ist das genaue Verständnis der Interaktion zwischen Zytokin und Rezeptor. Die heutigen Modelle für die Interaktion zwischen IL-6, IL-6R und den  $\beta$ -Rezeptoren basieren auf strukturellen Informationen einerseits und funktionellen Studien andererseits. Außerdem dienten Vergleiche zu anderen, bereits zuvor erforschten Modellen, vor allem des Growth Hormone (Wachstumshormon) (de Vos, et al., 1992). Dieses zeigt ähnliche Struktur- und Signalisierungsmechanismen wie die Typ-I-Zytokine, zu denen die Interleukine gezählt werden (Ozaki, et al., 2002).

Strukturelle Informationen konnten sowohl aus röntgenkristallographischen- als auch magnetresonanzspektroskopischen Studien gewonnen werden. Hierbei gelangen Xu et al. 1997 die Auflösung der Struktur von IL-6 mittels Magnetresonanzspektroskopie (Xu, et al., 1997), während Somers et al. im gleichen Jahr die Struktur mittels Röntgenkristallographie darstellten (Somers, et al., 1997). Boulanger et al. konnten 2003 röntgenkristallographisch einen hexameren Komplex aus IL-6, IL-6R und gp130 darstellen. Huyton et al. publizierten im Jahr 2007 die röntgenkristallographische Struktur eines Komplex aus LIF und LIFR (Huyton, et al., 2007). Basierend auf den strukturellen Informationen wurden in der Vergangenheit dreidimensionale Modelle entwickelt, um bestimmte Epitope abzugrenzen. Die Richtigkeit der Modelle wurde dann jeweils mittels Mutationsstudien geprüft. Allerdings beweist die Funktionslosigkeit eines mutierten Zytokins nicht notwendigerweise die Zerstörung eines Epitops, da die Einfügung einer Mutation auch zu einer veränderten Architektur und dadurch bedingten Funktionslosigkeit des Proteins führen kann. Eine interessante Alternative hierzu könnte der Austausch ganzer Module zwischen Proteinen sein, wie er für IL-6-artige Zytokine erfolgreich angewandt wurde. Bei Austausch eines funktionell wichtigen Bereiches eines Zytokins durch den gleichartigen Bereich eines anderen entsteht idealerweise ein funktionstüchtiges Zytokin mit veränderten Eigenschaften. Eine mögliche Denaturierung oder ähnliche Veränderungen der Zytokinarchitektur als Ursache für eine anschließende Funktionslosigkeit können dann ausgeschlossen werden.

Ausgangspunkt der experimentellen Arbeiten waren die Designerzytokine IC5 und IC7. Bei diesen wurden die gp130-bindende Site-III von IL-6, bzw. Teile davon, durch das entsprechende, an den LIFR bindende Epitop von CNTF ersetzt. Für diese Designerzytokine konnte gezeigt werden, dass sie die Fähigkeit, über ein gp130-Homodimer zu signalisieren, verloren haben und stattdessen Bioaktivität über ein gp130/LIFR-Heterodimer auslösen (Kallen, K. J., et al., 1999a). Eine zwischenzeitlich erschienene Arbeit hatte gezeigt, dass menschliches CNTF, im Gegensatz zu der

zuvor allgemein akzeptierten Auffassung, auch den IL-6R zur Bildung eines aktiven Rezeptorkomplexes benutzen kann (Schuster, et al., 2003). Hinsichtlich der Aktivierung des OSMR ging man bislang von einer Exklusivität der Bindung zwischen OSM und OSMR aus (Mosley, et al., 1996). Im Rahmen dieser Arbeit sollte eine mögliche Aktivierung des OSMR durch IC7 untersucht werden, also geklärt werden, ob das von CNTF stammende LIFR-Bindungs epitop von IC7 auf einem IL-6-Hintergrund zur Interaktion mit dem OSMR in der Lage ist.

Überraschenderweise ergab sich, dass IC7 auf HepG2-Zellen in der Lage ist, eine Phosphorylierung des OSMR zu induzieren (s. Abbildung 19). Diese ist allerdings deutlich schwächer als die durch OSM hervorgerufene Phosphorylierung, die bereits bei einer sehr viel geringeren Dosis nachweisbar ist. Problematisch ist, dass HepG2-Zellen auch den LIFR exprimieren, der ebenfalls Teil eines durch IC7 induzierten Rezeptorkomplexes sein kann. Es wurden daher auf BaF/3-Zellen basierende Zelllinien generiert, die über einen genau definierten Besatz aus Rezeptoren der IL-6-Familie verfügen (BaF/3-[gp130, IL-6R, OSMR]- oder „GIOR“-Zellen, s. Abbildung 22). Mit diesen GIOR-Zellen konnte das Ergebnis aus dem Experiment mit den HepG2-Zellen bestätigt werden: sowohl IC5 als auch IC7 zeigten klare Aktivität, sind also beide in der Lage, ein signalisierendes Heterodimer aus gp130 und OSMR zu induzieren. Der Aktivitätsverlauf von IC5 und IC7 auf GIOR-Zellen zeigt jedoch einige Besonderheiten.

Zunächst fällt auf, dass IC5 und IC7 auf GIOR-Zellen gleiche Aktivität zeigen (s. Abbildung 22). Dies steht im Gegensatz zu dem von Kallen et al. (Kallen, K. J., et al., 1999a) beschriebenen, ca. 100-fachen Aktivitätsunterschied von IC5 und IC7 auf BaF/3-[gp130, IL-6R, LIFR]-Zellen („GIRL“-Zellen). Dieser konnte auch in den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten nachvollzogen werden (s. Abbildung 23). Vergleicht man die Wirkung von IC5 und IC7 auf GIOR-Zellen (s. Abbildung 22) mit der auf GIRL-Zellen (s. Abbildung 23), sind sowohl IC5 als auch IC7 bei niedrigen Dosen weniger aktiv als IL-6 und LIF. Im direkten Vergleich miteinander entfalten sie etwa gleiche Aktivität. Verglichen mit der Situation auf GIRL-Zellen entspricht dies einem relativen Aktivitätsverlust von IC7 auf GIOR-Zellen. Allerdings erreichen sowohl IC5 als auch IC7 auf GIOR-Zellen die gleiche Maximalaktivität wie LIF und IL-6. Tatsächlich wurde für IC5 und IC7 auf GIOR-Zellen sogar eine überschießende „Supramaximalaktivität“ bei höheren Dosen beobachtet.

Ein von Aasland et al. (Aasland, et al., 2003) vorgeschlagenes Modell für die Interaktion von IC7 mit dem Rezeptorkonstrukt RILLIF<sup>Δ</sup>II (Konstruktion von RILLIF<sup>Δ</sup>II dargestellt in Abbildung 24) schien zunächst eine mögliche Erklärung für die beobachteten Dosisabhängigkeiten zu liefern. Nach diesem Modell bindet die Ig-artige Domäne des Konstrukts an Site-III des Zytokins. Das membrannahe, vom IL-6R stammende, CBM-II bindet hingegen an Site-I. Das vom LIFR stammende CBM-I wiederum macht einen Kontakt zu gp130. In diesem Modell könnte die zur Site-III gehörende BC-Schleife zusätzlich einen Kontakt zum N-terminalen CBM-I machen. Für das Modell wird die gleiche Anordnung für die Position von LIFR und OSMR in einem aktiven Rezeptorkomplex aus IL-6R, gp130 und LIFR bzw. OSMR angenommen. IC7, dessen BC-Schleife aus dem LIFR-bindenden Epitop von CNTF stammt, könnte dann auf GIRL-Zellen mit der BC-Schleife den Kontakt zum N-terminalen CBM-I des LIFR herstellen. IC5 wäre dazu nicht in der Lage, da es noch die BC-Schleife von IL-6 besitzt. Da ein solcher Verlust einer Bindungsstelle zu einer verringerten Gesamtaffinität des Rezeptorkomplexes führt, ließe sich so der Aktivitätsunterschied von IC5 und IC7 auf GIRL-Zellen erklären. Da der OSMR nur ein verkürztes N-terminales CBM besitzt und somit dieser Kontakt wegfiel, würde man gleiche, allerdings insgesamt verringerte Aktivität für IC5 und IC7 auf GIOR-Zellen erwarten, was in der Tat in dieser Arbeit beobachtet wurde. Bei höheren Dosen würden sich dann doch genügend aktive Rezeptorkomplexe bilden können, um Zellen maximal zu stimulieren.

Obwohl das von Aasland et al. vorgeschlagene Modell scheinbar eine einfache Erklärung für die beobachteten Daten liefert, macht die zwischenzeitlich gelöste Kristallstruktur der Bindung von LIF an die ersten fünf Domänen des LIFR (Huyton, et al., 2007) das Modell obsolet. In dem von dieser Struktur abgeleiteten Modell des aktiven Komplexes aus LIF, LIFR und gp130 befindet sich das C-terminale CBM-II in räumlicher Nähe zum CBM von gp130. Die Ig-artige Domäne des

LIFR kontaktiert die Site-III von LIF, während die Domänen des N-terminalen CBM-I scheinbar nicht in Kontakt zu LIF stehen (Huyton, et al., 2007).

Verglichen zu der Kontaktstelle zwischen Site-III von IL-6 und gp130, ist der Kontakt zwischen LIF und der Ig-artigen Domäne des LIFR ausgedehnter ( $1890$  zu  $1276 \text{ \AA}^2$ ). Dies könnte die fehlende Notwendigkeit eines  $\alpha$ -Rezeptors für die Bildung eines aktiven LIF-Rezeptorkomplexes erklären. Besonders wichtig für den Kontakt sind die Aminosäuren Pro-59 (AB-Schleife) sowie Lys-153, Phe-156 und Lys-159 (CD-Schleife). Ferner machen die Aminosäuren der BC-Schleife von LIF einen Kontakt zu einer Einbuchtung in der Ig-artigen Domäne des LIFR und zur Domäne D4 (Teil des CBM-II) des LIFR, der zu der insgesamt vergrößerten Kontaktfläche beiträgt. Die BC-Schleife von IL-6 spielt für die Bildung des IL-6 Rezeptorkomplexes dagegen keine entscheidende Rolle (Boulanger, et al., 2003).

