

**Entwicklung und Charakterisierung eines IL-6-Inhibitors
basierend auf
Funktionsanalysen des murinen IL-6R α**

Von der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften der
RWTH Aachen University zur Erlangung des akademischen Grades
eines Doktors der Naturwissenschaften
genehmigte Dissertation

vorgelegt von
Diplom-Biologin
Monique Yvonne Wiesinger
aus
Würselen

Berichter:
Professor em. Dr. rer. nat. Peter C. Heinrich
Privatdozent Dr. rer. nat. Christoph Peterhänsel

Tag der mündlichen Prüfung: 21 Juli 2008

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Hochschulbibliothek online verfügbar

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	
1. EINLEITUNG	1
1.1. Zytokine	1
1.1.1. Einteilung der Zytokine	1
1.1.2. Biologische Funktionen der Zytokine.....	2
1.1.3. Zytokine in der Medizin.....	2
1.1.4. Interleukin-6	3
1.1.5. Dysregulation von IL-6.....	5
1.2. Rezeptoren der IL-6 Superfamilie	6
1.2.1. Untereinheiten des IL-6 Rezeptorkomplexes	7
IL-6R α / gp80/ CD126	9
gp130/CD 130	10
1.2.2. Der IL-6 Rezeptorkomplex.....	10
1.3. Signaltransduktion der IL-6-Typ-Zytokine am Beispiel von IL-6	13
1.4. Anti-Zytokin-Therapien mit Biomolekülen am Beispiel von IL-6	14
1.5. Ziel der Arbeit	17
2. MATERIAL UND METHODEN	18
2.1. Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	18
Radiochemikalien	18
2.2. Plasmide	18
2.3. Antikörper	19
Primärantikörper	19
Sekundärantikörper	19
2.4. Zytokine	20
2.5. Zellkultur und zellbiologische Methoden	20
2.5.1. Zelllinien.....	20
2.5.2. Nährmedien und Lösungen für die Zellkultur.....	21
2.5.3. Kultivierung von Säugerzellen	21
2.5.4. Gefrierkonservierung von Säugerzellen	21
2.5.5. Bestimmung der Zellzahl	22
2.5.6. Konfokale Mikroskopie lebender Zellen.....	22
2.6. Molekularbiologische Methoden	23
2.6.1. Bakterienstämme	23
2.6.2. Kultivierung und Konservierung von Bakterien.....	23
2.6.3. Herstellung RbCl-kompetenter Bakterien	23
2.6.4. Transformation von Bakterien.....	24
2.6.5. Präparation von Plasmid-DNA.....	24
2.6.6. Quantitative Nukleinsäurebestimmung.....	25
2.6.7. Enzymatische Spaltung von DNA (Restriktionsverdau)	25
2.6.8. Dephosphorylierung von linearisierter Plasmid-DNA	25
2.6.9. Trennung von Nukleinsäure-Fragmenten durch Agarose-Gelelektrophorese	26
2.6.10. DNA-Fragmentisolierung aus präparativen Agarosegelen.....	26

2.6.11. Ligation	26
2.6.12. Hybridisierung von Oligonukleotiden	27
2.6.13. Oligonukleotide	27
2.6.13.1. Klonierung von Fusionsproteinen	27
2.6.13.2. Signalpeptid/ Polypeptid- <i>Linker</i>	28
2.5.13.3. Modifikationen/ Protein- <i>tags</i>	28
2.6.13.4. mL-6R α -Mutanten	28
2.6.14. cDNA-Synthese aus RNA mit Reverser Transkriptase	29
2.6.15. Polymerasekettenreaktion (PCR)	30
2.7. Proteinexpression in eukaryotischen Zellen.....	31
2.7.1. Transfektion von Eukaryotenzellen	31
2.7.2. Transfektion mittels DEAE-Dextran	32
2.7.3. Transfektion mittels Lipidgemischen (FuGENE6, Lipofectamine2000).....	32
2.8. Biochemische Methoden zum Nachweis der Fusionsproteinkonstrukte.....	33
2.8.1. Herstellung von Zellextrakten	33
2.8.2. Immun- bzw. Koimmunpräzipitation von Proteinen	34
2.8.3. Proteinbestimmung (<i>nach Bradford</i>).....	34
2.8.4. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....	35
2.8.5. Silberfärbung von Proteinen in PAA-Gelen	36
2.8.6. Protein-Transfer (<i>blotting</i>)	36
2.8.7. Westernblot-Analyse.....	37
Immundetektion mittels ECL (enhanced chemiluminescence)	37
Gegenfärbung einer PVDF-Membran	38
2.8.8. Konzentrierung und Umpuffern von Proteinlösungen	38
2.8.9. Kopplung von Proteinen an CNBr-Sepharose™ 4B	39
2.8.10. Durchflusszytometrie (FACS-Analyse).....	39
2.8.11. Herstellung von Kernextrakten	40
2.8.12. Radioaktive Markierung doppelsträngiger DNA-Sonden.....	40
2.8.13. Gel-Retentionsanalyse (EMSA).....	41
2.8.14. Konzentrationsbestimmung von Fusionsproteinen mittels ELISA.....	42
2.8.15. Messung der Zellproliferation	43
2.8.16. Bestimmung der Transkriptionsinduktion mittels Reporter-Gen-Assay.....	44
Luciferase-Assay	44
β -Galaktosidase-Assay	45
2.9. Erstellung eines Homologie-Modells des mL-6Rα-Komplexes und Computer-gestützte Analyse der Protein-Protein-Interaktionsflächen.....	45
3. ERGEBNISSE	47
3.1. Optimierung der Protein-Expression am Beispiel des hIL-6-RFP.....	47
Mutation der Kozak-Sequenz und Austausch des Signalpeptids	49
3.2. Konstruktion des mL-6-RFP (ΔD1-Typ).....	52
Das CBM (Domänen D2-D3) des murinen IL-6R α ist zur IL-6 Bindung nicht ausreichend.....	53
3.3. <i>in silico</i> Analyse des murinen IL-6Rα-Proteins	56
3.3.1. Spezies-übergreifende Analyse konservierter Sequenzmotive des IL-6R α	57
3.3.2. <i>molecular modelling</i> des murinen IL-6R α	60
3.3.3. Vergleich der N-terminalen Sequenz-Motive des murinen und humanen IL-6R α	62
3.3.4. Vergleich der Interaktionsflächen des murinen und humanen IL-6R α	64
Die <i>site</i> I-Interaktion: Das IL-6R α /IL-6- <i>interface</i>	65
Die <i>site</i> IIb-Interaktion: Das IL-6R α /gp130- <i>interface</i>	68
Die <i>site</i> IIIb-Interaktion: Das IL-6R α /gp130-D1- <i>interface</i>	70

3.4. Auswirkung von Mutationen auf die Funktion des mL-6Rα in lebenden Zellen	72
Mutationen des aminoterminalen LVL-Motivs des murinen IL-6R α beeinflussen die IL-6-abhängige Signaltransduktion	76
3.5. Auswirkung von Mutationen des extrazellulären Bereiches des mL-6Rα auf die Liganden-Bindung im Kontext eines Rezeptorfusionsproteins (RFP)	82
3.6. Biochemische Charakterisierung des mL-6-RFP	85
3.7. Charakterisierung der inhibitorischen Wirkung und Spezifität des mL-6-RFP	88
3.7.1. Aktivierung des JAK/STAT Signalweges durch IL-6 verschiedener Spezies	88
3.7.2. mL-6-RFP hemmt IL-6 unterschiedlicher Spezies	90
3.7.3. mL-6-RFP hemmt spezifisch die IL-6-vermittelte Signaltransduktion	92
3.7.4. mL-6-RFP inhibiert die IL-6 vermittelte Proliferation von B9-Zellen stärker als ein antagonistischer Antikörper gegen mL-6R α	94
3.7.5. mL-6-RFP hemmt das IL-6- <i>transsignaling</i>	97
3.8. In vivo Expression in Ratten	98
4. DISKUSSION	100
4.1 Besondere strukturelle Merkmale des mL-6Rα	100
4.1.1. Die Disulfidbrücke	101
4.1.2. Das N-terminale Sequenz-Motiv des IL-6R α	102
4.1.3. Beurteilung der <i>site I</i> - und <i>site II</i> Kontakte an der IL-6-Bindung im mL-6R α	102
4.1.4. Beitrag der ersten Aminosäure des mL-6R α zur <i>site IIIb</i> -Kontaktfläche	103
4.1.5. Elektrostatische Unterschiede bei der IL-6/ IL-6R α -Interaktion	104
4.2. Möglichkeiten zur Optimierung der Rezeptorfusionsprotein-Strategie	106
4.2.1. Auswirkungen von Deletionen auf die Oberflächen-Potenziale am Beispiel des IL-6R α	106
4.2.2. Verbesserung pharmakologischer Eigenschaften des mL-6-RFP	108
4.3. Bewertung der mL-6-RFP-Strategie im Vergleich mit anderen Ansätzen	109
4.3.1. Lösliches gp130	109
4.3.2. Anti-IL-6R α -Antikörper	110
4.3.3. mL-6-RFP/ „ <i>cytokine-trap</i> “	110
5.AUSBLICK	113
5.1. <i>in vivo</i> Nachweis der Wirkung von mL-6-RFP	113
5.2. Übertragbarkeit des Fusionsprotein-Konzeptes auf Inhibitoren für andere Zytokine ...	113
6. ZUSAMMENFASSUNG	116
6.1 Untersuchungen zur Funktion des mL-6R α	116
6.2. Konstruktion des IL-6-Inhibitors	117
7. LITERATURVERZEICHNIS	118
8. ANHANG	126

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Ä	A	G-CSF	<i>granulocyte colony stimulating factor</i>
ADAM	Angstrom		
Amp ^R	A Disintegrin And Metalloprotease	h	H
APS	Ampicillin Resistenzgen	hc	<i>hour</i> ; Stunde
ATP	Ammoniumperoxodisulfat	hIL- R	<i>heavy chain</i> , schwere Antikörperkette
AS	Adenosintriphosphat	HEPES	humaner IL-...-Rezeptor
	Aminosäure	HRP	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-2-ethansulfonsäure
			<i>horseradish peroxidase</i>
BSF-2	B		
Bp	<i>B-cell stimulatory factor-2</i>	IBD	I
BSA	Basenpaare	IgG	<i>inflammatory bowel disease</i>
	bovines Serumalbumin	IL-...	Immunglobulin der Subklasse G
		IP	Interleukin
			Immunpräzipitation
CBM	C		
CD	<i>cytokine-binding-module</i>	JAK	J
cDNA	<i>cluster of differentiation</i>		Janus Kinase
CDS	<i>complementary DNA</i>		
CIS	codierende DNA Sequenz		
	<i>cytokine inducible SH2-containing protein</i>		K
CLC	<i>cardiotrophin-like cytokine</i>	kDa	Kilodalton
CNTF	<i>ciliary neurotrophic factor</i>	K _d	Affinitätskonstante
cpm	<i>counts per minute</i>		
CT-1	<i>cardiotrophin-1</i>		
		LB	L
		LIF	Luria-Bertani
			<i>leukemia inhibitory factor</i>
D	D		
Da	Domäne		
ddH ₂ O	Dalton		
DEAE	doppelt destilliertes H ₂ O	mA	M
DMEM	Diethylaminoethyl	μ	Milliampere
DMSO	<i>Dulbecco's modified Eagle medium</i>	MAPK	mikro-
DNA	Dimethylsulfoxid	MCS	<i>mitogen activated protein kinase</i>
dNTP	<i>desoxyribonucleic acid</i>	MG	<i>multiple cloning site</i>
ds	Desoxyribonucleosidtriphosphat	min	Molekulargewicht
DTT	doppelsträngig	ml	Minute
	Dithiothreitol	mM	Milliliter
		M	Millimolar
		mIL-...R	Molar
		MMP	muriner IL-...-Rezeptor
		mRNA	<i>matrix metalloproteinase</i>
ECM	E		messenger RNA
<i>E. coli</i>	extrazelluläre Matrix		
E _{260 (280)}	<i>Escherichia coli</i>	ng	N
ECL	Extinktion bei 260 (280) nm	nm	Nanogramm
ED ₅₀	<i>enhanced chemoluminescence</i>	NP	Nanometer
EDTA	50% der effektiven Dosis		<i>Neuropeptin</i>
ELISA	<i>ethylenediamine-tetraacetic acid</i>		
	<i>enzyme-linked immunoadsorbant assay</i>	OD ₆₀₀	O
Erk	<i>extracellular regulated kinase</i>	ori	Optische Dichte bei einer Wellenlänge von 600 nm
EtOH	Ethanol	OSM	<i>origin of replication</i>
EMSA	<i>electrophoretic mobility shift assay</i>		<i>oncostatin M</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum		
Fab	F		
FACS	<i>fragment antigen binding</i>		
FCS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>		
Fc	<i>fetal calf serum</i> ; fötales Kälberserum		
	Konstantes Antikörperfragment; c von <i>crystallize</i>		
FNIII	Fibronektin-Typ-III	p	P
		PAA	Plasmid
		p.a.	Polyacrylamid
		PAGE	<i>pro analysis</i>
		PAS	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
		PBS	Protein A-Sepharose
		PCR	<i>phosphate buffered saline</i>
		Pen	<i>polymerase chain reaction</i>
		PMSF	Penicillin
		PVDF	Phenylmethylsulfonylfluorid
			Polyvinylidfluorid
g	G		
Gab	Erdbeschleunigung		
gp	<i>Grb2-associated binder</i>		
Grb	Glykoprotein		
GPL	<i>growth factor receptor bound protein gp130 like receptor</i>		

pY	Phosphotyrosin	Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
R		U	
...R	Rezeptor	U	<i>unit</i> : Einheit für die spezifische Enzymaktivität
RA	rheumatoide Arthritis	ü.N.	über Nacht
-RFP	Rezeptorfusionsprotein	ÜS	Überstand
RNA	<i>ribonucleic acid</i>	UV	Ultraviolett
RT	Raumtemperatur		
rpm	<i>revolutions per minute</i> ; Umdrehungen pro Minute		
RT-PCR	Reverse Transkriptase Polymerase Kettenreaktion		
S		V	Volt
SDS	<i>sodium-dodecylsulfate</i>	VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>
sec	Sekunde	Vol	Volumen
sIL-...R	<i>soluble IL-...-receptor</i>	v/v	Volumenverhältnis; <i>volume/volume</i>
SH	<i>src homology</i>		
SHP	<i>SH2-domain-containing tyrosine phosphatase</i>	wt	Wildtyp
SOCS	<i>suppressor of cytokine signaling</i>	WB	Westernblot
SOS	<i>son of sevenless</i>	w/v	Gewichtsverhältnis; <i>weight/volume</i>
STAT	<i>signal transducer and activator of transcription</i>		
Strep	Streptomycin	YFP	<i>yellow fluorescent protein</i>
SV40	Simian Virus 40		
T			
TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer		
Taq	<i>Thermophilus aquaticus</i>		
TCCR	T-cell cytokine receptor		
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin		
TF	Transkriptionsfaktor		
TMB	3, 5, 3', 5'-Tetramethylbenzidin		

Einbuchstabenkode für Aminosäuren

A	Alanin
C	Cystein
D	Asparaginsäure
E	Glutaminsäure
F	Phenylalanin
G	Glycin
H	Histidin
I	Isoleucin
K	Lysin
L	Leucin
M	Methionin
N	Asparagin
P	Prolin
Q	Glutamin
R	Arginin
S	Serin
T	Threonin
V	Valin
W	Tryptophan
Y	Tyrosin

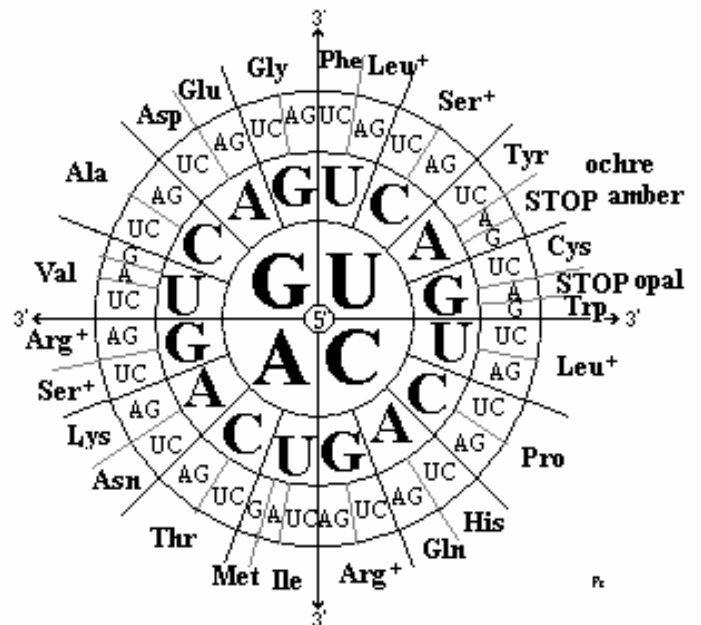


Abbildung 1: Genetischer Code
 Triplet-Code der RNA und die korrespondierenden Aminosäuren mit Abkürzung im Dreibuchstabencode (Quelle: Wikipedia)

1. EINLEITUNG

1.1. Zytokine

Voraussetzung für die Koordination biologischer Prozesse in einem multizellulären Organismus ist ein präzise gesteuerter Informationsaustausch zwischen Zellen unterschiedlicher Gewebe und Organe. Diese Aufgabe übernimmt ein Netzwerk sezernierter Botenstoffe, zu denen neben den klassischen Hormonen auch die Zytokine zählen.

Unter dem Begriff „Zytokine“ wird eine Reihe von Polypeptiden zusammengefasst, die von unterschiedlichen Zelltypen als Reaktion auf unterschiedliche Signale produziert und sezerniert werden. In der Regel werden Zytokine *de novo* synthetisiert und im Gegensatz zu glandulären Hormonen (wie Glukagon und Insulin) nicht als präformierte Moleküle in spezialisierten Organen gespeichert. Neben klassischen löslichen Formen existieren Zytokine auch als membranständige Proteine (TNF-Familie) [1] oder werden als inaktive Pro-Formen sezerniert (TGF β 1) [2]. Zytokine besitzen nur kurze Halbwertszeiten, jedoch kann ihre Aktivität durch Bindung an bestimmte Strukturen wie die extrazelluläre Matrix verlängert werden.

Zytokine binden als Liganden an Membranrezeptoren auf der Zelloberfläche und lösen dadurch definierte zelluläre Antworten aus. Aus der Rekrutierung identischer Rezeptorketten und Signalmoleküle resultiert die hohe Redundanz der biologischen Effekte unterschiedlicher Zytokine. Ihre Wirkung vermitteln Zytokine auf unterschiedliche Zelltypen (Pleiotropie) sowohl autokrin (auf Zellen des gleichen Typs bzw. auto-stimulatorisch), parakrin (auf benachbarte Zielzellen) und auch über größere Distanzen durch die Verteilung über den Blutstrom (endokrin). Da Zytokine oft in Kaskaden produziert werden, beeinflussen sie die Wirkung anderer Zytokine additiv, synergistisch oder antagonistisch [3,4].

1.1.1. Einteilung der Zytokine

Zytokine wurden nach verschiedenen Gesichtspunkten klassifiziert. Bezeichnungen wie „Lymphokine“ oder „Monokine“ wurden aufgrund der Beobachtung geprägt, dass Immunzellen wie T-Zellen und Makrophagen eine wichtige Quelle für Zytokine darstellen und beruhte auf der Annahme, dass die Produktion Zelltyp-spezifisch sei.

Ebenfalls historisch bedingt ist die Einteilung nach Funktionen wie z.B. in „Interleukine“, „Chemokine“ (*chemotactic cytokine*), „Wachstumsfaktoren“ oder „Kolonie-stimulierende Faktoren“.

Weitere Einteilungen erfolgten aufgrund der beteiligten Rezeptorketten (z.B. IL-6-Typ-Zytokine) oder aufgrund struktureller Homologie.

1.1.2. Biologische Funktionen der Zytokine

Zytokine vermitteln über die Bindung an die extrazelluläre Region von Rezeptoren auf der Oberfläche von Zielzellen die Aktivierung intrazellulärer Signaltransduktionsprozesse. Durch die daraus resultierende Änderung im Genexpressions-Muster wird der Differenzierungs- und/oder Proliferationsstatus der Zelle reguliert. Beispielsweise koordinieren Zytokine biologische Prozesse wie

- Hämatopoese, durch Stimulation pluripotenter Stammzellen der hämatopoetischen Reihe
- Embryogenese und Fertilität
- die „geordnete“ Entwicklung des Immunsystems durch Beteiligung an Prozessen wie Apoptose (z.B. durch Eliminierung autoreaktiver Immunzellen) oder Differenzierung (von B-Zellen zu Antikörper-sezernierenden Plasmazellen)
- die Aktivierung des Immunsystems und der Übergang von angeborener zu adaptiver Immunantwort durch Synthese der Akut-Phase-Proteine, Migration von Phagozyten an den Ort der Entzündung und Permeabilisierung des Endothels durch Freisetzung bioaktiver Mediatoren (Prostaglandine, Glycosidasen und Metalloproteinasen)

1.1.3. Zytokine in der Medizin

Zytokine besitzen eine hohe medizinische Relevanz. Generell sind unter therapeutischen Gesichtspunkten zwei gegensätzliche Szenarien denkbar: Fehlende Zytokine können durch Verabreichung rekombinanter Proteine substituiert werden. Ein klassisches Beispiel ist das Zytokin Erythropoetin (EPO), das zur Behandlung verschiedener Formen der Anämie verwendet wird [5]. Darüber hinaus gab es in der Vergangenheit Ansätze bestimmte Zytokine wie Interferon- γ und IL-2 aufgrund ihrer biologischen Wirkung in einer antiviralen bzw. Anti-Tumor-Therapie einzusetzen. Aufgrund der zentralen Funktion von Zytokinen in der Hämatopoese wird z.B. das Zytokin IL-11 zur Behandlung der Chemotherapie-induzierten Thrombozytopenie [6] eingesetzt. Hier wird die Reifung der

Megakaryozyten durch IL-11 stimuliert, wodurch die Anzahl der Blutplättchen erhöht und die Blutgerinnung wiederhergestellt wird. Ebenso wird das IL-6-verwandte Zytokin G-CSF (*granulocyte-colony stimulating factor*) eingesetzt, um die Granulopoese voranzutreiben. Dadurch wird die Anzahl der Neutrophilen erhöht, wodurch die Patienten vor Infektionen geschützt werden können.

Andere Erkrankungen wie Rheumatoide Arthritis (RA) sind wiederum durch eine chronische Überproduktion pro-inflammatorischer Zytokine wie IL-1 β , TNF- α , IFN- γ und IL-6 gekennzeichnet, deren Wirkung es zu inhibieren gilt. Generell kann die Wirkung eines Zytokins auf zwei Weisen inhibiert werden: Entweder durch Verabreichung niedermolekularer membrangängiger Inhibitoren, welche die Signalfortleitung an Schlüsselpositionen unterbinden oder indem bereits die Bindung des Zytokins an den Rezeptor durch geeignete Antagonisten verhindert wird.

Zur Behandlung von Patienten mit Rheumatoider Arthritis werden in Kombinations-Therapien neben Steroiden wie Glucocorticoiden, die u. a. die Zytokin- bzw. Rezeptor-Expression negativ regulieren, auch Biomoleküle („*biologicals*“) als Zytokin-Inhibitoren eingesetzt. Makromolekulare Inhibitoren für TNF- α wie *Infliximab* oder *Etanercept* sind sehr erfolgreich eingesetzt worden [7]. *Infliximab* ist ein rekombinanter, humanisierter Antikörper, der die variable Region eines murinen monoklonalen Antikörpers gegen humanes TNF enthält (effektive Dosis: 1-3 mg/kg Körpergewicht). *Etanercept* basiert auf der Extrazellulär-Region des humanen TNFR2/p75, die über ein F_c-tag fusioniert sind (effektive Dosis: 25 mg/kg Körpergewicht). Jedoch treten bei Inhibition von TNF nicht unerhebliche Nebenwirkungen wie Infektionen mit opportunistischen Erregern (*Aspergillus*, Cytomegalie-Viren, *Candida*, *Cryptococcus*, *Mycobacterium*), Veränderungen des hämatopoetischen Systems (Anämie, Neutropenie, Lymphome) und Lupus-ähnliche Symptome auf (Übersichtsartikel: [8]). Rheumatoide Arthritis ist eine multifaktoriell bedingte Erkrankung bei der auch das pleiotrope IL-6 für eine Vielzahl klinischer Symptome verantwortlich ist und zur Progression der Erkrankung beiträgt. Da sich bestimmte Arthritis-Formen wie die juvenile idiopathische Arthritis (JIA) auch als resistent gegen etablierte Anti-TNF-Therapien erweisen [9], wird IL-6 als weiteres Zielmolekül in der Pathogenese dieser Erkrankungen betrachtet.

1.1.4. Interleukin-6

IL-6 gehört zur Familie der IL-6-Typ-Zytokine, der neben IL-6 auch IL-11, IL-27, *leukaemia inhibitory factor* (LIF), *oncostatin M* (OSM), *ciliary neurotrophic factor* (CNTF), *cardiotrophin* (CT)-1, *cardiotrophin-like cytokine* (CLC) und Neuropoetin angehören. Diese Zytokinfamilie ist dadurch gekennzeichnet, dass alle Mitglieder ihre Signale unter

Beteiligung einer gemeinsamen Rezeptorkette, des Glykoproteins gp130, weiterleiten. Alle IL-6-Typ-Zytokine werden nach Bazan [10] der Gruppe der langkettigen 4- α -Helix-Bündel-Zytokine zugeordnet. Diese sind durch die charakteristische Anordnung von vier antiparallelen α -Helices, die durch Polypeptidschleifen in einer auf-auf-ab-ab-Topologie miteinander verbunden sind, gekennzeichnet.

Interleukin-6 (IL-6) kann geradezu als Paradigma für die Pleiotropie der Zytokine betrachtet werden. Das wird auch durch die historisch bedingte Vielzahl der synonymen Bezeichnungen (Anzahl: 38) [3] verdeutlicht, die diesem Protein aufgrund seiner Funktion zugeschrieben wurden [11]. Nur einige Beispiele sind:

Interferon beta 2 [12-14]

IL-1 inducible 26kD Protein [15]

hybridoma/plasmacytoma growth factor [16]

cytotoxic T-cell differentiation factor [17]

B-cell differentiation factor (BCDF) [18]

hepatocyte stimulating factor [19,20]

Die Sekretion von IL-6 wurde bei unterschiedlichen Zelltypen beschrieben. Neben Immunzellen (B- und T-Lymphozyten [21], Monozyten, Neutro- und Eosinophilen [22,23]) wurde die IL-6 Expression auch bei Neuronen [24], Fibroblasten [25], Keratinozyten [26], Endothel-Zellen [27], Osteoblasten [28], Langerhans Zellen [29], β -Zellen des Pankreas [30] und Tumorzellen nachgewiesen. Diese Zellen synthetisieren einen Proteinvorläufer (212 Aminosäuren), welcher nach Abspaltung eines Signalpeptides von 28 Aminosäuren und N-Glykosylierung als biologisch aktives Molekül mit einem Molekulargewicht von 26 kDa sezerniert wird [12,15,31,32]. Es existiert auch eine virale Form mit 204 Aminosäuren Länge (codiert von Herpesvirus Typ 8), welche 25% Homologie zu humanen IL-6 aufweist und bioaktiv (jedoch mit 10^3 -fach geringerer Aktivität) auf gp130 exprimierende Zellen ist [33-35].

IL-6 kann nur in geringen Mengen (ca. 1-10 pg/ml) [36,37] im Serum gesunder Individuen nachgewiesen werden. Jedoch können unter bestimmten Bedingungen, z.B. nach Operationen die IL-6-Spiegel bis auf 30-430 pg/ml ansteigen [38]. Maximale IL-6-Konzentrationen werden in der akuten Sepsis gemessen (überlebende Patienten: Medianwert 1434 pg/ml, wobei die gemessenen IL-6-Werte eine hohe individuelle Varianz aufweisen (200- 21774 pg/ml) [39].

IL-6 wirkt immunmodulatorisch, da es sowohl über pro- als auch anti-inflammatorische Eigenschaften verfügt: Zusammen mit IL-1 ist IL-6 für die Induktion der Pyrexie (Fieber) verantwortlich und gilt als Hauptmediator der Synthese von Akutphase-Proteinen (APP) in

der Leber [40,41]. Anti-inflammatorisch wirkt IL-6 durch Verminderung der Synthese der pro-inflammatorischen Zytokine IL-1 und TNF- α , GM-CSF und IFN- γ sowie durch Induktion der Expression des IL-1-Rezeptor-Antagonisten (IL-1-ra) und des löslichen TNF-Rezeptors.

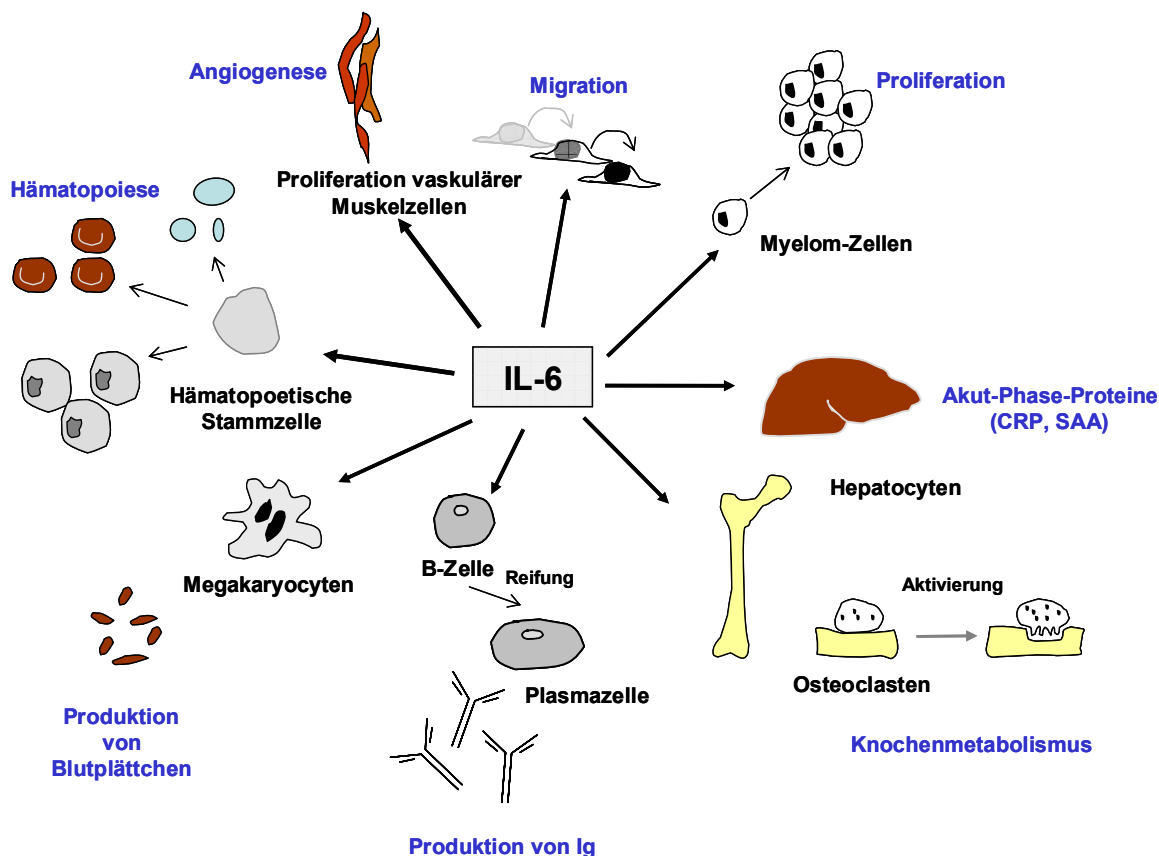


Abbildung 1-1: Pleiotrope Wirkungen von IL-6

IL-6 vermittelt eine Vielzahl biologischer Effekte auf einem breiten Spektrum unterschiedlicher Zielzellen. (Abkürzungen: CRP= C-reaktives Protein, SAA= Serumamyloid A, Ig= Immunglobuline)

1.1.5. Dysregulation von IL-6

Zytokine wie IL-6 spielen eine zentrale Rolle im akuten Entzündungsprozess und sind bereits in geringen Konzentrationen (pico- bis nanomolar) wirksam.

Viele Erkrankungen sind durch eine Dysregulation des Zytokin-Netzwerkes gekennzeichnet und vorangetrieben. Erhöhte IL-6-Serumspiegel sind bei einer Vielzahl von chronisch entzündlichen- und Autoimmunerkrankungen wie Rheumatoider Arthritis (RA) [42], Morbus Crohn [43], der *Castleman* Erkrankung [44,45], systemischem Lupus Erythematosus [46], *inflammatory bowel disease* (IBD) [47] und Psoriasis [48] beobachtet worden.

Da pro-inflammatorische Genprodukte Prozesse wie Apoptose, Proliferation, Angiogenese und Invasion von Zellen modulieren, wird eine Dysregulation dieser Zytokine als Tumor-fördernd betrachtet. Bei zahlreichen Tumorerkrankungen (Multiples Myelom [49,50], malignem Melanom [50], Brustkrebs [51], Prostata Karzinom [52], Kaposi-Sarkom [53], Hodgkin-Lymphom [54]) sind erhöhte IL-6-Spiegel gemessen worden und gelten im Allgemeinen als negativ prognostischer Marker.

Genetisch zeigt keine dieser Neoplasien chromosomale Aberrationen des IL-6 Locus. Jedoch wurde ein Restriktionsfragmentlängen-Polymorphismus (RFLP) in der Promotorregion des IL-6-Gens beschrieben. Dieser G/C Polymorphismus an Position -174 des IL-6 Promotors beeinflusst die Transkriptionsrate des Gens und ist mit erhöhten IL-6-Plasmaspiegeln bei gesunden Individuen assoziiert [55]. Die gemessenen IL-6-Konzentrationen sind an den Genotyp der Allelkombination (homozygot/ heterozygot) für diesen Polymorphismus gekoppelt [56] und negativ mit dem Verlauf bestimmter Erkrankungen korreliert. Beispielsweise wurde die erhöhte Sterblichkeitsrate bei Brustkrebs bei unterschiedlichen ethnischen Gruppen auf das Auftreten des Allels zurückgeführt [57].

Obwohl IL-6 direkt als Wachstumsfaktor für bestimmte Vorläuferzellen des Multiplen Myeloms fungiert [58], beruht der Beitrag dieses Zytokins zur Tumor-Progression hauptsächlich auf der anti-apoptotischen Wirkung, da bei Fortschreiten der Erkrankung die aberrante Expression klassischer Onkogene (z.B. ras) beobachtet werden kann [59].

1.2. Rezeptoren der IL-6 Superfamilie

Die IL-6-Typ-Zytokine entfalten ihre Wirkung auf Zielzellen durch die Bindung an spezifische Rezeptoren auf der Zelloberfläche.

Bei diesen Rezeptoren handelt es sich um Typ-I-Transmembranproteine, welche die Membran mit einer Helix aus hydrophoben Aminosäuren durchspannen, wobei der Amino-Terminus des Proteins extrazellulär orientiert ist. Der C-terminale Intrazellulärbereich dieser Rezeptoren ist wenig homolog und strukturell nicht näher charakterisiert. Nach Bazan [60] werden die beteiligten Rezeptorketten der Klasse-I zugeordnet. Die Mitglieder der Klasse-I-Zytokinrezeptoren besitzen keine intrinsische enzymatische Aktivität.

Der extrazelluläre Bereich verschiedener Klasse-I-Rezeptoren unterscheidet sich hinsichtlich der Komplexität ihrer Domänenarchitektur. Die Extrazellulärregion ist aus Domänen aufgebaut, die der Fibronectin-Typ-III (FNIII)- sowie der Immunglobulin (Ig)-ähnlichen-Superfamilie zugerechnet werden. Ihnen gemeinsam ist das Vorhandensein

mindestens eines Zytokin-bindenden-Moduls (CBM). Das CBM besteht aus zwei Fibronektin Typ-III- Domänen, mit charakteristischen Merkmalen: N-terminal finden sich vier konservierte Cysteinreste und in der C-terminalen Domäne eine Aminosäuresequenz in Form eines WSXWS-Motivs (X steht für eine nicht konservierte Aminosäure).

Zytokine sind in der Lage, durch Bindung an ihre Rezeptoruntereinheiten deren Oligomerisierung zu induzieren und somit einen signaltransduzierenden Komplex auszubilden. Je nach Zusammensetzung der Untereinheiten lassen sich die Rezeptorkomplexe der Klasse-I-Zytokinrezeptoren in Homodimere und Heterooligomere unterteilen. Wie in Abbildung 1-2 verdeutlicht wird, sind am Aufbau der Rezeptorkomplexe der IL-6-Typ-Zytokine die signaltransduzierenden Untereinheiten gp130, LIFR, OSMR, WSX-1 und GPL beteiligt. Gemeinsamer Bestandteil der dieser Rezeptorkomplexe ist das Glykoprotein gp130, worin zum Teil die Überschneidung der biologischen Wirkung der Zytokine begründet liegt. Einen Sonderfall stellt das Zytokin Interleukin-31 dar: Obwohl es nicht über gp130 signalisiert, wird es ebenfalls der IL-6-Typ-Zytokinfamilie zugeordnet, da sowohl das Zytokin als auch seine Rezeptoren sehr eng mit den anderen Familienmitgliedern verwandt sind.

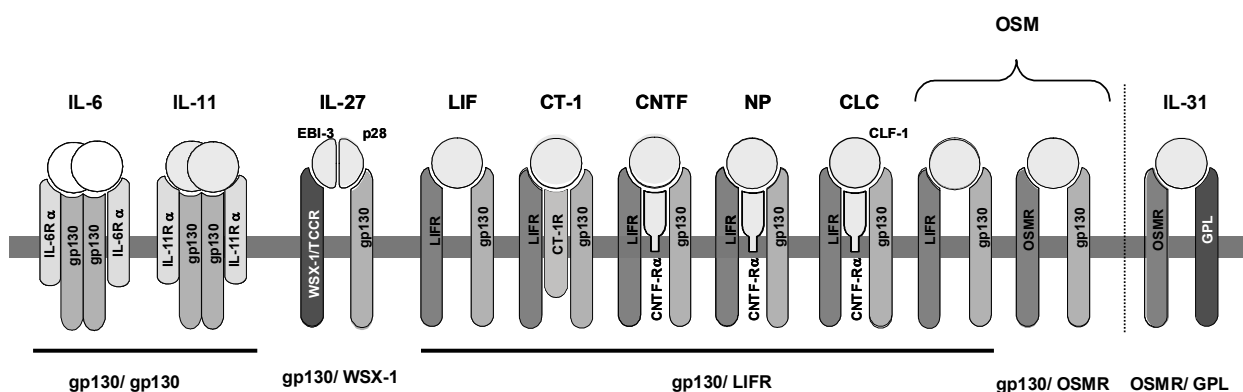


Abbildung 1-2: Rezeptorkomplexe der IL-6-Typ-Zytokine

Die Rezeptoren der IL-6-Typ-Zytokine sind Typ-I-Transmembranproteine. Von dieser Klassifizierung weicht der CNTF-Rezeptor ab, der über einen Glykosylphosphatidyl-Inositolanker mit der Plasma-Membran verbunden ist. IL-6-Typ-Zytokine (mit Ausnahme von IL-31) signalisieren über Homo- bzw. Heterodimere des gp130.

Die Rezeptor-Komplexe der Zytokine IL-6 und IL-11 stellen eine weitere Besonderheit dar, da beide Zytokine über gp130 Homodimere signalisieren. Die Spezifität der Ligandenbindung wird in diesen Fällen über die Rekrutierung von Alpha-Rezeptoren gesteuert (modifiziert nach [61]).

1.2.1. Untereinheiten des IL-6 Rezeptorkomplexes

IL-6 signalisiert über zwei verschiedene Rezeptorketten: Der α -Rezeptor (IL-6R α) ist der Anteil, der die Spezifität für das Zytokin vermittelt, während die β -Kette (gp130) die

signaltransduzierende Rezeptor-Untereinheit des funktionalen IL-6-Rezeptorkomplexes darstellt.

Der nächste Abschnitt stellt exemplarisch die humanen IL-6-Rezeptorproteine vor. Grund hierfür ist, dass diese eingehend charakterisiert sind und bestimmte Daten wie Röntgenstrukturanalysen nicht für die murinen Rezeptorproteine vorliegen. Auf Basis der Aminosäuresequenz sind die humanen und murinen Rezeptorproteine sehr homolog, so dass von einer ähnlichen Sekundärstruktur der Proteine ausgegangen werden kann. Aufgrund nahezu identischer Signaltransduktionsvorgänge fungiert die Maus als Modellorganismus zur Charakterisierung humaner Erkrankungen, so dass klinische Daten (wie in Kapitel 1.6 für humanes IL-6 dargelegt) weitgehend auf das murine System übertragbar sind.

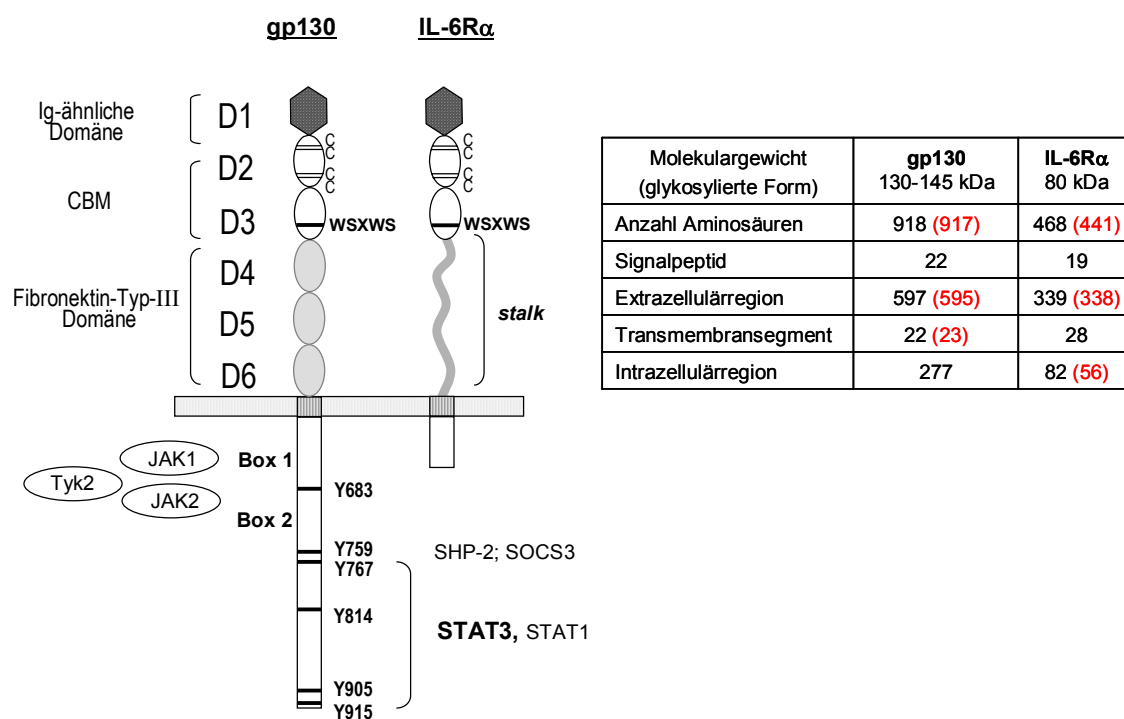


Abbildung 1-3: Übersicht über die Substruktur der humanen IL-6-Rezeptor-Untereinheiten

Die Zahl der Aminosäuren, die auf die verschiedenen Abschnitte der Rezeptoren entfallen, ist in der Tabelle wiedergegeben (Abschnitte mit abweichender Anzahl von Aminosäuren, die auf entsprechende murine Rezeptorabschnitte entfallen, sind in rot dargestellt). Bezeichnungen wie Ig-ähnliche- und Fibronektin-Typ-III- Domäne beschreibt die strukturelle Verwandtschaft mit bekannten Proteinfamilien.

(Abkürzungen: *stalk*= flexible Region, Box 1/2-Motiv = Region, an der die Assoziation mit Tyrosinkinase erfolgt, C= konserviertes Cystein, CBM= Zytokin-bindendes Modul, D= Domäne, *stalk*= nicht-strukturierte flexible Region, WSXWS= Typ-I-Zytokin-Rezeptor-Motiv, Y= Tyrosin-Seitenkette bestimmter Aminosäure-Motive, die nach Phosphorylierung Signalmoleküle über deren SH2-Domänen rekrutieren; assoziierte Tyrosinkinase: JAK= *Janus-Kinase*, Tyk= *tyrosine kinase*, Transkriptionsfaktor: STAT3= *signal transducer and activator of transcription 3* feedback inhibitor des Signalweges: SOCS3= *suppressor of cytokine signaling 3*, Phosphatase, SHP-2= *SH2-domain-containing tyrosine phosphatase* (nähere Details siehe Kapitel 1.3).

IL-6R α / gp80/ CD126

Der Alpha-Rezeptor ist ein Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von etwa 80 kDa. Dieses Rezeptor-Protein bewirkt die initiale Bindung von IL-6 und die Rekrutierung von gp130. Jedoch besitzt es keine eigene oder assoziierte Kinase-Aktivität, so dass die Intrazellulärregion für die Signaltransduktion ohne Bedeutung ist. Im Intrazellulärbereich konnte aber ein Aminosäuremotiv identifiziert werden, welches die polare Expression des IL-6R α bewirkt [62].