Im Gegensatz zu LIF bindet OSM zuerst an gp130, bevor der OSMR gebunden wird, gp130 ist hier also der „Bindungsrezeptor“ (Olivier, et al., 2000). Es ist daher denkbar, dass die BC-Schleife von OSM eine geringere Rolle für das Zustandekommen eines Rezeptorkomplexes mit dem OSMR spielt. Dies könnte möglicherweise den fehlenden Unterschied in der Bioaktivität von IC5 und IC7 erklären, obwohl diese, vor Bindung an die signaltransduzierenden Rezeptoren gp130 bzw. OSMR, zuerst an den IL-6R binden.

Die Bindungsenergie eines Rezeptorkomplexes reflektiert die Summe der Bindungsenergien der einzelnen Kontaktstellen in einem Komplex. Da sich der Gesamtkomplex sequentiell bildet, ließe sich das verzögerte Ansprechen auf die Stimulation mit IC5 bzw. IC7 als Ausdruck einer suboptimalen Interaktion einer frühen Kontaktstelle mit geringem Beitrag zur Gesamtbindungsenergie des Komplexes interpretieren. Bei höheren Konzentrationen könnte es dann trotzdem noch zur Bildung eines voll funktionsfähigen Komplexes kommen, wie es auch in dieser Arbeit beobachtet wurde.

In einer jüngst erschienenen Arbeit konnten Skiniotis et al (Skiniotis, et al., 2008) mit einem elektronenmikroskopischen Ansatz die Struktur des extrazellulären CNTF-Rezeptorkomplexes klären. Die Position des LIFR im CNTF-Rezeptorkomplex entspricht dabei der von Huyton et al beschriebenen Position im LIF-Rezeptorkomplex. Die membrannahen FNIII-Domänen sind dabei so arrangiert, dass die Juxtamembran- und Transmembrandomänen nach Ligandenbindung immer eng miteinander assoziiert sind. Diese starre Anordnung dient anscheinend dazu, strukturelle Information, also Änderungen durch Ligandenbindung, mit hoher Empfindlichkeit durch die Membran zu transportieren und Janus-Kinasen zu aktivieren. Hinsichtlich der beobachteten überschüssigen Maximalaktivität sowohl von IC5 als auch IC7 ließe sich spekulieren, dass leichte strukturelle Abweichungen der Position der Juxtamembran- und Transmembrandomänen von gp130 und OSMR im IC5- bzw. IC7-Rezeptorkomplex, verglichen mit dem natürlichen OSM-Rezeptorkomplex, den Effekt einer „gain-of-function“ Mutation haben könnten.

Bemerkenswertestes Ergebnis dieser Arbeit ist die Beobachtung, dass das LIFR-Bindungsepitop von CNTF in einem von IL-6 stammenden Gerüst mit dem OSMR agieren kann, während CNTF gebunden an den CNTFR hierzu nicht in der Lage ist. Zur Erklärung dieses Phänomens wurde folgende, auf der gelösten Struktur des IL-6-Rezeptorkomplexes (Boulanger, et al., 2003) basierende Hypothese aufgestellt: Im IL-6-Rezeptorkomplex stellt die Ig-artige Domäne von gp130 einen Kontakt zur Site-III von IL-6 her, der eine Gesamtfläche von  $1276 \text{ \AA}^2$  hat. Allerdings ist dies nicht der einzige Kontakt der Ig-artigen Domäne. Sie stellt zusätzlich einen  $473 \text{ \AA}^2$  großen Kontakt zur zweiten Domäne des  $\alpha$ -Rezeptors von IL-6 her. Für Zytokine, die den LIFR als Teil ihres aktiven Rezeptorkomplexes besitzen, wäre daher denkbar, dass ebenfalls ein Kontakt zwischen der Ig-artigen Domäne des LIFR und Domäne-2 des  $\alpha$ -Rezeptors existieren könnte. Dieser Kontakt könnte ebenfalls einen Einfluß auf die Spezifität ausüben.

Um die dargestellte Hypothese zu überprüfen, wurden ein artifizielles Liganden-Rezeptorpaar, bestehend aus dem Designerzytokin IC15 sowie den IL-6R/CNTFR-Chimären CIR2 und CIR2  $\Delta$ Ig geschaffen. IC15 ist von IC7 abgeleitet und besitzt im Unterschied zu diesem die komplette AB-Schleife von CNTF (s. Abbildung 26). In den CIR-Chimären sind die Domänen D1 und D2 des IL-6R durch die Domänen D1 bzw. D1 und D2 des CNTFR ersetzt (s. Abbildung 30). Diesen

Konstrukten liegen folgende Überlegungen zugrunde: Aus früheren Untersuchungen ist die Tatsache bekannt, dass die Domäne-3 des IL-6R zwar für 90 % der Bindungsenergie verantwortlich ist, diese Bindung allein aber nicht für das Zustandekommen eines aktiven Rezeptorkomplexes ausreicht (Özbek, et al., 1998). Eine Interaktion zwischen IL-6-Site-I und Domäne-1 oder -2 des IL-6R spielt also offensichtlich eine entscheidende Rolle. Yawata et al. konnten zeigen, dass Domäne-1 für die Aktivität des IL-6R nicht wichtig ist: Die Deletionsmutante IL-6R  $\Delta$ Ig zeigt eine dem natürlichen Rezeptor vergleichbare Aktivität. Bei dieser Deletionsmutante fehlt die Ig-artige Domäne-1 (Yawata, et al., 1993). Folglich findet eine funktionell wichtige Interaktion zwischen IL-6-Site-I und IL-6R-Domäne-2 statt und zwar zwischen der zur Site-I von IL-6 gehörenden AB-Schleife und der Domäne-2 des IL-6R. Diese Interaktion könnte die AB-Schleife stabilisieren, das heißt deren der Bindung des  $\beta$ -Rezeptors entgegenwirkende kinetische Energie so weit herabsetzen, dass die Interaktion zwischen Site-III-A, die Teil der AB-Schleife ist, und dem  $\beta$ -Rezeptor realisiert werden kann. Damit nun überprüft werden kann, ob ein Kontakt zwischen der Ig-Domäne des  $\beta$ -Rezeptors und der Domäne-2 des  $\alpha$ -Rezeptors wichtig für die Spezifität ist, wurde die Domäne-2 des IL-6R durch die des CNTFR ersetzt und, zur Ermöglichung eines Kontaktes zur AB-Schleife, die komplette AB-Schleife von CNTF in IC7 eingesetzt. Zusätzliche wurde ein Rezeptorkonstrukt (CIR2) entworfen, das ebenfalls die Ig-Domäne des CNTFR trägt. Auf Zellen, die gp130 und LIFR sowie eine der CIR-Chimären exprimieren, sollte IC15 so aktiv sein wie LIF. Auf Zellen mit gleicher Ausstattung, aber mit dem OSMR anstelle des LIFR, sollte IC15 dagegen keine Aktivität besitzen.

Bei der Verfolgung dieses Ansatzes traten erhebliche experimentelle Schwierigkeiten auf, die letztlich eine Beantwortung der Hypothese im zeitlichen Rahmen dieser medizinischen Arbeit verhinderten. Im Gegensatz zu IL-6 fällt IC15 bei der Expression in *E. coli* nicht in Inclusionbodies aus, was eine einfache Aufreinigung durch Waschen und Refolding der Inclusionbodies verhindert. Stattdessen musste ein aufwendigerer Weg über chromatographische Verfahren gegangen werden (vgl. Kapitel 2.2.6). Dieses konnte erfolgreich bewältigt werden. CD-spektrometrisch ließ sich zeigen, dass das hochgereinigte IC15 das typische Spektrum eines korrekt gefalteten tetrahelicalen Zytokins enthält. In COS7-Zellen wurde die Expression der Chimären CIR2 und CIR2 $\Delta$ Ig erfolgreich demonstriert. Anschließend wurden BaF3-[gp130, LIFR]-Zellen entweder mit CIR2 oder CIR2 $\Delta$ Ig transfiziert und der Versuch gemacht, erfolgreich transfizierte Zellen mit IC15 zu selektionieren. Trotz zahlreicher Versuche gelang es nicht, BaF3-[gp130, LIFR, CIR2] oder BaF3-[gp130, LIFR, CIR2 $\Delta$ Ig]-Zellen zu etablieren. Als Alternative wurde eine Triple-Transfektion von COS7-Zellen mit gp130, LIFR und CIR2 bzw. CIR2 $\Delta$ Ig durchgeführt. Ziel war, das Zustandekommen aktiver Rezeptorkomplexe nach Stimulation mit IC15 durch Nachweis der Phosphorylierung der  $\beta$ -Rezeptoren zu demonstrieren. Durch geeignete Variierung der zur Transfektion verwandten DNA-Mengen der Rezeptoren bzw. Rezeptorkonstrukte konnten optimale Transfektionsbedingungen gefunden werden, womit der experimentelle Teil dieser Arbeit abgeschlossen wurde.

Rückblickend müssen zu dem hier skizzierten Ansatz einige kritische Anmerkungen gemacht werden. In der Vergangenheit war die Herstellung von BaF/3-Zellen mit definierter Expression von Rezeptoren bzw. Rezeptorchimären der IL-6-Familie sehr erfolgreich verfolgt worden. Allerdings wurde hier immer nur entweder ein mutierter Ligand oder ein mutiertes Rezeptorkonstrukt verwandt, während in dieser Arbeit versucht wurde, ein mutiertes Rezeptorkonstrukt mit einem neuen Ligandenkonstrukt zu selektionieren. Dies setzte stillschweigend voraus, dass beide neuen Konstrukte funktionell intakt waren. Eine Vermutung die auch falsch sein kann. Daher kann der genannte Fehlschlag Ausdruck funktionell inaktiver Mutanten sein. Ferner konnte in COS7-Zellen zwar die Expression der Rezeptorkonstrukte nachgewiesen werden, Präsenz auf der Oberfläche wurde aber nicht formal nachgewiesen. Da sich somit ein positives, nicht jedoch ein negatives Ergebnis interpretieren lässt, erscheint der experimentelle Ansatz rückblickend als verbesserungswürdig.