Die extrazelluläre Region des Alpha-Rezeptors (IL-6R α) weist eine modulare Struktur auf, die aus drei distinkten Domänen (D1-D3) mit je 100 Aminosäuren besteht. Diese werden aufgrund ihrer Faltung entweder der Ig-Superfamilie oder dem Fibronectin-Typ-III zugeordnet [63]. Die Ig-ähnliche Domäne des IL-6R α (D1) ist nicht an der Bindung von IL-6 beteiligt und für die biologische Aktivität nicht relevant [64], trägt aber zur Proteinstabilität und Rezeptorinternalisierung bei [65]. Die Domänen D2 und D3 bilden das CBM und vermitteln die Ligandenbindung.

Membran-proximal findet sich eine flexible Region, die als *stalk* bezeichnet wird. In dieser Region finden sich Schnittstellen für bakterielle Toxine und Metalloproteinasen. Durch proteolytische Prozessierung dieser Schnittstellen (*shedding*) entsteht eine lösliche Form (55 kDa) des Rezeptors [66,67]. Ein weiterer Mechanismus zur Bildung des löslichen Rezeptors ist die Translation einer alternativ gespleißten mRNA [68]. Da die intrazelluläre Region nicht zur Signalfortleitung beiträgt, kann die lösliche Form des Rezeptors die gleiche Funktion wie die membranständige Variante erfüllen. Der lösliche IL-6R α bindet IL-6 in der Zirkulation und erhöht so dessen Halbwertszeit des Zytokins im Plasma [69]. In gesunden Individuen findet sich eine mittlere IL-6R α -Serum-Konzentration von 100 ng/ml, die aber eine große individuelle Varianz (50-230 ng/ml) zeigt. Diese ist bei bestimmten Erkrankungen erhöht (Multiples Myelom: 190 ng/ml (50-900ng/ml) [70], HIV-infizierten Patienten: 170 ng/ml [71]; beim akuten Myelom können die Plasma-Konzentrationen sogar 10-fach erhöht sein). Zusammen mit IL-6 vermittelt der lösliche Rezeptor (sIL-6R α) eine agonistische Wirkung, indem der Komplex aus sIL-6R α /IL-6 einen Signaltransduktions-kompetenten Komplex mit gp130 an der Zelloberfläche bildet. Dadurch werden auch Zellen responsiv für IL-6, denen der Alpha-Rezeptor fehlt und somit erstreckt sich das Wirkungsspektrum von IL-6 nicht nur auf Zellen, die den Alpha-Rezeptor exprimieren.

Die Aminosäuresequenzen der Extrazellulärregion des murinen und humanen IL-6-R α sind zu 54% identisch, so dass von einer hohen strukturellen Homologie (Sekundärstruktur) der Proteine ausgegangen werden kann.

Eine Besonderheit des murinen IL-6R α ist, sowohl das Zytokin der eigenen Spezies, als auch das des Menschen zu binden und Signaltransduktionsprozesse einzuleiten. Eine ähnliche heterologe Bindung (Kreuzreaktivität) wird für das humane IL-6R α -Protein nicht beobachtet [72]. Auf die Konsequenzen dieser Spezies-Spezifität wird im Rahmen des IL-6-Inhibitors in Kapitel 1-5 näher eingegangen.

gp130/ CD 130

Die extrazelluläre Region dieser signaltransduzierenden Rezeptorkette besteht aus einer N-terminalen Ig-ähnlichen Domäne und fünf FNIII-Domänen. Im Gegensatz zum IL-6R α trägt die Ig-ähnliche Domäne D1 des gp130 zusammen mit den Domänen D2-D3, die das CBM bilden, zur IL-6-Bindung bei [73]. Die FNIII-Domänen (D4-D6) sind nicht an der Ligandenbindung beteiligt, aber zur Signalfortleitung notwendig [74].

Die Rezeptorkette besitzt keine intrinsische enzymatische Aktivität. Intrazellulär befinden sich jedoch die sog. Box1/2-Region, die der konstitutiven Assoziation mit Tyrosinkinasen (Janus Kinasen; JAKs) dient und dem Rezeptor die Kinase-Aktivität verleihen.

Im Plasma gesunder Individuen finden sich auch lösliche Formen des gp130 (400 ng/ml) [75], die durch Translation alternativ gespleißter mRNA [76,77] generiert werden. Die Aufgabe dieser Proteine liegt wahrscheinlich in der Modulation der durch löslichen IL-6R α /IL-6 vermittelten Antwort, wobei gp130 nur eine Affinität zu IL-6R α aufweist, wenn IL-6 gebunden ist [75].

BLAST-Analysen zeigen, dass murines und humanes gp130 eine 77%ige Übereinstimmung der Aminosäuren aufweisen und dass Rezeptoren beider Spezies die gleichen Struktur-Merkmale besitzen [78]. Darüber hinaus kann das murine gp130 mit (löslichem) humanem IL-6R α und humanem IL-6 einen signalisierenden Rezeptorkomplex bilden.

1.2.2. Der IL-6 Rezeptorkomplex

Boulanger *et al.* [79] konnten einen Komplex aus hIL-6, hIL-6 α D2-3 und hgp130 D1-D3 (Kristallstruktur mit 3,65- 3,84 Å Auflösung) kristallisieren und so den Nachweis erbringen, dass IL-6 die Bildung eines hexameren Komplexes aus (IL-6) $_2$ -(IL-6R α) $_2$ -(gp130) $_2$ induziert. Hochaufgelöste Kristallstrukturen für hIL-6 (1,9Å) [80], hIL-6R α [81] und hgp130 D1-D2-D3 [82] mit je 2,4 Å Auflösung wurden für die Erstellung eines genaueren dreidimensionalen Modells herangezogen. Im Einklang mit Mutationsstudien [83] wurden die an der Interaktion beteiligten Aminosäuren identifiziert und ein Modell für die IL-6-Bindung an die Rezeptor-Proteine entwickelt.

IL-6 interagiert über drei verschiedene Epitope mit den Rezeptorproteinen [83], die als *sites* I, -II und -III bezeichnet werden und deren Positionen im IL-6 Molekül in Abbildung 1-4 verdeutlicht sind. Die Oligomerisierung der Proteine ist in Abbildung 1-5 dargestellt und verläuft sequenziell über die Interaktion verschiedener Epitope [79].

Die initiale IL-6-Bindung erfolgt mit niedriger Affinität ($K_d = 9 \text{ nM}$) über die Interaktion von IL-6 über dessen *site* I mit Aminosäuren der Domänen D2/D3 des IL-6R α . Weitere Studien haben gezeigt, dass 90% dieser Bindungsenergie aus der IL6R α -D3/IL-6-Interaktion resultiert [84].

Während weder Zytokin noch α -Rezeptor nennenswerte Affinität zu gp130 aufweisen, kann der binäre Komplex aus IL-6/IL-6R α gp130 rekrutieren. Die Interaktion erfolgt in kooperativer Weise über ein zusammengesetztes Epitop, wobei IL-6 (über *site* II) Aminosäuren der Regionen D2/D3 des gp130 kontaktiert. Zusätzlich wird dieser Komplex durch ausgedehnte Kontaktflächen zwischen D3 des IL-6R α und D3 von gp130 (in der Abbildung als Interaktion Iib bezeichnet) stabilisiert. Der intermediäre Komplex aus IL-6/IL-6R α /gp130 ist thermodynamisch deutlich instabiler ($K_d = 30 \text{ nM}$) als der binäre IL-6R α /IL-6-Komplex.

Durch die nachfolgende spiegelbildliche Assoziation zweier trimerer Komplexe wird eine zusätzliche Interaktion über die Domäne D1 von gp130 ermöglicht. Diese Kontaktflächen mit gp130 werden zum einen zwischen Aminosäuren des IL-6 gebildet (*site IIIa*-Interaktion) und zum anderen kontaktiert die Ig-ähnliche Domäne des gp130 Aminosäuren der Domäne D2 des IL-6R α (Interaktion IIIb). Es resultiert ein hochaffiner hexamerer Komplex ($K_d = 500 \text{ pM}$), von dem angenommen wird, dass er die signaltransduzierende Form darstellt (s. Abbildung 1-6). Alternativ zum hexameren Komplex werden auch abweichende stöchiometrische Verhältnisse im biologisch aktiven Komplex vorgeschlagen z.B. ein Tetramer aus IL-6-IL-6R α -(gp130) $_2$ [85,86].

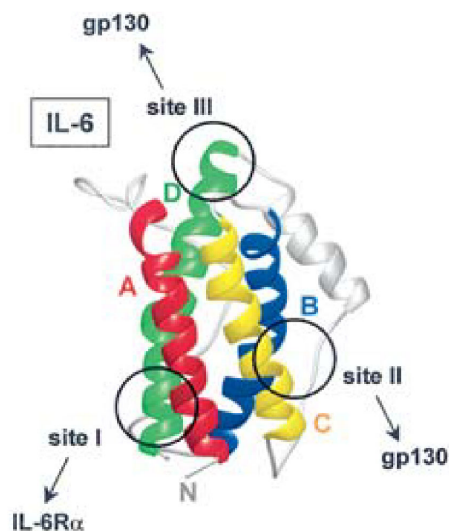


Abbildung 1-4: Struktur des IL-6 in der *ribbon*-Darstellung

Die Lage der an der Interaktion mit IL-6R α und gp130 beteiligten Epitope (*site*-I, -II und -III) ist durch schwarze Ringe gekennzeichnet [61]

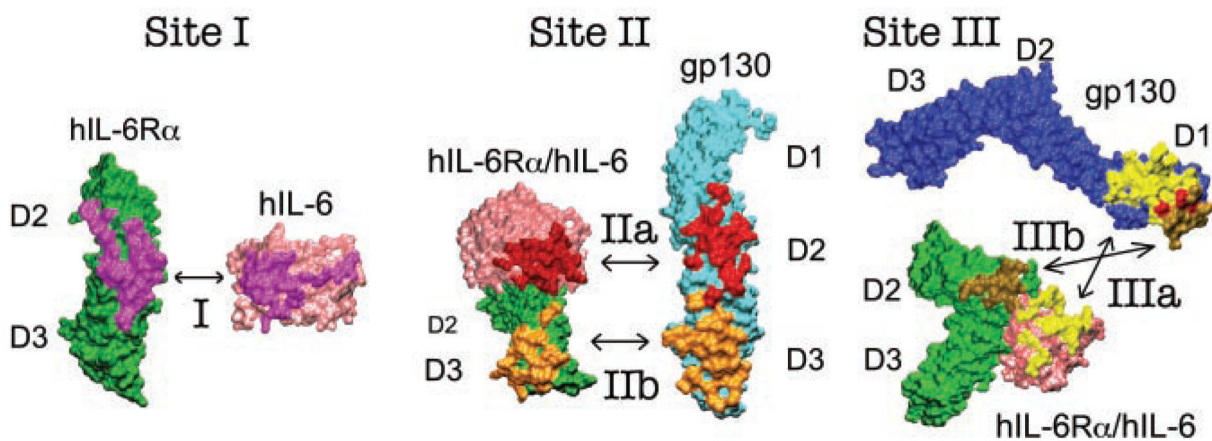


Abbildung 1-5: Oligomerisierung des IL-6 -Rezeptorkomplexes

Dargestellt sind die Bindungsepitope von IL-6, welches über die *site I*, *site II* und *site III* die Rezeptoruntereinheiten rekrutiert [79].

Durch die IL-6 Bindung an IL-6R α werden schwache Interaktionen (z.B. Affinität von gp130 zu IL-6R α , Interaktion I Ib) stabilisiert, die in den monomeren Proteinen zur Assoziation nicht hinreichend sind. Die Bindung von IL-6 an den IL-6 α verläuft über einen *induced fit* Mechanismus, da durch die Bindung des Liganden ganze β -Faltblattbereiche verschoben werden können [87]. Für die Darstellung der *site*-III-Interaktion wurde das über *site II* rekrutierte gp130 nicht dargestellt.

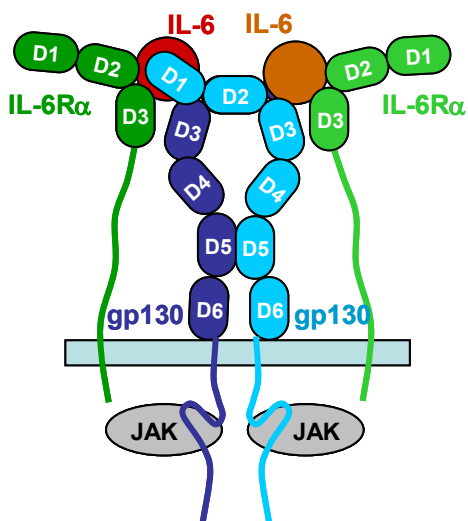


Abbildung 1-6: Vereinfachte Darstellung des hexameren IL-6-Rezeptorkomplexes in membranständiger Form [88], modifiziert nach [89].

1.3. Signaltransduktion der IL-6-Typ-Zytokine am Beispiel von IL-6

Abbildung 1-7 vermittelt eine Übersicht über die Aktivierung des JAK/STAT-Signaltransduktionsweges nach IL-6 (Übersichtsartikel: [61,90]). Die Bindung von IL-6 an den IL-6R α bewirkt die Rekrutierung von gp130 und leitet somit die intrazelluläre Signaltransduktion ein.

Das Glykoprotein gp130 besitzt keine intrinsische Kinase-Aktivität, ist jedoch konstitutiv mit Tyrosinkinasen, den Janus Kinasen (Jak1, Jak2, Tyk2) assoziiert. Man nimmt an, dass eine durch den Liganden bewirkte Konformationsänderung zur räumlichen Annäherung der Kinasen führt und diese aktiviert. Die Janus Kinasen (JAKs) phosphorylieren zahlreiche Tyrosin-Motive der zytoplasmatischen Region von gp130, wodurch Bindungsstellen für Proteine mit SH2-Domänen entstehen.

Durch IL-6 werden Transkriptionsfaktoren der STAT-Familie (vorwiegend STAT3 und in geringerem Maße STAT1) aktiviert. Diese werden über ihre SH2-Domäne an Tyrosin-phosphorylierte Rezeptormotive rekrutiert und ihrerseits durch die JAKs an definierten Tyrosinmotiven phosphoryliert. Anschließend dissoziieren die aktivierten STATs von den Rezeptoren und bilden aktive Homo- bzw. Heterodimere aus. Nach der Translokation in den Zellkern binden STAT-Dimere an cis-aktive Sequenzelemente (TTCN₃GAA) in den Promotoren ihrer Zielgene. Neben vorwiegend anti-apoptotischen (z.B. Bcl-XL) und proliferativen Zielgenen (Proteine der Zyklin-Familie) werden in bestimmten Organen auch Zelltyp-spezifische Zielgene (z.B. Akut-Phase-Proteine der Leber) exprimiert. Zudem wird durch die Induktion von Proteinen der *suppressor of cytokine signalling* (SOCS)-Familie der eigene Signalweg reguliert. Diese wirken als klassische *feedback*-Inhibitoren. Neben dem JAK/STAT-Weg wird auch die MAP-Kinase-Kaskade aktiviert. Die Initiierung erfolgt über die Rekrutierung der Tyrosin-Phosphatase SHP-2 (*SH2-domain containing tyrosine phosphatase*) an ein tyrosinphosphoryliertes Rezeptormotiv (Y⁷⁵⁹ in gp130). Nach dessen Phosphorylierung durch Janus-Kinasen werden Adaptorproteine wie Grb2 rekrutiert und über den Guaninnukleotidaustauschfaktor SOS sowie das GTP-bindende Protein Ras der MAP-Kinase-Weg aktiviert [61,90].

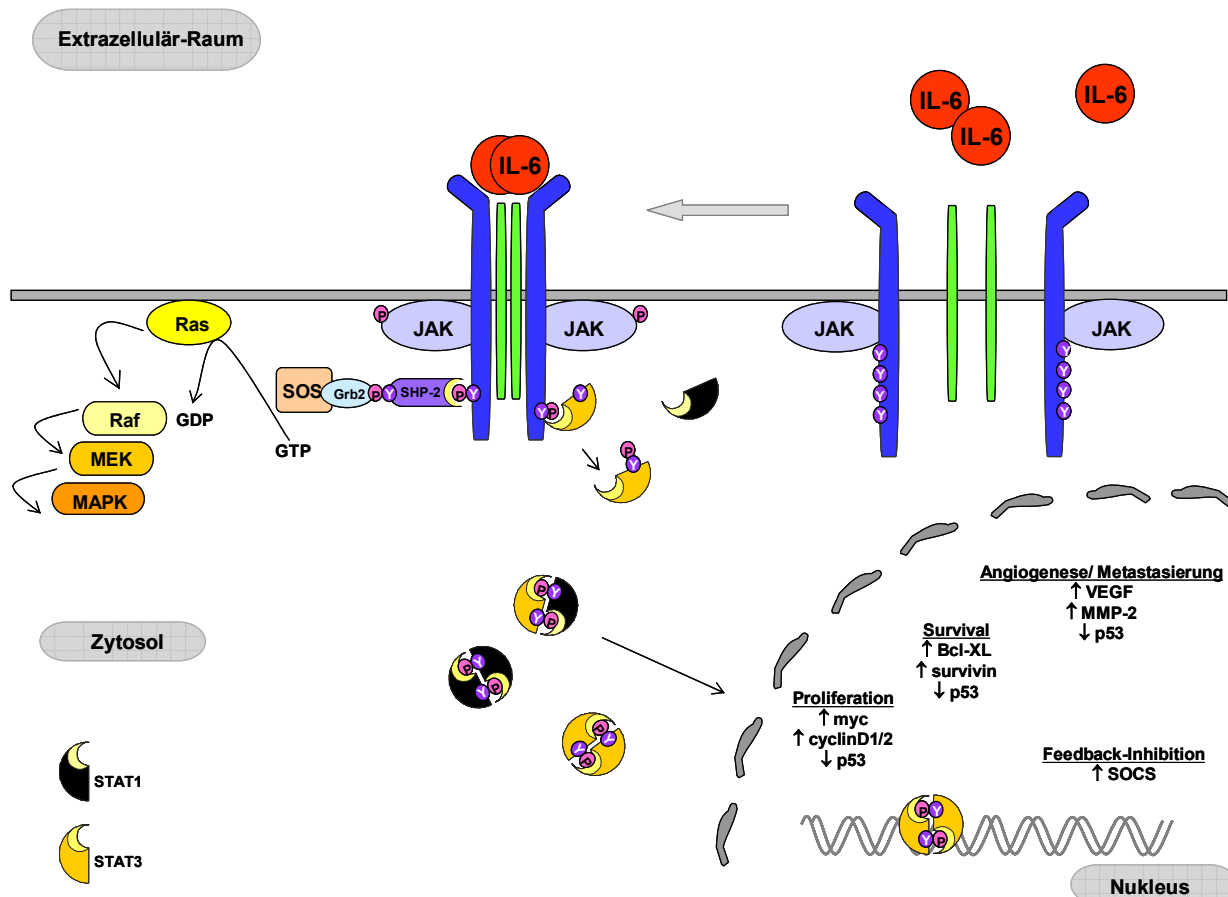


Abbildung 1-7: Aktivierung des JAK/STAT-Signaltransduktionsweges nach IL-6

Durch Bindung von IL-6 an membranständige Rezeptoren wird neben dem JAK/STAT Signaltransduktionsweg die MAPK-Kaskade aktiviert. Die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren, insbesondere von STAT3, führt zur Expression von Zielgenen. Frequenz und Amplitude des Signals sowie die Aktivierung unterschiedlicher STAT-Subspezies moduliert die Antwort der Zelle. Die negative Regulation der Signaltransduktion erfolgt über Phosphatasen und klassische *feedback*-Mechanismen wie die Induktion von SOCS-Proteinen.

1.4. Anti-Zytokin-Therapien mit Biomolekülen am Beispiel von IL-6

Im Laufe der Zeit wurden für das pleiotrop wirkende IL-6 eine Reihe unterschiedlicher Anti-Zytokin-Therapien entwickelt und z.T. in klinischen- oder tierexperimentellen Studien mit unterschiedlichem Erfolg getestet:

- **mutierte Zytokine**, die als Rezeptorantagonisten wirken (z. B. Sant7 [91,92]), ein mutiertes IL-6-Molekül, das an IL-6R α bindet, aber defekte *site* II und III-Interaktionen aufweist und somit die signaltransduzierende Untereinheit gp130 nicht rekrutiert [93]
- **Antikörper** gegen den IL-6R α (Toxilizumab, MRA) [94,95] oder das Zytokin [96,97]

- **Inhibitoren mit niedrigem Molekulargewicht**, wie z.B. Madindoline A [98], welches an gp130 bindet und dadurch eine breitere Wirkung vermittelt, da es die Wirkung aller Zytokine beeinflusst, die über gp130 signalisieren.

- **lösliche Rezeptoren**, stellen den extrazellulären, Liganden-bindenden Anteil eines Rezeptorproteins dar, der zwar das Zytokin bindet, aber kein Signal fortleitet.

Zytokine wie IL-1 oder TNF- α können aufgrund ihrer vergleichsweise einfachen Rezeptor-Architektur durch lösliche Rezeptoren inhibiert werden. Für das IL-6-Rezeptorsystem konnte gezeigt werden, dass lösliche Rezeptorproteine nicht zwangsläufig als Inhibitoren wirken. Während die lösliche β -Untereinheit (*soluble* gp130) keine Affinität zu IL-6 aufweist, wirkt der IL-6R α agonistisch: Dieser kann in Kombination mit IL-6 die Signaltransduktion auf gp130 exprimierenden Zellen initiieren. Dieser Effekt kann durch simultane Zugabe von löslichem gp130 unterbunden werden [75,99].

Zur Hemmung von IL-6 müssen daher beide Rezeptoruntereinheiten vorhanden sein. Weiterhin sollten die Untereinheiten kovalent verknüpft sein, um die Gefahr eines agonistischen Effektes zu minimieren.

Zwei Arbeitsgruppen konnten IL-6 mit Inhibitoren, die auf löslichen Rezeptoren basieren erfolgreich hemmen [100,101], wobei unterschiedliche Strategien zur kovalenten Verknüpfung der Rezeptordomänen gewählt wurden. Abbildung 1-8A verdeutlicht den Unterschied zwischen beiden Konzepten.

„Cytokine-trap“

Bei der in Abbildung 1-8A dargestellten „IL-6-trap“ [100] handelt es sich um ein lösliches Rezeptordimer. Durch Co-Expression der Extrazellulär-Region beider Rezeptoren, fusioniert mit einem F_c-tag (IL-6R α - F_c und gp130- F_c), werden die Rezeptorketten über Disulfidbindungen verknüpft, wobei jedoch nur das Heterodimer als Inhibitor wirkt.

Rezeptor-Fusionsproteine (RFPs)

Im Falle des IL-6-RFP [101] handelt es sich um ein Fusionsprotein, in welchem die Domänen D1-D3 des humanen gp130 mit den Domänen D2-D3 des humanen IL-6R α über einen flexiblen Polypeptid-Linker verbunden sind (Abb 1-8B,C). Diese Domänen der Rezeptorproteine sind direkt an der Ligandenbindung beteiligt.

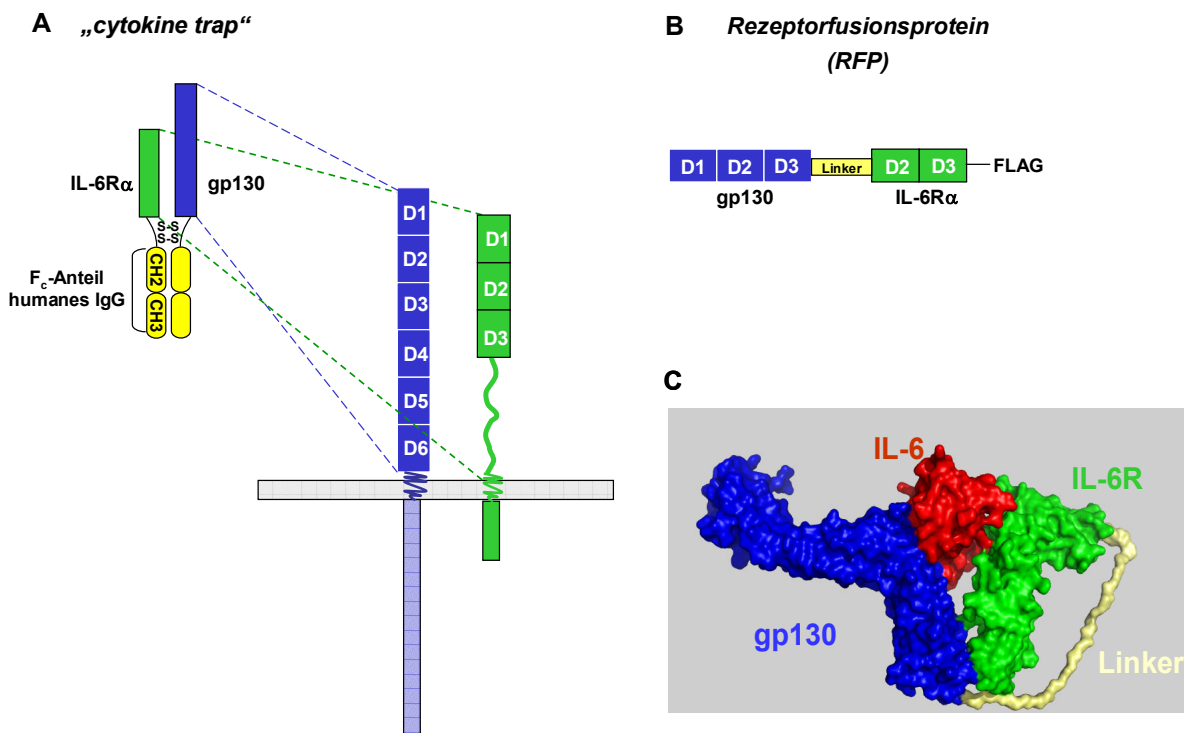


Abbildung 1-8: Auf löslichen Rezeptoren basierende Strategien zur Inhibition von IL-6

Beide Inhibitoren basieren auf den natürlichen Rezeptorproteinen, wodurch das Zytokin mit vergleichbarer Spezifität and Affinität gebunden wird.

A: Bei der „*cytokine-trap*“ werden alle Aminosäuren der extrazellulären Region der Rezeptorproteine IL-6R α (dargestellt in grün) und gp130 (dargestellt in blau) verwendet, unabhängig von ihrem Beitrag zur Ligandenbindung (vgl. Abschnitt 2.1.1 und 2.1.2). Dadurch enthält die „*cytokine trap*“ die FNIII-Domänen D4-D5-D6 von gp130, die den Inhibitor vergrößern ohne die IL-6 Bindung positiv zu beeinflussen, sowie die sog. stalk-Region des IL-6R α , die anfällig für proteolytische Spaltung (shedding) ist, wodurch der inhibitorische Effekt beeinträchtigt werden könnte.

B: Im Gegensatz dazu wurden für das IL-6-RFP nur diejenigen Domänen verwendet, die direkt an der IL-6-Bindung beteiligt sind.

C: Strukturmodell des hIL-6-RFP, basierend auf der Röntgenstrukturanalyse des humanen Rezeptorkomplexes.

1.5. Ziel der Arbeit

Das Konzept der Inhibition von IL-6-Typ-Zytokinen durch Rezeptor-Fusionsproteine (RFPs) wurde erstmals von Ancey *et al.* [101] für das humane Zytokin IL-6 beschrieben.

Für die weitere Charakterisierung des Fusionsprotein-Konzeptes im Hinblick auf einen möglichen Einsatz in der Human-Therapie muss zuvor ein *proof of principle* im geeigneten Tiermodell (z.B. Maus oder Ratte) erbracht werden. Aufgrund der Spezies-spezifischen Wirkung ist der bereits beschriebene IL-6-Inhibitor, der auf humanen Rezeptorproteinen basiert, im Tiermodell wirkungslos. Grund hierfür ist, dass humane Rezeptorproteine keine Kreuzreaktivität zu den Zytokinen der oben genannten Spezies aufweisen [72].

Im Rahmen dieser Doktorarbeit sollte die Fusionsprotein-Strategie exemplarisch für das murine Zytokin IL-6 adaptiert und validiert werden.

Ein weiteres Ziel dieser vorliegenden Arbeit bestand darin, ein Konzept für die Optimierung der Expression und Aufreinigung der Fusionsproteine zu entwickeln, das auf weitere Inhibitoren dieses Typs übertragen werden kann.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

Alle Chemikalien wurden in Qualität *pro analysi* von den Firmen Merck (Darmstadt), Sigma-Aldrich (Taufkirchen) und Roth (Karlsruhe) eingesetzt. Antikörper, DNA-modifizierende Enzyme, Plasmide, rekombinante Proteine, Reaktionskits und weitere Verbrauchsmaterialien der Firmen *invitrogen™ life technologies* (Karlsruhe), MBI Fermentas, (St. Leon-Rot), *New England Biolabs (NEB, Frankfurt/ Main)*, *PeproTech* (Hamburg), Qiagen (Hilden), *R&D Systems* (Minneapolis, MN/ USA), Roche (Mannheim) werden in den entsprechenden Kapiteln erwähnt.

Radiochemikalien

α [³²P]dATP Hartmann Analytic GmbH, Braunschweig

2.2. Plasmide

Plasmid	Kurzbeschreibung	Bezugsquelle
pGL3 α 2M-215 Luc	enthält den Promotorbereich -215 bis +8 aus <i>rattus norvegicus</i> , fusioniert mit der codierenden Sequenz des Luziferasegens	pGL3 (Promega, Mannheim)
pCH110 (β -Gal)	Expressionsplamid für β -Galactosidase	Pharmacia, Freiburg
pGL4.70 [hRluc]	Expressionsplamid für Renilla-Luziferase	Promega , Madison/ USA
pSVL hIL-6-RFP <i>stalk49</i>	Eukaryotischer Expressionsvektor, codiert für humanes gp130D1-3 fusioniert über einen Linker mit den Domänen D2/3 des humanen IL-6R α	pSVL (Pharmacia, Freiburg) Fusionsprotein: C. Ancey
pSVL hIL-6-RFP AGS 41	Eukaryotischer Expressionsvektor, codiert für humanes gp130D1-3 fusioniert über einen synthetischen Linker mit den Domänen D2/3 des humanen IL-6R α	pSVL (Pharmacia, Freiburg) Fusionsprotein: C. Ancey
pcDNA3.1 (+)	Eukaryotischer Expressionsvektor; Geneticin- (G418)-Resistenz	Invitrogen™ life technologies

2.3. Antikörper

Primärantikörper

Antikörper	Eigenschaften	Bezugsquelle	Verwendung
α -FLAG™ M2	Immunglobulin zur Detektion von rekombinanten Proteinen, die das FLAG™ Epitop (DYKDDDDK) enthalten	(Sigma-Aldrich)	WB, IP; ELISA
α V5	Immunglobulin zur Detektion von rekombinanten Proteinen, die das 14aa V5 Epitop (GKPIPPLLGLDST) beinhalten, welches aus den P und V-Protein des Paramyxovirus SV5 abgeleitet ist	(invitrogen™ life technologies)	WB, IP, ELISA
α -STAT3	gegen den N-terminalen Bereich des Transkriptionsfaktors STAT3 gerichtet	Transduction Laboratories, (USA)	WB
α -PY ⁷⁰⁵ STAT3	polyklonales Antiserum gegen die tyrosinphosphorylierte Form des Transkriptionsfaktors STAT3	Cell signaling (Frankfurt am Main)	WB
α CD126 mouse Klon: D7715A7	monoklonaler Antikörper gegen murinen IL-6R α ; inhibiert IL-6-abhängige Proliferation von Zellen [102,103]	BD Pharmingen	FACS

Sekundärantikörper

Antikörper	Eigenschaften	Bezugsquelle	Verwendung
Ziege-anti-Kaninchen-IgG	polyklonales Antiserum gegen den konstanten Bereich von Kaninchen Immunglobulin; Peroxidase (HRP)-konjugiert	DAKO (Glostrup/Dänemark)	WB
Ziege-anti-iMaus-IgG	polyklonales Antiserum gegen den konstanten Bereich von Maus-Immunglobulin; Peroxidase (HRP)-konjugiert	DAKO (Glostrup/Dänemark)	WB
PE-Ziege-anti-Ratte Ig FaB	polyklonales Antiserum gegen Ratte-IgG-Fab-Fragmente, R-Phycoerythrin-konjugiert	Dianova, (Hamburg)	FACS

2.4. Zytokine

Rekombinantes humanes IL-6 für die Kopplung an CNBr-Sepharose 4B (Abschnitt 2.8.9.) wurde nach der Methode von *Arcone et al.* [104] präpariert und freundlicherweise von B. Mütze zur Verfügung gestellt. Die spezifische Aktivität betrug 2×10^6 BSF-2 U/mg Protein.

- rekombinantes IL-6 (Spezies: Mensch, Maus, Ratte); *R&D Systems*
- rekombinantes IL-11 (Spezies: Mensch); *R&D Systems*
- rekombinantes OSM (Spezies: Mensch); *PeptoTech*; spezifische Aktivität: 5×10^5 U/ mg
Kommerziell erworbene rekombinante Zytokine wiesen (gemäß Herstellerangaben) Endotoxin-Werte von $<1 \text{ EU}/\mu\text{g}$ ($0,1 \text{ ng}/\mu\text{g}$ Protein) auf.
- löslicher IL-6R α (sIL-6R α) wurde nach der Methode von *Weihgräber et al.* [105] präpariert und freundlicherweise von M. Kaufmann zur Verfügung gestellt.

2.5. Zellkultur und zellbiologische Methoden

2.5.1. Zelllinien

Zelllinie	Kultivierung	Kurzbeschreibung	Bezugsquelle
B9	RPMI 640 10% FCS β -Mercaptoethanol hIL-6	murine Hybridomzelllinie (Resultat der Fusion von BALB/c Milzzellen mit SP2/0-AG14 Myelom-Zellen); Suspensionszellen, wachsen IL-6 abhängig;	DSMZ: ACC 221
Ba/F3 gp130	DMEM 10% FCS 5% BPV-Überstand	nicht adhären wachsende murine prä B-Zelllinie aus dem peripheren Blut (BALB/c), stabil transfiziert mit dem humanen gp130 Rezeptor, wachsen IL-3 abhängig	
COS-7	DMEM 10% FCS	adhären wachsende Nierenzelllinie der grünen Meerkatze (<i>Cercopithecus aethiops</i>) mit fibroblastenartiger Morphologie, transformiert mit einer Replikationsdefekten Mutante des SV-40 Virus	DSMZ ACC 60
HepG2	DMEM/F12 10% FCS	adhären wachsende Zelllinie, die 1975 aus Tumorgewebe (hepatozelluläres Karinom) generiert wurde humane Leberzelllinie	ATCC: HB-8065)
HEK293	DMEM 10% FCS	humane, embryonale Nierenzelllinie, die durch Transformation mit einem Adenovirus Typ 5 (Ad 5) etabliert wurde	DSMZ ACC 305
FaO	DMEM 10% FCS	Hepatom-Zelllinie der Ratte	ECACC 89042701

2.5.2. Nährmedien und Lösungen für die Zellkultur

DMEM Flüssigmedium	(Gibco, Eggenstein)
DMEM/ F12 Flüssigmedium	(Gibco, Eggenstein)
RPMI1640 Flüssigmedium	(Gibco, Eggenstein)
OptiMEM	(Gibco, Eggenstein)
FCS (Mycoplasmen-freies) fötales Kälberserum	(CytoGen GmbH, Sinn-Fleisbach)
Trypsin (0,05%)/ EDTA (0,02%)	(Lonza, Verviers/ Belgien)
Geneticin (G418)	(Sigma-Aldrich)

PBS	200 mM	NaCl
	2,5 mM	KCl
	8,0 mM	Na ₂ HPO ₄
	1,5 mM	KH ₂ PO ₄
Krebs-Ringer-HEPES	130 mM	NaCl
	4,7 mM	KCl
	2,5 mM	CaCl x 2H ₂ O
	1,2 mM	KH ₂ PO ₄
	1,2 mM	MgSO ₄
	5,5 mM	Glukose
	10 mM	HEPES

2.5.3. Kultivierung von Säugerzellen

Die Zellen wurden in wassergesättigter Atmosphäre bei einer konstanten Temperatur von 37°C und einer CO₂-Konzentration von 5% kultiviert.

Bei Erreichen des Stadiums der Konfluenz erfolgte die Subkultivierung. Adhärenz Zelllinien wurden durch Behandlung mit der Protease Trypsin von der Oberfläche des Zellkulturgefäßes abgelöst. Zuvor wurden Serumbestandteile, welche Trypsin inaktivieren, durch Waschen des Zellrasens mit PBS entfernt. Abgelöstes Zellmaterial wurde in einem geeigneten Volumen Kulturmedium resuspendiert und auf neue Zellkulturgefäße verteilt.

2.5.4. Gefrierkonservierung von Säugerzellen

Zur Lagerung wurden die Zellen wie bei der Subkultivierung vorbehandelt und durch Zentrifugation (1000 rpm/ 5 min/ 4°C) sedimentiert. Das Sediment wurde in vorgekühltem Einfriermedium aufgenommen. Der Zusatz von Dimethylsulfoxid (DMSO) diente dazu die

Bildung von Eiskristallen zu verhindern. Die Zellen wurden kontinuierlich mit ca. 1°C/ min auf –80°C abgekühlt und nach 24 h in flüssigem Stickstoff gelagert.

Einfriermedium	70% (v/v)	Kulturmedium
	20% (v/v)	FCS
	10% (v/v)	DMSO

2.5.5. Bestimmung der Zellzahl

Die Zellzahl wurde mikroskopisch durch Auszählen mittels einer Neubauer-Zählkammer ermittelt. Parallel wurde durch Zusatz einer 0,4 %igen Lösung des Farbstoffes Trypanblau (Sigma-Aldrich) die Lebendzellzahl bestimmt. Die einfache Methode basiert auf der veränderten Membrandurchlässigkeit abgestorbener Zellen für Farbstoffe.

2.5.6. Konfokale Mikroskopie lebender Zellen

Zur Detektion fluoreszenzmarkierter Proteine in lebenden Zellen wurde ein konfokales *laserscanning* Mikroskop des Typs Zeiss LSM 510 Meta (Zeiss, Jena) verwendet. Dieses ist u. a. mit einem Argon-Laser ausgestattet, der Licht der Wellenlängen 458, 488 und 514 nm emittieren kann. Konfokale Bilder wurden mit einem 63x Wasser-korrigierten Objektiv (*ZeissC-Apochromat 63/1.2w Korr*) aufgenommen. Zur mikroskopischen Analyse stabil mit IL-6R α -Mutanten transfizierter HepG2-Zellen wurden diese auf 30 mm großen Coverslips ausgesät. Nach 12-18 h konnten die Zellen in eine offene Kultivierungskammer überführt werden, die eine Untersuchung unter Zellkulturbedingungen (5% CO₂, 37°C, in einem Krebs-Ringer-HEPES-Medium ohne Phenolrot) durchgeführt. Um verschiedene Fluoreszenz-Signale von einer Zelle aufzunehmen, wurde die *Multi-Track*-Funktion des LSM 510 Meta verwendet. YFP wurde mit einer Wellenlänge von 488 nm angeregt, die Emission wurde nach Passage durch einen *Bandpass*-Filter mit einer Durchlässigkeit von 505-550 nm detektiert. Zur Lokalisationsbestimmung wurde die Membran der lebenden Zellen mit 0,5 %iger Trypanblau-Lösung markiert, dessen Fluoreszenz in einem Bereich >630nm detektiert wurde. Die Einstellungen der konfokalen Fluoreszenz-Detektion waren somit für die verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe optimiert. Der Durchmesser des *pinholes* - der konfokalen Blende - betrug bei allen Aufnahmen in Abhängigkeit von der Anregungswellenlänge ungefähr eine *Airy Unit*. Für die verwendeten Anregungswellenlängen ergibt diese Einstellung eine Schichtdicke der konfokalen Aufnahmen < als 1 μ m.

2.6. Molekularbiologische Methoden

2.6.1. Bakterienstämme

JM 83, DH5α	zur Vermehrung von Plasmid-DNA verwendet
JM 110	dam-, dcm-Methylase-defizienter <i>E.coli</i> –Stamm, geeignet zur Präparation unmethylierter Plasmid-DNA

2.6.2. Kultivierung und Konservierung von Bakterien

Die Kultivierung rekombinanter Bakterien erfolgte bei 37°C auf festen Nährmedien oder als Flüssigkultur unter Schütteln (225 rpm) unter Selektion (Antibiotika) für 16-18 h (ü.N.).

LB (Luria-Bertani) Medium	1% (w/v) 0,5% (w/v) 1% (w/v)	Bactotrypton Hefeextrakt NaCl pH 7,0 (bei 25°C)
LB-Agar	1,5% (w/v)	LB-Flüssigmedium Bacto-Agar
Ampicillin-Stammlösung	100 mg/ml	in 70% EtOH (-20°C)

Die Konservierung erfolgte in Form von Glycerinkulturen. Diese wurden durch Zugabe von 20 % (v/v) Glycerol (87 %) zu einer Flüssigkultur in stationärer Wachstumsphase erstellt und bei -80°C gelagert.

2.6.3. Herstellung RbCl-kompetenter Bakterien

E. coli Stämme wie DH5 α , JM83 und JM110 wurden durch Inkubation mit RbCl und CaCl₂ für die Aufnahme von DNA kompetent gemacht.

Zur Herstellung kompetenter *E. coli*-Bakterien wurde eine Hauptkultur mit Zellsuspension einer stationär gewachsenen Vorkultur des entsprechenden Bakterienstammes bis zu einer OD₆₀₀ von 0,05 angeimpft und bei Erreichen der logarithmischen Wachstumsphase (OD₆₀₀ von 0,4) abgeerntet. Vor der Zentrifugation wurden die Zellen für 10-20 min auf Eis

abgekühlt und anschließend sedimentiert (2700g/ 10min/ 4°C). Das Sediment wurde in 10 ml eiskaltem TfB1 resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation (2700g/ 10 min/ 4°C) wurden die Zellen in 4 ml TfB2 aufgenommen und zügig resuspendiert. Die kompetenten Bakterien wurden in einem Volumen von 200 µl aliquotiert, in flüssigem N₂ eingefroren und bei -80°C gelagert. Zur Ermittlung der Kompetenz wurde eine Testtransformation mit 10-100 pg superhelikaler Plasmid-DNA durchgeführt.

TfB1-Puffer	100 mM	RbCl
	50 mM	MnCl ₂
	30 mM	Kaliumacetat
	10 mM	Calciumchlorid
	15%	Glycerol (v/v)
		pH 5,8 (bei 20-25°C) mit Essigsäure einstellen
TfB2-Puffer	10 mM	MOPS pH 8,0
	10 mM	RbCl
	75 mM	CaCl ₂
	15%	Glycerol (v/v)

2.6.4. Transformation von Bakterien

Kompetente Bakterien wurden auf Eis aufgetaut und mit DNA-Lösung vermischt. Nach 20 minütiger Inkubation auf Eis erfolgte eine Hitzeschockbehandlung für 90 s bei 43°C, gefolgt von kurzem Abkühlen auf Eis. Die Bakterien wurden in 500 µl LB-Medium aufgenommen und 1 h bei 37°C inkubiert. Nach einem Zentrifugationsschritt und Aufnahme des Sediments in 100 µl LB-Medium wurden die Bakterien auf vorgewärmten Selektionsplatten ausgestrichen.

Für Retransformationen wurden 100 pg - 1 ng superhelikale Plasmid-DNA verwendet.

2.6.5. Präparation von Plasmid-DNA

Die Präparation von Plasmid-DNA in kleinem Maßstab diente der Charakterisierung rekombinanter Bakterienklone mittels analytischer Restriktion oder Sequenzierung. Die Isolation der Plasmid-DNA erfolgte mit Hilfe des *QIAprep®Spin Miniprep Kit* (Qiagen) nach Angaben des Herstellers.

Zur Gewinnung von DNA für die Transfektion von Säugetierzellen wurden größere Kulturvolumina (250ml) nach Angaben des Herstellers mittels *HiSpeed®Plasmid Maxi Kit* (Qiagen) aufgearbeitet.

2.6.6. Quantitative Nukleinsäurebestimmung

Die Konzentration von Nukleinsäurelösungen wurde mittels eines NanoDrop® Spectrophotometers (NanoDrop Technologies, Wilmington/ USA) bestimmt. Dazu wurde ein Spektrum der DNA-Lösung über einen Bereich von $\lambda=230$ nm bis $\lambda=280$ nm erstellt.

Eine Extinktion bei 260 nm (E_{260}) von 1.0 entspricht einer DNA-Konzentration von 50 $\mu\text{g/ml}$ dsDNA und etwa 30 $\mu\text{g/ml}$ ssDNA oder RNA.

Mit Hilfe des Quotienten E_{260}/E_{280} können Aussagen über die Reinheit der DNA-Lösung getroffen werden. Bei reinen Präparationen liegt dieser Wert zwischen 1.8 bis 2.0. Einzelsträngige Nukleinsäuren (z.B. RNA) zeigen bei $\lambda=260$ nm eine etwa 1,4-fach höhere Absorption als dsDNA (Hyperchromizität). Die Zunahme dieses Quotienten (>2.0) ist daher ein Maß für den Anteil an RNA in der Nukleinsäurepräparation. Bei proteinhaltigen Verunreinigungen fällt dieser Quotient unter 1.8, da aromatische Aminosäuren ebenfalls bei 280 nm absorbieren.

2.6.7. Enzymatische Spaltung von DNA (Restriktionsverdau)

Durch Restriktionsverdau wurden DNA-Moleküle analysiert oder kompatible Enden für die Subklonierung von DNA-Fragmenten generiert.

Für präparative Zwecke wurde die benötigte Enzym-Menge anhand der nachfolgenden Formel ermittelt:

$$\text{Menge Enzym } [\mu\text{L}] = \frac{\text{Anzahl bp Genom d. Phagen } \lambda \times \text{Schnittstellen Enzym in Vector DNA} \times \text{DNA-Menge } [\mu\text{g}]}{\text{Größe Plasmid-DNA} \times \text{Anzahl Schnittstellen Enzym im Phagen } \lambda \times \text{Enzymaktivität } [\text{U}/\mu\text{L}]}$$

Restriktionen erfolgten nach Herstellerangaben in Volumina von 20-50 μl . Für analytische Spaltungen wurde 1 μg Plasmid-DNA verwendet. Für präparative Zwecke wurden 2,5-4 μg Plasmid-DNA mit 2,5-fachem Überschuß des Enzym für 3 h restringiert und ggf. hitzedenaturiert (65°C/ 15 min).

2.6.8. Dephosphorylierung von linearisierter Plasmid-DNA

Um die Religation geschnittener Plasmid-DNA zu verringern, wurden die 5'-Phosphatgruppen entfernt. Zu diesem Zweck wurde geschnittene Vektor-DNA mit 5U *Antarctic Phosphatase* (NEB) für 1 h bei 37°C terminal dephosphoryliert. Das Enzym wurde durch Erhitzen für 15 min bei 65°C inaktiviert.

2.6.9. Trennung von Nukleinsäurefragmenten durch Agarose-Gelelektrophorese

Nukleinsäuren bewegen sich aufgrund der negativen Ladung der Phosphodiestergruppen in einem elektrischen Gleichspannungsfeld in Richtung der Anode. Nukleinsäure-Fragmente wurden nach enzymatischer Spaltung durch den Molekularsiebeffekt der Agarosegelmatrix in 1%-igen Agarosegelen bei 110 V für 30-60 min in Horizontalgel-apparaturen elektrophoretisch aufgetrennt.

Die Größe der DNA-Fragmente wurde durch den Vergleich der Laufstrecken mit einem DNA-Längenstandard (1kb-Leiter; invitrogen) ermittelt.

Zur Visualisierung der DNA wird die Elektrophorese in Gegenwart des DNA-interkalierenden Farbstoffes Ethidiumbromid (10mg/ ml) durchgeführt. Die Visualisierung der Nukleinsäurebanden erfolgte bei 302 nm Anregungs-Wellenlänge auf einem UV-Tisch. Die Photodokumentation erfolgte über ein System der Firma INTAS (Intas Science Imaging instruments GmbH, Göttingen).

50 x TAE-Laufpuffer	2 M	Tris
	1 M	Essigsäure
	0,05 M	EDTA (pH 8,0)
10x Probenpuffer	150 mM	Tris pH 7,6
	25%	Glycerol (v/v)
	0,4%	Bromphenolblau (w/v)
	0,4%	Xylencyanol (w/v)

2.6.10. DNA-Fragmentisolierung aus präparativen Agarosegelen

DNA-Fragmente, durch PCR amplifiziert oder mittels Restriktion generiert, wurden aus Agarosegelen isoliert und unter UV-Licht mit einem Skalpell ausgeschnitten. Anschließend erfolgte die Aufreinigung des DNA-Fragmentes mittels *QIAquick® Gel Extraction Kit* (Qiagen) gemäß den Herstellerangaben.

2.6.11. Ligation

Die Ligation von doppelsträngigen DNA-Fragmenten in Vektoren wurde durch T4-DNA-Ligase (MBI Fermentas) in Gegenwart von ATP katalysiert. Die Reaktion erfolgte nach Herstellerangaben unter Verwendung von 1-5U/ Ligase pro Reaktion für 1 h bei RT. Um den Einbau der Fremd-DNA zu fördern, wurde das zu inserierende Fragment im dreifachen molaren Überschuß gegenüber der Vektor-DNA eingesetzt.

2.6.12. Hybridisierung von Oligonukleotiden

Kleinere doppelsträngige DNA-Abschnitte zur Modifikation von Plasmid-DNA oder zur Herstellung von Sonden für Gel-Retentionsanalysen (2.8.13) wurden durch Hybridisierung komplementärer Oligonukleotide generiert. Dazu wurden die Oligonukleotide in einem Ionenreichen Puffer für 2 min bei 95°C im Heizblock denaturiert und ü.N. hybridisiert.

12,5%	Oligo (sense) (200pmol/μl)
12,5%	Oligo (antisense) (200pmol/μl)
1x	Hybridisierungspuffer
ad 200 μl	H ₂ O

5 x Hybridisierungspuffer	200 mM	Tris/HCl pH 7,5
	100 mM	MgCl ₂
	200 mM	NaCl

2.6.13. Oligonukleotide

2.6.13.1. Klonierung von Fusionsproteinen

P1) mL-6R α L ¹ (s)	attgtaggtaccctggtcctcgggagctgccgc
P2) mL-6R α T ³⁰⁰ (as)	attgtactcgagggtggtcctgggctctgtatc
P3) mL-6R α SGS (s)	ggtaccgcctctggctcaggagctgccgcgcgctgg
P4) mL-6R α Δ D1 (s)	ggtaccgtggatgtccccagaggagc
P5) mL-6R α Δ PräD1 (s)	ggtaccgcggtggcaaatggcacagtgc
P6) mL-6R α Δ D1 + präD1 (s)	ggtaccctggtcctcgggagctgccgcgcgctggaggtggcaaatggcaca gtgacaagcctgggggtggatgtccccag
P7) mgp130 Δ NheI(s)	gctagcccctgcaagatgtcagcaccaggattggctggcgc
P8) mgp130 R323 (as)	attgtatctagatctgtctctgtatgtgg
P9) soluble mgp130 E615(as)	ctcgagtctcctgagcgaacttggtgttg

Klonierung:

Die verwendeten Oligonukleotide wurden basierend auf der Nukleotidsequenz des murinen IL-6R α (Datenbankquelle: NM_010559) und des murinen gp130 (Datenbankquelle: BC058679) generiert. Zur Amplifikation der entsprechenden Rezeptordomänen wurde Gesamt-RNA aus murinen Zelllinien (B9 und Raw 264.7-Makrophagen) isoliert und in *cDNA* umgeschrieben. Für nachfolgende Klonierungen wurde die gesamte CDS des mL-6R α mit den Primern P18+P19 und die extrazelluläre Region des murinen gp130 mit den Primern P7+P9 amplifiziert. Die α -Rezeptor-Mutanten der Fusionsproteine wurden mit den sense-Primer P1, P3, P4, P5, P6 in Kombination mit dem antisense-Primer P2 generiert.

Unter Verwendung des Primers P10 wurde das endogene Signalpeptid von gp130 (Aminosäuren M¹-G²²) mit dem Präprotrypsin-Signalpeptid substituiert.

2.6.13.2. Signalpeptid/ Polypeptid-Linker

P10) Präprotrypsin-Signalpeptid	gctagcgccaccatgtctgcacttctgacccctagctcttggagctgcag ttgctcaacttttgaaccgtgtgg
P11) Ala-Gly-Ser-45 Linker	tctagagggcccgaagtgcggccgaacgcgtggaagtgcgtgtagtggc ggaagtgaaccggtagtgaagtgcagctgtagtggcgactccgctgcagctgtagtggaggtg gaagtgggatggtacc
P11a) AGS (s)	attgtatctagagggcccgaagtgcggc
P11b) AGS (as)	attgtaggtaccactcccactccacctcc

Klonierung

Ein Alanin-Glycin-Serin-reicher Polypeptid-Linker (AGS-*Linker*) wurde unter Verwendung des Konstruktes pSVL-hIL-6-RFP AGS41 mit den Primern P11a) und P11b) amplifiziert.

2.5.13.3. Modifikationen/ Protein-tags

P12) CFP/ YFP(s)	attgtagaattcatggtgagcaagggcgag
P13) CFP/ YFP (as)	attgtagtttaaactcattactgtacagctcgtc
P14) FLAG Δ XbaI(s)	tgcaggatcgaattcgactacaaggacgacgatgacaagtgagttt
P15) FLAG(as)	aaactcactgtcatcgtcgtcctttagtgcgaattcgatatcc
P16) V5 His (s)	tcgaggatcgaattcggcaaacctatacctaaccactgtaggattag attcaacgcgtaccggtcatcatcaccatcaccattgagttt
P17) V5 His (as)	aaactcaatggtgatggtgatgaccggtacgcgttgaatctaatacctaa cagtggttaggtataggtttgccgaattcgatatcc

Klonierung

Als Grundlage für die Expression der Fusionsproteine dienten modifizierte *pcDNA3.1 (+)* Vektoren. Diese wurden sequentiell geöffnet die entsprechenden Fragmente des Fusionsproteins oder das YFP-*tag* subkloniert. Weiterhin wurden Oligo-Ligationen durchgeführt, wodurch die Protein-*tags* (FLAG, und V5 His) eingeführt wurden.

2.6.13.4. mL-6R α -Mutanten

P18) mL-6R α ^{Full} (s)	gctagcggaggaagcatgctgaccgtcggtgcacg
P19) mL-6R α ^{Full} Δ Stop(as)	ctcgagctccctgattggctgcagcccatcg
P20) mL-6R α Δ D1 (s)	gctagcggaggaagcatgctgaccgtcggtgcacgctggtgctgcctcg

	ctggccgccccggtcgcggtcgacgttccccag
P21) mL-6R α Δ PräD1 (s)	gctagcggaggaagcatgctgaccgtcggtgcacgctgttgctgccctgctgg ccgcgccccggtcgcgctggtggcaaatggcacagt
P22) mL-6R α A-SGS (s)	gctagcggaggaagcatgctgaccgtcggtgcacgctgttgctgccctgctgg ccgcgccccggtcgcgctctggtcagggagctgccgcgctgg
P23) mL-6R α (as)	ctcgagctccctgattggctgcagccatcgccgagtgacgtcacggg aaggcagagcacatggagtggagaaccaccctcg
P24) mL-6R α ^{C6S} (s)	ctggtcctcgggagctctcgcgctggacgtg
P25) mL-6R α ^{C6S} (as)	cacctccagcgcgagagctcccaggaccag
P26) CD126 Δ D1+ präD1	gctagcggaggaagcatgctgaccgtcggtgcacgctgttgctgcc tgctggccgccccggtcgcgctggtcctcgggagc
P27) mL-6R α (as)	aggtgatccggtgcaccattttaagctg

Klonierung:

Zur Charakterisierung der Funktion der Ig-ähnlichen Domäne des mL-6R α wurde eine Reihe von Mutanten hergestellt und analysiert.

Der Wildtyp-Rezeptor wurde über die Primer P18/ P19 aus cDNA amplifiziert. Dieses Konstrukt diente als Grundlage für die Punktmutante mL-6R α ^{C6S} mit den Primern P24/ P25 durch QuikChange®PCR.

Deletionsmutanten wie mL6R α - Δ PräD1 (Primerkombination: P21/P19), mL-6R α - Δ D1 (Primerkombination: P20/ P19) und die Dreifach-Mutante mL-6R α ^{SGS} (Primerkombination: P22/ P19) wurden durch PCR-Mutagenese generiert.

Da es sich um Typ-I-Transmembranproteine handelt, besitzen die Rezeptoren ein Signalpeptid, welches im ER abgespalten wird. Daher wurden mit den Primern neben Klonierungsschnittstellen die endogene Kozak-Sequenz in Verbindung mit dem Signalpeptid des mL-6R α in Deletionsmutanten eingeführt. Die Abspaltung der Signalpeptide wurde durch das Vorhersage-Programm SignalP überprüft.

Die mL-6R α - Δ D1 + PräD1-Fusionsmutante wurde in zwei Phasen kloniert: Die Fusion der PräD1-D2 Region erfolgte über die Primer P6 und P2 aus der Deletionsmutante Δ D1 mL-6R α . Durch Amplifikation mit den Primern P26 und P27 wurden Klonierungsschnittstellen, Kozak-Sequenz und Signalpeptid fusioniert. Unter Nutzung einer endogenen BamHI Schnittstelle wurde die modifizierte Region des mL-6R α in den Wildtyp-Rezeptor ausgetauscht.

2.6.14. cDNA-Synthese aus RNA mit Reverser Transkriptase

Rezeptoren bzw. Rezeptordomänen wurden aus zellulärer RNA kloniert. Zur Gewinnung zellulärer RNA wurde Zellmaterial über *QIAshredder*TM Säulen (Qiagen) mechanisch

aufgebrochen und die RNA mit Hilfe des *RNeasy Mini Kit* (Qiagen) nach Herstellerangaben isoliert.

Mit Hilfe des *1st strand cDNA synthesis kit for RT-PCR (AMV)* (Roche) wurde die Gesamt-RNA über das Enzym Reverse Transkriptase in cDNA überführt. Zur Vermeidung störender Sekundärstrukturen wurde die RNA vor der cDNA-Synthese für 10 min bei 95°C hitzedenaturiert und dann auf Eis gelagert.

Standardansatz für die Erststrang-cDNA-Synthese mit Reverser Transkriptase

Reagenz	Volumen
10×Reaktionspuffer	2 µl
25mM MgCl ₂	4 µl
dNTP- Mix (10 mM)	2 µl
Random Primer (2µg/µl) p(dN) ₆	2 µl
RNase-Inhibitor (50U/µl)	1 µl
Gelatine (0,5mg/ml)	1 µl
AMV Reverse Transkriptase (Avian-Myoblastosis-Virus)	1 µl
Template mRNA (1µg)	
ddH ₂ O	ad 20 µl

10 min	25°C
60 min	42°C
5 min	95°C

2.6.15. Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR (*polymerase chain reaction*) wurde zur spezifischen Amplifikation von DNA-Abschnitten aus cDNA, sowie zum Einführen von größerer Mutationen oder Schnittstellen eingesetzt. Punktmutationen wurden mittels *QuikChange® XL site directed mutagenesis kit* (Stratagene, La Jolla/ USA) in die DNA eingeführt.

Dazu wurden folgende standardisierten Protokolle benutzt, welche bei Bedarf modifiziert wurden:

Standard-PCR

	Konzentration der Stammlösung	Volumen
<i>high fidelity</i> Puffer (Eppendorf)	10 ×	5 µl
dNTP	2,5mM	4 µl
5'-3' Primer (<i>sense</i>)	10 pmol/ µl	2,5 µl
3'-5' Primer (<i>antisense</i>)	10 pmol/ µl	2,5 µl
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase	5U/ µl	0,5 µl
DNA-Matrize Plasmid-DNA (25 ng) <i>cDNA</i>		4 µl
ddH ₂ O		ad 50 µl

initiale Denaturierung	95°C	360 s	30 Zyklen
Denaturierung	95°C	45 s	
Hybridisierung	50-60°C	60 s	
Synthese	72°C	60 s/ 1kb	
Auffüllreaktion	72°C	720 s	

* Die Hybridisierungstemperatur (HT) richtet sich nach Länge und GC-Gehalt des Oligonukleotides

QuikChange® PCR

	Konzentration der Stammlösung	Volumen
Reaktionspuffer	10 ×	5 µl
dNTP-Mix	keine Herstellerangaben	1 µl
5'-3' Primer (<i>sense</i>)	2,5ng/ µl	2,5 µl
3'-5' Primer (<i>antisense</i>)	2,5ng/ µl	2,5 µl
<i>Pfu-Turbo</i> ®-DNA-Polymerase	2,5U/ µl	1 µl
DNA-Matrize Plasmid-DNA (50 ng)		
ddH ₂ O		ad 50 µl

initiale Denaturierung	95°C	30 s	16 Zyklen
Denaturierung	95°C	30 s	
Hybridisierung	55°C	60 s	
Synthese	72°C	60 s/ 1kb	

2.7. Proteinexpression in eukaryotischen Zellen2.7.1. Transfektion von Eukaryotenzellen

Um die Funktion eines Proteins oder dessen Interaktion mit anderen Proteinen zu analysieren, wird die heterologe DNA in Form eines Replikons in Säugerzellen eingebracht (Transfektion) und ausgehend von starken Promotoren (z.B. CMV-Promotor) transkribiert.

Man unterscheidet zwischen transienter und permanenter (stabiler) Transfektion:

Bei transienten Transfektionen wird das Fremdgen nicht in das Genom integriert. Es liegt im Zytoplasma der Zelle als Replikon vor und wird in der Regel stark überexprimiert. Das Genprodukt kann nach ca. 18-48 h immunologisch nachgewiesen werden.

Zur Herstellung einer stabilen Zelllinie ist es notwendig, dass die DNA in das Zellgenom integriert wird. Die Expressionslevel sind in der Regel moderater und der Einfluss des Fremdgens auf die Physiologie der Zelle kann verlässlicher beobachtet werden.

2.7.2. Transfektion mittels DEAE-Dextran

Diese Transfektionsmethode wurde für COS-7-Zellen verwendet. Plasmid-DNA bildet in Anwesenheit des kationischen Polymers DEAE-Dextran Komplexe, die sich auf der Zelloberfläche anlagern. Diese werden von den Zellen durch Endozytose aufgenommen. Die Gegenwart von Chloroquin fördert diesen Prozeß, vermutlich, indem eine zu starke Ansäuerung von DNA-enthaltenden Endosomen verhindert wird.

Hierzu wurden 70-80 % konfluente Zellen mit einem Gemisch aus Plasmid-DNA, DEAE-Dextran und Chloroquin für 80 min unter Luftabschluß inkubiert.

Anschließend wurden die Zellen mit 5 ml PBS gewaschen, mit Kulturmedium versetzt und die Zellen nach 24 h subkultiviert. Rekombinantes Protein konnte 48 h nach der Transfektion biochemisch untersucht werden.

Transfektionsansatz (100 mm Petrischale)	0,1%	100mM Chloroquin
	1%	50mg/ ml DEAE-Dextran
	2,5-10µg	Plasmid-DNA in 6 ml DMEM-Medium (FCS-frei)

2.7.3. Transfektion mittels Lipidgemischen (FuGENE6, Lipofectamine2000)

Fremd-DNA kann durch Lipidgemische wie FuGENE6 transfection reagent (*Roche*) oder Lipofectamine2000 (*invitrogen*) in Säugerzellen (Hek293, HepG2, COS-7) eingebracht werden. Diese Lipide bilden zusammen mit DNA diffusible Komplexe, die innerhalb eines Zeitraums von ca. 6 h von den Zellen aufgenommen werden.

Zur Transfektion wurde das zwei-fache Volumen der Lipidlösung bezogen auf die DNA-Menge (in µg) in 100 µl FCS-freiem Medium mit der DNA-Lösung vermischt. Anschließend wurden die Ansätze für 20 min zur Ausbildung von Lipid/DNA-Komplexen bei RT inkubiert und der Transfektionsmix tropfenweise zu den Zellen ins Kultivierungsmedium gegeben. Nach 12 h erfolgte die Subkultivierung der Zellen. Rekombinante

Proteine wurden 48 h nach der Transfektion biochemisch untersucht (s. Kapitel 2.7.) oder stabile Zelllinien durch Antibiotika-Selektion generiert.

2.8. Biochemische Methoden zum Nachweis der Fusionsproteinkonstrukte

2.8.1. Herstellung von Zellextrakten

Zum Nachweis sowohl endogener als auch rekombinanter Proteine wurden Säugerzellen durch Detergenzien-haltige Puffer aufgeschlossen. Die Lysate repräsentieren ein Gemisch aus zytosolischen, nukleären und Membranproteinen.

Suspensionszellen wurden in RIPA-Lysispuffer lysiert. Zur Analyse phosphorylierter Proteine und für Immunpräzipitationen wurde ein Tritonhaltiger-Puffer auf HEPES-Basis verwendet.

Zur Herstellung von Gesamtzellextrakten wurde der Zellrasen mit PBS gewaschen. Nach Zugabe geeigneter Volumina Lysispuffer wurden die Zellen mittels eines Zellschabers von der Platte abgetragen und 30 min auf Eis lysiert. Durch Zentrifugation (13000rpm/ 10min/ 4°C) wurden Membranbestandteile abgetrennt. Rohlysate wurden direkt für eine Immunpräzipitation (IP) eingesetzt oder zur Analyse mittels Westernblot in 4x Laemmli-Puffer denaturiert. Nach Möglichkeit wurden wiederholte Einfrier- und Auftau-Zyklen vermieden.

RIPA-Lysispuffer	50 mM	Tris-HCl pH 7,4
	150 mM	NaCl
	1 mM	EDTA pH 8,0
	1 mM	NaF
	0,5%	NP 40
	15%	Glycerin
Triton-Lysispuffer	20 mM	HEPES pH7,4
	100 mM	NaCl
	10 mM	β-Glycerophosphat
	50 mM	NaF
	1%	Triton X-100

Folgende Komponenten wurden kurz vor der Verwendung zugegeben:

1 mM	Na ₃ VO ₄
1 mM	PMSF
5µg/ ml	Aprotinin
5µg/ ml	Leupeptin
3µg/ ml	PepstatinA

2.8.2. Immun- bzw. Koimmunpräzipitation von Proteinen

Durch eine IP kann eine spezifische Anreicherung von Proteinen oder Proteinkomplexen aus Zelllysaten erreicht oder Interaktionspartner identifiziert werden.

Die Präzipitation der Proteinkomplexe erfolgt über Immunglobuline, die gegen das entsprechende Epitop gerichtet sind und über die Wechselwirkung mit ProteinA an eine Sepharose-Matrix immobilisiert wurden.

Zur Immobilisierung wurde eine Lösung aus Antikörper und ProteinA Sepharose™CL-4B (GE Healthcare Biosciences AB, Uppsala/ Schweden) in PBS für 1h/ 4° auf einem Rotationsschüttler inkubiert. Exprimierte Fusionsproteine (RFP) wurden zumeist ü.N. durch Inkubation mit 100 µl PAS/ Antikörper-Lösung aus 500 µg Zelllysate oder 5ml Überstand angereichert und die Immunkomplexe durch Zentrifugation (13.000rpm/ 15s/ 4°C) sedimentiert. Zur Verringerung der unspezifischen Bindung wurden die Ansätze dreimal mit 500 µl PBS Tween20 pH 6,5 gewaschen.

Die Sepharose wurde in 50 µl 2x Laemmli-Probenpuffer aufgenommen und die Proteine durch Hitzedenaturierung (80°C/ 5 min) von der Matrix getrennt. Die präzipitierten Proteine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt und einer Westernblot-Analyse unterzogen.

Protein-A-Sepharose (PAS): 5 mg ProteinA Sepharose™CL-4B/ Ansatz in 100 µl PBS für 10 min bei RT quellen,
Kopplung des Immunglobulins: 1h/ 4°C (Rotationsschüttler)

2.8.3. Proteinbestimmung (nach Bradford)

Zum quantitativen Nachweis gelöster Proteine wurde das *Bio-Rad Protein Assay* Testsystem (BioRad, München) verwendet. Das Prinzip der Bestimmung basiert auf der von Bradford *et al.* [106] beschriebenen Methode.

Der Test basiert auf der Verschiebung des Absorptionsmaximums des Farbstoffes Coomassie Brilliant-Blau G-250 von 465 nm nach 595 nm in proteingebundener Form.

Zur Konzentrationsbestimmung wurde die Proteinprobe mit einer fünffach verdünnten Gebrauchslösung gemischt und 5 min bei RT inkubiert. Die Extinktion der Lösung bei $\lambda=595$ wurde gegen einen Leerwert nm photometrisch bestimmt. Als Referenz der gemessenen Proteinkonzentration diente eine Eichkurve, welche für BSA ermittelt wurde.

2.8.4. SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Diese Methode erlaubt, Proteine gemäß ihrem Molekulargewicht aufzutrennen. Durch unspezifische Anlagerung des Detergenz SDS (*sodium dodecylsulfate*) wird die Eigenladung der Proteine maskiert.

Bei der Probenvorbereitung werden die Proteine durch Hitzebehandlung denaturiert und Disulfidbrücken mittels reduzierenden Thiolverbindungen (β -Mercaptoethanol) zu den entsprechenden Thiolen reduziert. Daraus resultieren SDS-Proteinkomplexe mit konstantem Ladungs-Masse Verhältnis, die sich proportional zu ihrem Molekulargewicht im elektrischen Feld bewegen.

Die SDS-Page wurde als diskontinuierliche vertikale Gelelektrophorese nach Laemmli [107] durchgeführt. Diese Technik kombiniert den Molekularsiebeffekt des PAA-Gels mit einem diskontinuierlichen Puffersystem. Die Proteine durchlaufen zunächst ein weitporiges Sammelgel (3%-ig, pH 6,8). Aufgrund der Puffereigenschaften werden die Proteine im Sammelgel fokussiert und gemäß ihren Molekulargewichten über die Trenngelmatrix (8,75- oder 10%-ig, pH 8,8) aufgetrennt.

Mittels eines Größenstandards (Precision Plus Protein™ Standards dual Color; Bio Rad, München) wird das Gel kalibriert. Die Elektrophorese erfolgt in einer vertikalen Multigel-Apparatur (Whatman Biometra®, Göttingen) bei einer Stromstärke von 2,5 mA/ cm² Trenngel. Das Trenngel wurde je nach Verwendungszweck zur weiteren Analyse angefärbt oder geblottet.

Acrylamidlösung	30% Acrylamid4K-Solution (Applichem/ Darmstadt) 29% Acrylamid 1% Bisacrylamid	
4 x Sammelgelpuffer	0,5 M 0,4%	Tris/HCl pH6,8 SDS
4 x Trenngelpuffer	1,5 M 0,4%	Tris/ HCl pH8,8 SDS
4 x Laemmli-Ladepuffer	250 mM 8% 40% 20% 0,4%	Tris/HCl pH 6,8 SDS Glycerin β -Mercaptoethanol Bromphenolblau
10x SDS-Laufpuffer	0,25 M 1,92 M 1%	Tris-Base pH8,3 Glycin SDS

2.8.5. Silberfärbung von Proteinen in PAA-Gelen

Mittels Silberfärbung können Proteinmengen von 5-30 ng/Bande nachgewiesen werden. Ag^+ -Ionen bilden Komplexe mit Glutamin-, Asparagin- und Cysteinseitenketten der Proteine, wobei alkalisches Formaldehyd die Silberionen zu Ag reduziert.

Im Anschluss an die SDS-PAGE wurde das Trenngel ü.N. mit Fixierlösung behandelt und anschließend 4×10 min mit ddH_2O gewaschen. Die Vorbehandlung des Gels erfolgte durch Inkubation in Natriumthiosulfat-Lösung für 1 min. Das Gel wurde 2×1 min mit ddH_2O gewaschen und 30-60 min mit einer Silbernitratlösung imprägniert. Nach einem kurzen Waschschrift (5-15 sec / ddH_2O) wurde die Färbereaktion durch Zugabe der Entwicklerlösung gestartet. Bei ausreichender Intensität der Proteinbanden erfolgte die Zugabe der Stopplösung (30-60 min). Alle Lösungen wurden vor Gebrauch stets frisch hergestellt.

Fixierlösung	30% 5%	EtOH (v/v) Eisessig (v/v)
Vorbehandlung	0,8 mM	$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \times 5\text{H}_2\text{O}$
Silbernitratlösung	12 mM	AgNO_3
Entwicklerlösung	2% 0,00925% 0,00125%	K_2CO_3 Formaldehyd $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$
Stopp-Lösung	4% 2%	Tris-Base (w/v) Essigsäure (v/v)

2.8.6. Protein-Transfer (*blotting*)

Beim *blotting* werden die mittels SDS-PAGE aufgetrennten Proteine auf eine mechanisch stabile Trägermatrix transferiert. Dabei bleibt das elektrophoretisch erhaltene Proteinmuster des Gels auf der Membran erhalten.

Nach Separation der Proteine mittels SDS-PAGE konnten diese im „*semi-dry*“- Verfahren nach Kyshe-Anderson [108] durch Anlegen eines elektrischen Feldes aus dem Polyacrylamidgel eluiert und auf eine PVDF-Membran (BioTrace™ PVDF Membrane, Pall Gelman Laboratory, Dreieich) übertragen werden.

Dazu wurde die PVDF-Membran wurde mit Methanol vorbehandelt, und anschließend 15 min in Anodenpuffer II äquilibriert. Auf die Anode der Western Blot Apparatur wird ein sogenanntes „*blotting-sandwich*“ bestehend aus PVDF-Membran, Gel sowie drei in

verschiedenen Puffer getränkte Whatman® GB005 Filterpapiere (Whatman Internat. Ltd. Maistone/England) luftblasenfrei aufgebaut. Um einen gleichmäßigen Spannungsverlauf zu gewährleisten, wird die Apparatur mit einem Gewicht beschwert. Der Transfer erfolgt bei einer konstanten Stromstärke von 0,8 mA/cm² bei RT für eine Stunde.

Anodenpuffer I	300 mM 20%	Tris-Base (pH10,4) Methanol (v/v)
Anodenpuffer II	25 mM 20%	Tris-Base (pH10,4) Methanol (v/v)
Kathodenpuffer	40 mM 20% 0,01%	ε-Aminocaprinsäure Methanol (v/v) SDS (w/v)

2.8.7. Westernblot-Analyse

Bei der Westernblot-Analyse wird das Zielprotein über eine Antigen-Antikörper-Reaktion identifiziert, wobei eine enzymatische Reaktion als Indikator für die Ausbildung des Immunkomplexes dient.

Nach dem Transfer der Proteine wurden freie Bindungsstellen der PVDF-Membran mit einer Lösung aus 10 % bovinem Serumalbumin in TBS-N blockiert. Primäre Antikörper wurden gemäß Herstellergaben, sekundäre Antikörper in 1: 5000 Verdünnung eingesetzt. Die Bindung der Primärantikörper erfolgt mindestens 1 h bei RT oder ü. N. bei 4°C. Anschließend werden die Immunkomplexe auf der Blot-Membran mit einem Peroxidasegekoppelten Sekundärantikörper für 30 min bei RT nachgewiesen. Zwischen den einzelnen Inkubationsschritten erfolgten Waschzyklen (1× 15 min, 2× 5 min) mit TBS-N.

5x TBS-N	2 M 5 M 0,5%	Tris-HCl pH 7,5 NaCl Nonidet P-40/ Igepal CA 630
-----------------	--------------------	--------------------------------------------------------

Immundetektion mittels ECL (enhanced chemiluminescence)

Zum Nachweis der Immunkomplexe aus Protein und Primärantikörper, wird ein polyklonaler sekundärer Antikörper verwendet, der mit einem Enzym, der Meerettich-Peroxidase (*horseradish peroxidase*, HRP) konjugiert ist. Dieser Antikörper ist gegen den F_c-Teil des Primärantikörpers gerichtet und sorgt für eine Signalamplifikation.

Der Nachweis der Antikörper/Protein-Komplexe erfolgt durch Chemilumineszenz. Bei einer enzymatischen Reaktion fungieren Substanzen als Substrate, die unter Emission

von Licht zerfallen. Bei dem verwendeten Lumineszenz-System (*Pierce Luminol Enhancer Solution*, Pierce, Thermo Fisher Scientific, Inc. Waltham MA/ USA) wird durch HRP die Oxidation des Farbstoffes Luminol in Gegenwart von Wasserstoffperoxid katalysiert. Luminol wird dadurch in einen angeregten Zustand überführt. Durch Lichtemission kehrt das Luminol wieder seinen Grundzustand zurück, was zu einer lokalen Belichtung des Röntgenfilms (Amersham Hyperfilm™ECL, GE Healthcare, Buckinghamshire/ UK) führt.

Gegenfärbung einer PVDF-Membran

Bei der ECL-Methode ist es möglich, die PVDF-Membran mehrfach einer Immundetektion zu unterziehen. Dazu werden die Antikörperkomplexe durch Inkubation in *stripping*-Puffer bei 70 °C für 30 min von der Membran entfernt. Anschließend wird die Blotmembran 2x 10 min in TBS-N gewaschen und die Immundetektion kann mit dem Blocken der Membran (s. 2.8.7.) fortgesetzt werden.

<i>stripping</i>-Puffer (pH6,7)	62,41 mM	Tris-Base
	20 %	SDS
vor Gebrauch:	0,076%	β-Mercaptoethanol (v/v)

2.8.8. Konzentrierung und Umpuffern von Proteinlösungen

Verdünnte Proteinlösungen wie konditionierte Zellkultur-Überstände wurden mittels Druckfiltration sukzessiv bei 4°C bis zum gewünschten Endvolumen aufkonzentriert.

Dazu wurde eine Amicon-Rührzelle 8050 (Millipore Corporation, Billerica MA/ USA) mit Cellulose-Filtermembranen (MOWG 30kDa, ebenfalls Millipore) verwendet, welche Substanzen oberhalb eines definierten Molekulargewichtes zurückhalten.

Durch anschließende Dialyse des Filtrates wurden niedermolekulare Bestandteile aus den Proteinlösungen (Salze etc.) entfernt. Das Prinzip der Dialyse beruht darauf, dass Proteine aufgrund ihrer Molekülgröße die Poren einer semipermeablen Membran nicht passieren können, während niedermolekulare Substanzen, insbesondere Salze, sich mit der Zeit gleichmäßig zwischen Innen- und Außenraum des Schlauches verteilen.

Dialyseschläuche wurden autoklaviert und in 50% (v/v) Ethanol gelagert und kurz vor Gebrauch mit ddH₂O ausgespült. Proteinlösungen wurden in den Schlauch eingefüllt und ü.N. bei 4°C unter Rühren gegen den entsprechenden Puffer dialysiert.

2.8.9. Kopplung von Proteinen an CNBr-Sepharose™ 4B

Bei CNBr-Sepharose™ 4B (GE Healthcare Biosciences AB, Uppsala/ Schweden) handelt es sich um Sepharose-Kügelchen (Größe: 45-165µm) an die rekombinantes humanes IL-6 (siehe Abschnitt 2.5) über primäre Amine gekoppelt wird.

Zur Vorbehandlung der Sepharose wurden Additive durch Waschen (15 min) mit 1mM HCl-Lösung entfernt. Anschließend erfolgte die Immobilisierung des Liganden an die Separose in einem Kopplungspuffer für 1h/ bei RT.

Verbleibende reaktive Gruppen wurden durch Inkubation der proteinbeladenen Gelmatrix mit 100 mM Tris/HCl pH 8,0 für 2 h abgesättigt. Ungebundene Liganden wurden durch drei Waschzyklen mit Puffern alternierender pH-Werte entfernt. Die Lagerung der Matrix erfolgte bei 4°C.

Kopplungspuffer	100 mM 500 mM	NaHCO ₃ pH8,3 NaCl
Waschpuffer I	100 mM 500 mM	NaAcetat pH4,0 NaCl
Waschpuffer II	100 mM 500 mM	Tris-HCl pH8,0 NaCl

Fusionsproteine wurde dann ähnlich den unter Abschnitt 2.8.2 geschilderten Prozeduren über immobilisiertes humanes IL-6 präzipitiert und anschließend biochemisch analysiert (s. 2.8.4 – 2.8.7).

2.8.10. Durchflusszytometrie (FACS-Analyse)

Zur Überprüfung der Oberflächenexpression von mIL-6R α -Rezeptormutanten wurden stabil transfizierte HepG2-Zellen durch Zugabe von PBS/10mM EDTA von der Platte gelöst, auf FACS-Röhrchen (BD, Heidelberg) verteilt (ca. 2,5 x 10⁶ Zellen/ Ansatz) und durch Zentrifugation sedimentiert. Anschließend erfolgte die Inkubation der Zellen auf Eis für 20 min unter Zugabe einer 100-fachen Verdünnung des entsprechenden Antikörpers [1µg/µl]. Die Spezifität der Analyse konnte durch Zusatz eines Immunglobulins des gleichen Subtyps (Ig-Kontrolle) überprüft werden. Die Zellen wurden mit 3 ml FACS-Puffer gewaschen und zur Detektion gebundenen Antikörpers 20 min mit einem Phycoerythrin-konjugierten Sekundärantikörper inkubiert. Um ein Ausbleichen des Farbstoffes zu verhindern, wurde die Reaktion im Dunkeln durchgeführt.

Nach erneutem Waschen mit 3 ml FACS-Puffer wurden 10^5 Zellen durchflußzytometrisch in einem FACScalibur (Becton Dickinson) analysiert. Der Farbstoff Phycoerithrin wurde mit einem 488 nm Argonlaser angeregt und emittiertes Licht einer Wellenlänge von 576 nm detektiert.

FACS-Puffer 5% FCS in PBS

2.8.11. Herstellung von Kernextrakten

Die Kernextraktion erfolgte nach *Andrews und Faller [109]*. Dazu wurden sowohl Zellen mit Zytokinen stimuliert als auch unstimuliert belassen. Anschließend wurden die Zellen mit kaltem PBS gewaschen und mit Hilfe eines Gummischabers von der Oberfläche des Kulturgefäßes gelöst. Ein Aliquot der Zellen wurde zur Überprüfung der Oberflächenexpression der Rezeptorkonstrukte einer durchflußzytometrischen Analyse (s. 2.8.10) unterzogen. Die abgelösten Zellen wurden in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt, durch Zentrifugation sedimentiert (5min/ 1500rpm) und in 1 ml Puffer A aufgenommen. Nach zehnmütiger Inkubation auf Eis wurden die Zellen mechanisch durch Zentrifugation aufgebrochen. Die cytosolische Fraktion wurde entfernt und das Sediment, welches die intakten Zellkerne enthält, in 60 µl Kernextraktionspuffer C aufgenommen. Nach 20-minütiger Inkubation auf Eis wurden die Membranbestandteile sedimentiert und der kernproteinhaltige Überstand abgenommen. Der Proteingehalt wurde mittels BioRad Protein-Assay (s. 2.8.3) oder photometrisch (nanodrop) bestimmt.

Puffer A	10 mM	HEPES-KOH, pH 7,8
	1,5 mM	MgCl ₂
	10 mM	KCl
Puffer C	20 mM	HEPES-KOH, pH 7,8
	1,5 mM	MgCl ₂
	420 mM	NaCl
	0,2 mM	EDTA
	25 %	Glycerin (v/v)

2.8.12. Radioaktive Markierung doppelsträngiger DNA-Sonden

Die radioaktive Markierung doppelsträngiger DNA-Sonden erfolgte durch 30 minütige Inkubation bei 37°C durch Auffüllen der 5'-überhängenden Enden mit dem Klenow-Enzym (Roche) unter Verwendung von [³²P]dATP.

Die radioaktiv markierte DNA wurde von Enzym und freien Nukleotiden mit Hilfe des *Qiaquick Nukleotide Removal Kit* (Qiagen) nach Herstellerangaben gereinigt. Die Markierungseffizienz wurde im β -Counter als cpm bestimmt.

Markierungsansatz	2,5 pmol	SIE-Sonden-DNA
	1 x	Restriktionspuffer M (Boehringer Mannheim)
	0,5 mM	dCTP, dGTP, dTTP
	2 μ l	[α - ³² P]dATP
	1 μ l	Klenow-Enzym (5 U, Roche)
		ad 60 μ l H ₂ O

Zum Nachweis der Aktivierung von STAT1 und STAT3 wurde eine doppelsträngige m67SIE-DNA-Sonde eingesetzt. Es handelt sich dabei um eine synthetische DNA-Sequenz, die dem humanen c-fos-Promotor entnommen wurde und das sis-induzierbare-Element (SIE) repräsentiert. Durch eine Mutation (m67) wird gewährleistet, daß die Transkriptionsfaktoren STAT1 und STAT3 mit gleich hoher Affinität binden können [110].

„m67SIE“ 5´-GATCCGGGAGGGATTTACGGGAAATGCTG-3´
 3´-GCCCTCCCTAAATGCCCTTTACGACTTAA-5´

(Konsensus-Sequenz zur STAT-Bindung ist unterstrichen)

2.8.13. Gel-Retentionsanalyse (EMSA)

Transkriptionsfaktoren der STAT-Familie werden durch Tyrosinphosphorylierung aktiviert und können als Dimer an spezifische Konsensussequenzen in Promotoren binden.

Das Prinzip der Gel-Retentionsanalyse beruht auf der Interaktion von DNA-bindenden Proteinen mit dsDNA-Sequenzen, die in Form einer radioaktiv markierten DNA-Sonde (s 2.8.12) zur Verfügung gestellt werden. Komplexe aus DNA und aktiviertem Transskriptionsfaktor besitzen eine niedrigere elektro-phoretische Mobilität im Vergleich zu Monomeren (freie Sonde oder ungebundenes Protein) und werden daher im Gel zurückgehalten. In einem nativen Gel und unter Verwendung von Puffern niedriger Ionenstärke können diese DNA-Protein-Komplexe ohne zu dissoziieren bei der Elektrophorese erhalten werden.

Je 5 μ g Kernextrakt wurden mit 9,5 μ l Reaktionsansatz, welcher 30 000cpm/ μ l der radioaktiv markierten m67SIE-DNA-Probe enthält, für 10 min bei RT inkubiert. Dies erlaubt die Bindung der Transkriptionsfaktoren an die Sonde.

Die Protein-DNA-Komplexe wurden anschließend in einem 5%-igen nativen Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die Elektrophorese erfolgte bei 250 V über eine Laufstrecke von 12 cm. Aufgrund der niedrigen Ionenkonzentration des Laufpuffers war eine kontinuierliche Umwälzung des Puffers mit Hilfe einer Pumpe erforderlich. Nach einer Laufstrecke von 9,5 cm wurde die Elektrophorese ohne Umwälzung durchgeführt. Dadurch wird verhindert, dass freie radioaktivmarkierte DNA in den Elektrophorese-Tank gelangt.

Nach der Elektrophorese wurde das Gel für 15 min in 10% Methanol/ 10% Essigsäure fixiert, auf ein 3MM Whatman-Papier überführt und bei 80°C unter Vakuum getrocknet.

Die Visualisierung der Protein/DNA-Komplexe erfolgte mit Hilfe eines *PhosphoScreens* (Kodak) über Autoradiographie. Dieser konnte auf einem Typhoon Gel imager (Amersham Biosciences) ausgelesen und mit Hilfe dem Programm ImageQuant (Molecular Dynamics) quantifiziert werden.

Reaktionsansatz für eine Probe	9,5 µl	Kernextrakt (5 µg)
	4 µl	5 x Gelshift-Puffer
	0,1 µl	1M DTT
	0,2 µl	200 mM PMSF
	1 µl	Poly(dI-dC) (1 mg/ml)
	2 µl	BSA (10 mg/ml)
	ad 20 µl	H ₂ O
5 x Gelshift-Puffer	50 mM	HEPES-KOH, pH 7,8
	5 mM	EDTA
	25 mM	MgCl ₂
	50%	Glycerin (99%)(v/v)
Gellösung	5,5%	Acrylamid-Bisacrylamid (40:2)
	7,5%	Glycerin (99 %)
	0,25%	5 x TBE
	200 µl	APS (20%)
	40 µl	TEMED
	ad 60 ml	ddH ₂ O
5x TBE	1 M	Tris-Base
	0,83 M	Borsäure
	10 mM	EDTA
		ad 1000ml ddH ₂ O, (pH 8,3)

2.8.14. Konzentrationsbestimmung von Fusionsproteinen mittels ELISA

Murines IL-6-RFP wurde aus konditionierten Überständen und Seren von Versuchstieren über einen *sandwich-ELISA* quantifiziert, bei dem eine validierte Antikörper-Kombination der Firma *R&D Systems* verwendet wurde. Über dieses System können in einer Probe

mIL-6-RFP-Mengen zwischen 46 pg und 3ng quantifiziert werden. Das Fusionprotein wird dabei über Epitope im IL-6R α -Anteil des mIL-6-RFP nachgewiesen. Als Referenz für die Messung diente löslicher muriner IL-6R α (*R&D Systems*).

Zum Nachweis des Proteins wurde mIL-6-RFP über 100 ng/ ml Kopplungsantikörper an die Oberfläche einer Mikrotiterplatte (Nunc-ImmunoPlates MaxiSorp) üN/ RT adsorbiert. Nach drei Waschzyklen wurden freie Bindungsstellen durch Zugabe von jeweils 300 μ l einer 1% ige BSA-Lösung/ well für 1 h bei 37°C abgesättigt. Die konditionierten Überstände wurden vor der Messung mindestens 500- bis 1000-fach verdünnt. Die Messreihen wurden dabei durch weitere Serienverdünnungen erstellt und in Doppelbestimmung durchgeführt.

Fusionsprotein und Standard wurden durch Zugabe von 100 ng/ml biotinyliertem Nachweisantikörper/ well detektiert. Die Ausbildung der Immunkomplexe erfolgte für 2 h bei RT. Diese wurden durch Inkubation mit Streptavidin Peroxidase-Konjugat (*R&D Systems*) für 20 min bei RT unter Lichtabschluss nachgewiesen. Nach drei Waschzyklen wurde 100 μ l Entwicklerlösung/ well zugegeben. Das Enzym HRP katalysiert hierbei die Umwandlung eines chromogenen Substrates (TMB), was durch einen Farbumschlag von farblos zu blau visualisiert wurde. Die Intensität der Farbreaktion ist proportional zum Anteil des mIL-6-RFP in der Probe. Nach deutlicher Färbung wurde die Reaktion durch Zugabe von 100 μ l 2 M Schwefelsäure gestoppt und die Extinktion bei 492 nm am ELISA-Reader bestimmt.

Blockierungslösung	1%	BSA (w/v) in PBS
Waschpuffer	0,05%	Tween 20 (v/v) in PBS
Reagenz-Verdünnungspuffer	1%	BSA (v/v) in PBS
Substratlösung	110 μ l 11 ml 11 μ l	TMB (10mg/ml in DMSO) 0,1 M Na-Acetat Puffer; pH5,5 30% H ₂ O ₂ (v/v)

2.8.15. Messung der Zellproliferation

Die Funktion eines Inhibitors wurde über die Hemmung der IL-6-abhängigen Proliferation von B9-Zellen nachgewiesen. Zur Quantifizierung wurde das *Cell Proliferation Kit II (XTT)* (Roche) verwendet.

Für die Experimente wurde folgendes Protokoll für B9-Zellen etabliert: In einer 96-well Mikrotiterplatte wurden Serienverdünnungen des Inhibitors in 50 μ l konditionierten Kultur-

medium („Kontrollüberstand“) angefertigt. Pro Vertiefung wurden jeweils 50 µl der Zytokinverdünnung (750 pg/ml) und B9-Zellen (Zelldichte: 1×10^5 / ml) zugesetzt. Als Referenz wurden äquivalente Volumina Kontrollüberstand (d.h. ohne mIL-6-RFP) verwendet. Die Auswertung des Testes erfolgt nach Kultivierung der Zellen für 72 h. Um statistisch signifikante Werte zu erhalten, wurden alle Messreihen im Doppelansatz durchgeführt und zur Vermeidung von „Randeffekten“ die Vertiefungen an den Außenrändern der Zellkulturplatte mit PBS aufgefüllt.