Eine bessere Alternative bestünde darin, IC15 als Fusionsprotein mit CIR2 bzw. CIR2  $\Delta$ Ig analog zur Konstruktion von Hyper-IL-6 (Fischer, et al., 1997) zu exprimieren. In Hyper-IL-6 ist IL-6 über einen flexiblen Aminosäurenlinker mit dem CBM des IL-6R verbunden. Ein solcher Ansatz

umginge alle oben geschilderten Probleme. Würde man ein solches Hyperkonstrukt aus IC15 und CIR2 bzw. CIR2  $\Delta$ Ig am C-terminus von IC15 mit einem Tag versehen, z.B. einem Protein C-Tag (Schuster, et al., 2003), ließe es sich einfach aus dem Überstand von COS7-Zellen reinigen. Dieses ließe sich dann hinsichtlich Funktionalität direkt auf BaF3-[gp130, LIFR]- bzw. BaF3-[gp130, OSMR]-Zellen testen. Wäre ein solches Konstrukt auf BaF3-[gp130, LIFR]-, nicht aber BaF3-[gp130, OSMR]-Zellen aktiv, ließe sich daraus schließen, dass eine Interaktion der Domäne D2 des CNTFR mit der Ig-artigen Domäne des OSMR zu funktioneller Inaktivität führt. Man könnte dann noch ein neues Konstrukt klonieren, bei dem, bis auf die die AB-Schleife von IC15 kontaktierenden Bereiche der Domäne D2 des CNTFR, alle anderen Aminosäuren des  $\alpha$ -Rezeptorteils vom IL-6R stammen würden. Wäre dies dann wieder auf BaF3-[gp130, OSMR]-Zellen aktiv, hätte man ein starkes Argument für die Hypothese, dass die Spezifität der Interaktion von Site-III des Zytokins mit der Ig-artigen Domäne des  $\beta$ -Rezeptors bei den Zytokinen der IL-6-Familie, die einen  $\alpha$ -Rezeptor zur Induktion eines aktiven Rezeptorkomplexes benötigen, auch über den Kontakt zwischen der Domäne D2 des  $\alpha$ -Rezeptors und der Ig-artigen Domäne des  $\beta$ -Rezeptors bestimmt wird.

## 5 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit sollte einen Beitrag zum besseren Verständnis der komplexen Interaktionen zwischen Zytokinen und Rezeptoren Interleukin-6-artiger Zytokine leisten.

Ausgangspunkt für die experimentellen Arbeiten waren die zuvor beschriebenen Designerzytokine IC5 und IC7. Bei diesen war die Glykoprotein 130 (gp130)-bindende Site-III von Interleukin-6 ganz bzw. teilweise durch das entsprechende Leukemia Inhibitory Factor-Rezeptor (LIFR)-Bindungsepitop von Ciliary Neurotrophic Factor (CNTF) ersetzt worden. Hierdurch waren neue Zytokine entstanden, die ihre Bioaktivität nun nicht mehr über ein Homodimer aus gp130, sondern über ein Heterodimer aus gp130 und LIFR entfalten. Eine mögliche Aktivierung des Oncostatin M-Rezeptors (OSMR) durch IC7, das heißt ein Verlust der Spezifität für den LIFR, war bislang nicht untersucht worden.

Das überraschende Ergebnis dieser Arbeit ist, dass das LIFR-Bindungsepitop von CNTF nach Übertragung auf ein IL-6-Gerüst in dem Designerzytokin IC7 in der Lage ist, eine Aktivierung des OSMR auf humanen HepG2-Zellen zu induzieren. Experimente mit BaF/3-[gp130, IL-6R, OSMR]-Zellen, einer neu generierten Zelllinie, die neben gp130 und IL-6R zusätzlich den OSM-Rezeptor exprimiert, bestätigten den initialen Befund. Zusätzlich fand sich, dass die in einer früheren Arbeit auf BaF/3-[gp130, IL-6R, LIFR]-Zellen beschriebene ca. 100-fach stärkere Aktivität von IC7 gegenüber IC5 auf BaF/3-[gp130, IL-6R, OSMR]-Zellen verschwindet. Der Verlauf der Aktivitätskurven spricht für einen relativen Aktivitätsverlust von IC7 auf BaF/3-[gp130, IL-6R, OSMR]-Zellen. Allerdings erreichen beide Zytokinchimären in höherer Dosierung die gleiche Aktivität und sogar eine überschießende „Supramaximalaktivität“. Anhand der gelösten 3-D-Struktur des IL-6/IL-6R-Komplexes wurde folgende Hypothese für das veränderte Verhalten der Site-III aufgestellt: Durch eine Interaktion zwischen der Domäne D2 des Interleukin-6-Rezeptors (IL-6R) und einem Teil der zur Site-I gehörenden AB-Schleife von IL-6 kommt es zu einer Stabilisierung derselben. Dies ermöglicht die Interaktion zwischen Site-III, die ebenfalls zum Teil aus der AB-Schleife besteht, und der Ig-Domäne des  $\beta$ -Rezeptors. Dies ist möglicherweise Voraussetzung für eine Bindung zwischen der Domäne-2 des  $\alpha$ -Rezeptors und der Ig-artigen Domäne des  $\beta$ -Rezeptors. Insgesamt könnte eine Interaktion der Domäne-2 des  $\alpha$ -Rezeptors mit der Ig-artigen Domäne des  $\beta$ -Rezeptors bei allen Interleukin-6-artigen Zytokinen, die einen  $\alpha$ -Rezeptor zur Signaltransduktion benötigen, Einfluß auf die Spezifität der Site-III haben.

Zum Abschluß dieser Arbeit wurden die experimentellen Grundlagen zur Überprüfung dieser Hypothese durch die Konstruktion des Designerzytokins IC15 sowie die Rezeptorchimären CIR2 und CIR2 $\Delta$ Ig gelegt. IC15 besitzt im Unterschied zu IC7 die komplette AB-Schleife von CNTF. In den Rezeptorchimären sind die Domänen D1 und D2 des IL-6R durch die Domänen D1 bzw. D1 und D2 des CNTFR ersetzt. Auf Zellen, die gp130 und LIFR sowie eine der Rezeptorchimären exprimieren, sollte IC15 so aktiv sein wie LIF. Auf Zellen mit gleicher Ausstattung, aber mit dem OSMR anstelle des LIFR, sollte IC15 dagegen keine Aktivität besitzen. IC15 wurde in *E. coli* exprimiert, gereinigt und durch Circular Dichroism die strukturelle Integrität nachgewiesen. Für die Rezeptorchimären CIR2 und CIR2 $\Delta$ Ig wurden, als Basis für weiterführende Experimente, optimale Expressionsbedingungen ermittelt und gezeigt, dass sich diese auch in Kombination mit den signaltransduzierenden Untereinheiten gp130 und LIFR in Zellen exprimieren lassen.

Die hier gewonnenen Erkenntnisse tragen zu einem besseren Verständnis der Rezeptor-Liganden-Interaktion bei und sollen somit langfristig zur Entwicklung spezifischer Agonisten bzw. Antagonisten Interleukin-6-artiger Zytokine beitragen. Angesichts der Vielzahl menschlicher Erkrankungen, bei denen Interleukin-6-artige Zytokine eine entscheidende Rolle spielen, hätte eine Modulation der Zytokinwirkungen ein erhebliches therapeutisches Potenzial.

## 6 Literaturverzeichnis

Aarden, L. A., 1989. Hybridoma Growth Factor. *Ann N Y Acad Sci* **557** 192-8, discussion 198-9.

Aasland, D., Oppmann, B., Grötzinger, J., Rose-John, S. and Kallen, K. J., 2002. The Upper Cytokine-Binding Module and the Ig-Like Domain of the Leukaemia Inhibitory Factor (Lif) Receptor Are Sufficient for a Functional Lif Receptor Complex. *J Mol Biol* **315** (4) 637-46.

Aasland, D., Schuster, B., Grötzinger, J., Rose-John, S. and Kallen, K. J., 2003. Analysis of the Leukemia Inhibitory Factor Receptor Functional Domains by Chimeric Receptors and Cytokines. *Biochemistry* **42** (18) 5244-52.

Ali, S. A. and Steinkasserer, A., 1995. Pcr-Ligation-Pcr Mutagenesis: A Protocol for Creating Gene Fusions and Mutations. *Biotechniques* **18** (5) 746-50.

Aoki, Y., Jaffe, E. S., Chang, Y., Jones, K., Teruya-Feldstein, J., Moore, P. S. and Tosato, G., 1999. Angiogenesis and Hematopoiesis Induced by Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus-Encoded Interleukin-6. *Blood* **93** (12) 4034-43.

Atreya, R., Mudter, J., Finotto, S., Müllberg, J., Jostock, T., Wirtz, S., Schutz, M., Bartsch, B., Holtmann, M., Becker, C., Strand, D., Czaja, J., Schlaak, J. F., Lehr, H. A., Autschbach, F., Schurmann, G., Nishimoto, N., Yoshizaki, K., Ito, H., Kishimoto, T., Galle, P. R., Rose-John, S. and Neurath, M. F., 2000. Blockade of Interleukin 6 Trans Signaling Suppresses T-Cell Resistance against Apoptosis in Chronic Intestinal Inflammation: Evidence in Crohn Disease and Experimental Colitis in Vivo. *Nat Med* **6** (5) 583-8.

Atreya, R. and Neurath, M. F., 2005. Involvement of Il-6 in the Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease and Colon Cancer. *Clin Rev Allergy Immunol* **28** (3) 187-96.

Audet, J., Miller, C. L., Rose-John, S., Piret, J. M. and Eaves, C. J., 2001. Distinct Role of Gp130 Activation in Promoting Self-Renewal Divisions by Mitogenically Stimulated Murine Hematopoietic Stem Cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **98** (4) 1757-62.