Zur Quantifizierung der Zellproliferation wird ein nicht-radioaktives, kolorimetrisches Verfahren eingesetzt. Durch Zusatz des Tetrazoliumsalses XTT kommt es unter dem Einfluss mitochondrialer Succinat-Dehydrogenase zur Bildung eines orange-farbenen Formazan-Derivates. Die Quantifizierung der enzymatischen Reaktion erfolgt photometrisch bei einer Wellenlänge von 450 nm.

2.8.16. Bestimmung der Transkriptionsinduktion mittels Reporter-gen-Assay

Genexpressionsvorgänge, die nach Aktivierung des JAK/STAT-Signaltransduktionswegs initiiert werden, wurde über Reporter-gen-Assays analysiert. Das verwendete Reporter-gen-Konstrukt enthält einen Minimalpromotor in Kombination mit einer STAT-Konsensus-Sequenz, welcher der kodierenden Sequenz eines Reporterproteins (*firefly luciferase*) vorangestellt ist. Über die Messung der enzymatischen Aktivität des Reporterproteins kann so die Aktivierung eines Promotors durch einen extrazellulären Stimulus bestimmt werden. Die Genauigkeit der in Reportergensystemen gemessenen Aktivitäten wird durch verschiedene Faktoren, im Besonderen durch die Anzahl der Zellen und die Transfektionseffizienz beeinflusst. Deshalb wurde neben dem experimentellen Reporter-gen-plasmid Kontrollreporter-gen-plasmide (codieren für β -Galaktosidase oder *Renilla*-Luziferase) mit konstitutiver Promotorktivität kotransfiziert (pCH110, *Pharmacia* oder pGL4.70 [hRLuc] *promega*).

Luciferase-Assay

HepG2-Zellen wurden mit FuGene6 transient transfiziert und nach einer 12 stündigen Erholungsphase mit dem entsprechenden Zytokin für ca. 18 h stimuliert. Die Lyse der Zellen erfolgte mit Hilfe des *Dual-Luciferase®reporter-Systems* der Firma Promega (Madison, Wisconsin, USA) nach Herstellerangaben.

10 µl der Zellextrakte wurden in einer lichtundurchlässigen 96well-Platte (PerkinElmer, Waltham MA/ USA) mit 50 µl Substratlösung, wodurch die enzymatisch katalysierte

Reaktion gestartet wurde. Die Luziferase des Leuchtkäfers, *Photinus pyralis* (Firefly Luciferase) oxidiert dabei das Substrat Luciferin zu Oxyluciferin und bei dieser Reaktion wird Licht emittiert. Anschließend konnte aus dem gleichen Ansatz der Messwert für die *Renilla*-Luziferase bestimmt werden. Die Messung der Lumineszenz erfolgte unter Verwendung des Microlumat 96 P (EG & G Berthold, Bad Wildbad). Die so erhaltenen Rohdaten wurden mit den Messwerten für die Transfektionseffizienz (β -Galaktosidase / oder *Renilla*-Luziferase-Aktivität) korrigiert.

β -Galaktosidase-Assay

Zum Nachweis der gebildeten β -Galactosidase (bei Verwendung von Plasmid pCH110) wurden 100 μ l der Zell-Lysate mit 500 μ l β -Galaktosidase-Puffer und 100 μ l ONPG (1mg/ml o-Nitrophenylgalactosid), einem chromogenen Substrat der β -Galaktosidase, bei 37° C inkubiert. Sobald eine leichte Gelbfärbung der Proben festzustellen war, wurde die Reaktion durch Zugabe von 250 μ l 1M Na₂CO₃ gestoppt und die OD der Proben bei 420 nm bestimmt.

β-Galaktosidase-Puffer	60 mM	Na ₂ HPO ₄
	40 mM	NaH ₂ PO ₄
	1 mM	KCl
	1 mM	MgCl ₂
	0,386%	β -Mercaptoethanol

2.9. Erstellung eines Homologie-Modells des mL-6R α -Komplexes und Computer-gestützte Analyse der Protein-Protein-Interaktionsflächen

Das Modell des Komplexes aus (mIL-6/ mL-6R α / mgp130)₂ basiert auf der Röntgenstruktur des hexameren hIL-6-Rezeptorkomplexes sowie des humanen IL-6R α . Für das *molecular modelling* durch Priv Doz. Dr. S. Haan wurde die software WHATIF [111] verwendet. Zur Analyse der an der Interaktionsfläche beteiligten Aminosäuren dienten die Programme *Molsurfer* [112], *InterProsurf* [113] und der *Protein-Protein Interaction* (PPI) server [114]. Zur graphischen Repräsentation der Molekülmodelle wurde das Programm PyMOL [115] verwendet. Die graphische Darstellung der Oberflächen-Potentiale erfolgte mit dem Swiss-PdbViewer [116]. Homologieabgleiche zwischen verschiedenen Sequenzen wurden mit dem Programm BLAST [117] durchgeführt

Referenz-Nr. der verwendeten Kristallstrukturen (PDB)

humaner IL-6-Rezeptorkomplex	1p9M
humaner IL-6R α	1n26

Referenz-Nr. der verwendeten Protein-Sequenzen des **IL-6R α**

Mensch	<i>(homo sapiens)</i>	NP_0005556
Maus	<i>(mus musculus)</i>	NP_034689
Ratte	<i>(rattus norvegicus)</i>	P22273
Schwein	<i>(sus scrofa)</i>	NP_999568
Rhesusaffe	<i>(macaca maculata)</i>	XP_001114404
Weißbüschelaffe	<i>(callithrix jacchus)</i>	ABH03457
Huhn	<i>(gallus gallus)</i>	NP_001038140
Hund	<i>(canis familiaris)</i>	XP_855105
Rind	<i>(bos taurus)</i>	NP_001104255

Referenz-Nr. der verwendeten Protein-Sequenzen des **gp130**

Mensch	<i>(homo sapiens)</i>	NP_002175
Maus	<i>(mus musculus)</i>	NP_034690
Ratte	<i>(rattus norvegicus)</i>	P40190

Referenz-Nr. der verwendeten Protein-Sequenzen des **IL-6**

Mensch	<i>(homo sapiens)</i>	NP_000591
Maus	<i>(mus musculus)</i>	NP_112445
Ratte	<i>(rattus norvegicus)</i>	NP_036726

Referenz-Nr. der verwendeten Protein-Sequenzen des **IL-11R α**

Mensch	<i>(homo sapiens)</i>	NP_004503
Maus	<i>(mus musculus)</i>	NP_034679

Referenz-Nr. der verwendeten Protein-Sequenzen des **CNTFR α**

Mensch	<i>(homo sapiens)</i>	CAI13159
Maus	<i>(mus musculus)</i>	AAH46974

3. ERGEBNISSE

3.1. Optimierung der Protein-Expression am Beispiel des hIL-6-RFP

Bevor auf die Konstruktion des murinen IL-6-RFP eingegangen wird, sollen Experimente beschrieben werden, die sich mit der Optimierung der Expression des bereits charakterisierten hIL-6-RFP beschäftigen.

Ancey *et al.* [101] haben basierend auf extrazellulären Domänen der humanen Rezeptorproteine IL-6R α und gp130 einen Inhibitor gegen humanes IL-6 konstruiert (Abbildung 3-1). Zur Herstellung dieses sogenannten Rezeptor-Fusionsproteins (**RFP**) wurden die Domänen D1-D2-D3 (Ig-ähnliche Domäne + CBM) des humanem gp130 C-terminal mit den Domänen D2-D3 (CBM) des humanen IL-6R α über eine Reihe von Aminosäuren mit kleinen Seitenketten (*Peptid-Linker*) fusioniert [101]. Zur Fusion der Domänen wurden unterschiedliche Peptid-Linker-Varianten getestet (*stalk 49-* oder Ala-Gly-Ser-(**AGS**)-Linker). Diese *Linker* wurden unter den Gesichtspunkten konzipiert, dass sie flexibel und eine Distanz von etwa 73 Å überbrücken können und darüber hinaus wenig immunogen sind. Dieses Fusionsprotein hemmt ausschließlich humanes IL-6, indem es das Zytokin bindet und so die Aktivierung membranständiger Rezeptoren verhindert.

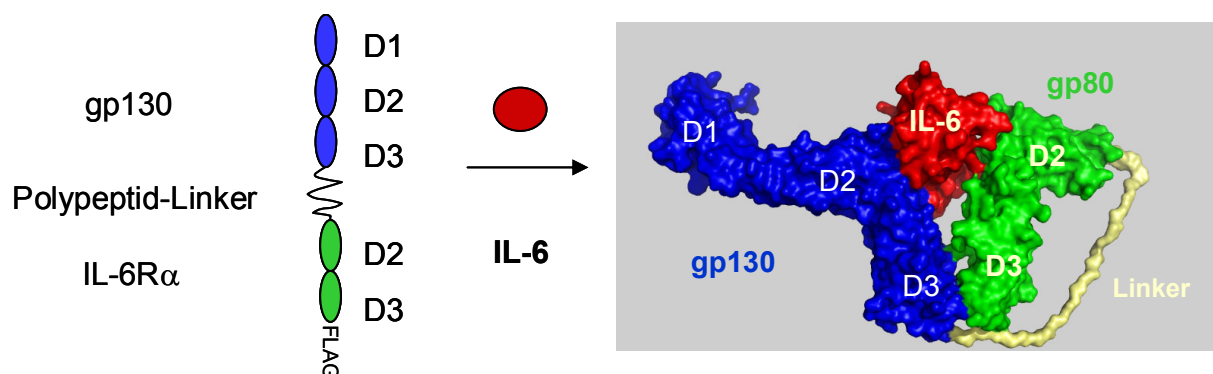


Abbildung 3-1: Schematische Darstellung des humanen IL-6-RFP und die Struktur des hIL-6-RFP im Komplex mit IL-6

Die Domänen D1-D2-D3 des humanen Rezeptorproteins gp130 (blau) sind C-terminal über einen Peptid-*Linker* mit den Domänen D2-D3 des humanen IL-6R α (grün) fusioniert. Der *Linker* (gelb) muss den Rezeptor-Domänen die erforderliche Flexibilität zur Bindung des Liganden (rot) einräumen. Der rechte Teil der Abbildung zeigt ein Strukturmodell des hIL-6-RFP im Komplex mit IL-6, welches basierend auf den Daten der Röntgenstruktur des hexameren Komplexes erstellt wurde. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wurde nur die Interaktion zwischen den *sites* I und *sites* II dargestellt.

Expressionsstudien im Rahmen dieser Arbeit zeigten, dass das humane IL-6-RFP nur unzureichend sezerniert wurde. Die Rezeptorfusionsprotein-Strategie sollte jedoch auf eine endogene Expression (im Versuchstier z.B. über lenti- bzw. adenovirale Systeme) ausgeweitet werden. Diese erfordert eine hinreichende Sekretion des rekombinanten Proteins, so dass weitere Untersuchungen zur Expression erforderlich wurden. Um das Problem darzustellen ist ein repräsentatives Experiment in Abbildung 3-2 gezeigt. Zur Expression von hIL-6-RFP-Varianten wurden COS-7-Zellen mit Expressionsvektoren transfiziert, die eine konstitutive Sekretion des codierten Proteins erlauben. Die Varianten des hIL-6-RFP enthielten zum Nachweis ein sogenanntes FLAG-tag und unterschieden sich lediglich in der Sequenz, die zur Fusion der Domänen verwendet wurde (*stalk 49*- bzw. AGS-Linker).

48 h nach der Transfektion wurde hIL-6-RFP aus konditionierten Kulturüberständen und, nach Aufschluss der Zellen, aus den Lysaten der entsprechenden Zellen durch eine Immunpräzipitation mittels α -FLAG™-Antikörper angereichert. In der nachfolgenden Westernblot-Analyse wurde das Protein immunologisch nachgewiesen. Dabei konnte der Hauptanteil des Proteins in der zellulären Fraktion (Abbildung 3-2, linke Seite) nachgewiesen werden, während im Überstand (Abbildung 3-2, rechte Seite) nur geringe Mengen nachweisbar waren. Da sezerniertes Protein über den sekretorischen Pfad aus der Zelle ausgeschleust wird, weist dieses aufgrund seiner komplexen Glykosylierung eine niedrigere elektrophoretische Mobilität im Vergleich zu Protein der zellulären Fraktion auf.

Es wurde damit festgestellt, dass der überwiegende Teil des Proteins in der zellulären Fraktion verbleibt. Daher stellt sich die Frage, ob das Protein aufgrund von Faltungsproblemen im ER zurückgehalten wird.

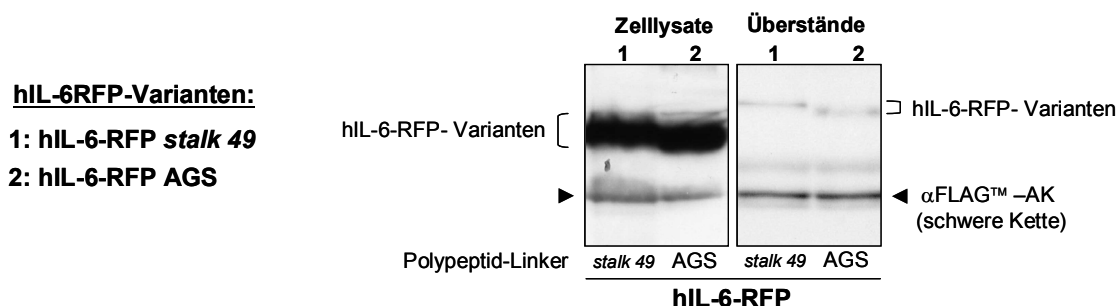


Abbildung 3-2: Sekretion von hIL-6-RFP-Varianten

COS-7-Zellen wurden transient mit zwei Fusionsprotein-Konstrukten transfiziert. 48 h nach der Transfektion wurden das Protein aus konditionierten Überständen und aus Zelllysaten über eine Immunpräzipitation angereichert.

Die analysierten Konstrukte unterscheiden sich nur anhand von Länge und Zusammensetzung der Peptid-Linker. Im Gegensatz zum AGS-Linker enthält der Linker *stalk49* acht zusätzliche Aminosäuren sowie eine (putative) N-Glykosylierungsstelle, was vermutlich die niedrigere elektrophoretische Mobilität dieses Proteins im Vergleich zur AGS-Variante bedingt. Doch unabhängig vom verwendeten Linker-Typ werden beide Proteine schlecht sezerniert.

Mutation der Kozak-Sequenz und Austausch des Signalpeptids

Für weiterführende Experimente sollte rekombinantes Protein unter Verwendung geeigneter Expressions-Systeme erzeugt und aus dem Überstand gewonnen werden. Da jedoch der Anteil sezernierten Proteins nur gering war, mussten Strategien erarbeitet werden, um hinreichende Proteinmengen zu generieren.

Dabei mussten einige Voraussetzungen beachtet werden: Da die ersten sechs N-terminalen Aminosäuren der Domäne D1 von gp130 an der IL-6-Bindung [73] und damit der Ausbildung der *site* IIIa-Interaktion beteiligt sind, durfte der aminoternale Bereich des gp130-Anteils im Fusionsprotein nicht mit einem *Linker* oder einem künstlichen Epitop zum Nachweis des Proteins (*tag*) fusioniert werden. Somit konnte die Reihenfolge für die Fusion der Protein-Domänen sowie die Position des Protein-*tags* nicht grundlegend verändert werden.

Aus diesem Grund konzentrierten sich die Untersuchungen zur Sekretion des Proteins auf die Auswirkungen von a) Mutationen in der 5' untranslatierten Region (*Kozak*-Sequenz) und b) den Austausch der Signalsequenz.

Die sogenannte *Kozak*-Sequenz wurde durch mRNA-Analyse statistisch ermittelt und befindet sich in Position -1 bis -6 relativ zum Startcodon, wobei besonders das Purin-Nukleotid (in den meisten Fällen ein Adenin-Nukleosid) auf Position -3 stark konserviert ist [118]. Diese Sequenz bewirkt die optimale Definition des Startpunktes für das sogenannte *scanning* der 40s Untereinheit des Ribosoms. Fehlt dieser Kontext kann es zum „*leaky scanning*“ des Ribosoms kommen, wobei das nächste AUG zur Initiation der Translation genutzt wird [119].

Durch Sequenzierung konnte im von Ancey *et al.* [101] publizierten Konstrukt eine artifizielle Nukleotid-Sequenz (CAGGCT) identifiziert werden, welche dem Startcodon AUG in 5'-Richtung voransteht. Diese entspricht nicht der *Kozak*-Sequenz des humanen gp130-Proteins (CGCAAG) und stellt vermutlich ein Klonierungsartefakt dar. Da das Sequenzumfeld des Startcodons mutiert wurde, sollte der Einfluss zweier Varianten des Sequenz-Motives getestet werden: Die von M. Kozak publizierte Standard-Sequenz (GCCACC= *KozakA*) und die Sequenz, die dem Startcodon von humanem gp130 vorgestellt ist (CGCAAG =*KozakB*).

Die Glykoproteine IL-6R α und gp130 besitzen Signalsequenzen, deren schematischer Aufbau in Abbildung 3-3 gezeigt ist. Signalpeptide sind hydrophobe Sequenzen, die das Einschleusen des Proteins in das Lumen des endoplasmatischen Retikulums der Zelle steuern und im reifen Protein nicht mehr vorhanden sind.

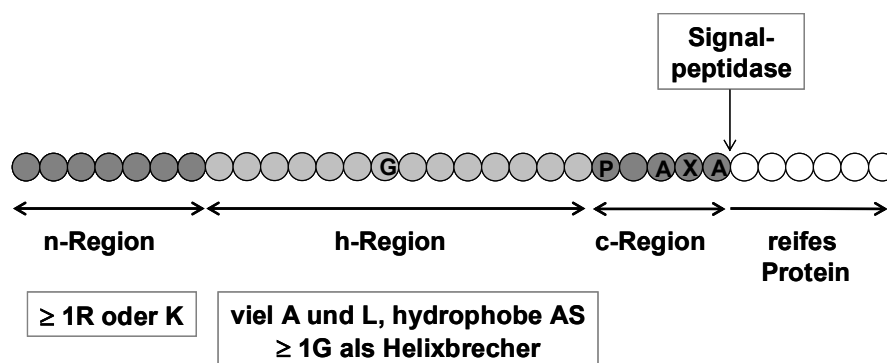


Abbildung 3-3: Schematischer Aufbau eines Signalpeptides (modifiziert nach [120])

Das Signalpeptid besteht aus zumeist hydrophoben Aminosäuren. Weder Länge (15-30 AS) noch die Sequenz sind streng konserviert. Abkürzungen: n = N-terminal, c = C-terminal, h = hydrophob

Das von Ancy *et al.* [101] publizierte hIL-6-RFP enthielt zur Sekretion des Proteins die natürliche Signalsequenz des humanen Rezeptorproteins gp130. Für die Sekretion rekombinanter Proteine (z.B. von Zytokinen wie IL-27) wird häufig nicht das endogene Signalpeptid, sondern die Signalsequenz des Präprotrypsins [121] verwendet. Voraussetzung für einen solchen Austausch ist, dass die hybride Proteinsequenz (Übergang zwischen dem artifiziellen Signalpeptid und dem reifen Protein) von einer Signalpeptidase erkannt wird. Das ist insofern von Bedeutung, da Deletionen nur weniger Aminosäuren aufgrund einer fehlerhaften Spaltung mit dem Funktionsverlust des Proteins einhergehen können.

Daher wurde *in silico* unter Verwendung des bioinformatischen Programms SignalP [122] die Spaltstelle zwischen Signalpeptid und reifem Protein prognostiziert. Abbildung 3-4 zeigt das Resultat einer SignalP-Analyse. Die Abspaltung eines Signalpeptides erfolgt im Bereich der maximalen Hydrophobizität (maximaler Y-Wert). Gemäß der bioinformatischen Vorhersage resultieren nach dem Austausch der endogenen Signalsequenz des humanen gp130 gegen diejenige des Präprotrypsins identische Spaltstellen.

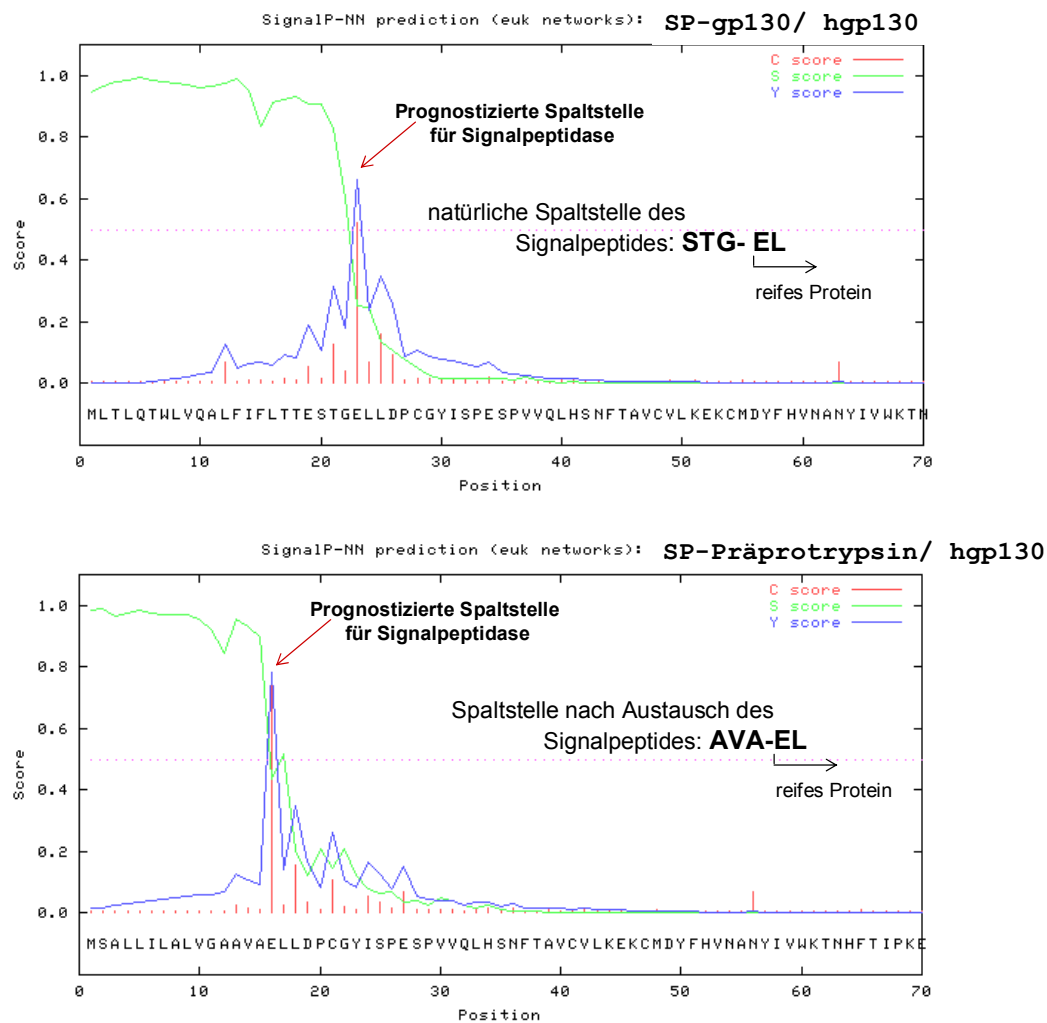


Abbildung 3-4: Graphische Darstellung der *SignalP-NeuralNetwork* Resultate zur Vorhersage der Spaltstelle verschiedener Signalpeptide in Kombination mit humanem gp130

Für die Verwendung des Präprotrypsin-Signalpeptids (PPT-SP) (untere Graphik) wird eine identische Spaltstelle wie für die Signalsequenz des hgp130 (obere Graphik) vorhergesagt. Die Spaltung erfolgt bei max. Y-score (Wert max. Hydrophobizität).

Mittels PCR-Mutagenese wurden drei verschiedene DNA-Sequenzen generiert, die die Sequenz des hIL-6-RFP mit dem natürlichen Signalpeptid von gp130 (in Kombination mit Kozak A/ Kozak B) bzw. dem Präprotrypsin-Signalpeptid (mit Kozak A) fusioniert. Die hIL-6-RFP-Konstrukte wurden identisch dem Prototypen (wegen der mutierten Kozak-Sequenz als „ Δ -Kozak“ bezeichnet) in eukaryotische Expressionvektoren kloniert und transient in COS-7-Zellen exprimiert. Nach 48 h wurde rekombinantes Protein aus zellulären Lysaten oder konditionierten Überständen durch Immunpräzipitation mittels α -FLAG™-Antikörper angereichert und in nachfolgender Westernblot-Analyse nachgewiesen. Abbildung 3-5 zeigt ein repräsentatives Experiment: Bereits durch die Mutation der Kozak-Sequenz (Kozak A/ Kozak B) wurde die Sekretion des Proteins drastisch verbessert, da deutlich mehr Protein im Überstand akkumuliert (Spuren 3 und 4). Der Austausch des Signalpeptids bewirkte eine weitere Zunahme der Proteinmenge im Überstand, während sich der Anteil des

Proteins, das in der zellulären Fraktion nachgewiesen werden kann, nur geringfügig veränderte.

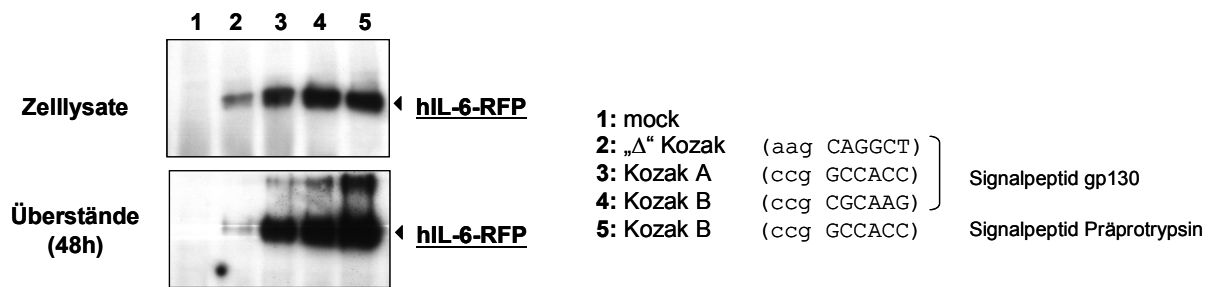


Abbildung 3-5 Sekretion von hIL-6-RFP nach Austausch von Kozak-Sequenz und Signalpeptid
 COS-7-Zellen wurden transient mit vier verschiedenen hIL-6-RFP-Konstrukten transfiziert. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen lysiert und das Protein aus konditionierten Überständen und Lysaten mittels FLAG™-Antikörpern präzipitiert. Die Westernblot-Analyse zeigt eine stärkere Sekretion des Proteins nach Insertion einer Kozak-Sequenz (Spuren 3 und 4) im Vergleich zum Prototyp (Spur 2). Der Austausch des Signalpeptids (Spur 5) hat eine weitere Zunahme der sekretierten Proteinmenge zur Folge.

3.2. Konstruktion des mL-6-RFP (Δ D1-Typ)

Für das geplante murine IL-6-RFP wurde von der weiteren Verwendung der Linker-Variante *stalk49* abgesehen. Die Aminosäure-Sequenz, die zur Konstruktion des Polypeptid-Linkers herangezogen wurde, entstammt dem membranproximalen Teil des humanen IL-6R α (E³²⁴-V³⁶²), also der Region zwischen dem C-Terminus der Domäne D3 und dem Beginn der Transmembran-Region. Diese Aminosäure-Sequenz wurde für das humane IL-6-RFP als Linker verwendet, da sie Teil einer flexiblen Region des IL-6R α ist. Durch Einsatz einer humanen Sequenz sollte die Gefahr einer putativen Immunogenizität, hervorgerufen durch die *Linker*-Sequenz, reduziert werden, da Sequenzen der gleichen Spezies als niedrig immunogen eingestuft werden. So sollte vermieden werden, dass das hIL-6-RFP bei wiederholter Verabreichung durch das Auslösen einer humoralen Immunantwort seine Wirkung verlieren könnte. Allerdings ist diese Region auch susceptibel für proteolytische Spaltung durch endogene Proteasen (ADAM10, ADAM17), durch die die lösliche Form des IL-6R α generiert wird [66,67]. Da die Konsensussequenz dieser Proteasen Teil der Linker-Sequenz ist, kann nicht ausgeschlossen werden, dass dieser Effekt auch im Kontext des Fusionsproteins auftreten kann. Durch Spaltung des Rezeptor-Fusionsproteins wird der inhibitorische Effekt gemindert, da lösliche Rezeptoren weniger effizient IL-6 neutralisieren [101] oder durch Freisetzung des IL-6R α -Anteils könnte nunmehr eine agonistische Wirkung eintreten (s. 1.2.1), die sogar die Wirkung von IL-6 verstärken würde. Daher wurde für die Weiterführung der Rezeptorfusionsprotein-Strategie eine synthetische Aminosäure-Sequenz (Ala-Gly-Ser-reicher Linker = AGS-Linker) verwendet.

Basierend auf den Befunden zur verbesserten Sekretion des hIL-6-RFP wurde das mL-6-RFP nach vorangehender SignalP-Analyse (s. Anhang: 8-1) mit dem Signalpeptid des Präprotrypsins in Verbindung mit der von M. Kozak beschriebenen Nukleotidsequenz auf Position -6 bis -1 relativ zum Startcodon (Kozak A) modifiziert. Das mL-6-RFP wurde zunächst als Δ D1-Typ, d.h. ohne die Ig-ähnliche Domäne des mL-6R α , auf Basis der Daten konstruiert, die dem humanen IL-6-RFP zugrunde lagen.

Mittels PCR-Mutagenese wurde eine Sequenz aus Kozak A auf Position -6 bis -1 relativ zum Startcodon des Präprotrypsin-Signalpeptids mit der Aminosäure-Sequenz der Domänen D1-D2-D3 des „reifen“ murinen gp130 (AS Q²³ bis R³²³) fusioniert. Über einen Ala-Gly-Serreichen *Linker* wurde die Fusion mit den Domänen D2-D3 (AS V¹⁰⁷ bis W³⁰⁶) des murinen IL-6R α vorgenommen. Damit beinhaltet das Fusionsprotein diejenigen Domänen der murinen Rezeptorproteine, deren humane Homologe zur IL-6-Bindung notwendig sind. Zum Nachweis des Proteins diente ein FLAG-Epitop, welches in 3' Richtung an die Nukleotid-Sequenz des mL-6-RFP anknüpft. Eine schematische Übersicht ist in Abbildung 3-6A gezeigt.

Das CBM (Domänen D2-D3) des murinen IL-6R α ist zur IL-6 Bindung nicht ausreichend

Wie in Abschnitt 1.2.2. beschrieben wurde, interagiert IL-6 über Aminosäuren verschiedener Regionen (*site I/ site II/ site III*) mit IL-6R α und gp130. Bei beiden Untereinheiten des IL-6-Rezeptorkomplexes finden sich ebenfalls sogenannte *hot spots* für die Ligandenbindung auf den FNIII-Domänen D2-D3, die das Zytokin-bindende Modul (CBM) bilden. Für die Immunglobulin-ähnliche Domäne gp130 wurde darüber hinaus eine direkte Beteiligung an der IL-6-Bindung nachgewiesen [73]. Besonders hervorzuheben sind die Aminosäuren L², L³, D⁴ und P⁵ der Ig-ähnlichen Domäne des humanen gp130, die sich in eine Furche in der IL-6-Oberfläche einfügen. Diese sind an der *site IIIa*-Interaktion beteiligt, wodurch der Zusammenschluss der Rezeptoren zum hexameren Komplex stabilisiert wird.

Für die Ig-ähnliche Domäne des humanen IL-6R α konnte keine Beteiligung an der IL-6-Bindung nachgewiesen werden. Dieser Befund kann aus unabhängigen Studien abgeleitet werden: So wurde gezeigt, dass Deletionsmutanten der Ig-ähnlichen Domäne in der Lage sind IL-6 zu binden und das Signal ins Zellinnere weiterzuleiten [63,65]. Boulanger *et al.* [79] haben bei der Kristallisation des humanen hexameren IL-6-Rezeptorkomplexes nicht nur auf die FN-Typ-III-Domänen D4-D5-D6 des gp130, sondern auch auf die Ig-ähnliche Domäne des IL-6R α verzichtet.

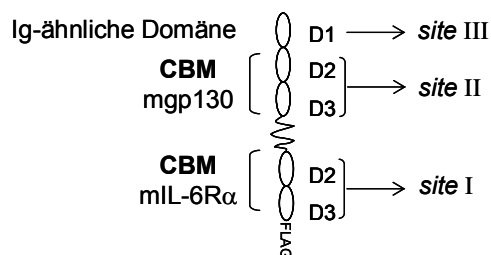
Zur Expression des mL-6-RFP wurde ein eukaryotischer Expressionvektor, der die codierende Sequenz des Fusionsproteins enthält, in COS-7-Zellen transfiziert und rekombinante Zellen, die das Transgen stabil in ihr Genom integriert haben, mit einem Antibiotikum selektiert.

Die Expression des Proteins wurde durch Immunpräzipitation mittels FLAG™-Antikörpern aus zellulären Lysaten oder konditionierten Überständen nachgewiesen. Um parallel den Nachweis zu führen, dass der potentielle Inhibitor IL-6 zu binden vermag, wurde eine Präzipitation durch immobilisierten Liganden durchgeführt. Dabei handelte es sich um humanes IL-6, das über primäre Amine kovalent an eine Sepharose-Matrix gekoppelt wurde (s. Abschnitt 2.8.9) und in unserer Arbeitsgruppe in größere Mengen präpariert wird (s. Abschnitt 2.4). Coulie *et al.* [72] haben für die Interaktion von humanem IL-6 mit murinen Zellen gezeigt, dass die Bindung an Oberflächenrezeptoren eine fünffach geringere Affinität verglichen mit der homologen Bindung besitzt. Obwohl der mL-6R α allein nicht genügend Affinität für humanes IL-6 aufweist, kann dieses dennoch zur Präzipitation des mL-6-RFP verwendet werden, da bei gleichzeitiger Anwesenheit von gp130 die *site* I-Interaktion (zwischen mL-6R α und dem humanen Zytokin) stabilisiert wird, so dass ein Komplex der Proteine nachweisbar ist [123].

Die Westernblot-Analyse präzipitierter Proteine zeigt, dass mL-6-RFP zwar über das FLAG-Epitop sowohl aus Überständen als auch aus der zellulären Fraktion präzipitiert werden konnte, aber keine Interaktion des Proteins mit der IL-6 nachweisbar war (Abb. 3-6B, linker Abschnitt).

Da theoretisch eine Bindung des mL-6-RFP (Δ D1-Typ) über die enthaltenen Domänen der Rezeptorproteine an das immobilisierte Zytokin erfolgen sollte, wurde die Funktionalität des Proteins in weiteren Experimenten getestet. Damit sollte ausgeschlossen werden, dass die fehlende IL-6-Bindung ein Artefakt darstellt, der auf der Immobilisierung des Liganden beruht.

A Aufbau: mL-6-RFP (Δ D1-Typ)



B IL-6-Bindungstest

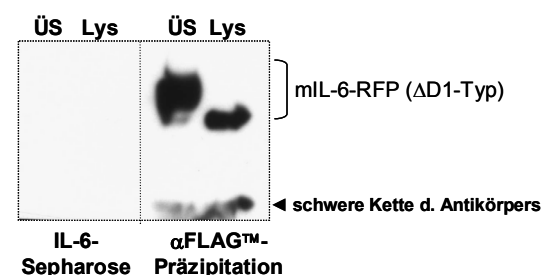


Abbildung 3-6: Schematische Darstellung des Aufbaus des mL-6-RFP (A) und Bindungstest mit IL-6-Sepharose

(A) Das mL-6-RFP beinhaltet diejenigen Domänen der murinen Rezeptorproteine, deren humane Homologe nachweislich Aminosäurekontakte zum Zytokin aufweisen (putative Kontakte bezeichnet analog zu den humanen Proteinen mit *sites* I- III) (B) Repräsentatives Präzipitationsexperiment bei dem rekombinantes mL-6-RFP mit immobilisiertem FLAG-Antikörper oder immobilisiertem humanem IL-6 aus konditionierten Überständen (ÜS) oder Zelllysaten (Lys) präzipitiert wurde. Nach Denaturierung der Proben wurden die in den Ansätzen enthaltenen Proteine über SDS-PAGE aufgetrennt und im Westernblot über das FLAG-Epitop nachgewiesen. mL-6-RFP konnte weder aus Lysaten noch aus Überständen mit IL-6 präzipitiert werden.

Wie durch Präzipitation über das FLAG-Epitop in Abbildung 3-6B demonstriert, wurde das mL-6-RFP(Δ D1) von COS-7-Zellen in ausreichenden Mengen sezerniert. Konditionierte Überstände dieser Zellen wurden durch Ultrafiltration 10-fach angereichert und es wurde mittels Westernblot-Analysen abgeschätzt, dass ausreichende mL-6-RFP-Mengen zur Hemmung von IL-6 vorhanden waren.

Zum Nachweis der biologischen Aktivität wurden Zellen mit murinem oder humanem IL-6 in Anwesenheit eines mL-6-RFP-haltigen Überstandes oder eines gleichartig aufgearbeiteten Kontrollüberstandes stimuliert. mL-6-RFP(Δ D1) soll theoretisch IL-6 binden, welches nachfolgend nicht mehr in der Lage ist, durch Bindung an zelluläre Rezeptoren den JAK/STAT-Signaltransduktionsweg zu aktivieren. Die Aktivierung des Signalwegs wurde entweder durch Induktion eines STAT3 responsiven Promotors (im Reporterassay) oder durch immunologische Detektion der aktivierenden Modifikation des Transkriptionsfaktors STAT3 (Phosphorylierung des Tyrosins Y⁷⁰⁵) nachgewiesen.

mL-6-RFP, welches analog zum humanen IL-6-RFP konstruiert wurde, konnte jedoch in keinem Versuchsansatz die biologische Aktivität von hIL-6 (Abb. 3-7A), oder mL-6 (Abb. 3-7B) hemmen, da weder eine Reduktion der pY-STAT3-Menge (Abbildung 3-7B), noch IL-6-abhängiger Geninduktionsvorgänge (Abbildung 3-7A) im Vergleich zur Kontrolle nachweisbar war.

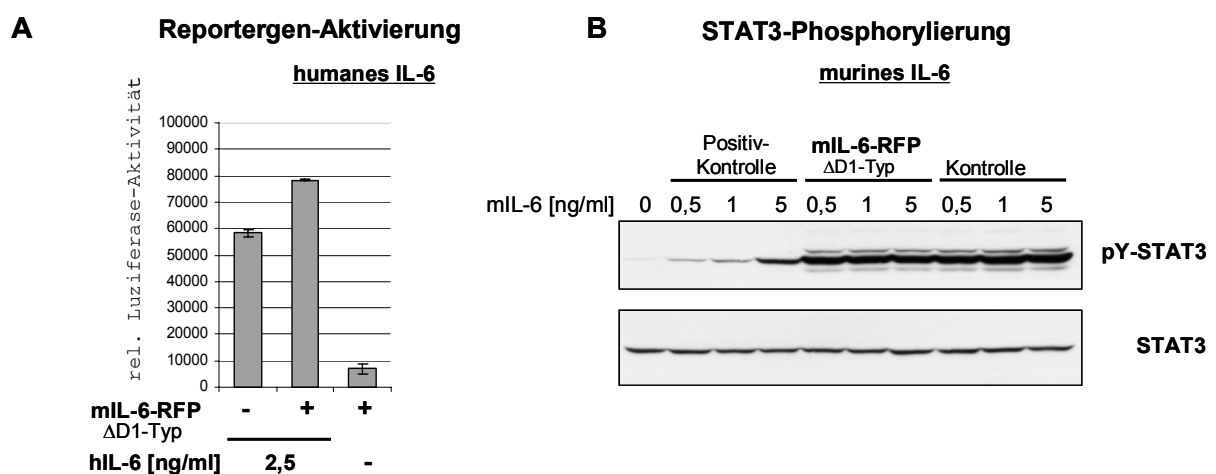


Abbildung 3-7: A) Messung der Luziferaseaktivität in Lysaten von HepG2-Zellen

Eine humane Hepatomzelllinie (HepG2) wurde transient mit dem STAT3-responsiven α 2M-firefly-Luziferase-Reporterkonstrukt und einem Kontrollplasmid (konstitutive Promotoraktivität, codiert für β -Galactosidase) kotransfiziert. Nach 12 h wurden die Zellen für weitere 18 h mit 2,5 ng/ml hIL-6 und mL-6-RFP stimuliert. Die Luziferase-Aktivität wurde aus Lysaten dieser Zellen bestimmt. Die Werte wurden auf die Messwerte für die β -Galactosidase normiert. In der Abbildung sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei Experimenten dargestellt.

B) Nachweis der STAT3-Phosphorylierung in murinen B9-Zellen

mL-6-RFP aus konditionierten Überständen der im Text beschriebenen COS-7-Zellen oder Kontroll-Überstände wurden mit mL-6 in verschiedenen Konzentrationen für 30 min bei RT präinkubiert. Anschließend wurden B9-Zellen mit diesen Gemischen 20 min stimuliert und Lysate der Zellen hergestellt. Die Phosphorylierung von STAT3 mit einem pY-STAT3-spezifischen Antikörper im Westernblot nachgewiesen. Zur Beladungskontrolle wurde die Membran einer Gegenfärbung für STAT3 unterzogen. (Bei der hier gezeigten Positiv-Kontrolle handelt es sich um modifizierten IL-6-Inhibitor, der den unter Abschnitt 3.6 näher beschrieben wird.)

3.3. *in silico* Analyse des murinen IL-6R α -Proteins

Der Befund, dass die FNIII Domänen D2 und D3, die das sog. „Zytokin-bindende Modul“ (CBM) des murinen IL-6R α bilden, zur IL-6 Bindung nicht ausreichen, ist für den hIL-6R α nicht bekannt. Moritz *et al.* [73] haben aber einen ähnlichen Befund für den humanen Klasse I-Transmembranrezeptor gp130 publiziert, da auch bei diesem Protein die Domänen D2 und D3 (CBM) nicht ausreichend zur Ligandenbindung beitragen, um einen trimeren Komplex aus IL-6/IL-6R α /gp130 auszubilden.

Die in Abbildung 3-7 dargestellten Befunde zeigen, dass es zwischen den strukturell und funktionell sehr ähnlichen IL-6-Rezeptorproteinen der Maus und des Menschen in biochemischer Hinsicht signifikante Unterschiede gibt. Eine Übertragung des Aufbaus des humanen IL-6-Inhibitors auf das murine System führt demnach nachweislich nicht zu einem funktionellen Inhibitor.

Daher sollten durch Homologievergleich und einen *molecular modelling*-Ansatz Unterschiede zwischen den Rezeptoren beider Spezies identifiziert und deren Bedeutung für die Ligandenbindung experimentell überprüft werden.

Zunächst wurde die von Varghese *et al.* [81] publizierte Kristallstruktur des humanen IL-6R α eingehend analysiert. Abbildung 3-8 zeigt die Struktur des hIL-6R α in einer Übersicht. Die Extrazellulär-Region des Rezeptors besteht aus drei Protein-Domänen, die aufgrund ihrer Substruktur entweder der Ig-ähnlichen-Superfamilie (D1) oder der Fibronektin-Typ-III-(FNIII)-Familie (D2-D3) angehören. Die IL-6 Bindung erfolgt über das Zytokin-bindende Modul (CBM). Betrachtet man die Feinstruktur des CBM, so sind an der Bindung von IL-6 Aminosäuren der flexiblen Regionen (*loops L3, L5, L7*) in der Scharnierregion zwischen den Domänen D2 und D3 beteiligt, wobei IL-6 sogar nur über die Interaktion mit Domäne D3 gebunden werden kann [84]. Ein besonderes Merkmal des hIL-6R α ist eine Disulfidbrücke, die bereits Cole *et al.* [124] beschrieben haben. Diese wird zwischen C⁶ (lokalisiert in einer ungefalteten Region, die der Kerndomäne von D1 vorgelagert ist und hier als PräD1-Region bezeichnet werden soll) und C¹⁷⁴ (lokalisiert im β F-Strang der Domäne D2) ausgebildet. Yawata *et al.* [64] haben in ihrer Studie nachgewiesen, dass weder die Disulfidbrücke noch die Ig-ähnliche Domäne des hIL6-R α für die biologische Aktivität des Rezeptors von Relevanz sind. Deletionsmutanten, die die Ig-ähnlichen Domäne umfassen, zeigen Oberflächen-Lokalisation und können Signaltransduktionsvorgänge nach IL-6 vermitteln.

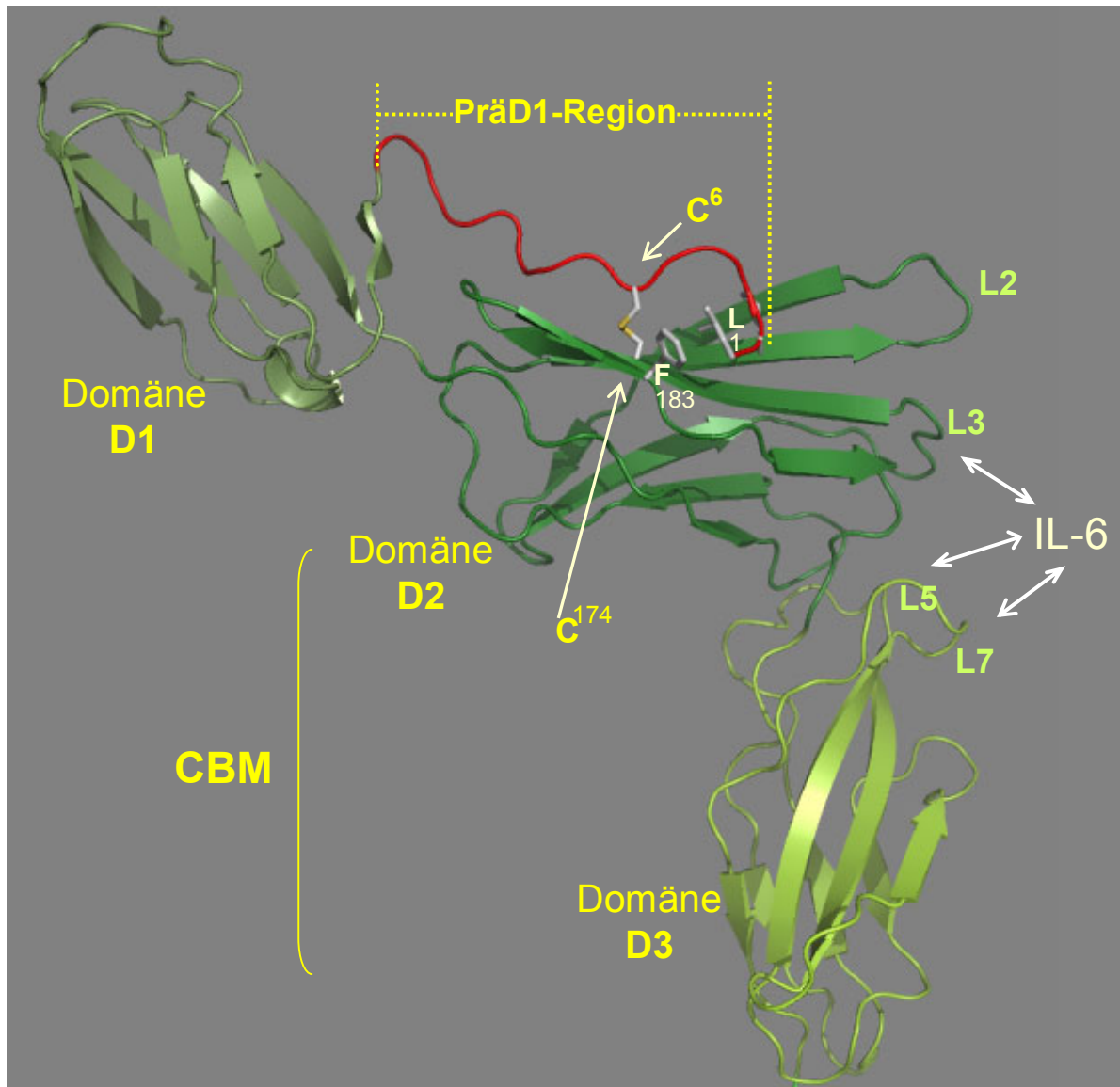


Abbildung 3-8: Darstellung der extrazellulären Domänen des humanen IL-6R α

Für die IL-6-Bindung sind die FN-Typ-III-Domänen D2 und D3 ausreichend. (CBM: *cytokine binding module*; L3, L5, L7: flexible Bereiche (*loops*) zwischen β -Strängen, deren Beteiligung an der IL-6-Bindung ebenfalls durch Mutationsanalysen [64] identifiziert wurden (beteiligte Aminosäuren: *loop* L3: P¹⁶², E¹⁶³; *loop* L5: S²²⁸, F²²⁹, Y²³⁰, R²³¹; *loop* L7: E²⁷⁸ und F²⁷⁹). Die Disulfidbrücke zwischen C⁶ und C¹⁷⁴ sowie der unter 3.3.3. besprochene Kontakt zwischen L¹ und F¹⁸³ sind dargestellt. Die Abbildung wurde mit dem Programm PyMol auf Basis der Kristallstruktur [81] erstellt.

3.3.1. Spezies-übergreifende Analyse konservierter Sequenzmotive des IL-6R α

Um funktionell relevante Bereiche aufgrund von konservierten Aminosäuren zu kartieren, wurden Aminosäure-Sequenzen in einem *sequential alignment* der Domänen D1-D2-D3 der IL-6R α -Proteine verschiedener Spezies verglichen.

Neben dem prozentualen Anteil homologer bzw. identischer Aminosäuren (bezogen auf das humane Rezeptorprotein) ist in Abbildung 3-9 ein Ausschnitt des Sequenzvergleiches

(*alignment*) gezeigt. Gleichzeitig werden wichtige Gemeinsamkeiten und Unterschiede hervorgehoben.

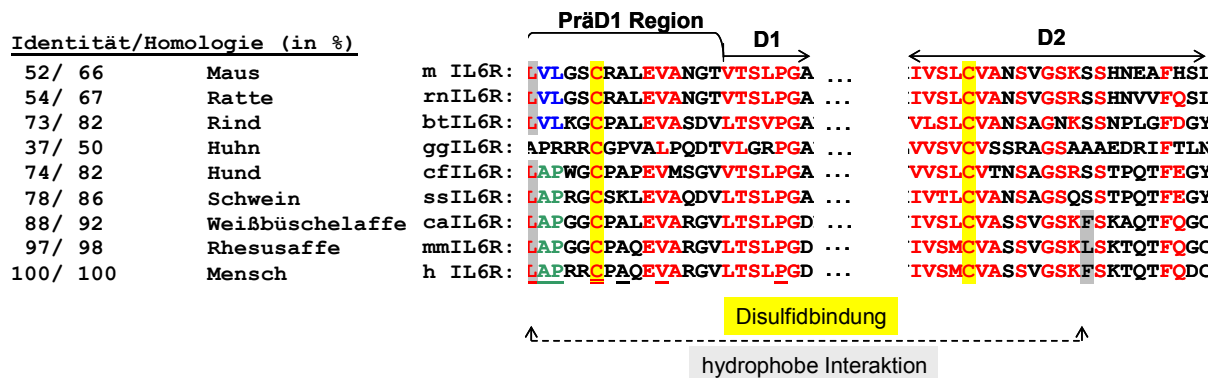


Abbildung 3-9: Ausschnitt aus einem *sequential alignment* von IL-6R α -Proteinen verschiedener Spezies

Die IL-6R α -Proteine der analysierten Arten weisen im Vergleich zum humanen Protein einen hohen Grad an Homologie auf. Der Ausschnitt zeigt den N-terminalen Bereich des Proteins (PräD1-Region) und ein Segment der Domäne D2. In rot sind stark konservierte Aminosäuren dargestellt. Auf weitere strukturelle Merkmale (Disulfidbrücke: gelb unterlegt; intramolekulare hydrophobe Interaktion: grau unterlegt; Sequenz von speziellem Interesse: in grün und blau hervorgehoben) wird in den Abschnitten 3.3.1. und 3.3.2 näher eingegangen.

Konservierte Cysteine an vergleichbaren Positionen in der PräD1-Region und der Domäne D2 sind ein Merkmal aller IL-6R α , wodurch der Schluss naheliegt, dass in allen Proteinen eine entsprechende Disulfidbrücke ausgebildet werden kann. Da die Deletion der Ig-ähnlichen Domäne im murinen Rezeptorprotein zur Folge hat, dass die Ausbildung dieser Disulfidbrücke verhindert wird, stellt sich natürlich die Frage, welche Relevanz sie für die murine Proteinstruktur und damit die *site I*-Interaktion hat.

Eine weitere Auffälligkeit im *alignment* sind die aminoterminalen Aminosäuren. Abgesehen von der Proteinsequenz des IL-6R α des Huhns, welches auch die geringste Homologie zum humanen Rezeptorprotein aufweist, sind zwei verschiedene Motive evolutionär konserviert. Bei einigen Arten (Maus, Ratte und Rind) ist ein Motiv aus Aminosäuren mit großen hydrophoben Seitenketten (V-L, dargestellt in blau) konserviert. IL-6R α -Proteine anderer Spezies (Hund, Schwein und verschiedene Primaten-Arten) weisen stattdessen ein Motiv mit deutlich kleineren Aminosäure-Seitenketten (A-P, dargestellt in grün) auf.

Als Resultat dieser Sequenzanalyse kann festgehalten werden, dass muriner und humaner IL-6R α zwei unterschiedlichen Gruppen angehören, bei denen evolutionär unterschiedliche Motive am N-Terminus konserviert wurden.

Die nachfolgenden Analysen konzentrieren sich nur auf die Proteine des Menschen und der Maus (Abb.3-10). Tabelle 1 vermittelt zusätzlich einen detaillierten Überblick über die

Sequenz-Homologie aller am Aufbau des IL-6-Rezeptorkomplexes beteiligten Proteine der Maus im Vergleich zu denen des Menschen.

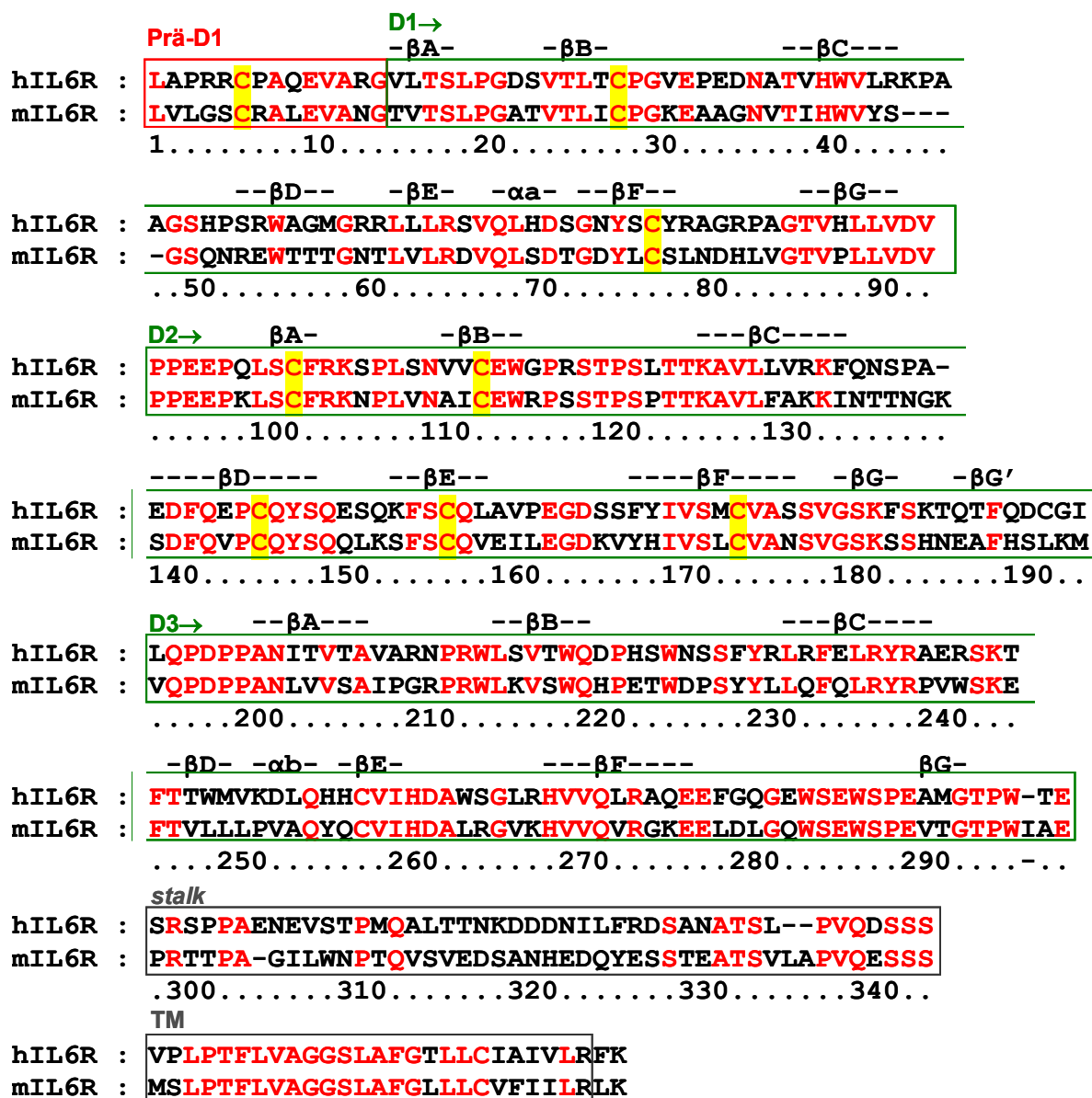


Abbildung 3-10: sequential alignment der Extrazellulär-Region der IL-6R α -Proteine des Menschen und der Maus

Die konservierten Aminosäuren sind rot hervorgehoben. Die angegebenen Sekundärstruktur-Elemente beziehen sich auf das humane Protein und basieren auf der Kristallstruktur des humanen IL-6R α [81].

Das *alignment* wurde generiert, indem zunächst eine BLAST-Analyse durchgeführt und diese anschließend anhand der humanen Struktur manuell überprüft wurde. Hierbei wurde besonderes Augenmerk auf strukturell konservierte Aminosäuren gelegt, sowie darauf geachtet, dass Lücken im *alignment* (*gaps*) nicht in putativen Sekundärstruktur-Elementen (z.B. β -Strängen) lokalisiert sind.

Protein	Domänen	Identität
IL-6Rα	pD1-D1-D2-D3	54 %
	pD1	50 %
	D1	49 %
	D2	57 %
	D3	56 %
gp130	D1-D2-D3	72 %
	D1	68 %
	D2	71 %
	D3	75 %
IL6	-	41 %

Tabelle 1: Sequenz-Homologie der extrazellulären Domänen von humanem und murinem IL-6R α , gp130 und IL-6 .

3.3.2 molecular modelling des murinen IL-6R α

Anhand der Röntgenstruktur des humanen IL-6-Rezeptorkomplexes wurde von Herrn Priv.-Doz. Dr. rer. nat. Serge Haan mittels *homology modelling* ein Strukturmodell für den hexameren Komplex aus murinem (IL-6/ IL-6R α / gp130)₂ generiert. Dazu wurde nach einem Sequenz-*alignment* (wie bereits in Abb. 3-10 gezeigt) ein Austausch der Aminosäuren der humanen Komponenten gegen diejenigen des murinen Systems vorgenommen. Hierzu wurde das Programm „WHATIF“ verwendet [111]. Die erhaltenen Strukturen können mit Standard-Programmen wie z.B. der Software PyMol [115] dargestellt werden.

Durch Überlagerung der graphischen Darstellungen des Protein-Rückgrades (*superposition*) der Protein-Strukturen des murinen Modells und der humanen Kristallstruktur können, wie in Abbildung 3-11 für IL-6R α verdeutlicht, bereits wesentliche strukturelle Unterschiede sichtbar gemacht werden. Da das humane Protein als Maske zur Generierung des murinen Modells diente, werden hier im wesentlichen Bereiche mit einer abweichenden Anzahl an Aminosäuren und solche mit deutlich unterschiedlichen sterischen Anforderungen sichtbar. Für die IL-6R α -Proteine wird insgesamt eine hohe Übereinstimmung gefunden (Übersicht der Domänen D1-D3 in Abb. 3-11A). Die Domäne D3 zeigt eine perfekte Überlagerung der Struktur des humanen Proteins mit dem Modell des murinen IL-6 α . Jedoch können drei Regionen identifiziert werden, in der für das murine Protein größere Abweichungen in der Struktur vorhergesagt werden: In der D1-Kerndomäne tritt eine Verkürzung einer *Loop*-Region (um 4 Aminosäuren; vgl. Abb. 3-10) zwischen zwei β -Strängen (β C und β D) auf. Aufgrund der großen Distanz zur IL-6-Kontaktfläche hat diese Abweichung vermutlich keinen Einfluss auf die IL-6-Bindung. Jedoch sind weitere Unterschiede der Proteinstrukturen ersichtlich, die indirekt zur Ligandenbindung beitragen könnten.

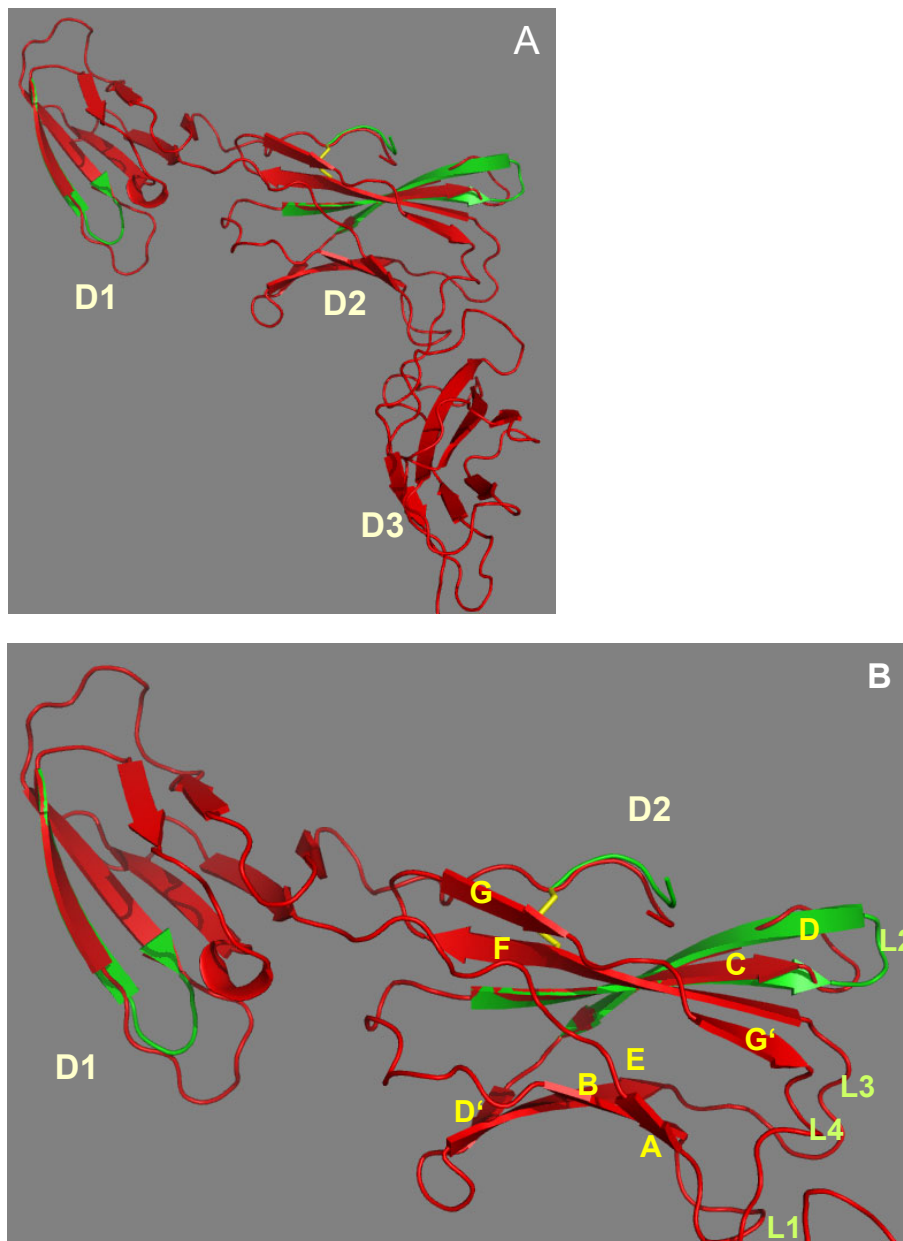


Abbildung 3-11: Strukturelle Unterschiede zwischen hIL-6R α (Kristallstruktur) und mIL-6R α (Modellstruktur)

(A) Überlagerung der Strukturen der Domänen D1 bis D3 und (B) vergrößerte Ansicht der Domänen D1 und D2 des murinen IL-6R α (grün) und des humanen IL-6R α (rot). Die Disulfidbindung zwischen der PräD1-Region und der Domäne D2 ist in gelb dargestellt und die Bezeichnung der β -Stränge und einiger Loop-Regionen (L1 bis L4) der Domäne D2 sind angegeben.

Für die Sekundärstruktur einer Region in Domäne D2 im murinen Protein wird durch den Einschub nur einer Aminosäure eine Verlängerung der β -Stränge β C und β D vorhergesagt. Daraus resultiert eine räumliche Verlagerung des *loop* L2 im Vergleich zum humanen Protein. Die Aminosäure L¹⁰⁸ dieser Loop-Region ist beim humanen Protein an der

IL-6-Bindung beteiligt und liegt ebenfalls in kurzer Distanz zur Hauptkontaktfläche für IL-6, an der auch *loop* L3 der Domäne D2 beteiligt ist.

Eine weitere Abweichung wird für die N-terminalen Aminosäuren postuliert: Aufgrund der Größe der Aminosäure-Seitenketten von V² und L³ in der Präd1-Region des murinen IL-6R α -Proteins, die einen Kontakt zur Domäne D2 herstellen, weicht die Position des C α -Gerüsts im Bereich vor der Disulfidbrücke von der des humanen Moleküls ab (A²-P³-Motiv).

3.3.3. Vergleich der N-terminalen Sequenz-Motive des murinen und humanen IL-6R α

Die Position der ersten drei N-terminalen Aminosäuren konnte in der von Varghese *et al.* [81] publizierte Kristallstruktur des humanen IL-6R α identifiziert werden: Die Aminosäure L¹ geht mit F¹⁸³ in der Domäne D2 eine hydrophobe Interaktion ein (Abb. 3-9 und Abb. 3-14A). Diese Bindungspartner sind ebenfalls an vergleichbaren Positionen in IL-6R α -Proteinen von Affenspezies konserviert (Abb. 3-9). Im murinen Protein sowie in allen übrigen in Abbildung 3-9 aufgeführten Spezies fehlt dieser Interaktionspartner an der entsprechenden Position in der Domäne D2.

Um die mögliche Bedeutung dieses Unterschiedes sowie des Austausches des oben erwähnten A²-P³-Motives (human) durch die Aminosäuren V²-L³ (murin) für die IL-6R α -Proteine abzuschätzen, wurde mittels des Programmes InterProsurf die Kontaktfläche der ersten drei Aminosäuren für das humane (LAP-Motiv) und murine (LVL-Motiv) Protein berechnet. Die Analyse (Anhang: Abschnitt 8-2; Tabellen 4 & 5) ergab eine Interaktionsfläche von etwa 84 Å² zwischen L¹ und F¹⁸³. Die nachfolgenden Aminosäuren A² und P³ tragen laut InterProsurf nur mit je etwa 6 Å² zur Gesamt-Interaktionsfläche (~96 Å²) des N-Terminus mit der Domäne D2 bei. Die Haupt-Interaktionspartner von A² und P³ in der D2-Domäne (dargestellt in Abb. 3-12A) sind L¹³⁰, S¹⁷², I¹⁷⁰, R¹³² und D¹⁴¹. Im murinen System gehen die Aminosäuren V² und L³ analog zum humanen Protein hydrophobe Interaktionen mit Aminosäuren von D2 ein (Abb. 3-12B). Aufgrund ihrer Größe tragen diese mit etwa 15 Å² und 37 Å² zur Interaktion bei (Haupt-Interaktionspartner: F¹²⁶, K¹²⁸, D¹³⁸, I¹⁶⁷, S¹⁶⁹). Damit ist im murinen Protein allein die Kontaktfläche der Aminosäuren V² und L³ mit der Domäne D2 im Vergleich zum humanen Protein annähernd viermal so groß.

Basierend auf dem Modell des murinen IL-6R α können für die ersten drei N-terminalen Aminosäuren nicht nur intramolekulare Kontaktflächen mit Aminosäuren der Domäne D2, sondern auch intermolekulare Wechselwirkungen mit der Domäne D1 von gp130 vorhergesagt werden. Da im murinen Rezeptor kein geeigneter d.h. hydrophober Interaktionspartner für L¹ vorliegt (Abb. 3-14A und Abb. 3-14B; hydrophobes F184 im humanen System; polares S¹⁷⁹ im murinen Rezeptor), stellt sich die Frage, ob L¹ im murinen System einen anderen Kontakt eingeht. Für diese Aminosäure kann ein Rotamer postuliert

werden, bei dem mit Aminosäure F⁸⁶ der Domäne D1 von gp130 ein geeigneter Interaktionspartner vorliegt. Diese hydrophobe Interaktion könnte mit einer Kontaktfläche von $\sim 133 \text{ \AA}^2$ zum *site* IIIb-Kontakt und damit zur Stabilität des hexameren Komplexes beitragen (Abb. 3-12C).

Insgesamt kann für die Interaktion des LVL-Motives des murinen Rezeptors mit D2 vom IL6R α und D1 von gp130 eine gemeinsame Kontaktfläche von etwa 185 \AA^2 berechnet werden, während die LAP/D2-Interaktion im humanen System nur etwa halb so gross ausfällt (etwa 96 \AA^2).

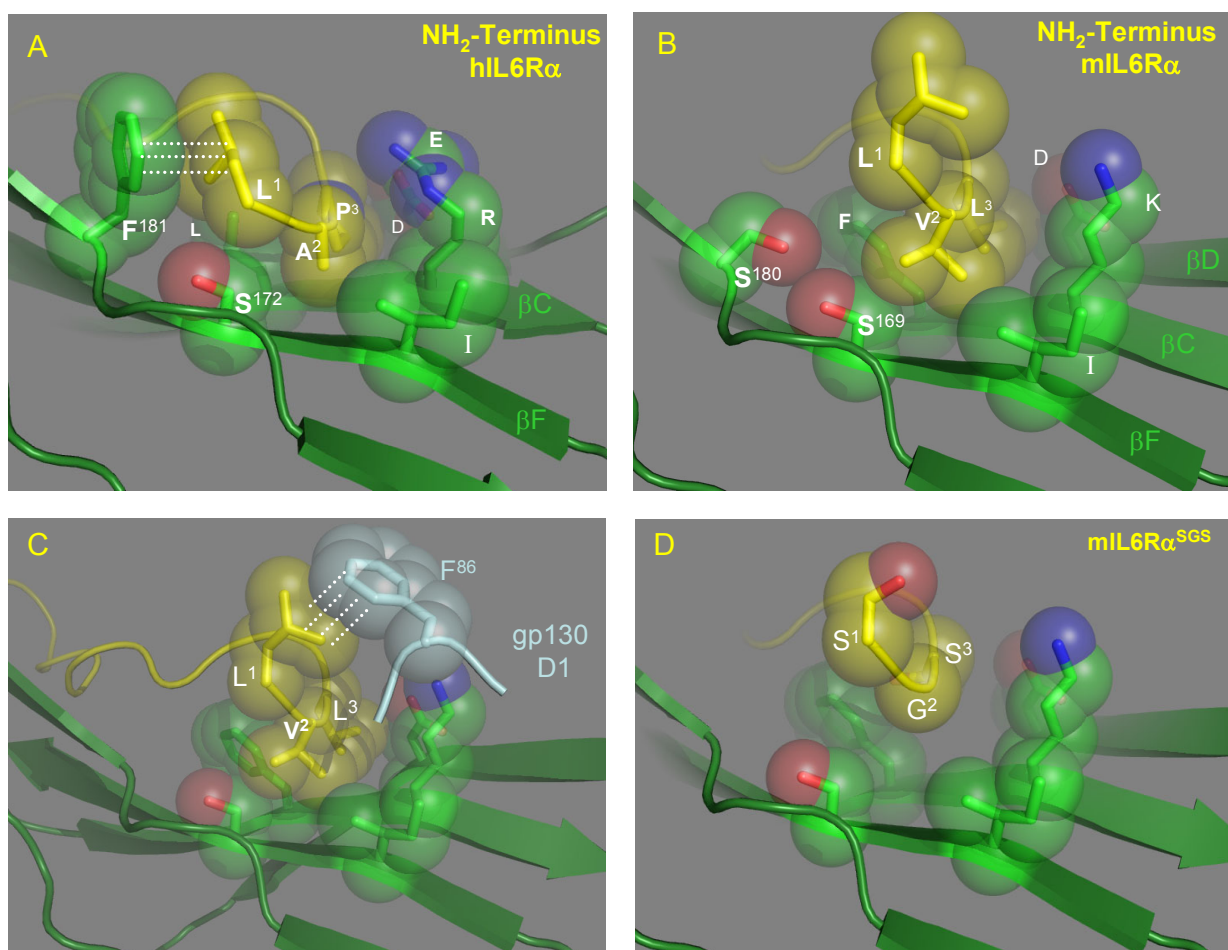


Abbildung 3-12: Kontakte der N-terminalen Aminosäuren des IL-6R α

A) LAP/D2-Kontakt im humanen IL-6R α . **B)** LVL/D2-Interaktion und möglicher zusätzlicher *site* IIIb Kontakt **(C)** zwischen L¹ und F⁸⁶ (gp130-D1) im murinen System. **D)** Effekt der Dreifach-Substitutionsmutante (LVL zu SGS) des mIL-6R α . Die C-Atome sind entsprechend ihrer Zuordnung (PräD1 in gelb, IL-6R α in grün und gp130 in cyan) farblich hervorgehoben. Stickstoff bzw. Sauerstoff sind gemäß ihrer Ladung in blau bzw. rot dargestellt.

Die Bedeutung des N-Terminus für die Ligandenbindung kann durch geeignete Mutationen der N-terminalen Aminosäuren näher untersucht werden. Daher wurde postuliert, dass ein Austausch dieser hydrophoben Aminosäuren (L-V-L) gegen ein Motiv aus kleinen polaren Aminosäuren (S-G-S) die Interaktionsfläche mit der D2 des mL-6R α und der D1 von gp130 negativ beeinflusst. Abbildung 3-12D stellt diesen Austausch graphisch dar.

3.3.4. Vergleich der Interaktionsflächen des murinen und humanen IL-6R α

Wie in Abschnitt 1.2.2. erläutert wurde, kontaktiert das IL-6-Molekül die Rezeptoruntereinheiten über drei verschiedene Regionen, die als *site* I-III bezeichnet wurden.

Boulanger *et al.* [79] wählten diese Nomenklatur in Analogie zu den *sites* des IL-6-Moleküls ebenfalls zur Beschreibung der Protein-Interaktionsflächen im hexameren IL-6-Rezeptorkomplex.

In den folgenden Abschnitten wird den Interaktionsanalysen eine Übersicht über die Protein-Kontakte vorangestellt. Dabei können die Proteine und ihre intermolekularen Kontaktflächen anhand eines Farbcodes zugeordnet werden. Das Zytokin ist stets in rot dargestellt, der IL-6R α in grün und gp130 in blau. Anschließend fokussieren sich die Untersuchungen auf die intermolekularen Interaktionen des IL-6R α -Proteins.

Boulanger *et al.* [79] haben anhand der Kristallstruktur Kontaktflächen bestimmt, deren Größe mit verschiedenen Programmen (InterProSurf und Molsurfer/ Protein-Protein-Interaction surfer) analysiert werden kann.

In Anlehnung an diese Vorgehensweise von Boulanger *et al.* für den humanen IL-6-Rezeptorkomplex wurden die Daten aus der Kristallstruktur (human) und das Modell des murinen IL6-R α mittels verschiedener Programme (InterProSurf und Molsurfer/ Protein-Protein-Interaction surfer-PPI) parallel *in silico* analysiert und miteinander verglichen. Mit Hilfe der verwendeten Programme wurden die an Wechselwirkungen beteiligten Aminosäuren identifiziert und die Größe der Interaktionsflächen in Å² angegeben.

Da das Programm Molsurfer keine Angaben über die Größe der Interaktionsflächen gibt, wurde diese mittels des PPI-servers berechnet.

In den nachfolgenden Analysen wird die Position der am Kontakt beteiligten Aminosäuren graphisch auf dem IL-6R α -Protein des Menschen und der Maus markiert. Eine Auflistung der Aminosäuren und die Größe der Kontaktflächen können den Tabellen 2 - 5 (im Anhang unter 8-2 aufgelistet) entnommen werden. Die gesamte Kontaktfläche definiert sich hierbei aus der Summe der intermolekularen Wechselwirkungen.

Der site I-Kontakt

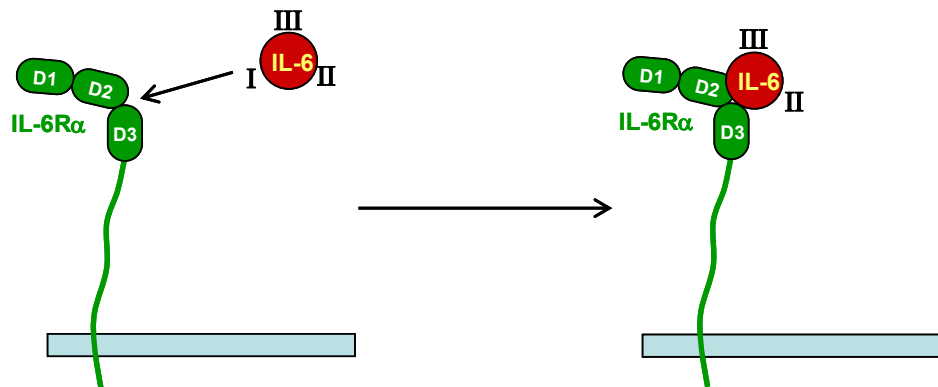


Abbildung 3-13: Schematische Darstellung des site I-Kontaktes

zwischen IL-6 (über die gleichnamige *site I*) in der Scharnierregion zwischen den Domänen D2 und D3 des IL-6R α . Eine genauere Darstellung der Interaktionsfläche kann aus Abbildung 3-8 entnommen werden.

Die site I-Interaktion: Das IL-6R α /IL-6-interface

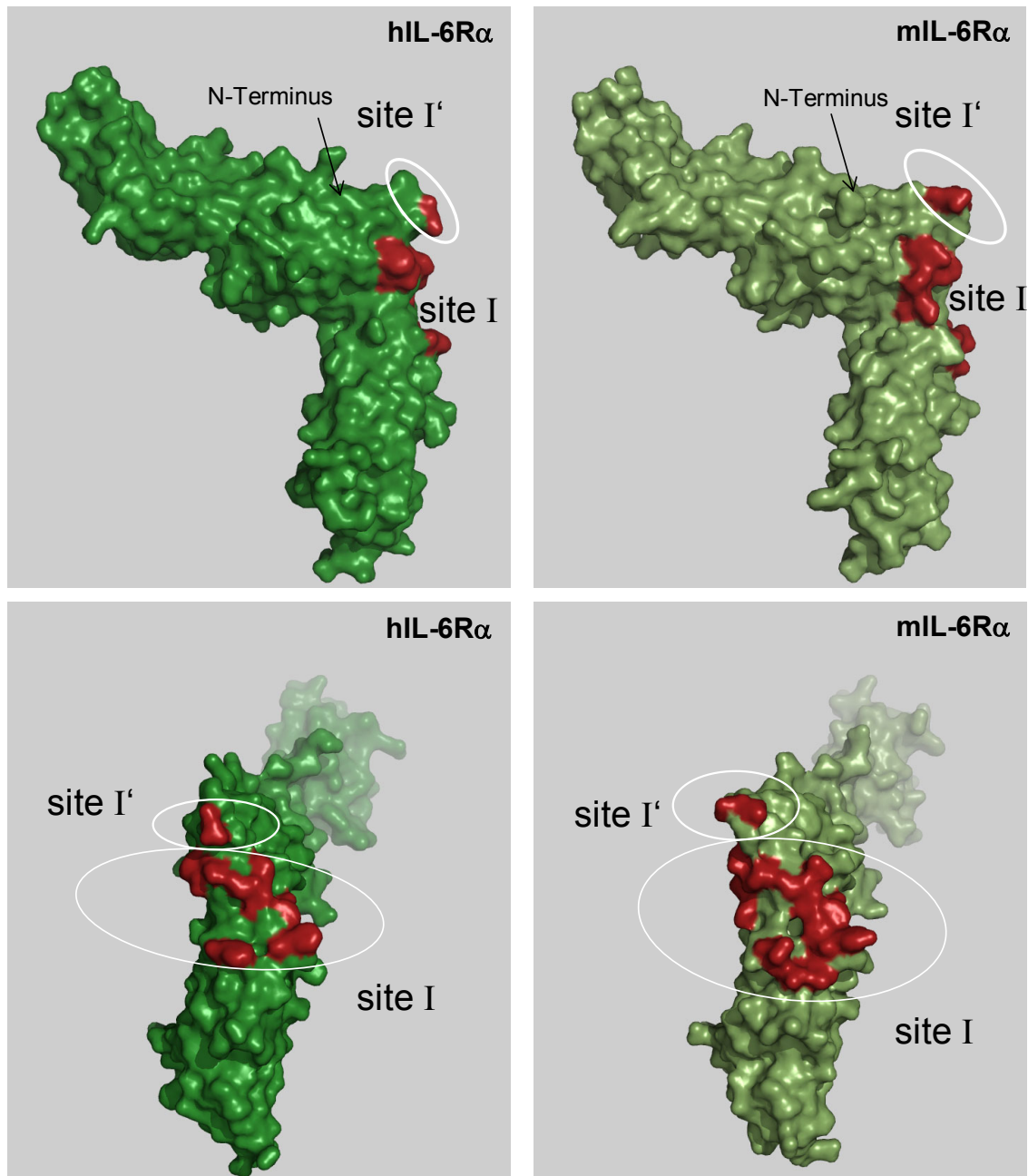
Im humanen IL-6R α wird der *site I*-Kontakt durch Aminosäuren unterschiedlicher *Loop*-Regionen des IL-6R α hergestellt. Hier bilden Aminosäuren in der Scharnierregion zwischen den Domänen D2-D3 (*loops* L3, L5, L7) eine relativ zusammenhängende Kontaktfläche (in Abbildungen 3-14A und B unter *site I* zusammengefasst). Die graphische Darstellung der am *site I*-Kontakt beteiligten Aminosäure-Reste zeigt, dass in beiden IL-6R α -Proteinen ein kleineres aufwärts gelegenes Epitop ebenfalls an der IL-6-Bindung beteiligt ist. Die Aminosäure-Reste gehören der Region *loop* L2 an und werden in Abbildung 3-14A und B als *site I'* bezeichnet. Die benutzten Programme identifizieren im murinen IL-6R α in dieser Region mehr Interaktionspartner als im humanen IL-6R α -Protein. Die als *site I'* bezeichnete Region befindet sich darüberhinaus in unmittelbarer Nähe zu den ersten drei Aminosäuren des N-Terminus, welche Aminosäure-Reste der angrenzenden β -Stränge (β C und β D) kontaktieren und so diese Region stabilisieren bzw. den *loop* L2 zwischen diesen Strängen ausrichten könnten.

Die Analyse der Kontaktflächen der murinen und humanen IL-6R α -Proteine wurde parallel mit den Programmen *Molserver* und *InterProSurf* durchgeführt. Unterschiede in den Vorhersagen der Interaktion ergeben sich vermutlich aus unterschiedlich stringent definierten Parametern beider Programme. So identifiziert das Programm *Molserver* quantitativ mehr an der Interaktion beteiligte Aminosäuren, was die Größe des Bindungs-*interfaces* in der Darstellung vergrößert (Abb. 3-14). Jedoch berechnen beide Programme, dass beim murinen IL-6R α im Vergleich zum humanen Protein, eine größere Kontaktfläche zwischen IL-6 und IL-6R α existiert: 22% (*Molserver*; Abb. 3-14A) bzw. 30% (*InterProSurf*; Abb. 3-14B).

Da im murinen Protein die *site I*-Kontaktfläche größer ist, können diese Interaktionen stärker zur IL-6 Bindung beitragen.

Der *site I* Kontakt

A Vergleich der Kontaktfläche IL-6R α / IL-6 (InterProSurf)



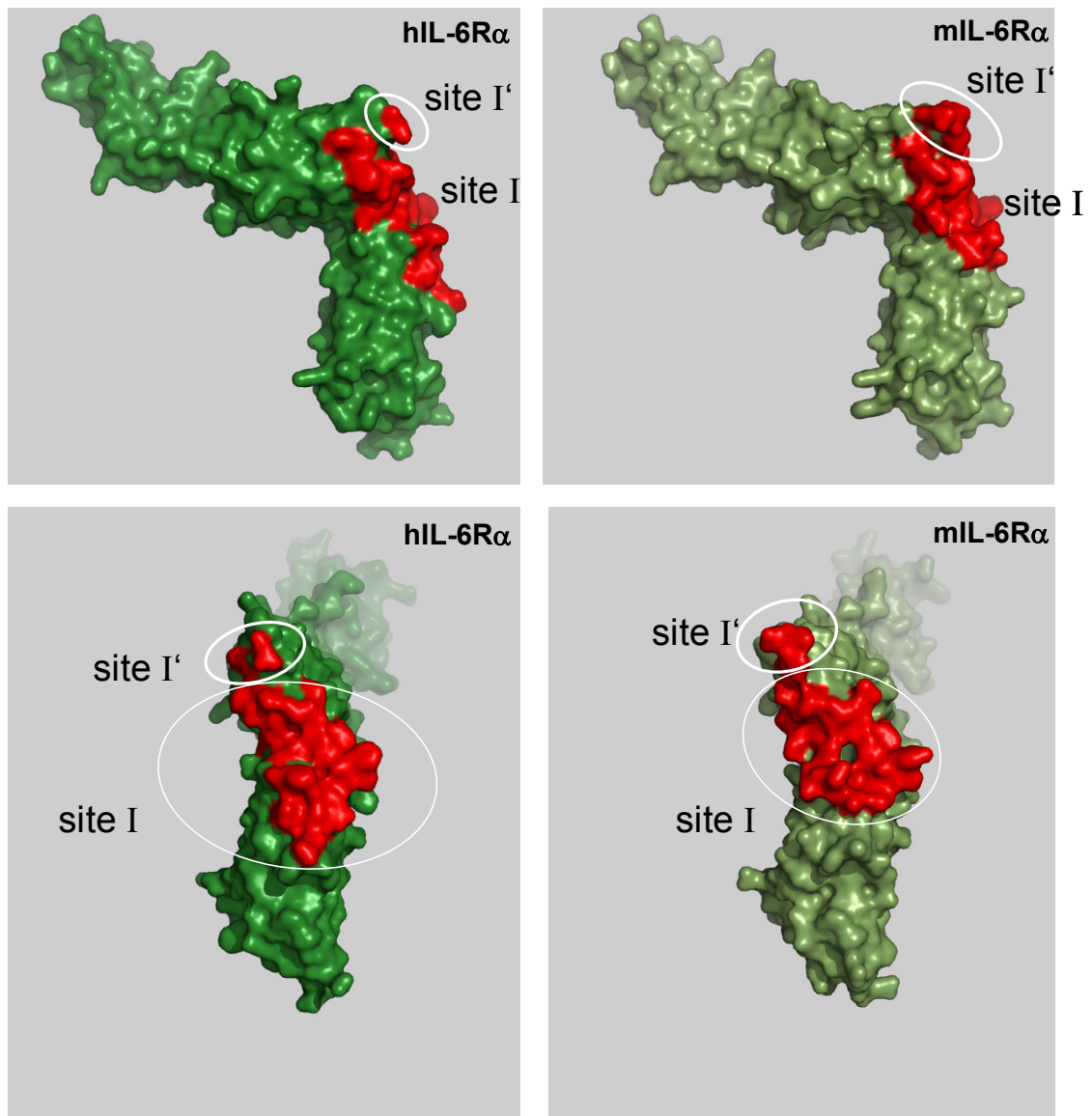
Gesamtfläche des IL-6R α *protein-interface*

hIL-6R α : 521 Å²

mIL-6R α : 735 Å²

Der *site I*-Kontakt

B Vergleich der Kontaktfläche IL-6R α / IL-6 (Molsurfer/PPI-server)



Gesamtfläche des IL-6R α *protein-interface*

hIL-6R α : 644 Å²

mIL-6R α : 834 Å²

Abbildung 3-14: Darstellung des IL-6-*interface* auf der IL-6R α -Oberfläche

Mittels der Programme InterProSurf (A) und Molsurfer/PPI-server (B) wurden anhand der Strukturdaten des humanen und des Modells des murinen IL-6R α die an der Interaktion mit IL-6 beteiligten Aminosäuren identifiziert und ihre Position im IL-6R α rot hervorgehoben. Gleichzeitig wurde die Gesamtgröße der Interaktionsflächen berechnet und unter der jeweiligen Abbildung angegeben.

Der *site II*-Kontakt

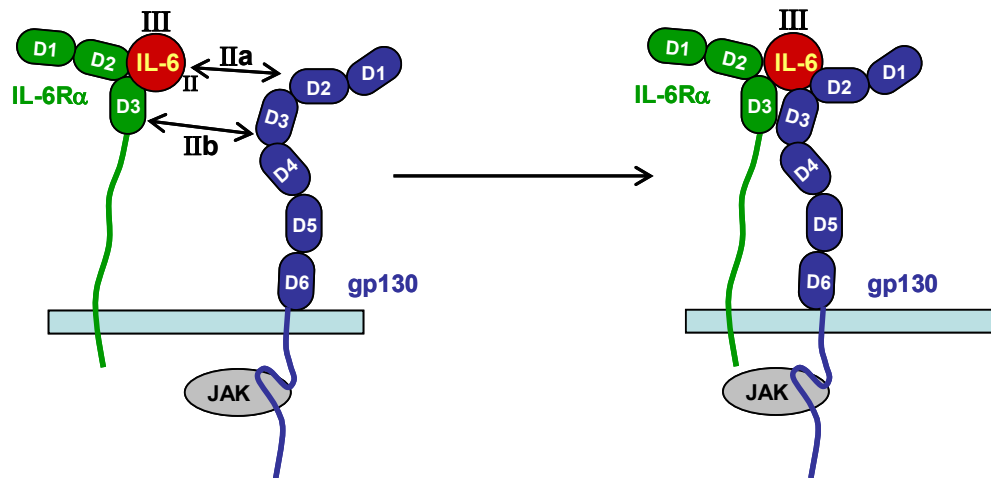


Abbildung 3-15: Schematische Darstellung des *site II*-Kontaktes

Der dimere Komplex aus IL-6 gebunden an IL-6R α besitzt Affinität zu gp130. Das IL-6-Molekül und der IL-6R α interagieren dabei kooperativ. IL-6 kontaktiert Aminosäuren der CBM-Region des gp130 über die *site II*. Dieser Kontakt wurde von Boulanger *et al.* als *site IIa* bezeichnet (vgl. Abb. 1-5). IL-6R α und gp130 besitzen ebenfalls eine gemeinsame Kontaktfläche, die in diesem Kontext als Wechselwirkung *IIb* bezeichnet wird. Diese Interaktion wird im nachfolgenden Abschnitt weiter behandelt.