Bataille, R., Barlogie, B., Lu, Z., Rossi, J., Lavabre-Bertrand, T., Beck, T., Wijdenes, J., Brochier, J. and Klein, B., 1995. Biologic Effects of Anti-Interleukin-6 Murine Monoclonal Antibody in Advanced Multiple Myeloma. *Blood* **86** (2) 685-691.

Baumann, H., Wang, Y., Morella, K. K., Lai, C. F., Dams, H., Hilton, D. J., Hawley, R. G. and Mackiewicz, A., 1996. Complex of the Soluble Il-11 Receptor and Il-11 Acts as Il-6-Type Cytokine in Hepatic and Nonhepatic Cells. *J Immunol* **157** (1) 284-90.

Bazan, J. F., 1990a. Shared Architecture of Hormone Binding Domains in Type I and II Interferon Receptors. *Cell* **61** (5) 753-4.

Bazan, J. F., 1990b. Structural Design and Molecular Evolution of a Cytokine Receptor Superfamily. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87** (18) 6934-8.

Becker, C., Fantini, M. C., Schramm, C., Lehr, H. A., Wirtz, S., Nikolaev, A., Burg, J., Strand, S., Kiesslich, R., Huber, S., Ito, H., Nishimoto, N., Yoshizaki, K., Kishimoto, T., Galle, P. R., Blessing, M., Rose-John, S. and Neurath, M. F., 2004. Tgf-Beta Suppresses Tumor Progression in Colon Cancer by Inhibition of Il-6 Trans-Signaling. *Immunity* **21** (4) 491-501.

Becker, C., Fantini, M. C., Wirtz, S., Nikolaev, A., Lehr, H. A., Galle, P. R., Rose-John, S. and Neurath, M. F., 2005. Il-6 Signaling Promotes Tumor Growth in Colorectal Cancer. *Cell Cycle* **4** (2) 217-20.

Belec, L., Mohamed, A. S., Authier, F. J., Hallouin, M. C., Soe, A. M., Cotigny, S., Gaulard, P. and Gherardi, R. K., 1999. Human Herpesvirus 8 Infection in Patients with Poems Syndrome-Associated Multicentric Castleman's Disease. *Blood* **93** (11) 3643-53.

Benigni, F., Fantuzzi, G., Sacco, S., Sironi, M., Pozzi, P., Dinarello, C., Sipe, J., Poli, V., Cappelletti, M., Paonessa, G., Pennica, D., Panayotatos, N. and Ghezzi, P., 1996. Six Different Cytokines That Share Gp130 as a Receptor Subunit, Induce Serum Amyloid a and Potentiate the Induction of Interleukin-6 and the Activation of the Hypothalamus-Pituitary-Adrenal Axis by Interleukin-1. *Blood* **87** (5) 1851-1854.

Bolin, L. M., Verity, A. N., Silver, J. E., Shooter, E. M. and Abrams, J. S., 1995. Interleukin-6 Production by Schwann Cells and Induction in Sciatic Nerve Injury. *J Neurochem* **64** (2) 850-8.

Boulanger, M. J., Chow, D. C., Brevnova, E. E. and Garcia, K. C., 2003. Hexameric Structure and Assembly of the Interleukin-6/Il-6 Alpha-Receptor/Gp130 Complex. *Science* **300** (5628) 2101-4.

Cahlin, C., Korner, A., Axelsson, H., Wang, W., Lundholm, K. and Svanberg, E., 2000. Experimental Cancer Cachexia: The Role of Host-Derived Cytokines Interleukin (Il)-6, Il-12, Interferon- $\gamma$ , and Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  Evaluated in Gene Knockout, Tumor-Bearing Mice on C57 Bl Background and Eicosanoid-Dependent Cachexia. *Cancer Res* **60** (19) 5488-5493.

Chow, D., He, X., Snow, A. L., Rose-John, S. and Garcia, K. C., 2001. Structure of an Extracellular Gp130 Cytokine Receptor Signaling Complex. *Science* **291** (5511) 2150-5.

Choy, E. H., Isenberg, D. A., Garrood, T., Farrow, S., Ioannou, Y., Bird, H., Cheung, N., Williams, B., Hazleman, B., Price, R., Yoshizaki, K., Nishimoto, N., Kishimoto, T. and Panayi, G. S., 2002. Therapeutic Benefit of Blocking Interleukin-6 Activity with an Anti-Interleukin-6 Receptor Monoclonal Antibody in Rheumatoid Arthritis: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Dose-Escalation Trial. *Arthritis Rheum* **46** (12) 3143-50.

Chung, C. D., Liao, J., Liu, B., Rao, X., Jay, P., Berta, P. and Shuai, K., 1997. Specific Inhibition of Stat3 Signal Transduction by Pias3. *Science* **278** (5344) 1803-5.

Clinchy, B., Fransson, A., Druvefors, B., Hellsten, A., Hakansson, A., Gustafsson, B., Sjobahl, R. and Hakansson, L., 2007. Preoperative Interleukin-6 Production by Mononuclear Blood Cells Predicts Survival after Radical Surgery for Colorectal Carcinoma. *Cancer* **109** (9) 1742-9.

Dalwadi, H., Krysan, K., Heuze-Vourc'h, N., Dohadwala, M., Elashoff, D., Sharma, S., Cacalano, N., Lichtenstein, A. and Dubinett, S., 2005. Cyclooxygenase-2-Dependent Activation of Signal Transducer and Activator of Transcription 3 by Interleukin-6 in Non-Small Cell Lung Cancer. *Clin Cancer Res* **11** (21) 7674-82.

Davis, S., Aldrich, T. H., Ip, N. Y., Stahl, N., Scherer, S., Farruggella, T., DiStefano, P. S., Curtis, R., Panayotatos, N., Gascan, H. and et al., 1993. Released Form of Cntf Receptor Alpha Component as a Soluble Mediator of Cntf Responses. *Science* **259** (5102) 1736-9.

De Meyts, P., 1994. The Structural Basis of Insulin and Insulin-Like Growth Factor-I Receptor Binding and Negative Co-Operativity, and Its Relevance to Mitogenic Versus Metabolic Signalling. *Diabetologia* **37 Suppl 2** S135-48.

de Vos, A. M., Ultsch, M. and Kossiakoff, A. A., 1992. Human Growth Hormone and Extracellular Domain of Its Receptor: Crystal Structure of the Complex. *Science* **255** (5042) 306-12.

Derouet, D., Rousseau, F., Alfonsi, F., Froger, J., Hermann, J., Barbier, F., Perret, D., Diveu, C., Guillet, C., Preisser, L., Dumont, A., Barbado, M., Morel, A., deLapeyriere, O., Gascan, H. and Chevalier, S., 2004. Neuropeptin, a New Il-6-Related Cytokine Signaling through the Ciliary Neurotrophic Factor Receptor. *PNAS* **101** (14) 4827-4832.

Dillon, S. R., Sprecher, C., Hammond, A., Bilsborough, J., Rosenfeld-Franklin, M., Presnell, S. R., Haugen, H. S., Maurer, M., Harder, B., Johnston, J., Bort, S., Mudri, S., Kuijper, J. L., Bukowski, T., Shea, P., Dong, D. L., Dasovich, M., Grant, F. J., Lockwood, L., Levin, S. D., LeCiel, C., Waggle, K., Day, H., Topouzis, S., Kramer, J., Kuestner, R., Chen, Z., Foster, D., Parrish-Novak, J. and Gross, J. A., 2004. Interleukin 31, a Cytokine Produced by Activated T Cells, Induces Dermatitis in Mice. *Nat Immunol* **5** (7) 752-60.

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** (10) 5487-94.

Diveu, C., Lak-Hal, A. H., Froger, J., Ravon, E., Grimaud, L., Barbier, F., Hermann, J., Gascan, H. and Chevalier, S., 2004. Predominant Expression of the Long Isoform of Gp130-

Like (Gpl) Receptor Is Required for Interleukin-31 Signaling. *Eur Cytokine Netw* **15** (4) 291-302.

Doyle, M. L., Tian, S.-S., Miller, S. G., Kessler, L., Baker, A. E., Brigham-Burke, M. R., Dillon, S. B., Duffy, K. J., Keenan, R. M., Lehr, R., Rosen, J., Schneeweis, L. A., Trill, J., Young, P. R., Luengo, J. I. and Lamb, P., 2003. Selective Binding and Oligomerization of the Murine Granulocyte Colony-Stimulating Factor Receptor by a Low Molecular Weight, Nonpeptidyl Ligand. *J. Biol. Chem.* **278** (11) 9426-9434.

Ehlers, M., Grötzinger, J., deHon, F. D., Müllberg, J., Brakenhoff, J. P., Liu, J., Wollmer, A. and Rose-John, S., 1994. Identification of Two Novel Regions of Human Il-6 Responsible for Receptor Binding and Signal Transduction. *J Immunol* **153** (4) 1744-53.

Ehlers, M., de Hon, F. D., Bos, H. K., Horsten, U., Kurapkat, G., van De Leur, H. S., Grötzinger, J., Wollmer, A., Brakenhoff, J. P. and Rose-John, S., 1995. Combining Two Mutations of Human Interleukin-6 That Affect Gp130 Activation Results in a Potent Interleukin-6 Receptor Antagonist on Human Myeloma Cells. *J Biol Chem* **270** (14) 8158-63.

Ehlers, M., Grötzinger, J., Fischer, M., Bos, H. K., Brakenhoff, J. P. and Rose-John, S., 1996. Identification of Single Amino Acid Residues of Human Il-6 Involved in Receptor Binding and Signal Initiation. *J Interferon Cytokine Res* **16** (8) 569-76.

Elson, G. C., Lelievre, E., Guillet, C., Chevalier, S., Plun-Favreau, H., Froger, J., Suard, I., de Coignac, A. B., Delneste, Y., Bonnefoy, J. Y., Gauchat, J. F. and Gascan, H., 2000. Clf Associates with Clc to Form a Functional Heteromeric Ligand for the Cntf Receptor Complex. *Nat Neurosci* **3** (9) 867-72.

Emilie, D., Wijdenes, J., Gisselbrecht, C., Jarrousse, B., Billaud, E., Blay, J., Gabarre, J., Gaillard, J., Brochier, J. and Raphael, M., 1994. Administration of an Anti-Interleukin-6 Monoclonal Antibody to Patients with Acquired Immunodeficiency Syndrome and Lymphoma: Effect on Lymphoma Growth and on B Clinical Symptoms. *Blood* **84** (8) 2472-2479.

Fischer, M., Goldschmitt, J., Peschel, C., Brakenhoff, J. P., Kallen, K. J., Wollmer, A., Grötzinger, J. and Rose-John, S., 1997. A Bioactive Designer Cytokine for Human Hematopoietic Progenitor Cell Expansion. *Nat Biotechnol* **15** (2) 142-5.

Fishman, D., Faulds, G., Jeffery, R., Mohamed-Ali, V., Yudkin, J. S., Humphries, S. and Woo, P., 1998. The Effect of Novel Polymorphisms in the Interleukin-6 (Il-6) Gene on Il-6 Transcription and Plasma Il-6 Levels, and an Association with Systemic-Onset Juvenile Chronic Arthritis. *J Clin Invest* **102** (7) 1369-76.

Gabay, C. and Kushner, I., 1999. Acute-Phase Proteins and Other Systemic Responses to Inflammation. *N Engl J Med* **340** (6) 448-454.

Galandrini, R., Cernetti, C., Albi, N., Dembech, C., Terenzi, A., Grignani, F. and Velardi, A., 1991. Interleukin-6 Is Constitutively Produced by Human Ctl Clones and Is Required to Maintain Their Cytolytic Function. *Cell Immunol* **138** (1) 11-23.

Gao, S. P., Mark, K. G., Leslie, K., Pao, W., Motoi, N., Gerald, W. L., Travis, W. D., Bornmann, W., Veach, D., Clarkson, B. and Bromberg, J. F., 2007. Mutations in the Egfr Kinase Domain Mediate Stat3 Activation Via Il-6 Production in Human Lung Adenocarcinomas. *J Clin Invest* **117** (12) 3846-56.

Giri, D., Ozen, M. and Ittmann, M., 2001. Interleukin-6 Is an Autocrine Growth Factor in Human Prostate Cancer. *Am J Pathol* **159** (6) 2159-2165.

Grivennikov, S. and Karin, M., 2008. Autocrine Il-6 Signaling: A Key Event in Tumorigenesis? *Cancer Cell* **13** (1) 7-9.

Grivennikov, S., Karin, E., Terzic, J., Mucida, D., Yu, G. Y., Vallabhapurapu, S., Scheller, J., Rose-John, S., Cheroutre, H., Eckmann, L. and Karin, M., 2009. Il-6 and Stat3 Are Required for Survival of Intestinal Epithelial Cells and Development of Colitis-Associated Cancer. *Cancer Cell* **15** (2) 103-113.

Grötzinger, J., Kernebeck, T., Kallen, K. J. and Rose-John, S., 1999. Il-6 Type Cytokine Receptor Complexes: Hexamer, Tetramer or Both? *Biol Chem* **380** (7-8) 803-13.

Grötzinger, J., 2002. Molecular Mechanisms of Cytokine Receptor Activation. *Biochim Biophys Acta* **1592** (3) 215-23.

Gubler, U., Chua, A. O., Schoenhaut, D. S., Dwyer, C. M., McComas, W., Motyka, R., Nabavi, N., Wolitzky, A. G., Quinn, P. M., Familletti, P. C. and et al., 1991. Coexpression of Two Distinct Genes Is Required to Generate Secreted Bioactive Cytotoxic Lymphocyte Maturation Factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88** (10) 4143-7.

Gustot, T., Lemmers, A., Louis, E., Nicaise, C., Quertinmont, E., Belaiche, J., Roland, S., Van Gossum, A., Deviere, J. and Franchimont, D., 2005. Profile of Soluble Cytokine Receptors in Crohn's Disease. *Gut* **54** (4) 488-495.

Hammacher, A., Wijdenes, J., Hilton, D. J., Nicola, N. A., Simpson, R. J. and Layton, J. E., 2000. Ligand-Specific Utilization of the Extracellular Membrane-Proximal Region of the Gp130-Related Signalling Receptors. *Biochem J* **345 Pt 1** 25-32.

Harre, E. M., Roth, J., Pehl, U., Kueth, M., Gerstberger, R. and Hubschle, T., 2002. Selected Contribution: Role of Il-6 in Lps-Induced Nuclear Stat3 Translocation in Sensory Circumventricular Organs During Fever in Rats. *J Appl Physiol* **92** (6) 2657-66.

Hasegawa, M., Sato, S., Ihn, H. and Takehara, K., 1999. Enhanced Production of Interleukin-6 (Il-6), Oncostatin M and Soluble Il-6 Receptor by Cultured Peripheral Blood Mononuclear Cells from Patients with Systemic Sclerosis. *Rheumatology* **38** (7) 612-617.

Haspel, R. L. and Darnell, J. E., Jr., 1999. A Nuclear Protein Tyrosine Phosphatase Is Required for the Inactivation of Stat1. *PNAS* **96** (18) 10188-10193.

Hayashi, M., Rho, M. C., Enomoto, A., Fukami, A., Kim, Y. P., Kikuchi, Y., Sunazuka, T., Hirose, T., Komiyama, K. and Omura, S., 2002. Suppression of Bone Resorption by Madindoline a, a Novel Nonpeptide Antagonist to Gp130. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99** (23) 14728-33.

Heinrich, P. C., Behrmann, I., Muller-Newen, G., Schaper, F. and Graeve, L., 1998. Interleukin-6-Type Cytokine Signalling through the Gp130/Jak/Stat Pathway. *Biochem J* **334** (Pt 2) 297-314.

Heinrich, P. C., Behrmann, I., Haan, S., Hermanns, H. M., Muller-Newen, G. and Schaper, F., 2003. Principles of Interleukin (Il)-6-Type Cytokine Signalling and Its Regulation. *Biochem J* **374** (Pt 1) 1-20.

Hideshima, T., Bergsagel, P. L., Kuehl, W. M. and Anderson, K. C., 2004. Advances in Biology of Multiple Myeloma: Clinical Applications. *Blood* **104** (3) 607-618.

Hirota, H., Kiyama, H., Kishimoto, T. and Taga, T., 1996. Accelerated Nerve Regeneration in Mice by Upregulated Expression of Interleukin (Il) 6 and Il-6 Receptor after Trauma. *J Exp Med* **183** (6) 2627-34.

Honda, M., Yamamoto, S., Cheng, M., Yasukawa, K., Suzuki, H., Saito, T., Osugi, Y., Tokunaga, T. and Kishimoto, T., 1992. Human Soluble Il-6 Receptor: Its Detection and Enhanced Release by Hiv Infection. *J Immunol* **148** (7) 2175-2180.

Horii, Y., Muraguchi, A., Iwano, M., Matsuda, T., Hirayama, T., Yamada, H., Fujii, Y., Dohi, K., Ishikawa, H., Ohmoto, Y. and et al., 1989. Involvement of Il-6 in Mesangial Proliferative Glomerulonephritis. *J Immunol* **143** (12) 3949-55.

Hosokawa, T., Kusugami, K., Ina, K., Ando, T., Shinoda, M., Imada, A., Ohsuga, M., Sakai, T., Matsuura, T., Ito, K. and Kaneshiro, K., 1999. Interleukin-6 and Soluble Interleukin-6 Receptor in the Colonic Mucosa of Inflammatory Bowel Disease. *J Gastroenterol Hepatol* **14** (10) 987-96.

Hoyland, J. A., Freemont, A. J. and Sharpe, P. T., 1994. Interleukin-6, Il-6 Receptor, and Il-6 Nuclear Factor Gene Expression in Paget's Disease. *J Bone Miner Res* **9** (1) 75-80.

Hurst, S. M., Wilkinson, T. S., McLoughlin, R. M., Jones, S., Horiuchi, S., Yamamoto, N., Rose-John, S., Fuller, G. M., Topley, N. and Jones, S. A., 2001. Il-6 and Its Soluble Receptor

Orchestrate a Temporal Switch in the Pattern of Leukocyte Recruitment Seen During Acute Inflammation. *Immunity* **14** (6) 705-14.

Huyton, T., Zhang, J.-G., Luo, C. S., Lou, M.-Z., Hilton, D. J., Nicola, N. A. and Garrett, T. P. J., 2007. An Unusual Cytokine:Ig-Domain Interaction Revealed in the Crystal Structure of Leukemia Inhibitory Factor (Lif) in Complex with the Lif Receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **104** (31) 12737-12742.

Idzerda, R. L., March, C. J., Mosley, B., Lyman, S. D., Vanden Bos, T., Gimpel, S. D., Din, W. S., Grabstein, K. H., Widmer, M. B., Park, L. S. and et al., 1990. Human Interleukin 4 Receptor Confers Biological Responsiveness and Defines a Novel Receptor Superfamily. *J Exp Med* **171** (3) 861-73.

Ilangumaran, S., Ramanathan, S. and Rottapel, R., 2004. Regulation of the Immune System by Socs Family Adaptor Proteins. *Semin Immunol* **16** (6) 351-65.

Inui, A., 1999. Cancer Anorexia-Cachexia Syndrome: Are Neuropeptides the Key? *Cancer Res* **59** (18) 4493-4501.

Jones, S. A., Horiuchi, S., Topley, N., Yamamoto, N. and Fuller, G. M., 2001. The Soluble Interleukin 6 Receptor: Mechanisms of Production and Implications in Disease. *FASEB J.* **15** (1) 43-58.

Jones, S. A. and Rose-John, S., 2002. The Role of Soluble Receptors in Cytokine Biology: The Agonistic Properties of the Sil-6r/Il-6 Complex. *Biochim Biophys Acta* **1592** (3) 251-63.

Jones, S. A., Richards, P. J., Scheller, J. and Rose-John, S., 2005. Review: Il-6 Transsignaling: The in Vivo Consequences. *Journal of Interferon & Cytokine Research* **25** (5) 241-253.