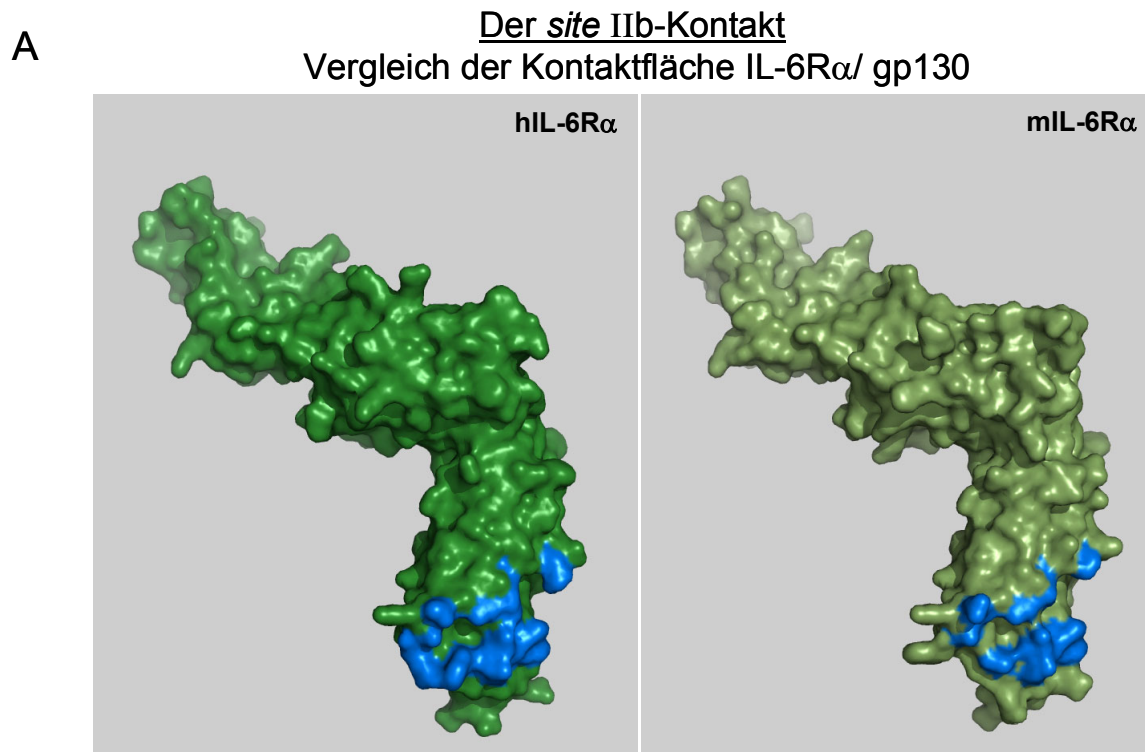
Die *site IIb*-Interaktion: Das IL-6R α /gp130-interface

Der IL-6R α besitzt zwei Interaktionsflächen mit gp130, wobei diese in Analogie zu Boulanger *et al.* [79] zu unterschiedlichen Wechselwirkungen gezählt werden.

Wie Abbildung 3-16 entnommen werden kann, stellen in beiden Spezies Aminosäure-Reste der Domäne D3 des IL-6R α den Kontakt zu Aminosäuren in gp130 her. Dieser Kontakt wird als Wechselwirkung *IIb* bezeichnet.

Die Größe der Kontaktfläche des IL-6R α für sich gesehen reicht nicht aus, um eine stabile Assoziation mit gp130 ohne Anwesenheit von IL-6 einzugehen. Die Affinität für eine stabile Assoziation mit gp130 wird erst in Anwesenheit von IL-6 erreicht (durch zusätzliche Kontakte zwischen IL-6 und gp130 in Abbildung 1-5 unter der Bezeichnung *site IIa* erwähnt).

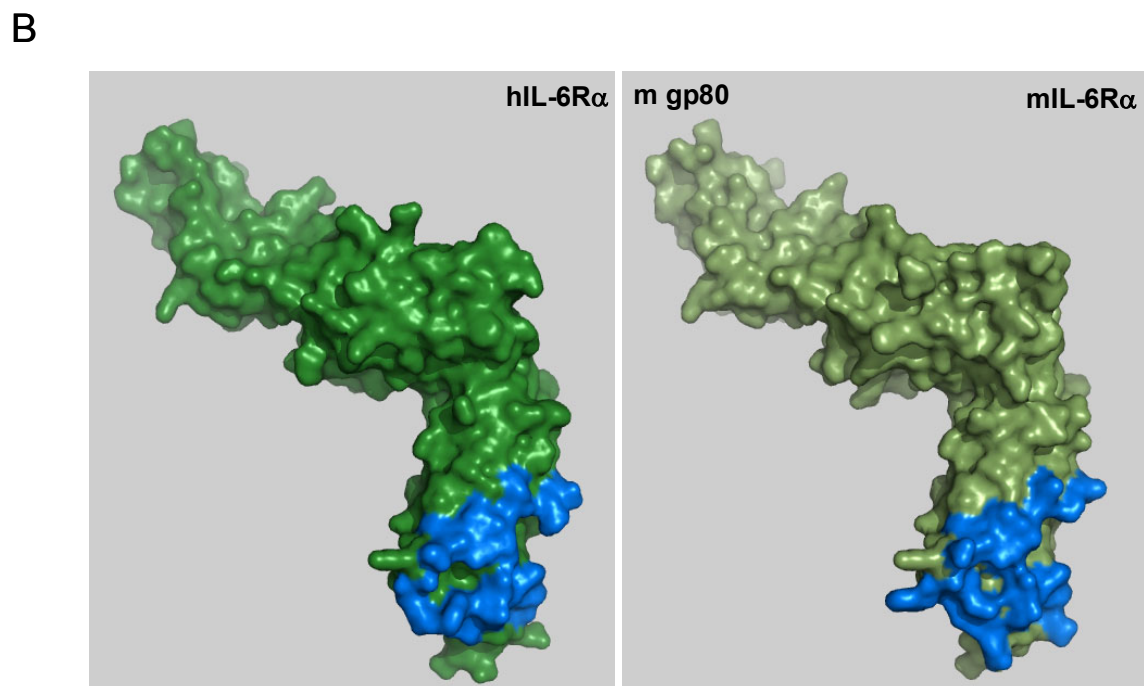
Beide genutzten Programme ermitteln, dass zwischen mIL-6R α und mgp130 eine kleinere Kontaktfläche im Vergleich mit den humanen Proteinen gebildet wird (Abb. 3-16).



Größe des *protein-interface* (InterProSurf):

hIL-6R α : 403 Å²

mIL-6R α : 322 Å²



Größe des *protein-interface* (Molsurfer/PPI-surfer):

hIL-6R α : 733 Å²

mIL-6R α : 618 Å²

Abbildung 3-16: Darstellung des gp130/D3-interface auf der IL-6R α -Oberfläche

Mittels der Programme InterproSurf (A) und MolSurfer/PPI-surfer (B) wurden die an der Interaktion mit IL-6 beteiligten Aminosäuren identifiziert und ihre Position im IL-6R α blau hervorgehoben. Gleichzeitig wurde die Gesamtgröße der Interaktionsflächen berechnet und unter der jeweiligen Abbildung angegeben. In Abbildung B) wurde die Fläche mittels des PPI-surfers berechnet.

Der *site* III-Kontakt

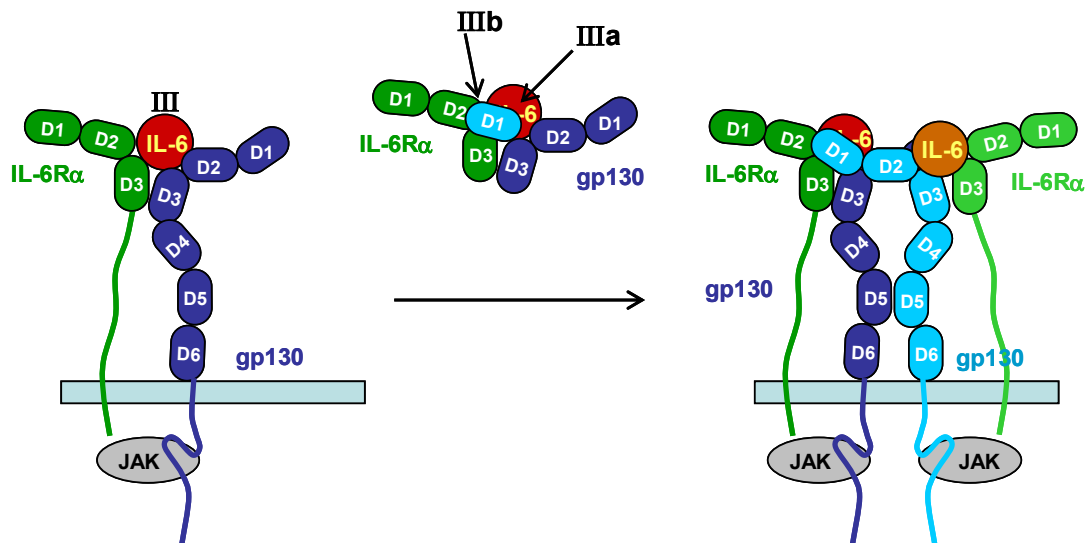


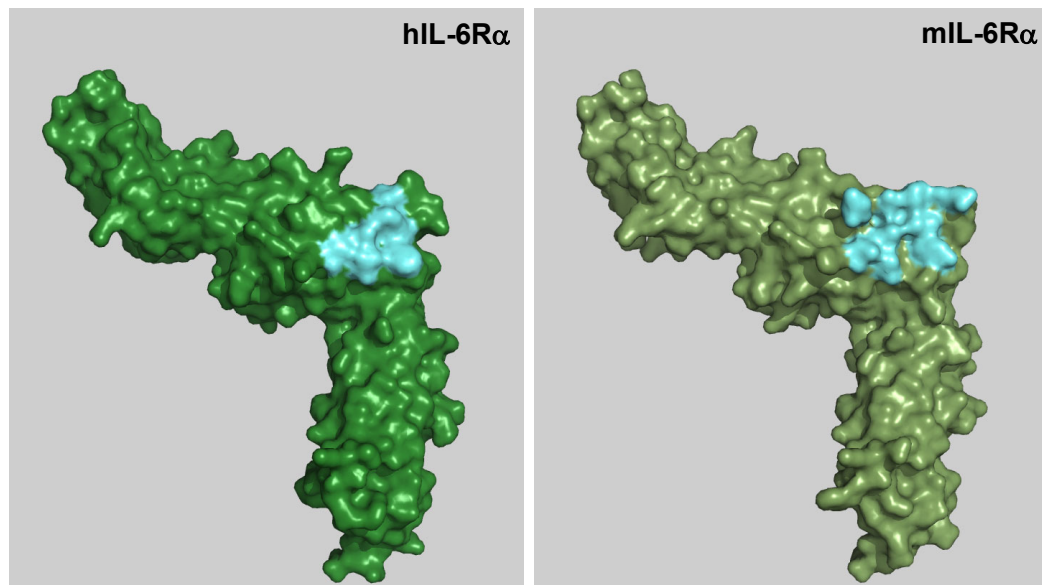
Abbildung 3-17: Schematische Darstellung des *site* III-Kontaktes

Der trimere Komplex aus IL-6/IL-6R α /gp130 kann durch spiegelbildliche Anlagerung eines weiteren identischen Komplexes zu einem höhermolekularen hexameren Komplex assoziieren. Das IL-6-Molekül und der IL-6R α interagieren dabei erneut kooperativ. Aminosäuren der freien Bindungsstelle (*site* III) des IL-6 interagieren mit Aminosäuren der Ig-ähnlichen Domäne des gp130. Gemäß Boulanger *et al.* wird diese Interaktionsfläche als *site* IIIa bezeichnet (vgl. Abb. 1-5). IL-6R α und gp130 besitzen in diesem Kontext eine weitere Kontaktfläche, die als Wechselwirkung IIIb bezeichnet wird. Diese Interaktion wird im nachfolgenden Abschnitt weiter behandelt.

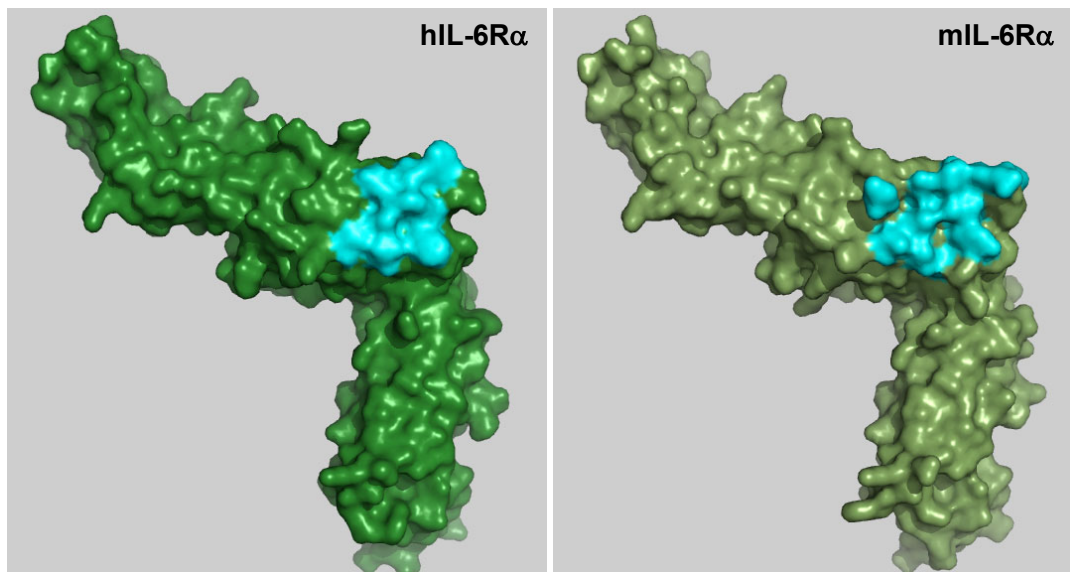
Die *site* IIIb-Interaktion: Das IL-6R α /gp130-D1-interface

Der IL-6R α besitzt ebenfalls eine Kontaktfläche mit Aminosäuren der Ig-ähnlichen Domäne D1 von gp130 (Abb. 3-18). Für diese Interaktion wurde berechnet, dass im mL-6R α die Kontaktfläche mit gp130 wesentlich größer ist als im Falle des humanen Rezeptors. Die N-terminale Aminosäure L¹ übernimmt dabei eine bedeutende Rolle: Laut Modell könnte dieser Aminosäure-Rest über eine hydrophobe Interaktion mit der Aminosäure F⁸⁶ in der Ig-ähnlichen Domäne von gp130 mit einer Kontaktfläche von etwa 133 Å² zum *site* IIIb-Kontakt und damit zur Stabilität des hexameren Komplexes beitragen.

A

Größe des *protein-interface* (InterProSurf):**hIL-6R α : 177Å²****mIL-6R α : 396Å²**

B

Größe des *protein-interface* (Molsurfer/PPI-surfer):**hIL-6R α : 275Å²****mIL-6R α : 448Å²****Abbildung 3-18: Darstellung des gp130-D1-interface auf der IL-6R α -Oberfläche**

Mittels der Programme InterproSurf (A) und Molsurfer/PPI-server (B) wurden die an der Interaktion mit IL-6 beteiligten Aminosäuren identifiziert und ihre Position im IL-6R α türkis hervorgehoben. Gleichzeitig wurde die Gesamtgröße der Interaktionsflächen berechnet und unter der jeweiligen Abbildung angegeben. In Abbildung B) wurde die Fläche mittels des PPI-servers berechnet.

3.4. Auswirkung von Mutationen auf die Funktion des mL-6R α in lebenden Zellen

Basierend auf dem Modell des murinen IL-6R α wurde folgende Arbeitshypothese entwickelt, die anschließend durch Mutationsstudien an lebenden Zellen validiert wurde:

Die Konsequenz der Deletion der Ig-ähnlichen Domäne (D1) des mL-6R α -Proteins ist, dass keine Interaktion mit IL-6 nachweisbar ist (wie bereits in Abb.3-6B gezeigt). Bei dieser Deletion wird, neben der D1-Kerndomäne, eine ungefaltete Region – die sogenannte PräD1-Region– abgeschnitten (mL-6R $\alpha^{\Delta D1}$; Abb. 3-19⑤). In der PräD1-Region findet sich ein konserviertes Cystein (C⁶), welches an der Ausbildung einer Disulfidbrücke zwischen den Domänen D1 und D2 beteiligt ist, sowie 11 Aminosäuren (L¹-V¹¹; vgl. IL-6R α^{wt} in Abb. 3-19①), die sowohl eine Interaktionsfläche mit der D2 als auch einen *site* IIIb-Kontakt (L¹) mit der D1 von gp130 ausbilden.

Um die strukturelle Bedeutung dieser Aminosäuren in der PräD1-Region zu untersuchen, wurden verschiedene Mutationen in diese Region eingeführt: Durch die Deletion eines Bereiches von 10 Aminosäuren wird diese Region nahezu vollständig entfernt, ohne die Struktur der Ig-ähnlichen Domäne zu beeinflussen (mL-6R $\alpha^{\Delta \text{PräD1}}$; Abb. 3-19④). Durch die Substitution von C⁶ zu S (mL-6R α^{C6S} ; Abb. 3-19③) sollte die Relevanz der Disulfidbrücke für die biologische Funktion des IL-6R α untersucht werden. Für das humane Protein wurde bereits gezeigt, dass eine Mutation des C¹⁷⁴ in der D2-Domäne nicht toleriert wird [64].

Um die Bedeutung des N-terminalen Aminosäure-Motivs für die Proteinstruktur und Ligandenbindung zu untersuchen, soll das hydrophobe Sequenz-Motiv (LVL) gegen Aminosäuren mit kleinen Seitenketten (SGS) ausgetauscht werden (mL-6R α^{SGS} ; Abb. 3-19②).

Eine weitere Frage war, ob nur die PräD1-Region von Bedeutung ist, oder ebenfalls die D1-Kerndomäne Relevanz für die Rezeptorfunktion hat. Daher sollte eine D1-Deletions-Mutante mit der PräD1-Region fusioniert werden, so dass die Disulfidbrücke zumindest theoretisch wieder geknüpft werden kann (mL-6R $\alpha^{\Delta D1+\text{PräD1}}$; Abb. 3-19⑥).

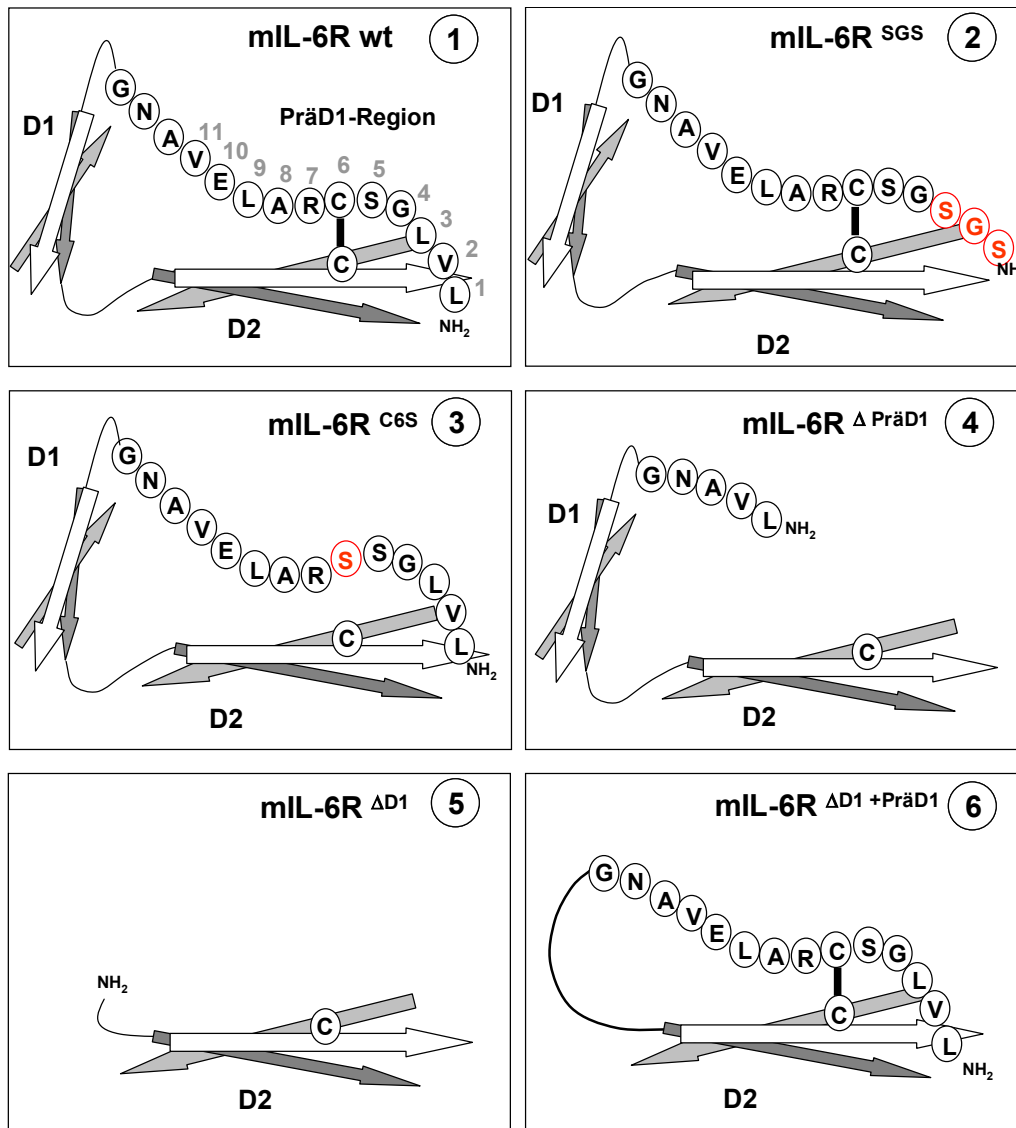


Abbildung 3-19: Schematische Darstellung verschiedener Mutationen des mIL-6R α

Gezeigt sind die PräD1-Region, sowie die Domänen D1 und D2. Punktmutationen sind rot hervorgehoben.

Die Rezeptor-Mutanten wurden wie unter Abschnitt 2.6.13.4 generiert und C-terminal mit der Sequenz des *yellow fluorescent protein* (YFP) fusioniert. Expressionsvektoren, die die codierende Sequenz für die entsprechenden Mutanten enthalten, wurden in HepG2-Zellen transfiziert. Da diese humanen Zellen nicht auf murines IL-6 reagieren, kann so die Funktion der Rezeptoren ohne endogenen „Hintergrund“ studiert werden. Durch Selektion mit Geneticin/G418 wurde eine Zellpopulation generiert, die moderate Expressionsspiegel aufweist und die biochemische Untersuchung der mIL-6R α -Mutanten reproduzierbarer macht. Da keine Einzelklone selektiert wurden, konnte vermieden werden, dass die beobachteten Effekte auf Positionseffekten beruhen, die durch die Integration des Transgens verursacht werden. Die Oberflächen-Expression der Rezeptormutanten wurde sowohl

durchflußzytometrisch (FACS-Analyse) als auch durch *live cell imaging* am konfokalen *laser-scanning* Mikroskop untersucht. Die Protein-Expression wurde zusätzlich im Westernblot nachgewiesen.

Die Auswirkungen der eingeführten Mutationen waren drastischer als erwartet:

In der FACS-Analyse konnten lediglich $IL-6R\alpha^{wt}$ und die $IL-6R\alpha^{SGS}$ -Mutante durchflußzytometrisch nachgewiesen werden (Abb. 3-20), alle weiteren Mutationen führten zum vollständigen Verlust der Oberflächenexpression und zeigten keine Induktion im Reporter-Gen-Assay nach IL-6 Stimulation (Daten nicht gezeigt). Da jede Mutation das Epitop des in der Durchflußzytometrie verwendeten Antikörpers beeinflussen kann, bietet die konfokale Mikroskopie den Vorteil, die subzelluläre Lokalisation fluoreszierender Proteine sichtbar direkt machen zu können.

Da der $mIL-6R\alpha$ -YFP ein Typ-I-Transmembranprotein ist, sollte dieser an der Plasmamembran akkumulieren und dort eine deutliche Fluoreszenz aufweisen. Die Lokalisation der Proteine kann im YFP-Kanal detektiert und gleichzeitig die Zellmembran durch Färbung mit Trypanblau-Lösung sichtbar gemacht werden. Der Farbstoff akkumuliert an der Außenseite der Zellen, da die Membran eine mechanische Barriere darstellt. Die Fluoreszenz des Farbstoffes wurde in einem Bereich $>630\text{nm}$ detektiert.

In Abbildung 3-20 sind die Resultate der *live-cell-imaging*-Untersuchungen dargestellt. Der $IL-6R\alpha^{wt}$ und die $IL-6R\alpha^{SGS}$ -Mutante zeigten im konfokalen Bild lebender Zellen eine Fluoreszenz, die mit der Position der Zellmembran koloalisiert, jedoch waren ebenfalls eine diffuse cytoplasmatische Fluoreszenz und optisch verdichtete Foci sichtbar. Diese Färbung lässt sich mit laufender Proteinexpression oder Degradation des Rezeptorproteins erklären. Der Zellkern erscheint frei von Fluoreszenz.

Die Deletion der Disulfidbrücke zeigte im Vergleich zum Wildtyp eine drastische Veränderung der subzellulären Lokalisation ($mIL-6R\alpha^{C6S}$, Abb. 3-20). Die Fluoreszenz fand sich nur in distinkten, optisch dichteren, retikulären Strukturen und nicht an der Zellmembran. Zellkerne und kleinere cytoplasmatische Bereiche waren frei von Fluoreszenz. Die fehlende Oberflächen-Lokalisation der Rezeptoren in der konfokalen Mikroskopie bestätigte die Daten der FACS-Analyse. Da sowohl in der $IL-6R\alpha^{\Delta Pr\ddot{a}D1}$ -Mutante als auch in der Mutante mit vollständig deletierter Ig-ähnlicher Domäne ($IL-6R\alpha^{\Delta D1}$) keine Disulfidbrücken vorliegen, fehlte auch hier die Oberflächenlokalisierung. Im mikroskopischen Bild zeigt sich eine dichtere perinukleäre Proteinlokalisierung, wobei z.T. auch der Kernbereich diffus fluoresziert. Durch Fusion der $Pr\ddot{a}D1$ -Region mit der Domäne D2 unter Deletion der Ig-ähnlichen Domäne ($IL-6R\alpha^{\Delta D1+Pr\ddot{a}D1}$) konnte die Oberflächenexpression des Rezeptors nicht wiederhergestellt werden, da das Protein ebenfalls in retikulären Strukturen zurückgehalten wird.

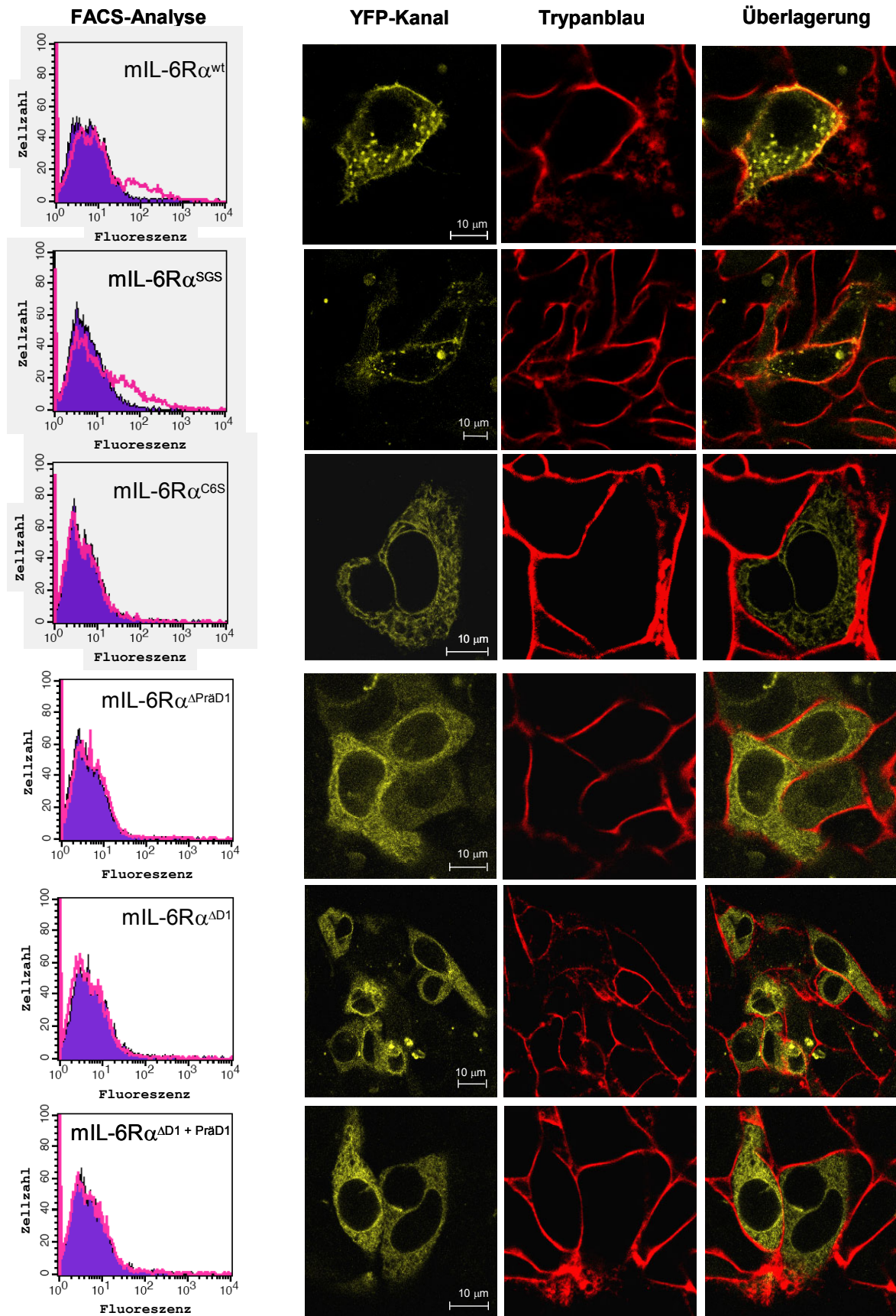


Abbildung 3-20: Einfluss von Mutationen auf die Lokalisation des murinen IL-6R α

HepG2-Zellen, die stabil die verschiedenen Mutanten des murinen IL-6R α exprimieren, wurden mittels FACS-Analyse und durch konfokale Mikroskopie lebender Zellen untersucht. Für die FACS-Analyse wurde ein monoklonaler Antikörper gegen die Extrazellulärregion des mL-6R α (auch als anti-CD126 Antikörper bezeichnet) oder ein Antikörper des gleichen Isotyps (Kontrolle) verwendet. Der linke Teil der Abbildungen zeigen die Oberflächenexpression dargestellt als Histogramm (lila: Kontrolle; pink: mL-6R α). Die subzelluläre Lokalisation der C-terminal mit YFP fusionierten Rezeptoren wurde anhand der Emission im YFP-Kanal detektiert (in gelb wiedergegeben). Die Färbung der Zellmembran erfolgt mit Trypanblau, welches nach Anregung bei 543 nm fluoresziert (in rot dargestellt). Die Zellmembran stellt eine physikalische Barriere für Trypanblau dar, wobei ihre Lage durch den Farbstoff markiert wird.

Mutationen des aminoterminalen LVL-Motivs des murinen IL-6R α beeinflussen die IL-6-abhängige Signaltransduktion

Durch FACS-Analyse und konfokale Mikroskopie wurde gezeigt, dass die Mutation, die zum Verlust der Disulfidbrücke im mL-6R α führt, einen dominant negativen Effekt auf die Oberflächen-Expression des Rezeptors ausübt. Lediglich mL-6R α^{wt} und die mL-6R α^{SGS} -Mutante konnten an der Zelloberfläche detektiert werden und wurden im weiteren Verlauf hinsichtlich ihrer Fähigkeit analysiert, nach Stimulation mit murinem IL-6 Signaltransduktions-Vorgänge auszulösen.

Anhand des Modells für das murine IL-6R α -Protein wurde die Hypothese entwickelt, dass durch Mutation des aminoterminalen Segments die Stabilität der *site* I-Wechselwirkung negativ beeinflusst wird. Gründe hierfür könnten der Verlust des *site* IIIb-Kontaktes zu gp130 und weiterer intramolekularer Wechselwirkungen (s. Abschnitt 3.3.3) sein. Daher sollte untersucht werden, ob diese Mutation einen Einfluss auf die IL-6-Bindung hat und sich damit auf die Aktivierung des JAK/STAT-Signaltransduktionswegs auswirkt.

Bei diesem Versuchsansatz wurde begleitend zu jedem Experiment die Rezeptordichte durchflusszytometrisch bestimmt, um auszuschließen, dass die beobachteten Effekte der mL-6R α^{SGS} -Mutation auf Unterschieden der Rezeptorexpression in den Zelllinien beruhen. Abbildung 3-21A zeigt konfokale Bilder lebender HepG2-Zellen, die entweder mit dem mL-6R α^{wt} oder der mL-6R α^{SGS} -Mutante stabil transfiziert wurden. Die beiden Rezeptoren zeigen in der konfokalen Mikroskopie eine charakteristische Fluoreszenz, die mit der Position der Zellmembran kolokalisiert ist. Signale in den zytoplasmatischen Bereichen der Zellen, (vermutlich zurückzuführen auf Expressions- oder Degradationsprozesse) sind ebenfalls in beiden Zelllinien vergleichbar. Die stärkere Membranfluoreszenz der mL-6R α^{SGS} -Mutante scheint in diesem Experiment eher auf eine höhere Expression des Rezeptors hinzudeuten. Simultan wurde die mL-6R α -Expression dieser Zelllinien durchflusszytometrisch untersucht und die erhaltenen Messwerte statistisch aufbereitet. Die Durchflusszytometrie vermittelt einen Überblick über die Zusammensetzung der Population, da bei dieser Messmethode

10 000 Zellen pro Messung untersucht werden, während das mikroskopische Bild nur eine charakteristische Zelle der Population zeigt. Die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse sind in Abbildung 3-22A dargestellt. Das gesteigerte Fluoreszenzsignal des konfokalen Bildes korreliert mit einer stärkeren Expression des Rezeptors in der Gesamtpopulation (statistisch erkennbar an der Erhöhung des Medianwertes). Die Charakterisierung der Zellen erfolgte parallel zu dem in Abbildung 3-24B dargestellten Experiment.

Die Rezeptordichten, die für $\text{mIL-6R}\alpha^{\text{wt}}$ oder der $\text{mIL-6R}\alpha^{\text{SGS}}$ -Mutante gemessen wurden variieren, waren aber in keinem Experiment für $\text{IL-6R}\alpha^{\text{SGS}}$ -Mutante signifikant geringer als für den $\text{mIL-6R}\alpha^{\text{wt}}$. Die in Abbildung 3-22B gezeigte durchflusszytometrische Analyse charakterisiert die Zellen, die für das Experiment 3-24A verwendet wurden.

Die Verwendung humaner Zellen bietet gegenüber murinen Zelllinien den Vorteil, dass die transfizierten murinen Rezeptoren ohne endogenen Hintergrund untersucht werden können. Wie bereits mehrfach erwähnt sind humane Zellen nicht responsiv für murines IL-6. Es wurden verschiedene Experimente durchgeführt, in denen die Fähigkeit der Rezeptoren getestet wurde durch murines IL-6 den JAK/STAT-Signaltransduktionsweg zu aktivieren. Die Aktivierung des Signalwegs wurde über den Nachweis der Induktion eines STAT3-responsiven Promotors (Abbildung 3-24A und B) nachgewiesen. In einem weiteren funktionellen Test wurde die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren der STAT-Familie über ihre Fähigkeit zur DNA-Bindung in einem so genannten *electrophoretic mobility shift assay* (EMSA) nachgewiesen (Abbildung 3-23A und B).

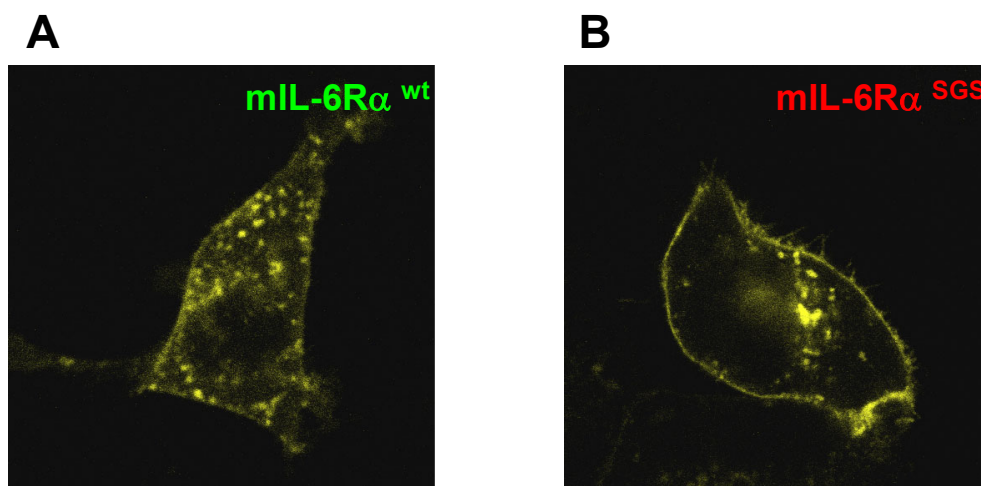


Abbildung 3-21: Analyse der Oberflächenexpression von $\text{mIL-6R}\alpha^{\text{wt}}$ und $\text{mIL-6R}\alpha^{\text{SGS}}$
Konfokales Bild einer lebendenden HepG2-Zelle, welche stabil (A) $\text{mIL-6R}\alpha^{\text{wt}}$ -YFP oder (B) $\text{mIL-6R}\alpha^{\text{SGS}}$ -YFP exprimiert. Auf Gegenfärbung der Membran wurde verzichtet.

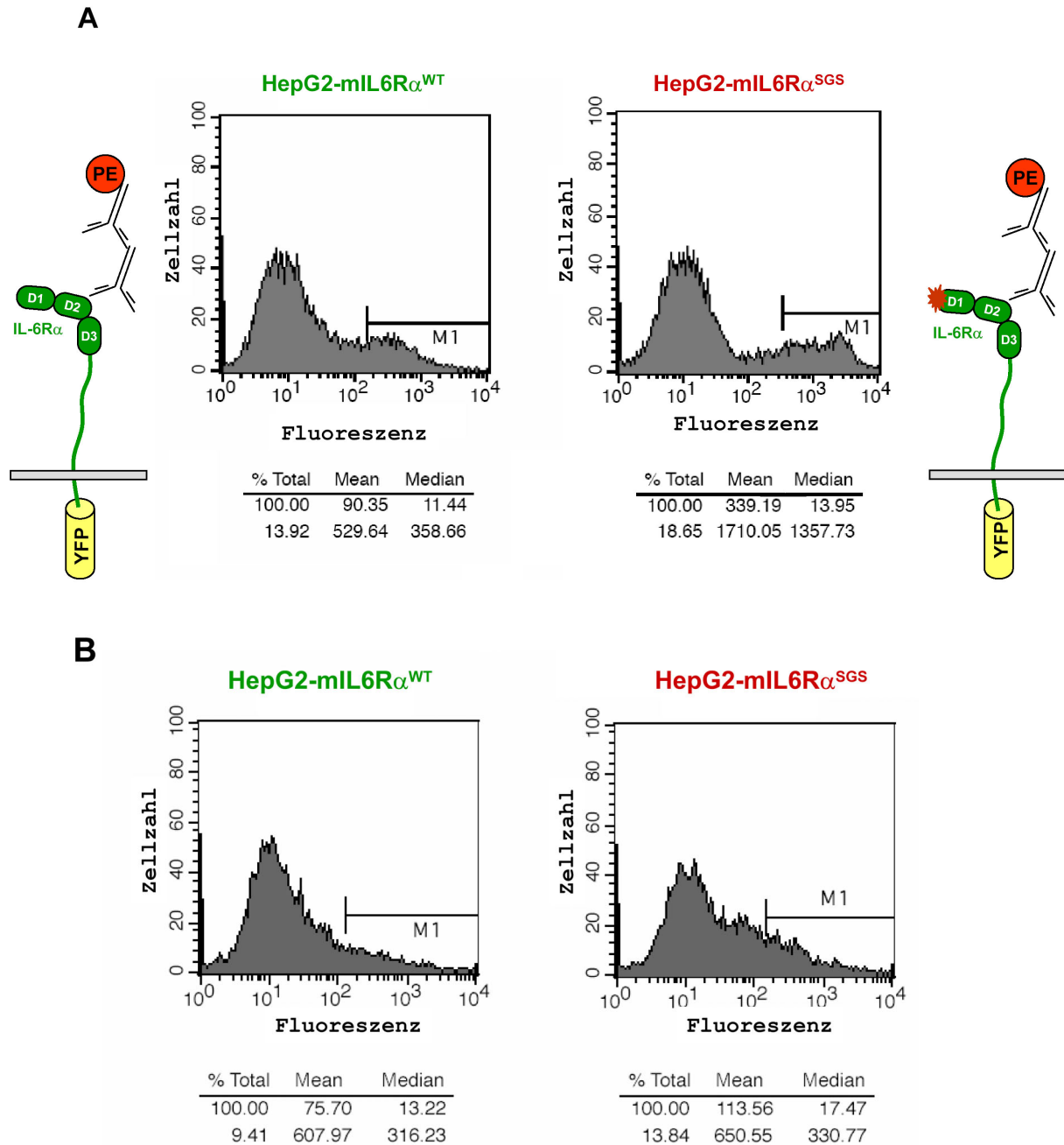


Abbildung 3-22: Analyse der Oberflächenexpression von mIL-6R α^{WT} und mIL-6R α^{SGS}

Zum Nachweis der Oberflächenexpression wurden beide Zelllinien mit einem monoklonalen Antikörper gegen mIL-6R α (anti-CD126 Antikörper) oder einem Kontrollantikörper des gleichen IgG-Subtyps inkubiert. In der Abbildung ist die Oberflächenexpression im Histogramm dargestellt. Der Anteil an Zellen, die eine höhere Fluoreszenz im Vergleich zur Ig-Kontrolle aufweisen ist statistisch ausgewertet. **(A)** Die statistische Analyse der Oberflächenexpression des Rezeptorproteins zeigt anhand des Medianwertes (*Median*), welcher der mittleren Fluoreszenz der gesamten Stichprobe entspricht, dass die Expression des mIL-6R α^{SGS} -Rezeptors insgesamt höher ist als die des IL-6R α^{WT} . Die 13%ige Reduktion der Reportergeninduktion (gezeigt in Abbildung 3-24B) resultiert daher nicht aus Unterschieden der Rezeptordichte. **(B)** In diesem Experiment kann anhand der statistischen Analyse (Medianwert) der Meßwerte gezeigt werden, dass beide Zelllinien (mIL-6R α^{SGS} / mIL-6R α^{WT}) keine signifikanten Abweichungen in der Rezeptor-Oberflächenexpression aufweisen. Die 38 bzw. 48%ige Reduktion der Reportergeninduktion (gezeigt in Abbildung 3-24A) kann daher nicht auf Unterschiede in der Expression zurückgeführt werden.

Im folgenden Experiment (Abbildung 3-23) wurde die Aktivierung von Transkriptionsfaktoren der STAT-Familie über ihre Fähigkeit nachgewiesen, in dimerisierter Form an synthetische DNA-Sequenzen zu binden, die entsprechenden Konsensus-Sequenzen STAT-responsiver Promotoren abgeleitet sind.

Dazu wurden HepG2-mIL-6R α^{wt} -YFP und HepG2-mIL-6R α^{SGS} -YFP-Zellen mit mIL-6 in unterschiedlichen Konzentrationen stimuliert und Kernproteine isoliert (s. 2.8.11). Gleiche Proteinmengen der nukleären Fraktion wurden mit einer radioaktiv-markierten dsDNA-Sonde, (s. 2.8.13), inkubiert. Aktivierte STAT-Moleküle sind an Tyrosin 705 phosphoryliert und dimerisieren über SH2-Domänen, wie in Abschnitt 1.3. beschrieben wurde. In diesem Zustand gelangen STATs in den Zellkern und können dort die Transkription initiieren. Daher korreliert die Signalstärke, die für die DNA-gebundenen STAT-Dimere gemessen werden kann, mit der Stärke eines extrazellulären Stimulus.

Abbildung 3-23 zeigt die Autoradiographie eines EMSA-Geles, in dem die mIL-6-vermittelte STAT-Aktivierung in beiden Zelllinien miteinander verglichen wurde. Wie in der Literatur beschrieben, konnten drei distinkte Banden mit unterschiedlichen elektrophoretischen Mobilitäten beobachtet werden, die STAT3/STAT3, STAT3/STAT1 und STAT1/STAT1-Dimeren entsprechen [125-127]. Generell kann man der Abbildung entnehmen, dass nach mIL-6 Stimulation STAT3/3-Homodimere das stärkste Signal im nukleären Extrakt darstellen, während sich STAT1/1-Homodimere sich erst bei höheren Zytokin-Konzentrationen ausbildeten.

Der wichtige Aspekt in dem Vergleich dieser Zelllinien ist jedoch, dass sich signifikante Unterschiede in der Signalstärke für DNA gebundene STAT-Spezies zeigten. HepG2-mIL-6R α^{SGS} -YFP-Zellen zeigten eine signifikant geringere Aktivierung von STAT1, während der Effekt auf Ebene des STAT3 geringer erschien. Durch Quantifizierung mit Hilfe des Programmes ImageQuant (Molecular Dynamics) konnten aber auch in der Spezies der STAT3/3 Homodimere Unterschiede bei HepG2-mIL-6R α^{wt} -YFP und HepG2-mIL-6R α^{SGS} -YFP nachgewiesen werden. Der durch die Mutation bewirkte Effekt schien ebenfalls um so stärker zu sein, je geringer die Zytokin-Konzentration war, die zur Stimulation der Zellen verwendet wurde.

Daher wurde die Auswirkung der Mutation auf Geninduktionsvorgänge auch in Reporter-Gen-Assays getestet. Da die Messung einen Zeitraum von 18 h umfasst und transiente Modifikationen wie die Tyrosin-Phosphorylierung von STAT3 in langlebige Proteine (Luziferase) übersetzt werden, können kumulative Effekte dieser Mutation dargestellt werden.

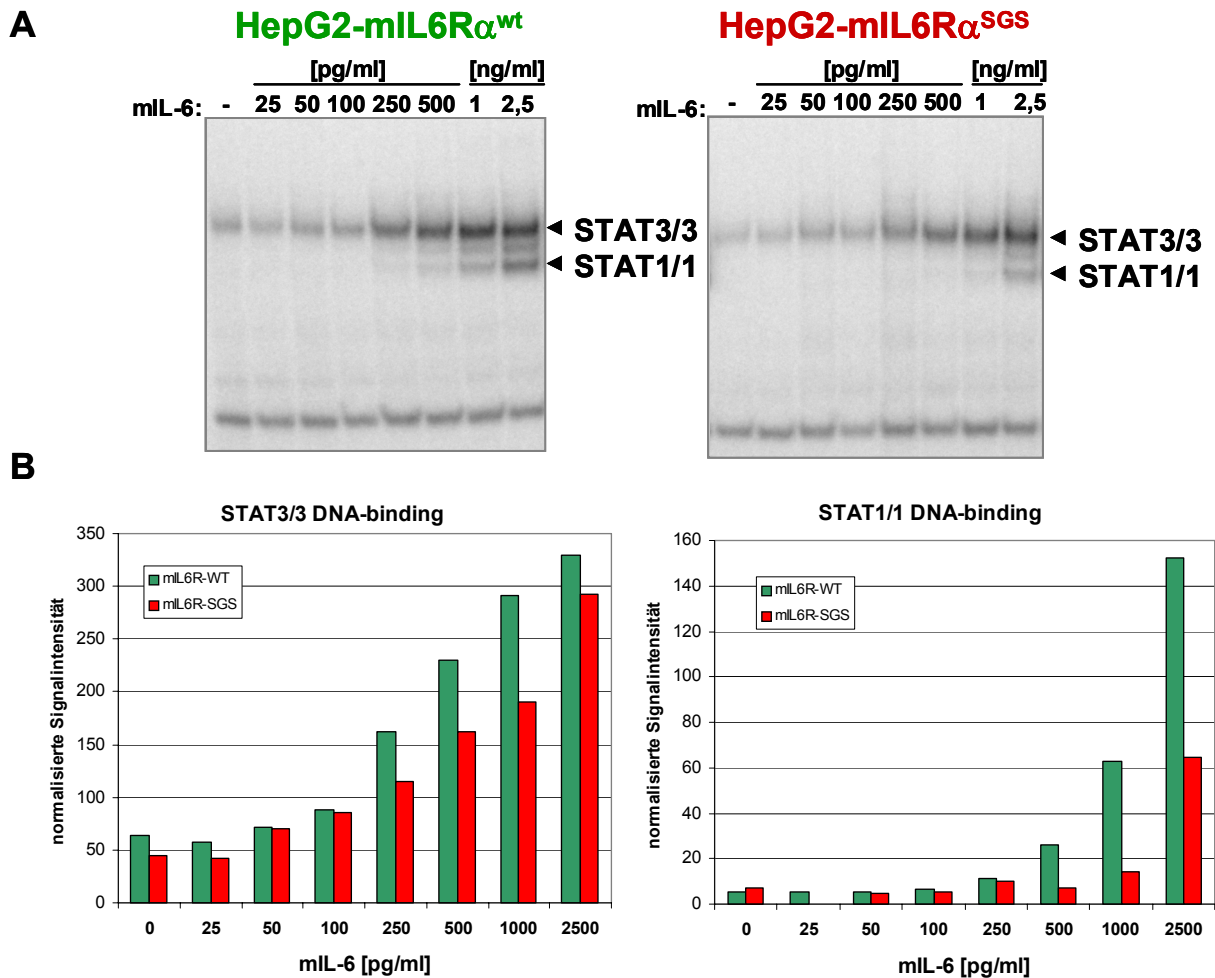


Abbildung 3-23 Vergleich der Aktivierung des JAK/STAT Signalweges durch IL-6R α^{wt} und IL-6R α^{SGS}

HepG2-Zellen, die stabil mIL-6R α^{wt} -YFP oder mIL-6R α^{SGS} -YFP exprimieren, wurden mit den angegebenen Mengen an murinem IL-6 für 20 min stimuliert. Anschließend wurden Kernextrakte hergestellt und mit einer radioaktiv markierten DNA-Sonde (SIEm67) inkubiert. Aktivierte, DNA-gebundene STAT-Spezies werden im PAA-Gel zurückgehalten und können nach Abschluss der Elektrophorese durch Scannen mit einem Phosphoimager visualisiert (A) und mit Hilfe der Software ImageQuant (Molecular Dynamics) quantifiziert werden (B).

Um die Geninduktion durch einen externen Stimulus (murines IL-6) in HepG2-Zellen, die entweder stabil mIL-6R α^{wt} -YFP oder mIL-6R α^{SGS} -YFP exprimieren, vergleichen zu können wurden Reporter-gen-Assays in Zellen durchgeführt, die mit mIL-6 in ausgewählten Konzentrationen stimuliert waren. Beide Zelllinien wurden mit einem Plasmid transfiziert, das für ein Reporter-gen (Sequenz der *firefly*-Luziferase) codiert, welches von einem STAT3 responsiven Promotors transkribiert wird. Zur Korrektur dieser Messwerte wurde ein weiteres Plasmid kotransfiziert, welches für ein zweites Reporterprotein (*Renilla*-Luziferase) unter Kontrolle eines konstitutiv-aktiven Promotors codiert.

Durch Bindung von murinem IL-6 an die Rezeptoren (mIL-6R α^{wt} -YFP oder mIL-6R α^{SGS} -YFP) wird der JAK/STAT-Signaltransduktionsweg aktiviert. Die gebildete Menge des

Reporterproteins (Luziferase) ist dabei ein Maß für die Zytokin-induzierte Aktivierung des Transkriptionsfaktors STAT3. Die Zellen wurden 12 h nach Transfektion der Reporterplasmide mit mL-6 in unterschiedlichen Konzentrationen (zwischen 2,5-10 ng/ml) für 18 h stimuliert und anschließend lysiert. Wie Abbildung 3-24 zeigt, konnte nach Auswertung der Reporter-Gen-Aktivität aus den Lysaten dieser Zellen bei allen Zytokinkonzentrationen eine deutliche Reduktion der Reporteraktivität der mL-6R α ^{SGS}-Mutante im Vergleich zum mL-6R α ^{wt} (zwischen 13-48%) ermittelt werden. Dabei war die gemessene Differenz der Reporter-Gen-Aktivität bei niedrigeren Zytokinkonzentrationen wesentlich drastischer. Aus der reduzierten Reporter-Gen-Aktivierung kann geschlossen werden, dass mL-6 signifikant schlechter mit dem mL-6R α interagiert, wenn das N-terminale LVL-Motiv substituiert ist.

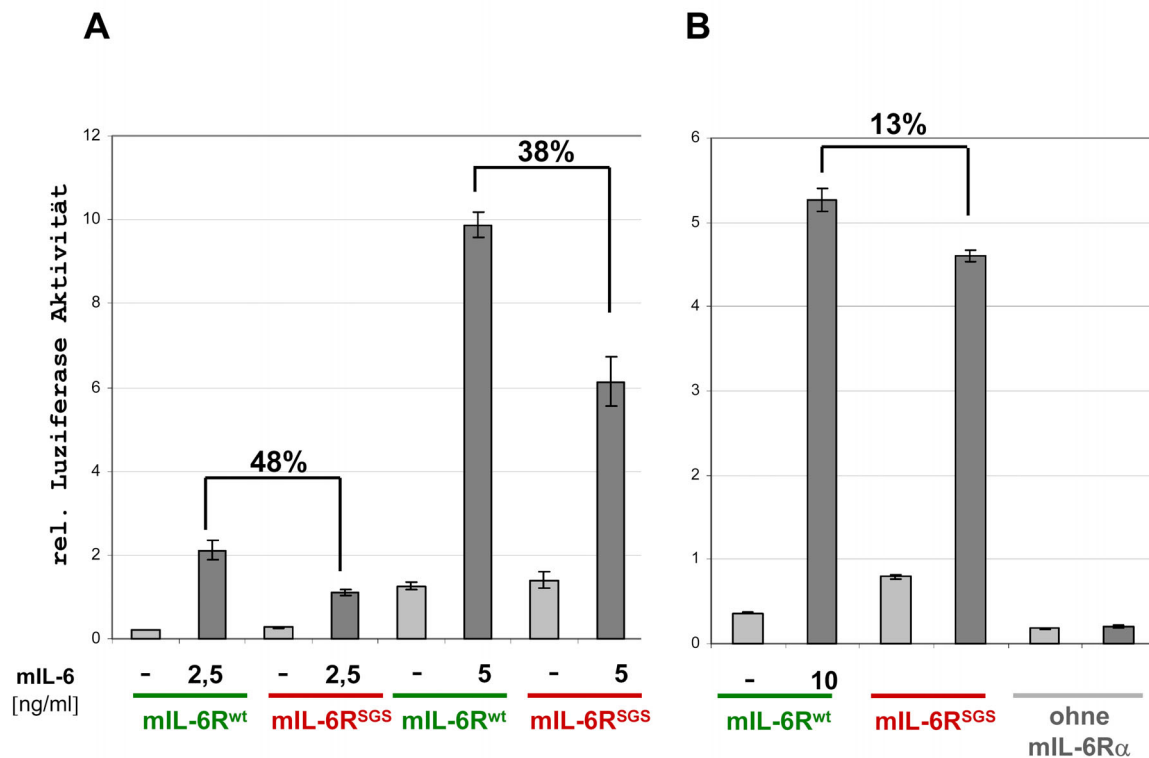


Abbildung 3-24: Vergleich von mL-6R α ^{wt} und mL-6R α ^{SGS}-Mutante in der Reporter-Gen-induktion HepG2-Zellen, die stabil mL-6R α ^{wt}-YFP oder die mL-6R α ^{SGS}-YFP-Mutante exprimieren, wurden transient mit einem STAT3-responsiven α 2M-*firefly*-Luziferase-Reporter-Genkonstrukt und einem Kontrollplasmid mit konstitutiver Promotor-Aktivität, welches für die *Renilla*-Luziferase codiert, kotransfiziert. Nach 12 h wurden die Zellen für weitere 18 h mit (A) 2,5 ng/ml bzw. 5 ng/ml mL-6 oder (B) 10 ng/ml mL-6 stimuliert. Ebenfalls wurden Zellen unter den gleichen Bedingungen untersucht, die kein Transgen (= mL-6R α) exprimieren. Da es sich dabei um humane Zellen handelt, sind diese nicht für mL-6 responsiv. Die Luziferase-Aktivität wurde in den Lysaten dieser Zellen bestimmt und die Werte auf die Messwerte für die *Renilla*-Luziferase normiert. In der Abbildung sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei Experimenten dargestellt.

Alle verschiedenen experimentellen Ansätze zeigen, dass nach Mutation des N-terminalen Sequenzmotives der mL-6R α nach einem extrazellulären Stimulus weniger effektiv die Aktivierung des JAK/STAT-Signaltransduktionswegs bewirkt werden kann. Daher kann angenommen werden, dass durch die Mutation eine signifikante Veränderung der Zytokin-Bindung an den Rezeptor bewirkt wird.

3.5. Auswirkung von Mutationen des extrazellulären Bereiches des mL-6R α auf die Liganden-Bindung im Kontext eines Rezeptorfusionsproteins (RFP)

In den vorangegangenen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Mutation der N-terminalen Aminosäure-Reste des mL-6R α einen negativen Einfluss auf die Aktivierung des JAK/STAT-Signaltransduktionsweges ausübt. Ebenfalls konnte ein dominanter Effekt einer Deletion der Disulfidbrücke auf die Oberflächenexpression gezeigt werden. Der Verlust der Oberflächenexpression erlaubt jedoch keinen Rückschluss auf die Fähigkeit des mL-6R α -Proteins mit dem Liganden zu interagieren.

Um die Auswirkung der entsprechenden Mutation auf die Funktion des mL-6R α näher zu untersuchen wurde die codierende Sequenz aller IL-6R α Mutanten und des Wildtyp-IL-6R α (korrespondierend zu L¹ bis T³⁰⁰) als Fusionsprotein-Konstrukt mit den Domänen D1-D2-D3 von gp130 exprimiert.

Mit Hilfe von Präzipitationsexperimenten mit immobilisiertem IL-6 sollte analysiert werden, ob die Mutanten des murinen IL-6R α in der Lage sind, über einen *site* I-Kontakt die initiale Interaktion mit IL-6 zu vermitteln. So kann ohne den zellulären Kontext untersucht werden, ob die mutierten Motive nur eine strukturelle Aufgabe besitzen (Qualitätskontrolle für die Oberflächenexpression eines Transmembranproteins) oder die entsprechende Mutation ebenfalls eine Auswirkung auf die Funktion des Proteins aufweist.

Gleichzeitig beantwortet dieses Experiment die Frage, ob grundsätzlich ein Inhibitor gegen IL-6 aus den Extrazellulärdomänen des murinen IL-6R α und des murinen gp130, also ein funktionelles mL-6-RFP, generiert werden kann.

Abbildung 3-25 dient zur Rekapitulation der strukturellen Auswirkungen der Mutationen, die am mL-6R α vorgenommen wurden. Diese mutierten Domänen sollten im Kontext des Fusionsproteins auf ihre Fähigkeit getestet werden, die IL-6-Bindung zu vermitteln. Der N-Terminus ist im Falle des Fusionsproteins mit den Aminosäuren des Linkers verbunden. Dieser ist jedoch aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht dargestellt.

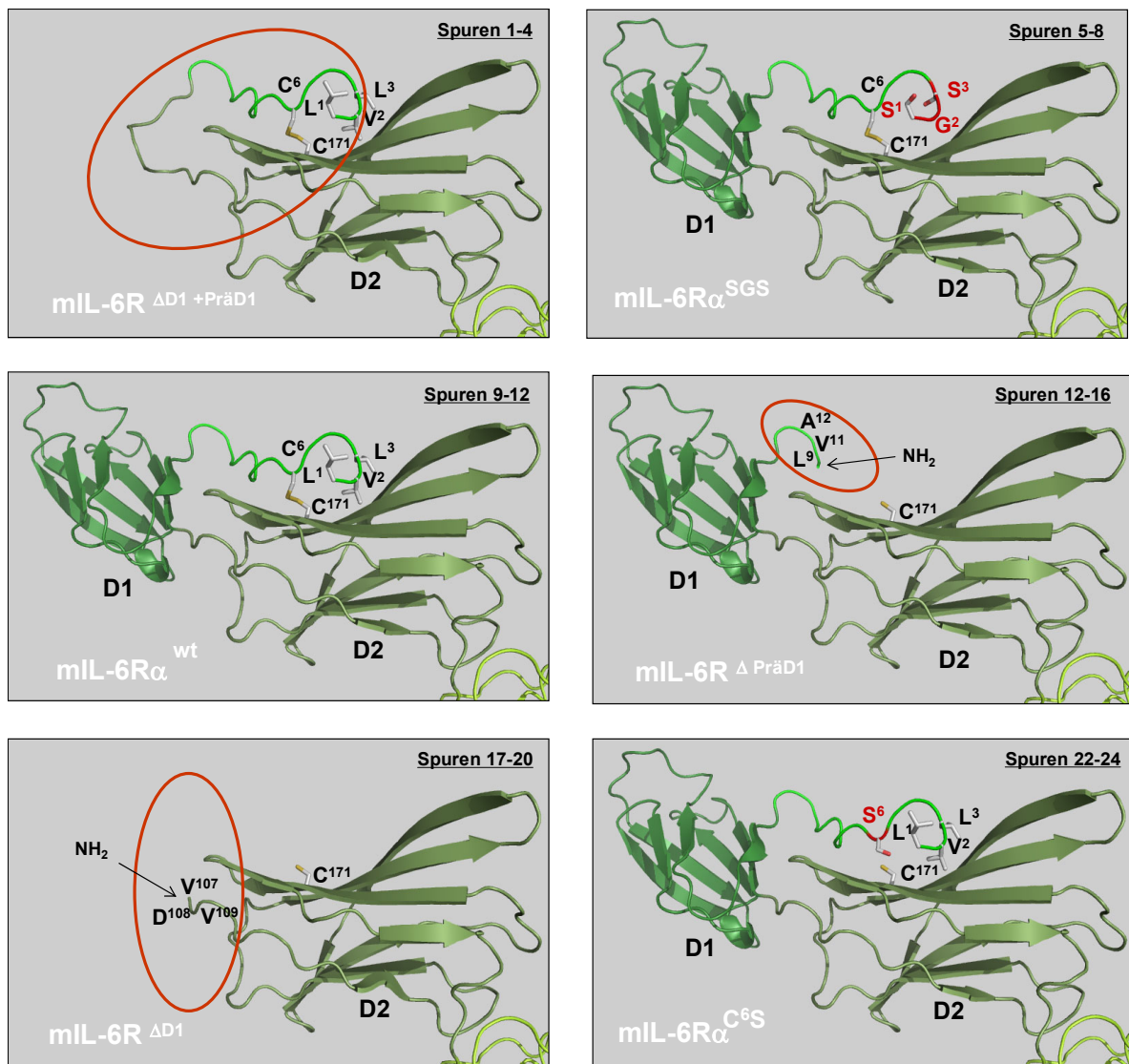


Abbildung 3-25: Schematische Darstellung des mIL-6R α -Anteils in den verschiedenen Fusionsprotein-Konstrukten mit Fokus auf die Domänen D1 und D2

Gezeigt sind die PräD1-Region sowie die Domänen D1 und D2. Punktmutationen sind rot hervorgehoben und die Regionen größerer Deletionen mit Ellipsen markiert. Der N-Terminus ist im Fusionsprotein (mFP) mit den Aminosäuren des Linkers verbunden. Dieser ist jedoch aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht dargestellt.

Da diese Abbildung als Ergänzung zu Abb 3-26 dient, wird jeweils in der rechten oberen Ecke auf die Position des entsprechenden Fusionsproteins im nachfolgenden Experiment (Abb 3-26) hingewiesen. Die Darstellungen fokussieren auf die Mutation des Alpha-Rezeptor-Anteils, über welchen die initiale Ligandenbindung (*site I*-Kontakt) in den verschiedenen Fusionsprotein-Varianten vermittelt werden soll.

Fusionsproteine aus mIL-6R α -Mutanten (2.6.15.4) und den Domänen D1-D2-D3 des murinen gp130 wurden wie unter Abschnitt 2.6.15.1 beschrieben generiert und in Expressionsvektoren kloniert. Zum Nachweis der Proteine wurden diese anstelle eines FLAG-tags C-terminal mit einer synthetischen Aminosäure-Sequenz, dem V5-Epitop (14 AS) versehen. Expressionsplasmide, welche für die entsprechenden Fusionsproteinvarianten codieren, wurden stabil in Hek293-Zellen transfiziert. Der Nachweis der Protein-Expression

erfolgte durch Präzipitation des rekombinanten Proteins aus Überständen und Lysaten über das V5-Epitop. Die Fähigkeit zur Bindung des Liganden wurde durch die Bindung an immobilisiertes humanes IL-6 untersucht. Präzipitierte Proteine wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und mittels Westernblot-Analyse über das V5-Epitops nachgewiesen.

Abbildung 3-26A zeigt ein repräsentatives Präzipitationsexperiment in dem die verschiedenen mL-6-RFP (mFP)-Varianten aus Überständen (Üs) und zellulären Lysaten (Lys) präzipitiert wurden. Die Präzipitation des entsprechenden Proteins über die IL-6-Sepharose weist somit die Funktionalität des IL-6R α nach.

Wie der Abbildung entnommen werden kann, scheinen die Mutationen im Alpha-Rezeptor-Anteil ebenfalls die Expressionsrate der mFPs zu beeinflussen, da alle Inhibitor-Mutanten unterschiedlich stark exprimiert wurden. Die schwächste Expression wiesen die mFPs mit der Punktmutante des mL-6R α^{C6S} (Spuren 21-24) und die mL-6R $\alpha^{\Delta D1+Pr\Delta D1}$ -Mutante (Spuren 1-4) auf. Diese Ansätze enthielten ebenfalls Banden niedrigerer elektrophoretischer Mobilität. Hierbei könnte es sich um Degradationsprodukte handeln. Alle Inhibitorvarianten, die größere Deletionen des mL-6R α aufweisen (mL-6R $\alpha^{\Delta D1}$, Spuren 17-20; mL-6R $\alpha^{\Delta Pr\Delta D1}$, Spuren 13-16) waren nicht in der Lage mit IL-6 zu interagieren, was das Fehlen des Proteins in den Ansätzen zeigt, in denen die Präzipitation mittels IL-6 vorgenommen wurde. Das mFP, welches die Punktmutante des mL-6R α^{C6S} (Spuren 21-24) enthielt, war ebenfalls nicht fähig an IL-6 zu binden.

Ein solch drastischer Effekt der Mutation der Disulfidbrücke auf die *site I*-Interaktion wurde bei vorangegangenen Studien im Kontext des humanen IL-6R α -Proteins nicht beobachtet [64]. Dieser Teil des Experimentes zeigt, dass die Ausbildung der intramolekularen Disulfidbrücke zwischen der Pr $\Delta D1$ -Region und der Domäne D2 für die Funktionalität des mL-6R α unerlässlich ist.

Das mL-6-RFP, welches die Sequenz des mL-6R α^{wt} enthält (Spuren 9-12) konnte durch immobilisiertes IL-6 präzipitiert werden. Damit steht ein Fusionsprotein zur Verfügung, das in weiterführenden Experimenten bezüglich seiner Funktionalität als Inhibitor untersucht werden konnte. Durch die IL-6-Präzipitation kann ein positiver Nachweis für eine *site I*-Interaktion erbracht werden, welche die Voraussetzung zur Hemmung von IL-6 darstellt.

Im vorangegangenen Abschnitt wurde gezeigt, dass die Mutation des LVL-Motivs (IL-6R α^{SGS}) vergleichsweise gut toleriert wird, jedoch eine Auswirkung auf die IL-6-abhängige Signaltransduktion zeigt. Diese Daten konnten durch den vorliegenden Versuch weiter untermauert werden. Im Vergleich zum mL-6-RFP wt wurde reproduzierbar eine signifikant geringere Menge des mL-6-RFP SGS durch immobilisierten Liganden präzipitiert (Abb. 3-26B). Damit konnte mit zwei unabhängigen Methoden gezeigt werden, dass die ersten drei N-terminalen Aminosäuren des mL-6R α ebenfalls zur IL-6-Bindung beitragen.

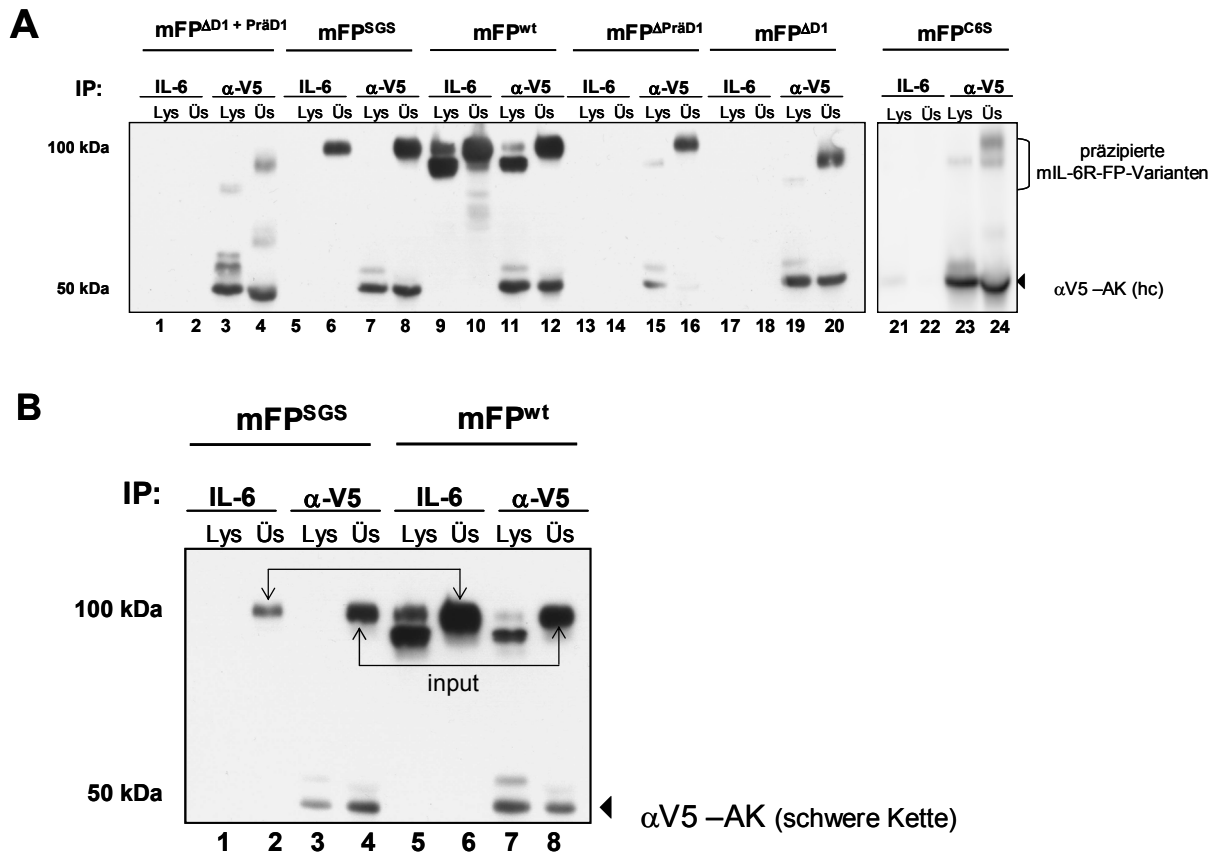


Abbildung 3-26: Bindungstest von verschiedenen mIL-6-RFP-Varianten mit IL-6-Sepharose

A Repräsentatives Präzipitationsexperiment bei dem verschiedene Varianten des mIL-6-RFP mit immobilisiertem V5-Antikörper oder immobilisiertem IL-6 aus konditionierten Überständen (Üs) oder Zelllysaten (Lys) präzipitiert wurde. Nach Denaturierung der Proben wurden die in den Ansätzen enthaltenen Proteine elektrophoretisch aufgetrennt und im Westernblot über das V5-Epitop nachgewiesen.

B Präzipitationsexperiment bei dem rekombinantes mIL-6-RFP^{wt} (mFP^{wt}) oder mIL-6-RFP^{SGS} (mFP^{SGS}) mit immobilisiertem V5-Antikörper oder immobilisiertem IL-6 aus konditionierten Überständen (Üs) oder Zelllysaten (Lys) präzipitiert wurde. Gezeigt wird, dass mittels einer bestimmten Menge immobilisierten V5-Antikörpers eine vergleichbare Menge des mFP^{wt} und des mFP^{SGS} präzipitiert werden kann (vgl. Spuren 4 und 8). Bei Verwendung von IL-6-Sepharose kann im Vergleich (s. Spuren 2 und 6) nur eine signifikant geringere Menge mFP^{SGS} mit dem Liganden präzipitiert werden.

3.6. Biochemische Charakterisierung des mIL-6-RFP

Durch die Präzipitationsexperimente konnte gezeigt werden, dass alle Domänen des mIL-6R α kooperativ zur IL-6 Bindung beitragen. Darüber hinaus konnte der positive Beitrag, der Ig-ähnlichen Domäne D1 zur Sekretion, wie für den humanen IL-6R α beobachtet wurde [65], auch für das murine Protein bestätigt werden. Weiterhin wurde gezeigt, dass ein funktionelles mIL-6-RFP die Domänen D1-D2-D3 des mIL-6R α aufweisen muss, um die Ligandenbindung zu vermitteln. Es ist jedoch notwendig, dass die inhibitorische Aktivität und Spezifität dieses putativen IL-6-Inhibitors noch in weiterführenden Experimenten charakterisiert wird. Die Präzipitation des mIL-6-RFP mit IL-6, wie im vorangegangenen Abschnitt gezeigt wurde, reicht als Nachweis für eine IL-6-Inhibition nicht aus. Grund hierfür

ist, dass die *site 1*-Interaktion im hIL-6-Rezeptorsystem zu agonistischen Effekten führt (vgl. 1.2.1, Abschnitt IL-6R α). Erst die Möglichkeit mit Domänen des gp130 weitere Interaktionen eingehen zu können, führt zur Hemmung des Zytokins.

In den nachfolgenden Abschnitten wird die unter 3.5 eingeführte Kurzbezeichnung mFP^{wt} in Analogie zu Ancey *et al.* [101] zu mL-6-RFP umgewandelt. Dieses Konstrukt enthält die Ig-ähnliche Domäne (im Gegensatz zu dem unter Abschnitt 3.2. beschriebenen mL-6-RFP des Δ D1-Typs).

Das mL-6-RFP wurden stationär in einem eukaryotischen Zellsystem (Hek293) exprimiert. Die Zellen wurden dazu bis zu einer Dichte von 70-80% kultiviert und dann das Wachstumsmedium gegen FCS-freies Medium ausgetauscht. Dadurch sollte der Proteingehalt in den Überständen für weitere biochemische Untersuchungen reduziert werden. Da davon ausgegangen werden kann, dass konditionierte Überstände nicht ganz proteinfrei sind, wurde parallel ein Kontrollüberstand mit Leervektor-transfizierten Zellen generiert und nach der gleichen Prozedur aufgearbeitet. Dieser sollte in den nachfolgenden Versuchen gewährleisten, dass die beobachteten Effekte auf der Anwesenheit des mL-6-RFP beruhen und keine Sekundäreffekte des Überstandes darstellen (basierend auf pH-Änderung, Glukose-Mangel, andere Proteine etc.).

Nach 48 h wurden die Überstände gesammelt und durch Ultrafiltration zehnfach konzentriert. Der Gehalt an mL-6-RFP im Konzentrat wurde mittels ELISA-Messung über den IL-6R α -Anteil quantifiziert. Die Meßwerte variierten je nach Expression zwischen 1,6 und 2,2 μ g/ml. Aliquots von 20 μ l des Überstandes von Leervektor-transfizierten Zellen (bezeichnet als Kontrolle) und von mL-6-RFP-exprimierenden Zellen wurde unter reduzierenden (Zusatz von β -Mercaptoethanol) oder unter nicht reduzierenden Bedingungen (ohne Zusatz von β -Mercaptoethanol) denaturiert und die Proben als Duplikat elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wurden die Gele geteilt und die Proteine sowohl durch Silberfärbung nachgewiesen als auch im Westernblot analysiert (Abbildung 3-27). Die im Silbergel analysierte mL-6-RFP-Menge beträgt 4 ng (1x) bzw. 40 ng (10x).

Das mL-6-RFP besteht (nach Abspaltung des Signalpeptids) aus 672 Aminosäuren, woraus ein theoretisches Molekulargewicht von ca. 74kDa errechnet werden kann. Da die im mL-6-RFP enthaltenen Proteindomänen zahlreiche Glykosylierungsstellen aufweisen, weist mL-6-RFP in der Silberfärbung unter reduzierenden/ nicht-reduzierenden Bedingungen (nach 10-facher Konzentration des Überstandes) eine Migrationsgeschwindigkeit auf, welche einem Molekulargewicht von etwa 95-100 kDa entspricht. Die Identität des mL-6-RFP konnte durch den Nachweis des V5-tags in einer Immundetektion bestätigt werden. Erwartungsgemäß konnten eine Reihe weiterer Proteine (Molekulargewicht <75 kDa) im Überstand detektiert werden. Diese Verunreinigungen sind im Gegensatz zum mL-6-RFP sensitiv gegenüber der Behandlung mit β -Mercaptoethanol. Diese nicht weiter

charakterisierten Proteine unterscheiden sich jedoch nicht gravierend in ihrer Menge bzw. Zusammensetzung bei Leervektor-transfizierten Zellen und mIL-6-RFP sezernierenden Zellen. Da ihre Molekulargewichte deutlich vom mIL-6-RFP abweichen, würde dies z.B. eine weitere Aufreinigung durch Gelfiltration erlauben.

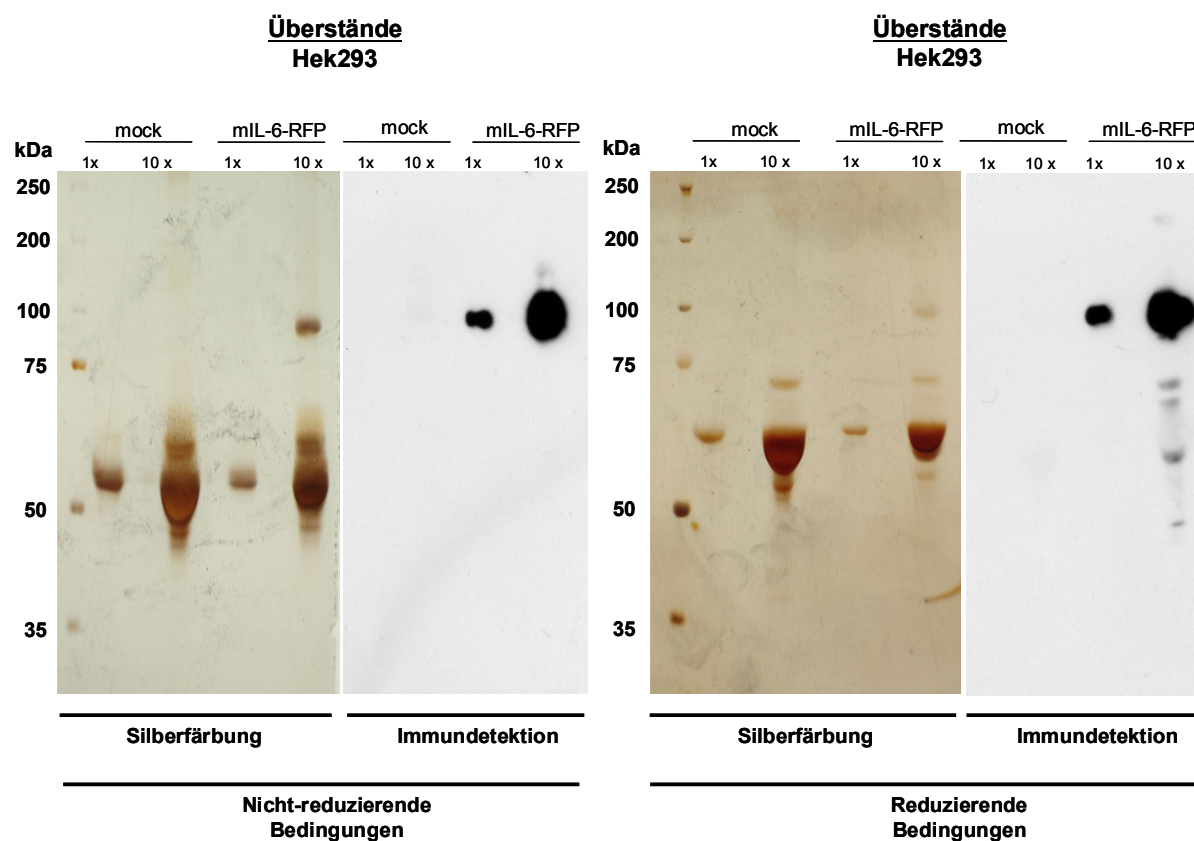


Abbildung 3-27: Vergleich von Kontroll-Überständen mit mIL-6-RFP haltigen Überständen nach Silberfärbung und Westernblot-Analyse. Konditionierte Überstände von Hek293-Zellen (stabil mit *pcDNA3.1-mIL-6-RFP-V5-His* oder *mock*-transfiziert, d.h. ohne Transgen) wurden durch Ultrafiltration 10-fach konzentriert. Vor der Analyse wurden die Proben unter reduzierenden oder nicht-reduzierenden Bedingungen denaturiert. Die in den Überständen enthaltenen Proteine wurden in einem 8,75% SDS-PAA-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und Gelfragmente parallel einer Silberfärbung bzw. einer Immundetektion unterzogen.

mIL-6-RFP (berechnetes Molekulargewicht: ca. 74 kDa) weist somit im Vergleich zum Zielmolekül Interleukin-6 (berechnetes Molekulargewicht: 22 kDa) ein 3,4-fach höheres Molekulargewicht auf. Zur Neutralisierung einer definierten Zytokinmenge ist mindestens ein theoretisches 1:1-Verhältnis von Inhibitor/Zytokin erforderlich. Daher wird in den nachfolgenden Abschnitten stets zusätzlich zu den verwendeten Proteinkonzentrationen das molare Verhältnis angegeben.

3.7. Charakterisierung der inhibitorischen Wirkung und Spezifität des mL-6-RFP

Zahlreiche akute und chronische humane Erkrankungen gehen mit einer Erhöhung der Serum-IL-6-Spiegel einher. Das Zytokin IL-6 induziert die Aktivierung der MAP-Kinase-Kaskade und des JAK/STAT-Signaltransduktionsweges in verschiedenen Zelltypen. Eine zentrale Rolle im Entzündungsgeschehen spielt die Aktivierung des Transkriptionsfaktors STAT3, der aufgrund der Induktion proinflammatorischer Zielgene und antiapoptotischen Effekte zur Progression einer Erkrankung beiträgt.

Das durch IL-6 vermittelte extrazelluläre Signal, welches durch Bindung des Zytokins an die Extrazellulärregion des Rezeptors initiiert wird, wird über die Transmembrandomänen ins Zellinnere übertragen. Dort wird das extrazelluläre Signal durch assoziierte Tyrosinkinasen (JAKs) an eine Reihe von Molekülen weitergeleitet, die an spezifischen Tyrosinmotiven phosphoryliert werden. Diese Modifikation kann immunologisch durch den Nachweis der Phosphorylierung eines Tyrosins an Position 705 von STAT3 nachgewiesen werden. Weitere Möglichkeiten die Aktivierung des JAK/STAT-Signalweges zu untersuchen bestehen darin, die DNA-Bindung von STAT-Faktoren in einem so genannten *electrophoretic mobility shift assay* (EMSA) (s. 2.8.13) nachzuweisen oder die Einleitung von Genexpressionsvorgängen in einem Reporter-Gen-Assay zu messen (s. 2.8.16).

3.7.1. Aktivierung des JAK/STAT Signalweges durch IL-6 verschiedener Spezies

Voraussetzung für die Stimulierbarkeit verschiedener Zelltypen mit IL-6 ist die Fähigkeit des IL-6R α das Zytokin zu binden. Hierbei ist die Spezies-Spezifität von besonderer Bedeutung: Humanes IL-6 wirkt sowohl auf murine Zellen und Zellen der Ratte [3], jedoch erfolgt keine Bindung dieser Zytokine an den hIL-6R α . Die Ursache hierfür ist, dass die Affinität von IL-6 der Maus oder Ratte zu humanem IL-6R α zu gering ist, um zur Oligomerisierung der Rezeptorproteine zu führen. Daher kann auch ein Fusionsprotein-Inhibitor, der auf humanen Rezeptordomänen basiert, nur das Zytokin der eigenen Spezies hemmen.

Da verschiedenen Zelltypen, welche responsiv für IL-6 sind, zur weiteren Charakterisierung des Inhibitors verwendet werden sollen, ist die Frage zu klären, ob IL-6 aus verschiedenen Spezies den JAK/STAT-Signaltransduktionsweg in einem bestimmten Zelltyp ähnlich effizient aktivieren können. Hierbei spielt natürlich auch die Affinität der Proteine zum entsprechenden Rezeptor eine Rolle. Obwohl der Mechanismus für die Bindung vergleichbar ist, bedeutet dies nicht zwangsläufig, dass die Interaktion mit gleicher Affinität erfolgt. Das heißt, dass bei gleichen Zytokinkonzentrationen die *off-rate* des Rezeptor-gebundenen Zytokins unterschiedlich sein kann. Im Fall einer erhöhten *off-rate* z.B. würde der Signalweg bei gleicher Zytokinkonzentration schwächer aktiviert. Gleichzeitig können aber auch signifikante Unterschiede in der Rezeptorexpression ähnliche Effekte verursachen.

Zur Erstellung einer Dosis-Wirkungsreihe für das Zytokin IL-6 wurden HepG2- (Spezies: Mensch), B9- (Spezies: Maus) und FaO-Zellen (Spezies: Ratte) mit aufsteigenden Konzentrationen des Zytokins stimuliert und Kernextrakte (s. 2.8.11) hergestellt. Zum Nachweis der Aktivierung von Transkriptionsfaktoren der STAT-Familie wurde ein *electrophoretic mobility shift assay* (EMSA) durchgeführt. Die DNA-Bindung aktivierter STAT-Spezies wurde durch Inkubation identischer Konzentrationen der nukleären Proteinfraction mit einer STAT-spezifischen, radioaktiv-(P³²)-markierten DNA-Sonde nachgewiesen. Abbildung 3-28 zeigt Autoradiographien dieser EMSA-Gele. Wie in der Literatur beschrieben, konnten in den nukleären Extrakten drei distinkte Banden mit unterschiedlichen Laufhöhen beobachtet werden, die STAT3/STAT3, STAT3/STAT1 und STAT1/STAT1-Dimeren entsprechen [125-127]. Weiterhin verdeutlicht die Abbildung, dass nach IL-6 Stimulation STAT3/3-Homodimere das stärkste Signal lieferten und sich bereits bei relativ geringen Zytokin-Konzentrationen ausbildeten. Bei höheren Zytokin-Konzentrationen konnte eine Zunahme der Intensität der Signale für Heterodimere (STAT3/1) und STAT1/1-Homodimere beobachtet werden.

Ein bemerkenswerter Unterschied besteht darin, dass die humane Zelllinie (HepG2) nur auf humanes IL-6 reagiert. Murine Zellen (B9) zeigten sowohl nach Stimulation mit humanem als auch murinem IL-6 eine starke Aktivierung von STAT3. Allerdings wurde die maximale Signalstärke bei Behandlung der Zellen mit murinem IL-6 bereits bei einer 5- 10-fach geringeren Konzentration (ca. 100 pg/ml) erreicht. Dieser Effekt beruht vermutlich auf der nachweislich geringeren Affinität des humanen IL-6 zu den murinen Rezeptorproteinen [72]. Die Aktivierung der unterschiedlichen STAT-Spezies in FaO-Zellen war bei humanem IL-6 und bei homologer Stimulation nicht signifikant unterschiedlich.

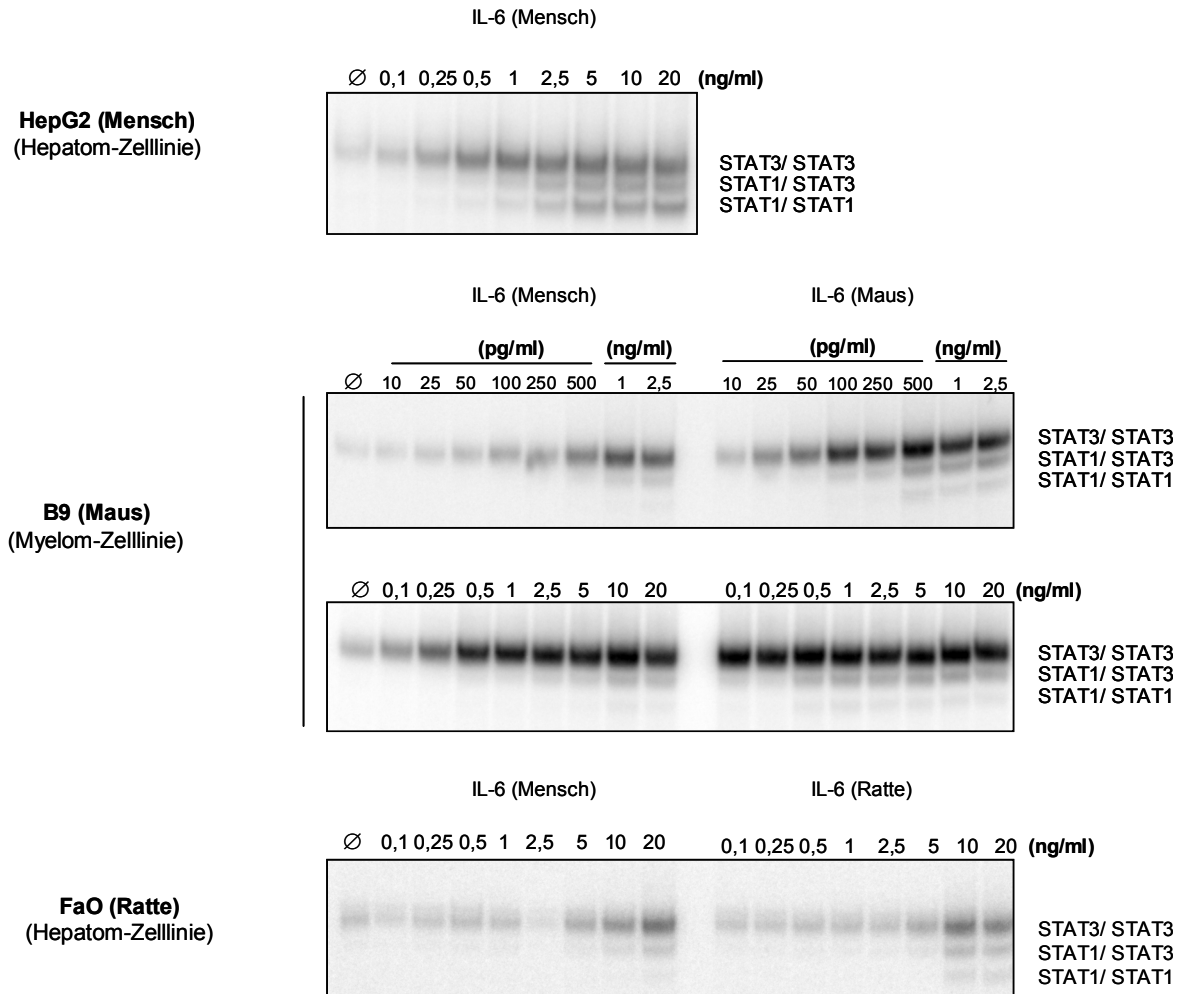


Abbildung 3-28: Vergleich der STAT3 und STAT1-Aktivierung durch IL-6 verschiedener Spezies (Mensch, Maus und Ratte)

Für HepG2 (humane Zellen), B9 (murine Zellen) und FaO (Ratten-Zellen) wurde eine Dosis-Wirkungsreihe mit IL-6 verschiedener Spezies erstellt (Stimulationszeit: 20 min) und Kernextrakte dieser Zellen präpariert. Gleiche Konzentrationen des nukleären Proteins wurden mit einer radioaktiv markierten DNA-Sonde (SIEm67) inkubiert. Die aktivierten, DNA-gebundenen STAT-Spezies zeigen eine geringere Migrationsgeschwindigkeit als freie Proteine und wurden in der PAA-Gelelektrophorese zurückgehalten. Diese wurden nach Abschluss der Elektrophorese durch Autoradiographie visualisiert.