Jostock, T., Müllberg, J., Özbek, S., Atreya, R., Blinn, G., Voltz, N., Fischer, M., Neurath, M. F. and Rose-John, S., 2001. Soluble Gp130 Is the Natural Inhibitor of Soluble Interleukin-6 Receptor Transsignaling Responses. *Eur J Biochem* **268** (1) 160-167.

Kalai, M., Montero-Julian, F. A., Grötzinger, J., Fontaine, V., Vandebussche, P., Deschuyteneer, R., Wollmer, A., Brailly, H. and Content, J., 1997. Analysis of the Human Interleukin-6/Human Interleukin-6 Receptor Binding Interface at the Amino Acid Level: Proposed Mechanism of Interaction. *Blood* **89** (4) 1319-1333.

Kallen, K. J. and Rose-John, K.-H. M. z. B. S., 1997. The Therapeutic Potential of Interleukin-6 Hyperagonists and Antagonists. *Exp.Opin.Inv.Drugs* **6** (3) 237-266.

Kallen, K. J., Grötzinger, J., Lelievre, E., Vollmer, P., Aasland, D., Renne, C., Müllberg, J., Myer zum Buschenfelde, K. H., Gascan, H. and Rose-John, S., 1999a. Receptor Recognition Sites of Cytokines Are Organized as Exchangeable Modules. Transfer of the Leukemia Inhibitory Factor Receptor-Binding Site from Ciliary Neurotrophic Factor to Interleukin-6. *J Biol Chem* **274** (17) 11859-67.

Kallen, K. J. and Rose-John, P. R. G. S., 1999b. New Developments in Il-6 Dependent Biology and Therapy: Where Do We Stand and What Are the Options? *Exp.Opin.Inv.Drugs* **8** (9) 1327-1349.

Kallen, K. J., 2002. The Role of Transsignalling Via the Agonistic Soluble Il-6 Receptor in Human Diseases. *Biochim Biophys Acta* **1592** (3) 323-43.

Kawaguchi, Y., Hara, M. and Wright, T. M., 1999. Endogenous Il-1{Alpha} from Systemic Sclerosis Fibroblasts Induces Il-6 and Pdgf-A. *J. Clin. Invest.* **103** (9) 1253-1260.

Klein, B., Zhang, X., Lu, Z. and Bataille, R., 1995. Interleukin-6 in Human Multiple Myeloma. *Blood* **85** (4) 863-872.

Klein, M. A., Moller, J. C., Jones, L. L., Bluethmann, H., Kreutzberg, G. W. and Raivich, G., 1997. Impaired Neuroglial Activation in Interleukin-6 Deficient Mice. *Glia* **19** (3) 227-33.

Klouche, M., Bhakdi, S., Hemmes, M. and Rose-John, S., 1999. Novel Path to Activation of Vascular Smooth Muscle Cells: Up-Regulation of Gp130 Creates an Autocrine Activation Loop by Il-6 and Its Soluble Receptor. *J Immunol* **163** (8) 4583-9.

Klouche, M., Carruba, G., Castagnetta, L. and Rose-John, S., 2004. Virokines in the Pathogenesis of Cancer: Focus on Human Herpesvirus 8. *Ann NY Acad Sci* **1028** (1) 329-339.

Kohase, M., Henriksen-DeStefano, D., May, L. T., Vilcek, J. and Sehgal, P. B., 1986. Induction of Beta 2-Interferon by Tumor Necrosis Factor: A Homeostatic Mechanism in the Control of Cell Proliferation. *Cell* **45** (5) 659-66.

Kotler, D. P., 2000. Cachexia. *Ann Intern Med* **133** (8) 622-634.

Kukielka, G. L., Smith, C. W., Manning, A. M., Youker, K. A., Michael, L. H. and Entman, M. L., 1995. Induction of Interleukin-6 Synthesis in the Myocardium. Potential Role in Postreperfusion Inflammatory Injury. *Circulation* **92** (7) 1866-75.

Kurth, I., Horsten, U., Pflanz, S., Timmermann, A., Kuster, A., Dahmen, H., Tacke, I., Heinrich, P. C. and Muller-Newen, G., 2000. Importance of the Membrane-Proximal Extracellular Domains for Activation of the Signal Transducer Glycoprotein 130. *J Immunol* **164** (1) 273-82.

Lee, S. O., Lou, W., Hou, M., de Miguel, F., Gerber, L. and Gao, A. C., 2003. Interleukin-6 Promotes Androgen-Independent Growth in Lncap Human Prostate Cancer Cells. *Clin Cancer Res* **9** (1) 370-376.

Leonard, W. J., 1994. The Defective Gene in X-Linked Severe Combined Immunodeficiency Encodes a Shared Interleukin Receptor Subunit: Implications for Cytokine Pleiotropy and Redundancy. *Curr Opin Immunol* **6** (4) 631-5.

Leonard, W. J. and Lin, J. X., 2000. Cytokine Receptor Signaling Pathways. *J Allergy Clin Immunol* **105** (5) 877-88.

Lieblein, J. C., Ball, S., Hutzen, B., Sasser, A. K., Lin, H. J., Huang, T. H., Hall, B. M. and Lin, J., 2008. Stat3 Can Be Activated through Paracrine Signaling in Breast Epithelial Cells. *BMC Cancer* **8** 302.

Liu, B., Liao, J., Rao, X., Kushner, S. A., Chung, C. D., Chang, D. D. and Shuai, K., 1998. Inhibition of Stat1-Mediated Gene Activation by Pias1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95** (18) 10626-31.

Lu, Z. Y., Brailly, H., Wijdenes, J., Bataille, R., Rossi, J. F. and Klein, B., 1995. Measurement of Whole Body Interleukin-6 (Il-6) Production: Prediction of the Efficacy of Anti-Il-6 Treatments. *Blood* **86** (8) 3123-3131.

Lucas, S., Ghilardi, N., Li, J. and De Sauvage, F. J., 2003. Il-27 Regulates Il-12 Responsiveness of Naive Cd4+ T Cells through Stat1-Dependent and -Independent Mechanisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100** (25) 15047-52.

Manolagas, S. C. and Jilka, R. L., 1995. Bone Marrow, Cytokines, and Bone Remodeling -- Emerging Insights into the Pathophysiology of Osteoporosis. *N Engl J Med* **332** (5) 305-311.

März, P., Cheng, J. G., Gadiant, R. A., Patterson, P. H., Stoyan, T., Otten, U. and Rose-John, S., 1998. Sympathetic Neurons Can Produce and Respond to Interleukin 6. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95** (6) 3251-6.

März, P., Otten, U. and Rose-John, S., 1999. Neural Activities of Il-6-Type Cytokines Often Depend on Soluble Cytokine Receptors. *Eur J Neurosci* **11** (9) 2995-3004.

Mendel, I., Katz, A., Kozak, N., Ben-Nun, A. and Revel, M., 1998. Interleukin-6 Functions in Autoimmune Encephalomyelitis: A Study in Gene-Targeted Mice. *Eur J Immunol* **28** (5) 1727-37.

Metcalf, D., 1993. Hematopoietic Regulators: Redundancy or Subtlety? *Blood* **82** (12) 3515-3523.

Ming, J. E., Cernetti, C., Steinman, R. M. and Granelli-Piperno, A., 1989. Interleukin 6 Is the Principal Cytolytic T Lymphocyte Differentiation Factor for Thymocytes in Human Leukocyte Conditioned Medium. *J Mol Cell Immunol* **4** (4) 203-11; discussion 211-2.

Molden, J., Chang, Y., You, Y., Moore, P. S. and Goldsmith, M. A., 1997. A Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus-Encoded Cytokine Homolog (Vil-6) Activates Signaling through the Shared Gp130 Receptor Subunit. *J. Biol. Chem.* **272** (31) 19625-19631.

Montero-Julian, F. A., 2001. The Soluble Il-6 Receptors: Serum Levels and Biological Function. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* **47** (4) 583-97.

Moore, P. S., Boshoff, C., Weiss, R. A. and Chang, Y., 1996. Molecular Mimicry of Human Cytokine and Cytokine Response Pathway Genes by Kshv. *Science* **274** (5293) 1739-44.

Mosley, B., De Imus, C., Friend, D., Boiani, N., Thoma, B., Park, L. S. and Cosman, D., 1996. Dual Oncostatin M (Osm) Receptors. Cloning and Characterization of an Alternative Signaling Subunit Conferring Osm-Specific Receptor Activation. *J. Biol. Chem.* **271** (51) 32635-32643.

Müller-Newen, G., Kuster, A., Hemmann, U., Keul, R., Horsten, U., Martens, A., Graeve, L., Wijdenes, J. and Heinrich, P. C., 1998. Soluble Il-6 Receptor Potentiates the Antagonistic Activity of Soluble Gp130 on Il-6 Responses. *J Immunol* **161** (11) 6347-55.

Naugler, W. E., Sakurai, T., Kim, S., Maeda, S., Kim, K., Elsharkawy, A. M. and Karin, M., 2007. Gender Disparity in Liver Cancer Due to Sex Differences in Myd88-Dependent Il-6 Production. *Science* **317** (5834) 121-4.

Neipel, F., Albrecht, J., Ensser, A., Huang, Y., Li, J., Friedman-Kien, A. and Fleckenstein, B., 1997. Human Herpesvirus 8 Encodes a Homolog of Interleukin-6. *J. Virol.* **71** (1) 839-842.

Nelson, W. G., De Marzo, A. M. and Isaacs, W. B., 2003. Prostate Cancer. *N Engl J Med* **349** (4) 366-381.

O'Shea, J. J., Gadina, M. and Schreiber, R. D., 2002. Cytokine Signaling in 2002: New Surprises in the Jak/Stat Pathway. *Cell* **109 Suppl** S121-31.

Olivier, C., Auguste, P., Chabbert, M., Lelievre, E., Chevalier, S. and Gascan, H., 2000. Identification of a Gp130 Cytokine Receptor Critical Site Involved in Oncostatin M Response. *J Biol Chem* **275** (8) 5648-56.

Oppmann, B., Lesley, R., Blom, B., Timans, J. C., Xu, Y., Hunte, B., Vega, F., Yu, N., Wang, J., Singh, K., Zonin, F., Vaisberg, E., Churakova, T., Liu, M., Gorman, D., Wagner, J., Zurawski, S., Liu, Y., Abrams, J. S., Moore, K. W., Rennick, D., de Waal-Malefyt, R., Hannum, C., Bazan, J. F. and Kastelein, R. A., 2000. Novel P19 Protein Engages Il-12p40 to Form a Cytokine, Il-23, with Biological Activities Similar as Well as Distinct from Il-12. *Immunity* **13** (5) 715-25.

Ozaki, K. and Leonard, W. J., 2002. Cytokine and Cytokine Receptor Pleiotropy and Redundancy. *J Biol Chem* **277** (33) 29355-8.

Özbek, S., Grötzinger, J., Krebs, B., Fischer, M., Wollmer, A., Jostock, T., Müllberg, J. and Rose-John, S., 1998. The Membrane Proximal Cytokine Receptor Domain of the Human Interleukin- 6 Receptor Is Sufficient for Ligand Binding but Not for Gp130 Association. *J Biol Chem* **273** (33) 21374-9.

Pennica, D., Shaw, K. J., Swanson, T. A., Moore, M. W., Shelton, D. L., Zioncheck, K. A., Rosenthal, A., Taga, T., Paoni, N. F. and Wood, W. I., 1995. Cardiotrophin-1. *J. Biol. Chem.* **270** (18) 10915-10922.

Peters, M., Odenthal, M., Schirmacher, P., Blessing, M., Fattori, E., Ciliberto, G., Meyer zum Buschenfelde, K. H. and Rose-John, S., 1997. Soluble Il-6 Receptor Leads to a Paracrine Modulation of the Il-6-Induced Hepatic Acute Phase Response in Double Transgenic Mice. *J Immunol* **159** (3) 1474-81.

Peters, M., Muller, A. M. and Rose-John, S., 1998. Interleukin-6 and Soluble Interleukin-6 Receptor: Direct Stimulation of Gp130 and Hematopoiesis. *Blood* **92** (10) 3495-3504.

Pflanz, S., Timans, J. C., Cheung, J., Rosales, R., Kanzler, H., Gilbert, J., Hibbert, L., Churakova, T., Travis, M., Vaisberg, E., Blumenschein, W. M., Mattson, J. D., Wagner, J. L., To, W., Zurawski, S., McClanahan, T. K., Gorman, D. M., Bazan, J. F., de Waal Malefyt, R., Rennick, D. and Kastelein, R. A., 2002. Il-27, a Heterodimeric Cytokine Composed of Ebi3 and P28 Protein, Induces Proliferation of Naive Cd4(+) T Cells. *Immunity* **16** (6) 779-90.

Pflanz, S., Hibbert, L., Mattson, J., Rosales, R., Vaisberg, E., Bazan, J. F., Phillips, J. H., McClanahan, T. K., de Waal Malefyt, R. and Kastelein, R. A., 2004. Wsx-1 and Glycoprotein 130 Constitute a Signal-Transducing Receptor for Il-27. *J Immunol* **172** (4) 2225-31.

Poli, G., Bressler, P., Kinter, A., Duh, E., Timmer, W., Rabson, A., Justement, J., Stanley, S. and Fauci, A., 1990. Interleukin 6 Induces Human Immunodeficiency Virus Expression in Infected Monocytic Cells Alone and in Synergy with Tumor Necrosis Factor Alpha by Transcriptional and Post-Transcriptional Mechanisms. *J. Exp. Med.* **172** (1) 151-158.

Prieto, J., 2008. Inflammation, Hcc and Sex: Il-6 in the Centre of the Triangle. *J Hepatol* **48** (2) 380-1.

Qiu, Y., Ravi, L. and Kung, H. J., 1998. Requirement of ErbB2 for Signalling by Interleukin-6 in Prostate Carcinoma Cells. *Nature* **393** (6680) 83-5.

Riedemann, N. C., Neff, T. A., Guo, R. F., Bernacki, K. D., Laudes, I. J., Sarma, J. V., Lambris, J. D. and Ward, P. A., 2003. Protective Effects of Il-6 Blockade in Sepsis Are Linked to Reduced C5a Receptor Expression. *J Immunol* **170** (1) 503-7.

Romano, M., Sironi, M., Toniatti, C., Polentarutti, N., Fruscella, P., Ghezzi, P., Faggioni, R., Luini, W., van Hinsbergh, V., Sozzani, S., Bussolino, F., Poli, V., Ciliberto, G. and Mantovani, A., 1997. Role of Il-6 and Its Soluble Receptor in Induction of Chemokines and Leukocyte Recruitment. *Immunity* **6** (3) 315-25.

Rose-John, S., Schooltink, H., Lenz, D., Hipp, E., Dufhues, G., Schmitz, H., Schiel, X., Hirano, T., Kishimoto, T. and Heinrich, P. C., 1990. Studies on the Structure and Regulation of the Human Hepatic Interleukin-6 Receptor. *Eur J Biochem* **190** (1) 79-83.

Rose-John, S. and Heinrich, P. C., 1994. Soluble Receptors for Cytokines and Growth Factors: Generation and Biological Function. *Biochem J* **300** ( Pt 2) 281-90.

Rose-John, S., 2002. Cytokines Come of Age. *Biochim Biophys Acta* **1592** (3) 213-4.

Sambrook J., F. E. F. a. M. T., 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY

Sansone, P., Storci, G., Tavolari, S., Guarnieri, T., Giovannini, C., Taffurelli, M., Ceccarelli, C., Santini, D., Paterini, P., Marcu, K. B., Chieco, P. and Bonafe, M., 2007. Il-6 Triggers Malignant Features in Mammospheres from Human Ductal Breast Carcinoma and Normal Mammary Gland. *J Clin Invest* **117** (12) 3988-4002.

Schroers, A., Hecht, O., Kallen, K. J., Pachta, M., Rose-John, S. and Grötzinger, J., 2005. Dynamics of the Gp130 Cytokine Complex: A Model for Assembly on the Cellular Membrane. *Protein Sci* **14** (3) 783-90.

Schuster, B., Kovaleva, M., Sun, Y., Regenhard, P., Matthews, V., Grötzinger, J., Rose-John, S. and Kallen, K. J., 2003. Signaling of Human Ciliary Neurotrophic Factor (Cntrf) Revisited. The Interleukin-6 Receptor Can Serve as an Alpha-Receptor for Cntrf. *J Biol Chem* **278** (11) 9528-35.

Senaldi, G., Varnum, B. C., Sarmiento, U., Starnes, C., Lile, J., Scully, S., Guo, J., Elliott, G., McNinch, J., Shaklee, C. L., Freeman, D., Manu, F., Simonet, W. S., Boone, T. and Chang, M. S., 1999. Novel Neurotrophin-1/B Cell-Stimulating Factor-3: A Cytokine of the Il- 6 Family. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96** (20) 11458-63.

Simpson, R. J., Hammacher, A., Smith, D. K., Matthews, J. M. and Ward, L. D., 1997. Interleukin-6: Structure-Function Relationships. *Protein Sci* **6** (5) 929-55.

Sims, N. A., Jenkins, B. J., Quinn, J. M., Nakamura, A., Glatt, M., Gillespie, M. T., Ernst, M. and Martin, T. J., 2004. Glycoprotein 130 Regulates Bone Turnover and Bone Size by Distinct Downstream Signaling Pathways. *J Clin Invest* **113** (3) 379-89.

Sironi, M., Breviario, F., Proserpio, P., Biondi, A., Vecchi, A., Van Damme, J., Dejana, E. and Mantovani, A., 1989. Il-1 Stimulates Il-6 Production in Endothelial Cells. *J Immunol* **142** (2) 549-53.

Skiniotis, G., Lupardus, P. J., Martick, M., Walz, T. and Garcia, K. C., 2008. Structural Organization of a Full-Length Gp130/Lif-R Cytokine Receptor Transmembrane Complex. *Mol Cell* **31** (5) 737-48.

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** (5) 989-97.

Sprang, S. R. and Fernando Bazan, J., 1993. Cytokine Structural Taxonomy and Mechanisms of Receptor Engagement : *Current Opinion in Structural Biology* 1993, 3:815-827. *Current Opinion in Structural Biology* **3** (6) 815-827.

Stahl, N., Boulton, T. G., Farruggella, T., Ip, N. Y., Davis, S., Witthuhn, B. A., Quelle, F. W., Silvennoinen, O., Barbieri, G., Pellegrini, S. and et al., 1994. Association and Activation of Jak-Tyk Kinases by Cntf-Lif-Osm-Il-6 Beta Receptor Components. *Science* **263** (5143) 92-5.

Staskus, K. A., Sun, R., Miller, G., Racz, P., Jaslowski, A., Metroka, C., Brett-Smith, H. and Haase, A. T., 1999. Cellular Tropism and Viral Interleukin-6 Expression Distinguish Human Herpesvirus 8 Involvement in Kaposi's Sarcoma, Primary Effusion Lymphoma, and Multicentric Castleman's Disease. *J Virol* **73** (5) 4181-7.

Stephanou, A., Isenberg, D. A., Akira, S., Kishimoto, T. and Latchman, D. S., 1998. The Nuclear Factor Interleukin-6 (Nf-Il6) and Signal Transducer and Activator of Transcription-3 (Stat-3) Signalling Pathways Co-Operate to Mediate the Activation of the Hsp90beta Gene by Interleukin-6 but Have Opposite Effects on Its Inducibility by Heat Shock. *Biochem J* **330** (Pt 1) 189-95.

Stoyan, T., Michaelis, U., Schooltink, H., Van Dam, M., Rudolph, R., Heinrich, P. C. and Rose-John, S., 1993. Recombinant Soluble Human Interleukin-6 Receptor. Expression in *Escherichia Coli*, Renaturation and Purification. *Eur J Biochem* **216** (1) 239-45.

Studebaker, A. W., Storci, G., Werbeck, J. L., Sansone, P., Sasser, A. K., Tavolari, S., Huang, T., Chan, M. W., Marini, F. C., Rosol, T. J., Bonafe, M. and Hall, B. M., 2008. Fibroblasts Isolated from Common Sites of Breast Cancer Metastasis Enhance Cancer Cell Growth Rates and Invasiveness in an Interleukin-6-Dependent Manner. *Cancer Res* **68** (21) 9087-95.

Sugimoto, K., Nishimoto, N., Kishimoto, T., Yoshizaki, K. and Nishimura, T., 2005. Imaging of Lesions in a Murine Rheumatoid Arthritis Model with a Humanized Anti-Interleukin-6 Receptor Antibody. *Ann Nucl Med* **19** (4) 261-6.

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** (3) 573-81.

Taga, T. and Kishimoto, T., 1997. Gp130 and the Interleukin-6 Family of Cytokines. *Annu. Rev. Immunol.* **15** (1) 797-819.

ten Hoeve, J., de Jesus Ibarra-Sanchez, M., Fu, Y., Zhu, W., Tremblay, M., David, M. and Shuai, K., 2002. Identification of a Nuclear Stat1 Protein Tyrosine Phosphatase. *Mol. Cell. Biol.* **22** (16) 5662-5668.

Trinchieri, G., Pflanz, S. and Kastelein, R. A., 2003. The Il-12 Family of Heterodimeric Cytokines: New Players in the Regulation of T Cell Responses. *Immunity* **19** (5) 641-4.

Udagawa, N., Takahashi, N., Katagiri, T., Tamura, T., Wada, S., Findlay, D. M., Martin, T. J., Hirota, H., Taga, T., Kishimoto, T. and et al., 1995. Interleukin (Il)-6 Induction of Osteoclast Differentiation Depends on Il-6 Receptors Expressed on Osteoblastic Cells but Not on Osteoclast Progenitors. *J Exp Med* **182** (5) 1461-8.

Ueda, T., Bruchovsky, N. and Sadar, M. D., 2002. Activation of the Androgen Receptor N-Terminal Domain by Interleukin-6 Via Mapk and Stat3 Signal Transduction Pathways. *J. Biol. Chem.* **277** (9) 7076-7085.

van Dam, M., Müllberg, J., Schooltink, H., Stoyan, T., Brakenhoff, J. P., Graeve, L., Heinrich, P. C. and Rose-John, S., 1993. Structure-Function Analysis of Interleukin-6 Utilizing Human/Murine Chimeric Molecules. Involvement of Two Separate Domains in Receptor Binding. *J Biol Chem* **268** (20) 15285-90.

Van Damme, J., Cayphas, S., Opdenakker, G., Billiau, A. and Van Snick, J., 1987. Interleukin 1 and Poly(Ri).Poly(Rc) Induce Production of a Hybridoma Growth Factor by Human Fibroblasts. *Eur J Immunol* **17** (1) 1-7.

Vollmer, P., Oppmann, B., Voltz, N., Fischer, M. and Rose-John, S., 1999. A Role for the Immunoglobulin-Like Domain of the Human Il-6 Receptor. Intracellular Protein Transport and Shedding. *Eur J Biochem* **263** (2) 438-46.

Waage, A., Brandtzaeg, P., Halstensen, A., Kierulf, P. and Espevik, T., 1989. The Complex Pattern of Cytokines in Serum from Patients with Meningococcal Septic Shock. Association between Interleukin 6, Interleukin 1, and Fatal Outcome. *J. Exp. Med.* **169** (1) 333-338.

Wendling, D., Racadot, E. and Wijdenes, J., 1993. Treatment of Severe Rheumatoid Arthritis by Anti-Interleukin 6 Monoclonal Antibody. *J Rheumatol* **20** (2) 259-62.

Wolf, S. F., Temple, P. A., Kobayashi, M., Young, D., Dicig, M., Lowe, L., Dzialo, R., Fitz, L., Ferenz, C., Hewick, R. M. and et al., 1991. Cloning of Cdna for Natural Killer Cell Stimulatory Factor, a Heterodimeric Cytokine with Multiple Biologic Effects on T and Natural Killer Cells. *J Immunol* **146** (9) 3074-81.

Wormald, S. and Hilton, D. J., 2004. Inhibitors of Cytokine Signal Transduction. *J. Biol. Chem.* **279** (2) 821-824.

Xu, G. Y., Yu, H. A., Hong, J., Stahl, M., McDonagh, T., Kay, L. E. and Cumming, D. A., 1997. Solution Structure of Recombinant Human Interleukin-6. *J Mol Biol* **268** (2) 468-81.

Yamamoto, M., Yoshizaki, K., Kishimoto, T. and Ito, H., 2000. Il-6 Is Required for the Development of Th1 Cell-Mediated Murine Colitis. *J Immunol* **164** (9) 4878-82.

Yamasaki, K., Taga, T., Hirata, Y., Yawata, H., Kawanishi, Y., Seed, B., Taniguchi, T., Hirano, T. and Kishimoto, T., 1988. Cloning and Expression of the Human Interleukin-6 (Bsf-2/Ifn Beta 2) Receptor. *Science* **241** (4867) 825-8.

Yasuda, H., Shima, N., Nakagawa, N., Yamaguchi, K., Kinosaki, M., Mochizuki, S., Tomoyasu, A., Yano, K., Goto, M., Murakami, A., Tsuda, E., Morinaga, T., Higashio, K., Udagawa, N., Takahashi, N. and Suda, T., 1998. Osteoclast Differentiation Factor Is a Ligand for Osteoprotegerin/Osteoclastogenesis-Inhibitory Factor and Is Identical to Trance/Rankl. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95** (7) 3597-602.

Yawata, H., Yasukawa, K., Natsuka, S., Murakami, M., Yamasaki, K., Hibi, M., Taga, T. and Kishimoto, T., 1993. Structure-Function Analysis of Human Il-6 Receptor: Dissociation of Amino Acid Residues Required for Il-6-Binding and for Il-6 Signal Transduction through Gp130. *Embo J* **12** (4) 1705-12.

Yeh, H. H., Lai, W. W., Chen, H. H., Liu, H. S. and Su, W. C., 2006. Autocrine Il-6-Induced Stat3 Activation Contributes to the Pathogenesis of Lung Adenocarcinoma and Malignant Pleural Effusion. *Oncogene* **25** (31) 4300-9.

Zerbini, L. F., Wang, Y., Cho, J.-Y. and Libermann, T. A., 2003. Constitutive Activation of Nuclear Factor {Kappa}B P50/P65 and Fra-1 and Jund Is Essential for Deregulated Interleukin 6 Expression in Prostate Cancer. *Cancer Res* **63** (9) 2206-2215.

Zoran Culig, H. S. G. B. A. H., 2005. Interleukin-6 Regulation of Prostate Cancer Cell Growth. *Journal of Cellular Biochemistry* **95** (3) 497-505.

## 7 Anhang

### 7.1 Danksagungen

Danken möchte ich allen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Dies gilt für Herrn Prof. Dr. rer. nat. Stefan Rose-John, der mich als Doktorand am Biochemischen Institut aufgenommen hat und mir somit die Möglichkeit zur Promotion gab. Er stand mit stets mit hilfreichen Diskussionen und Ratschlägen zur Seite.

Großer Dank gilt meinem Betreuer, PD Dr. Karl-Josef Kallen, PhD, der mich über all die Jahre begleitet und unterstützt hat, obwohl er in den vergangenen Jahren beruflich oft sehr eingebunden war.

Besonders bedanken möchte ich mich auch bei Prof. Dr. Joachim Grötzinger, der insbesondere bei den komplizierten strukturellen Fragestellungen eine unentbehrliche Hilfe war und mir darüber hinaus die dreidimensionalen Computermodelle von IC15 und CIR2 zur Verfügung gestellt hat.

Des Weiteren möchte ich mich bei allen übrigen Mitarbeitern des Institutes bedanken, die mir durch ihre fachliche Unterstützung und Freundschaft in vielen Fragen geholfen haben. Allen voran gilt hier mein Dank Herrn Dr. Björn Schuster, der mir immer mit Rat und Tat zur Seite gestanden hat und mir mit seiner wunderbaren norddeutschen Art auch mit wenigen Worten stets ein guter Gesprächspartner war.

Danken möchte ich auch meinen Eltern, die mir, als *conditio sine qua non* für diese Arbeit, nicht nur das Leben geschenkt, sondern mir über dies und vieles Weiteres hinaus auch das Studium ermöglicht haben.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei meiner Frau Susanne bedanken, die mich stets in allen Belangen unterstützt, und auch mit kritischen fachlichen Diskussionen zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat.

## 8 Lebenslauf

### PERSÖNLICHES

---

Wilhelm Sylvius Graf von Borries  
geboren am 17. März 1977 in Heidelberg  
Verheiratet, 1 Sohn

### SCHULISCHE AUSBILDUNG

---

1983 – 1987	Zellertal Grundschule Zellertal-Harxheim
1987 – 1996	Gymnasium Weierhof Bolanden Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

### WEHRDIENST

---

1996 -1997	1./FJGBTL 740, Mainz Sanitätsdienst
------------	--

### STUDIUM

---

1997 - 1998	Ruprecht-Karls Universität Heidelberg Fachrichtung Rechtswissenschaften
1998-2000	Ruprecht-Karls Universität Heidelberg Fachrichtung Humanmedizin Abschluss: Physikum
2000-2005	Christian-Albrechts Universität Kiel  Praktisches Jahr 1. Terial: Innere Medizin, Universitätsklinik Kiel 2. Terial: Pädiatrie, Universitätsklinik Kiel 3. Terial: Chirurgie, Universitätsklinik Kiel  Abschluss: 3. Staatsexamen

---

**BERUF**

---

01.10.2005-  
30.06.2008      Assistenzarzt  
Innere Klinik I, Kardiologie  
Klinikum Worms

Seit 01.07.2008      Assistenzarzt  
Praxis Dr. Kreuzer  
FÄ für Allgemeinmedizin  
Bobenheim-Roxheim

---

**PROMOTION**

---

2001-2010      Institut für Biochemie  
Universität Kiel  
Thema: „Untersuchungen zur Site-III  
Interleukin-6-artiger Zytokine“

Niefernheim, 5. Mai 2010