3.7.2. mL-6-RFP hemmt IL-6 unterschiedlicher Spezies

Wie im vorangegangenen Abschnitt demonstriert wurde, kann in murinen B9-Zellen der JAK/STAT-Signaltransduktionsweg sowohl durch murines als auch humanes IL-6 aktiviert werden. In BLAST-Analysen der IL-6-Rezeptor-Untereinheiten und der Zytokine von Maus und Ratte zeigte sich eine auffallende Identität bzw. Homologie auf Seiten des IL-6R α (88 / 92%), des gp130 (87 / 93%) und des IL-6 (85 / 93%).

Das führte zur der Hypothese, dass mL-6-RFP ebenfalls IL-6 der Ratte hemmen könnte. Um die Wirksamkeit des mL-6-RFP auf das Zytokin IL-6 dieser verschiedenen Spezies zu

untersuchen, wurden die betreffenden Zytokine in unterschiedlicher Konzentration mit einer standardisierten mL-6-RFP-Menge (190 ng/ml) für 30 min bei RT vorinkubiert. Wie bereits im vorangegangenen Abschnitt erwähnt, ergeben sich durch Variation der Zytokin-Konzentration (5, 10 oder 20 ng/ml) unterschiedliche stöchiometrische Verhältnisse des mL-6-RFP (d.h. ca. 11-, 6- oder 3-fach molarer Überschuss des mL-6-RFP) zum Zytokin. Da mL-6-RFP stets im Überschuss zur jeweiligen Zytokin-Konzentration vorliegen muss, kann unterhalb eines 1:1-Verhältnisses das Zytokin nicht mehr vollständig neutralisiert werden. Daher ist eine Aktivierung des JAK/STAT-Signalweges durch Zytokinmoleküle möglich, welche nicht durch mL-6-RFP komplexiert wurden.

Zum Nachweis der Hemmung IL-6-vermittelter Antworten durch Zugabe des mL-6-RFP wurden die Zelllinien mit einem Gemisch aus Fusionsprotein und IL-6 der eigenen Spezies (d.h. homologe Bindung des IL-6 zum IL-6R α der Zelle, aber nicht zum IL-6R α -Anteil des mL-6-RFP) für 20 min stimuliert. Proteine dieser Zelllysate wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und das Verhältnis von phosphoryliertem STAT3 im mL-6-RFP-Ansatz und der Kontrolle (ohne mL-6-RFP) nach anschließender Immundetektion verglichen. Durch Gegenfärbung der Membran mit einem STAT3-spezifischen Antikörper wurde eine einheitliche Beladung verifiziert. Abbildung 3-29 zeigt eine Zusammenstellung repräsentativer Experimente. Daraus wird ersichtlich, dass das mL-6-RFP die Wirkung des Zytokins, gemessen an der Aktivierung des Transkriptionsfaktors STAT3, in allen drei Spezies signifikant inhibiert.

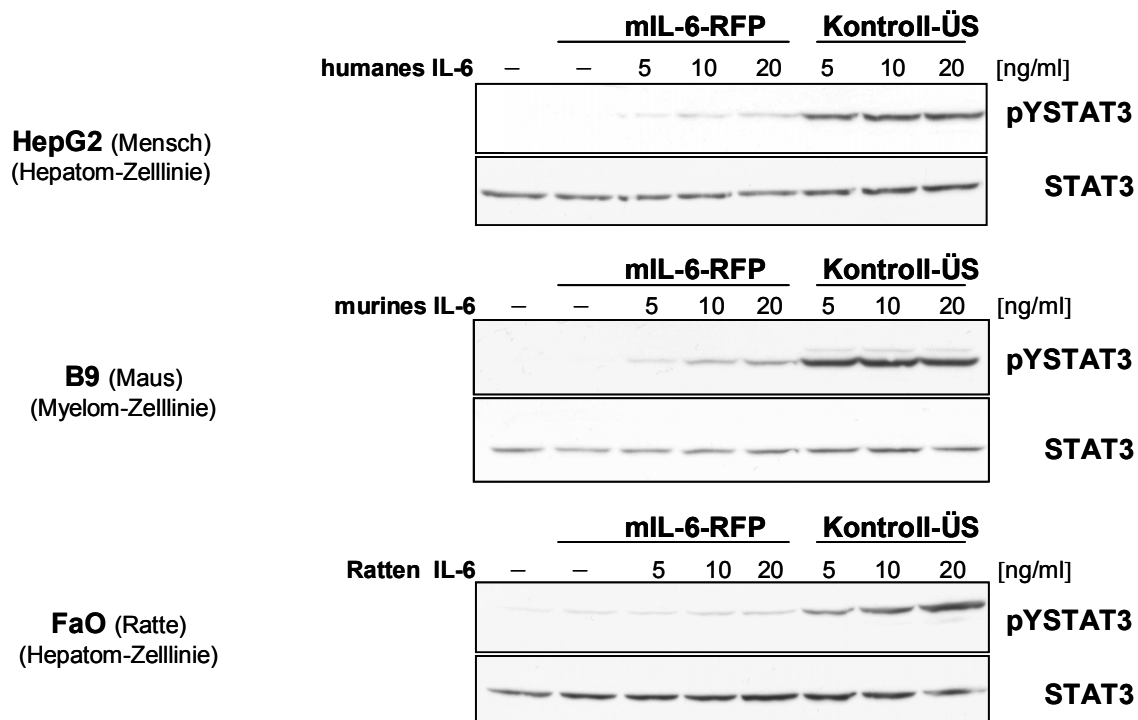


Abbildung 3-29: mIL-6-RFP zeigt Spezies-übergreifende Aktivität

Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Inhibitionsexperiment. 190 ng/ml mIL-6-RFP (enthalten in konditionierten Überständen der beschriebenen Hek293-Zellen) oder Kontrollüberstände wurden mit Zytokinen der angegebenen Konzentration präinkubiert und für 20 min stimuliert. Das stöchiometrische Verhältnis von Inhibitor zu Zytokin beträgt bei aufsteigenden Zytokinkonzentrationen jeweils 11, 6 und 3:1. Anschließend wurden die Zellen lysiert und die enthaltenen zellulären Proteine in einem 10% SDS-PAA-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und einer Westernblot-Analyse unterzogen. Die Phosphorylierung von STAT3 wurde mit einem pY⁷⁰⁵-STAT3-spezifischem Antikörper nachgewiesen. Zur Beladungskontrolle wurde eine Gegenfärbung für STAT3 durchgeführt.

3.7.3. mIL-6-RFP hemmt spezifisch die IL-6-vermittelte Signaltransduktion

Für einen Einsatz des Fusionsproteins als IL-6-Inhibitor ist es unerlässlich, die Spezifität nachzuweisen und so sicher zu stellen, dass strukturell verwandte Zytokine nicht gehemmt werden. Während der IL-6R α die spezifische Untereinheit des Inhibitors darstellt, wird die Rezeptorkette gp130 von weiteren Zytokinen (CNTF, IL-11, IL-27, OSM, LIF, CLC, CT-1) genutzt. Da an der Ligandenbindung stets die gleiche Region (CBM von gp130) involviert ist, könnten die Domänen, die zur Konstruktion des Inhibitors verwendet wurden, Wechselwirkungen mit anderen IL-6-Typ Zytokinen eingehen.

Da IL-6 als Hauptmediator der Produktion von Akut-Phase-Proteinen in der Leber gilt, wurde eine humane Hepatom-Zelllinie (HepG2) zur Charakterisierung der Spezifität des mIL-6-RFP eingesetzt. Diese Zellen sind ebenfalls durch ein breites Spektrum anderer Zytokine der IL-6-Typ-Familie wie IL-11, IL-27, LIF und OSM stimulierbar.

Um auszuschliessen, dass eine Kreuzreaktivität zu anderen strukturell verwandten Zytokinen besteht, wurden mehrere Kandidaten aus der Gruppe der langkettigen 4- α -Helix-Bündel-Zytokine getestet. Für das Zytokin OSM wurde beispielsweise beschrieben, dass es bereits ohne Anwesenheit einer zweiten Rezeptorkette mit niedriger Affinität mit gp130 assoziiert [128]. Das Zytokin IL-11 wurde ausgewählt, da es in Analogie zu IL-6 nach Rekrutierung eines spezifischen α -Rezeptors (dem IL-11R α ; Abb. 1-2) in Verbindung mit gp130-Homodimeren signalisiert.

Um die Wirksamkeit und gleichzeitig die Spezifität des mIL-6-RFP zu untersuchen, wurden verschiedene Konzentrationen der Zytokine mit und ohne Zusatz von mIL-6-RFP (190 ng/ml bzw. für IL-11 mit 760 ng/ml) für 30 min präinkubiert. Die entsprechenden molaren Überschüsse des Inhibitors gehen aus Abbildung 3-29 hervor.

Nach 20 minütiger Stimulation der HepG2-Zellen mit den angegebenen Komponenten (s. Abb. 3-30) wurden zelluläre Proteine in einem 10%igen SDS-PAA-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend wurde die Tyrosinphosphorylierung des Transkriptionsfaktors STAT3 an Position 705 im Westernblot analysiert. Die durch Komplexierung des Zytokins mit mIL-6-RFP bewirkte Hemmung der Aktivierung des JAK/STAT-Signalweges kann anhand reduzierter Tyrosinphosphorylierung des STAT3 ermittelt werden.

Eine deutliche Hemmung der Tyrosin-Phosphorylierung von STAT3 ist ausschließlich in den mit IL-6 behandelten Ansätzen bei Zugabe des mL-6-RFP zu beobachten. Dieses übt jedoch auf die IL-11 bzw. OSM-vermittelte STAT3-Aktivierung keinen Einfluß aus.

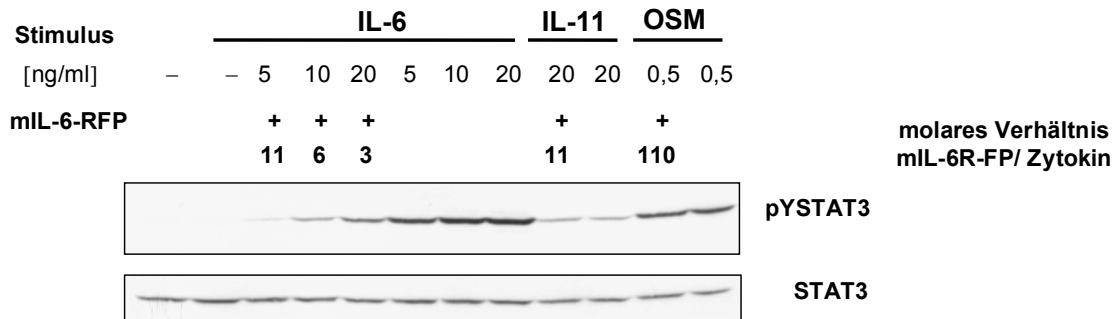


Abbildung 3-30: Inhibitorische Wirkung und Spezifität des mL-6-RFP

Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Inhibitionsexperiment. Gleiche Volumina konditionierter Überstände von mL-6-RFP produzierenden Hek293-Zellen (10-fach konzentriert; 1,9µg/ml) oder frisches Wachstumsmedium wurden mit Zytokinlösungen unterschiedlicher Konzentration für 30 min bei RT präinkubiert. Stöchiometrische Verhältnisse von Zytokin zu Inhibitor sind als molares Verhältnis angegeben. Anschließend wurden die HepG2-Zellen mit IL-6, IL-11 bzw. OSM +/- Zusatz von mL-6-RFP für 20 min stimuliert. Nach Lyse der Zellen wurden die Proteine in einem 10% SDS-PAA-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und nach der Übertragung auf eine PVDF-Membran einer Immundetektion unterzogen. Die Phosphorylierung von STAT3 wurde mit einem Phospho-Tyrosin 705 –spezifischem Antikörper nachgewiesen. Zur Kontrolle der Beladung wurde die Membran einer Gegenfärbung für STAT3 unterzogen.

Um die hemmende Wirkung des murinen IL-6-Inhibitors (mL-6-RFP) eingehender zu untersuchen, wurden Reporteragen-Assays durchgeführt. Da sich HepG2-Zellen nur vergleichsweise schwach mit IL-11 aktivieren lassen, soll nachfolgend der Einfluss von mL-6-RFP auf Geninduktion, die nach Bindung der Zytokine IL-6 oder OSM bewirkt wird, im Reporteragen-Assay untersucht werden. Dazu wurden HepG2-Zellen mit einem Plasmid transfiziert, welches die Transkription des Reporteragens (*firefly*-Luziferase) unter Kontrolle eines STAT3-responsiven Promotors erlaubt. Die gebildete Luziferase-Menge ist dabei ein Maß für die Genaktivierung, die durch einen äußeren Stimulus hervorgerufen wird. Zur Normierung der Messwerte wurde ein Plasmid ko-transfiziert, welches die β -Galaktosidase unter einem konstitutiv-aktiven Promotor exprimiert. Die Zellen wurden 12 h nach Transfektion mit den Reporter-Plasmiden mit Zytokinen in unterschiedlichen Konzentrationen stimuliert. Überstände, die mL-6-RFP enthalten oder ein entsprechendes Volumen des unter Abschnitt 3.6. beschriebenen Kontrollüberstands wurden gleichzeitig den Zytokinen zugesetzt. Um selbst schwache inhibitorische Effekt zu erfassen, wurden geringe Konzentrationen des hochaktiven Zytokins OSM eingesetzt.

Nach einer Dauer von 18 h wurden die Zellen lysiert und die Reporteragen-Aktivität in den Zelllysaten bestimmt. Wie Abbildung 3-31 zeigt, konnte auch in diesem experimentellen

Ansatz eine Dosis-abhängige Wirkung des mL-6-RFP auf IL-6 beobachtet werden, während keine Hemmung der OSM-vermittelten Reporter-gen-Aktivität erfolgte. Dieses repräsentative Experiment demonstriert, dass mL-6-RFP in einem 5-fach molaren Überschuss zur IL-6-Konzentration die Induktion des α 2M-Promotors signifikant inhibiert, während auch ein 38-facher Überschuss von Fusionsprotein keinen hemmenden Einfluß auf die OSM-vermittelte Aktivierung des JAK/STAT-Signalweges ausübt. Daher steht mit dem mL-6-RFP ein IL-6-spezifischer Inhibitor zur Verfügung, der keine Kreuzreaktivität zu verschiedenen Mitgliedern der Familie der 4- α Helix-Bündel-Zytokine IL-11 und OSM aufweist.

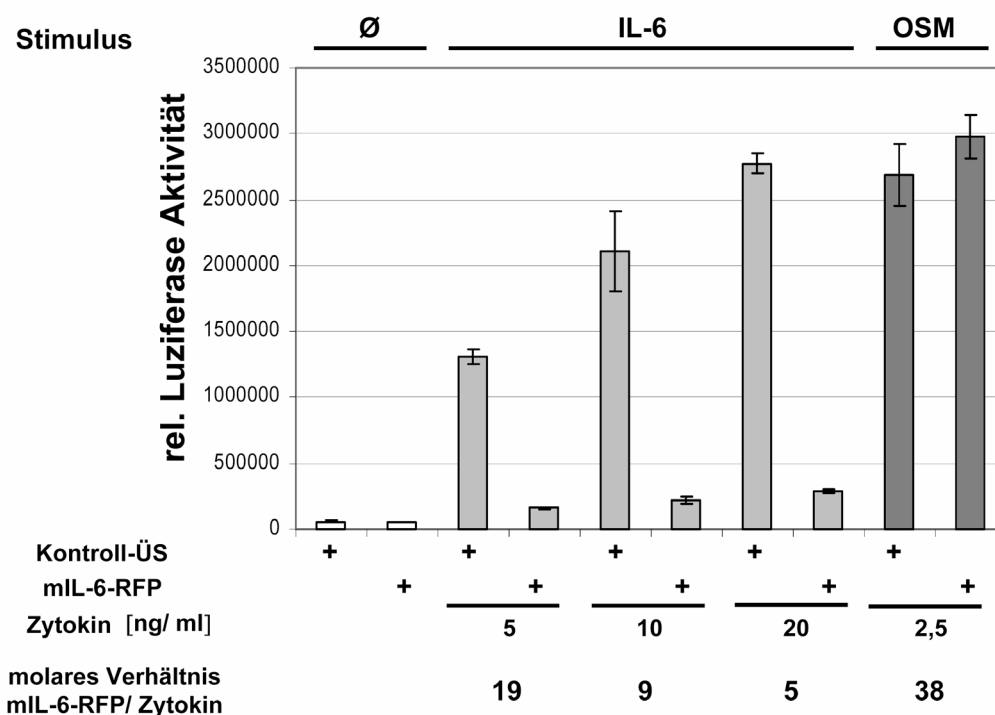


Abbildung 3-31: mL-6-RFP hemmt spezifisch die Wirkung von IL-6 im Reporter-gen-Assay. HepG2-Zellen wurden transient mit dem STAT3-responsiven α 2M-*firefly*-Luziferase-Reporterkonstrukt und der gleichen Konzentration eines Kontrollplasmids, welches die konstitutive Expression der β -Galaktosidase bewirkt, kotransfiziert. Die Zellen wurden 18 h mit den Gemischen aus Zytokin/Inhibitor oder Zytokin/Kontrollüberstand inkubiert. Die Luziferase-Aktivität wurde aus den Lysaten dieser Zellen bestimmt. Die Werte wurden auf die β -Galaktosidase-Messwerte normalisiert. In der Abbildung sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten dargestellt.

3.7.4. mL-6-RFP inhibiert die IL-6 vermittelte Proliferation von B9-Zellen stärker als ein antagonistischer Antikörper gegen mL-6R α

B9-Hybridomzellen, die nur in Abhängigkeit von IL-6 proliferieren, werden vielfach zur Quantifizierung dieses Zytokins eingesetzt. Diese Zelllinie besitzt eine ED₅₀ von 20-60 pg/ml und ist damit ausgesprochen sensitiv für das Zytokin. IL-6 hat im Proliferationsprozess eine

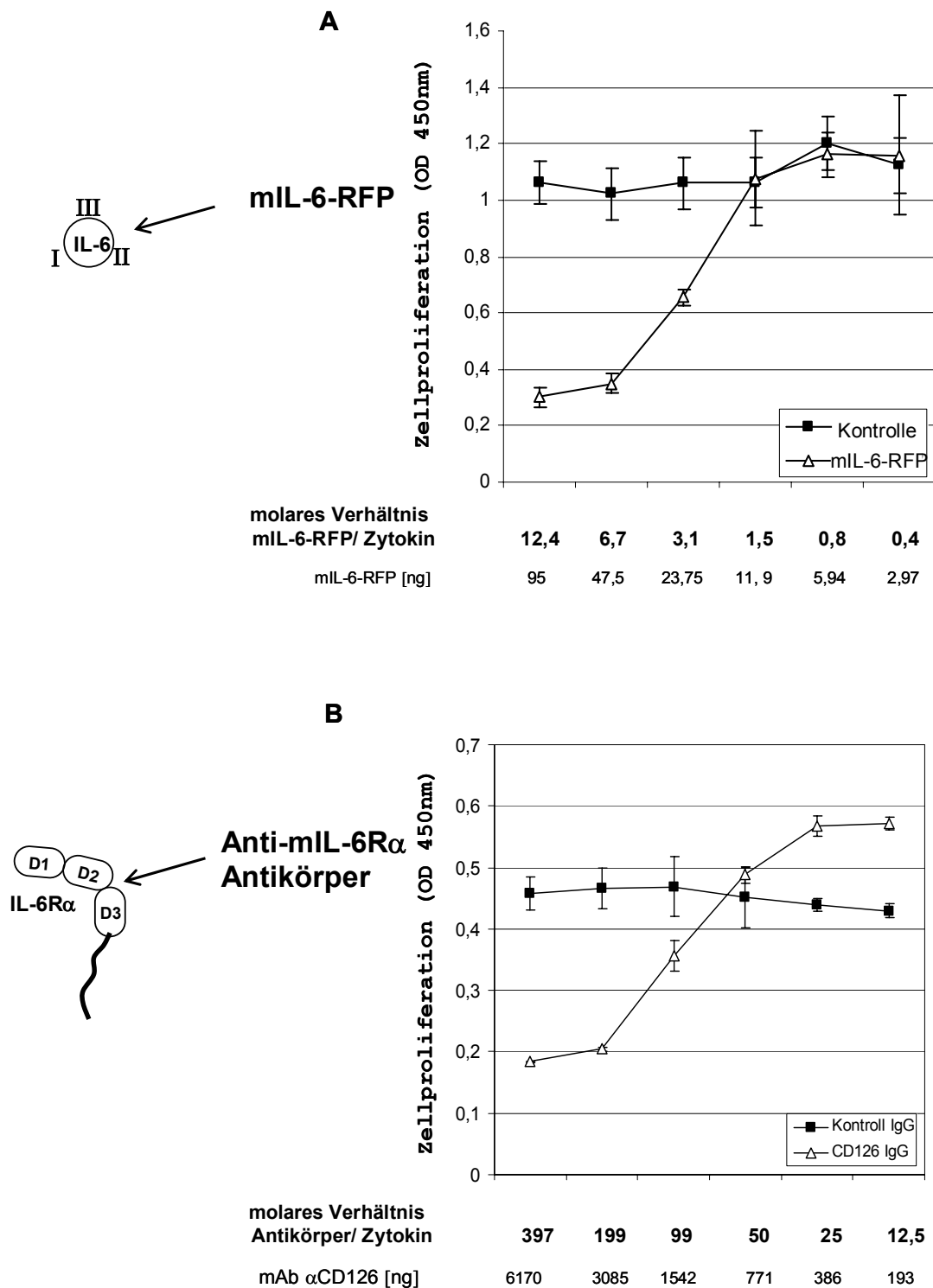
duale Funktion, da es durch Induktion anti-apoptotischer Gene als Überlebensfaktor wirkt und die Proliferation direkt durch Aktivierung der MAPK-Kaskade vorantreibt. Diese Rolle wird IL-6 auch in Erkrankungen wie dem malignen Myelom zugesprochen. Daher ist die Demonstration des inhibitorischen Effektes in einem Tumormodell von hoher klinischer Relevanz.

Wie unter Abschnitt 1-4 beschrieben, wurden zur Hemmung der biologischen Aktivität von IL-6 unterschiedliche Konzepte entwickelt (s. 1.4.), die entweder den Rezeptor oder das Zytokin als Zielmoleküle definieren. Daher sollte im nachfolgenden Experiment die Effizienz der Hemmung von IL-6-vermittelten Antworten durch das mIL-6-RFP mit der eines Inhibitors einer anderen Kategorie, wie z.B. einem Antikörper, verglichen werden. In der Humantherapie existiert mit Tocilizumab/ MRA ein solcher Inhibitor, der den IL-6-Rezeptor blockiert und im Rahmen einer Anti-IL-6-Therapie eingesetzt wird.

In folgendem Experiment wurde das mIL-6-RFP mit einem inhibitorischen monoklonalen Antikörper gegen den murinen IL-6R α (synonym: anti-CD126-Antikörper [102,103]) hinsichtlich seiner Effizienz verglichen, die IL-6-abhängige Proliferation von Indikatorzellen (B9-Zellen) zu hemmen. Zu diesem Zweck wurden Proliferations-Tests (s. 2.8.15) bei einer Zytokin-Konzentration von 750 pg/ml in Gegenwart (durch Verdünnung) abnehmender Konzentrationen von mIL-6-RFP bzw. des mIL-6R α -Antikörper durchgeführt. Beide Inhibitortypen zielen darauf ab, die Proliferation der Zellen zu hemmen, indem die Aktivierung der Oberflächen-Rezeptoren verhindert wird.

Abbildung 3-32A zeigt, dass zwischen 25 und 50 ng des mIL-6-RFP notwendig waren, um die IL-6-induzierte Proliferation der B9-Zellen nach Stimulation mit 750 pg/ml mIL-6 zu hemmen. Dies entspricht einem 3- bis 7-fachen molaren Überschuss an mIL-6-RFP zum Zytokin. Im Vergleich dazu sind zwischen 1,5 und 3 μ g des Antikörpers nötig, um den gleichen inhibitorischen Effekt zu erzielen (Abbildung 3-32B). Diese Menge entspricht einem 100- bis 200-fachen molaren Überschuss des Antikörpers zum Zytokin. Im direkten Vergleich des Fusionsproteins (MG: ca. 75kDa; unglykosyliert) mit einem inhibitorischen Antikörper (MG: ca. 150 kDa) ist eine 30-fach geringere Menge des mIL-6-RFP zur Hemmung notwendig.

Dieser Versuchsansatz demonstriert einen möglichen Schwachpunkt einer Anti-Zytokin-Therapie durch einen Antikörper gegen den IL-6R α : Im Vergleich zur IL-6-Konzentration bei verschiedenen Erkrankungen (maximale IL-6-Medianwerte zwischen 1,5 -7 ng/ml in der akuten Sepsis [39]) ist die Anzahl von IL-6-R α in löslicher und membrangebundener Form im Vergleich zur Zytokinkonzentration vermutlich um ein Vielfaches höher. Diese müssen im Rahmen einer Anti-IL-6R-Antikörper-Therapie blockiert werden, während das mIL-6-RFP das Zytokin selbst neutralisiert.



Abbildungen 3-32: Wachstums-hemmender Effekt von mIL-6-RFP und einem inhibitorischen mIL-6Rα-Antikörper auf die Proliferation von B9-Zellen

B9-Zellen wurden in Gegenwart von 750 pg/ml murinem IL-6 mit (A) einer Serien-Verdünnung des mIL-6-RFP oder (B) des inhibitorischen mIL-6Rα-Antikörpers (= antiCD126 IgG) kultiviert. Alle Verdünnungen wurden in Kontrollüberständen vorgenommen um Konzentrationseffekte auszuschließen. Die Proliferationsrate wurde mit Zellen verglichen, welche nur unter Zusatz eines äquivalenten Volumens an Kontrollüberstand kultiviert wurden. Nach 60 h wurden lebende Zellen mit Hilfe einer kolorimetrischen Färbung (XTT) quantifiziert.

3.7.5. mIL-6-RFP hemmt das IL-6-transsignaling

Unter *transsignaling* versteht man die Vermittlung von IL-6-Antworten, die durch die lösliche Form des IL-6R α (sIL-6R α) vermittelt wird. Wie unter Abschnitt 1.2.1. beschrieben, können bei der Progression bestimmter Erkrankungen nicht nur die IL-6-Mengen, sondern gleichzeitig auch die Konzentrationen an löslichem IL-6R α (sIL-6R α) ansteigen. Durch den sIL-6R α werden auch Zellen IL-6-responsiv, die den membranständigen Rezeptor nicht tragen.

Der Beitrag des *transsignaling* wird aktuell für eine Reihe von Krankheiten diskutiert [129].

Ähnlich wie bei den vorangegangenen Experimenten wurden Versuchsbedingungen für die Untersuchung des Inhibitors gewählt, die unter gewissen Voraussetzungen der *in vivo* Situation entsprechen können. Für die in Abbildung 3-33 gezeigten Versuche wurden murine Prä-B-zellen (Ba/F3) verwendet, die stabil ein Transgen –humanes gp130– exprimieren. Ba/F3-gp130-Zellen können nur durch den Zusatz von sIL-6R α durch IL-6 aktiviert werden, da ihnen der membranständige Rezeptor fehlt. Zur Stimulation der Zellen wurden entweder (a) IL-6 und sIL-6R α 10 min vorinkubiert und dann mIL-6-RFP für 20 weitere Minuten hinzugeben oder (b) alle Komponenten gleichzeitig zusammengegeben und 30 min inkubiert. Die Zellen wurden anschließend für 20 min mit den Gemischen inkubiert. Durch die unterschiedlichen Vorbehandlungen sollte sich in Ansatz (a) ein präformierter Komplex aus IL-6/sIL-6R α bilden. In einem Gleichgewichtszustand liegt IL-6 natürlich auch zum Teil als freies Molekül vor oder kann aus dem dimeren IL-6/IL-6R α -Komplex freigesetzt werden. In diesem Szenario müsste das mIL-6-RFP entweder sIL-6R α aus dem Komplex mit IL-6 verdrängen oder freigesetztes IL-6 effizienter binden, um so einen Effekt vermitteln zu können. Wenn alle Proteine gleichzeitig inkubiert werden, verschiebt sich automatisch das Gleichgewicht zugunsten des Proteins, welches IL-6 mit höherer Affinität zu binden vermag (Ansatz (b)). Als Kontrolle diente ein Gemisch aus IL-6/sIL-6R mit Kontrollüberständen (Ansatz (c)), welches analog zu Ansatz (b) 30 min vorinkubiert wurde.

Nach 20-minütiger Stimulation der Ba/F3-gp130-Zellen mit den entsprechend behandelten Komponenten wurden die Zellen lysiert und die STAT3-Tyrosin-Phosphorylierung im Westernblot gemessen. Das mIL-6-RFP reduziert in allen Ansätzen deutlich den Anteil an phosphoryliertem STAT3 im Vergleich zum Kontrollüberstand. Jedoch ist der Anteil an pY-STAT3 geringer, wenn IL-6, sIL-6R α und mIL-6-RFP gleichzeitig inkubiert werden. Ursache für diesen Effekt könnte sein, dass mIL-6-RFP in Ansatz (a) erst das Zytokin effizient inhibieren kann, wenn es aus dem dimeren Komplex aus löslichem Rezeptor und Zytokin freigesetzt wurde.

Hiermit konnte also gezeigt werden, dass das mIL-6-RFP auch Antworten unterdrückt, die durch die lösliche Form des IL-6-Rezeptors vermittelt werden (*transsignaling*).

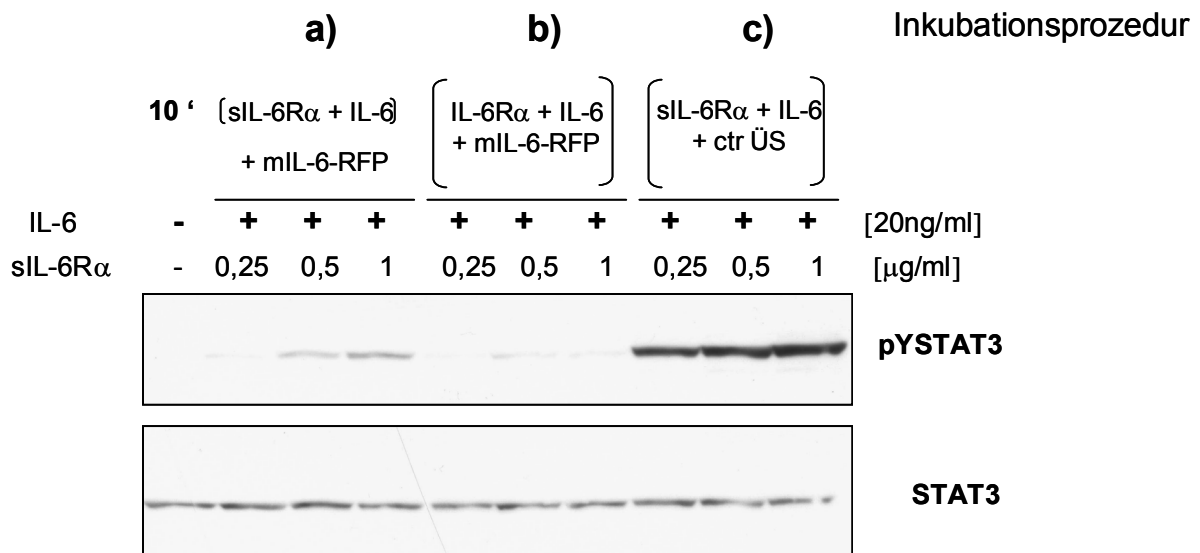


Abbildung 3-33: mL-6-RFP hemmt das IL-6-transsignaling

Die Abbildung zeigt ein repräsentatives Experiment. Ein 6-fach-molarer Überschuss (570 ng) an mL-6-RFP (enthalten in konditionierten Überständen der beschriebenen Hek293-Zellen) oder Kontrollüberstände wurden mit IL-6 und sIL-6R α folgendermaßen inkubiert: **(a)** Vorinkubation von IL-6 und sIL-R α für 10 min und anschließende Inkubation mit mL-6-RFP für 20 min; **(b)** gleichzeitige Inkubation von IL-6 mit sIL-6R α und mL-6-RFP (b) bzw. Kontrollüberstand für 30 min **(c)**. Anschließend wurden die Ba/F3-gp130-Zellen mit den Gemischen 20 min stimuliert und die Proteine der Zelllysate in einem 10% SDS-PAA-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Nach der Übertragung auf eine PVDF-Membran wurde diese einer Immundetektion unterzogen. Die Phosphorylierung von STAT3 wurde mit einem pY-STAT3-spezifischen Antikörper nachgewiesen. Als Ladungskontrolle wurde die Membran einer Gegenfärbung mit einem Antikörper gegen STAT3 unterzogen.

3.8. *In vivo* Expression in Ratten

Um die Wirksamkeit von Inhibitoren wie dem mL-6-RFP *in vivo* nachzuweisen, müssen Tierexperimente durchgeführt werden. Für bestimmte humane Erkrankungen, wie z.B. der Rheumatoiden Arthritis, in denen IL-6 eine Rolle in der Pathogenese spielt, existieren Tiermodelle, in denen die Krankheit künstlich induziert werden kann und die Wirksamkeit neuer Therapien getestet werden kann.

Durch eine Kooperation mit dem Institut für Nephrologie und Immunologie, Universitätsklinikum RWTH Aachen) sollten erste *in vivo* Daten gesammelt werden und im Vorfeld geklärt werden, ob das Fusionsprotein im lebenden Organismus stabil ist, d.h. es nicht durch endogene Proteasen abgebaut wird.

Zur Expression des mL-6-RFP im Versuchstier wurden 500 μ g eines Expressionsplasmids mit der codierenden Sequenz des mL-6-RFP (Inhibitorgruppe) oder ein Kontrollplasmid (Kontrollgruppe) in Muskelgewebe männlicher Wistar-Ratten (200g) mittels eines Elektroporationsverfahrens eingebracht. Nach 24, 48 und 72 h wurden Serumproben gesammelt und die Expression des Fusionsproteins durch Präzipitation über das V5-Epitop

aus den Serumproben nachgewiesen (Abbildung 3-34). Parallel dazu wurde die nach 72 h sezernierte Proteinmenge ($t = 72\text{h}$) im ELISA quantifiziert. Dabei wurde im Plasma eine Konzentration von 0,4- 0,7 ng/ml bestimmt. Die durchgeführten Verbesserungen zur Proteinexpression wie exemplarisch für das humane IL-6-RFP (vgl. Abschnitt 3.1) beschrieben, führten ebenfalls *in vivo* zu einer starken Sekretion des mIL-6-RFP in nicht spezialisierten Geweben (Muskulatur). Damit konnte nachgewiesen werden, dass das Fusionsprotein gut toleriert wird, in lebenden Organismen eine ausreichende Stabilität im Plasma aufweist und somit ein potenter IL-6-Inhibitor, auch für den tierexperimentellen Einsatz zur Verfügung steht.

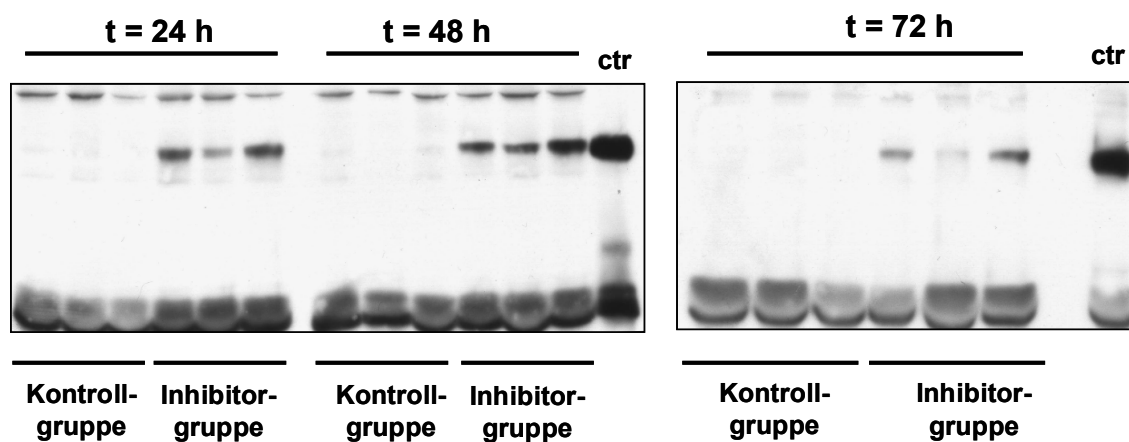


Abbildung 3-34: Immunpräzipitation des *in vivo* exprimierten mIL-6-RFP

Nach Elektroporation ($t=0$) wurden den Versuchstieren zu unterschiedlichen Zeitpunkten Blutproben entnommen. Rekombinantes mIL-6-RFP, welches von den Zellen der Skelettmuskulatur der Versuchstiere sezerniert wurde mittels immobilisierten V5-Antikörpers aus Serumproben der Tiere präzipitiert. Als Kontrolle zur technischen Durchführung des Versuchs dienten 400ng des rekombinant in Hek293-zellen exprimierten mIL-6-RFP, welches unter gleichen Bedingungen dem Serum unbehandelter Versuchstiere zugesetzt wurde. Präzipitiertes Protein wurde im Westernblot analysiert und über das V5-Epitop nachgewiesen.

4 DISKUSSION

Detaillierte Kenntnisse über die Struktur und Funktionsweise eines Proteins ermöglichen die Generierung spezifischer Inhibitoren. Während sich z.B. Enzyme relativ einfach durch niedermolekulare Substanzen hemmen lassen, die mit dem Substrat um die Bindung konkurrieren, ist die Hemmung von Zytokinen eine ungleich schwierigere Aufgabe.

Zytokine rekrutieren ihre Rezeptoren über mehrere Bindungsstellen (*sites*). Dabei interagieren die verschiedenen Proteine über große Kontaktflächen und bedingen so in ihrer Summe die sehr hohe Affinität zueinander. Im Fall der gemeinsam genutzten Rezeptorkette gp130 sind die extrazellulären Domänen D2 und D3 an Interaktionen mit allen IL-6-Typ-Zytokinen (mit Ausnahme von IL-31, welches nicht über gp130 signalisiert) beteiligt. Die Spezifität wird erst durch ein perfektes Zusammenspiel aller untereinander interagierenden Proteine erreicht.

4.1 Besondere strukturelle Merkmale des mIL-6R α

Um spezifisch humanes IL-6 zu hemmen und gleichzeitig das Molekulargewicht des Inhibitors so gering wie möglich zu halten, wurden von Ancey *et al.* [101] diejenigen extrazellulären Domänen der humanen IL-6-Rezeptorproteine fusioniert, die direkt zur Ligandenbindung beitragen. Während im humanen IL-6R α der Verlust der Ig-ähnlichen Domäne keine Auswirkung auf die Ligandenbindung auf Basis des Rezeptors [64] und im hIL-6-RFP zeigt, hat im murinen Protein die gleiche Deletion den Verlust der Bioaktivität zur Folge, obwohl die Hauptinteraktionsfläche des Proteins mit dem Liganden - das CBM - unangetastet ist.

Um eine Erklärung für die fehlende IL-6-Interaktion einer murinen Ig-Deletionsmutante des mIL-6R α im Rahmen des mIL-6-RFP zu finden, wurde ein Struktur-Modell des murinen IL-6R α erstellt. Dieses diente als Ausgangspunkt für Untersuchungen zur Funktion der sogenannten Präd1-Region des mIL-6R α .

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass trotz analoger Funktion des murinen IL-6R α -Rezeptors (bindet auch humanes IL-6) konservierte funktionelle Interaktionen zwischen den einzelnen Domänen existieren, die jedoch für die globale Stabilität des betreffenden Proteins unterschiedliche Relevanz besitzen.

4.1.1. Die Disulfidbrücke

Der IL-6R α ist ein Rezeptorprotein der Klasse I und besteht aus einer Ig-ähnlichen Domäne (N-terminal) und zwei proximal gelegenen Domänen des FNIII-Typs, die das CBM bilden. Ein Charakteristikum dieser Rezeptoren sind vier konservierte Cysteinreste in der N-terminalen Domäne und eine Aminosäuresequenz in Form eines WSXWS-Motivs in der C-terminalen Domäne des CBMs. Der IL-6R α stellt einen Sonderfall dar, da dieser eine zusätzliche Disulfidbrücke aufweist, die zwischen den Domänen D1 und D2 ausgebildet wird. Im murinen IL-6R α befinden sich ebenfalls konservierte Cysteine in der N-terminalen Region (C⁶ in der PräD1-Region) und in der Domäne D2 (C¹⁷¹), die analog zum humanen Protein eine Disulfidbrücke ausbilden können. Im Unterschied zum humanen Protein haben im murinen IL-6R α alle Mutationen z.B. die Deletionen (Δ D1, Δ PräD1) oder die Substitution gegen Serin (C⁶S), die die Ausbildung der Disulfidbrücke unterbinden, den vollständigen Verlust der Oberflächenlokalisierung des Rezeptors zur Folge (Abschnitt 3.4).

Obwohl die Rezeptor-Deletionsmutanten (Δ D1, Δ PräD1) durch Fusions-PCR mit der Signalsequenz des IL-6R α ^{wt} (inkl. identischer 5'UTR) erzeugt wurden, kann nicht vollständig ausgeschlossen werden, dass die fehlende Oberflächenexpression auf fehlgefaltete Proteine zurückgeht, die noch ungespaltene Signalsequenzen enthalten (Spaltung wurde mit dem Programm SignalP überprüft; siehe Anhang 8-3 A-E). Jedoch konnte der gleiche dominant negative Effekt durch Substitution von Cystein⁶ gegen ein Serin erhalten werden, wobei in diesem Fall die Spaltstelle zwischen Signalpeptid und N-Terminus des Rezeptors nicht verändert wurde. Aus diesem Befund kann daher geschlossen werden, dass die Disulfidbrücke ein strukturell notwendiges Motiv für die Oberflächenlokalisierung des Rezeptorproteins darstellt.

Darüber hinaus wurden korrespondierend die Domänen D1-D2-D3 dieser mutierten Rezeptorproteine in Kombination mit gp130 hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur Ligandenbindung getestet. Im Kontext des mL-6-RFP sind die mutierten IL-6R α -Rezeptordomänen nicht in der Lage an IL-6 zu binden. (Abb. 3-25A). Daher hat die Mutation der Disulfidbrücke auch einen negativen Effekt auf die Funktion des CBM des mL-6R α .

Gleichermaßen konnte gezeigt werden, dass weder die Oberflächenexpression noch die biologische Funktion des Rezeptors durch Fusion der PräD1-Region mit den Domänen D2-D3 wiederhergestellt werden kann. Dieser Befund deutet darauf hin, dass die Ig-ähnliche Domäne kooperativ an der Faltung der folgenden Domänen und der effizienten Ausbildung der Disulfidbrücke beteiligt ist. Dieser Effekt zeigt deutlich, dass Domänen auch indirekt zur Ligandenbindung beitragen können, indem sie stabilisierend auf die Gesamtstruktur des Proteins wirken.

4.1.2. Das N-terminale Sequenz-Motiv des IL-6R α

Basierend auf dem Modell des murinen IL-6R α -Proteins konnte einerseits eine stärkere intramolekulare Interaktion der N-terminalen Aminosäuren V² und P³ mit Bindungspartnern in der Domäne D2 im Vergleich zum humanen Protein ermittelt werden. Andererseits wurde auch eine weitere intermolekulare Interaktion der ersten Aminosäure L¹ des murinen IL-6R α mit F⁸⁶ der Ig-ähnlichen Domäne von murinem gp130 postuliert.

Sowohl beim humanen, als auch beim murinen IL-6R α ist die erste Aminosäure ein Leucin, welches eine grosse unpolare Seitenkette besitzt. In der Kristallstruktur des humanen Proteins geht diese Aminosäure eine Interaktion mit F¹⁸³ (in Domäne D2) ein. Im murinen IL-6R α -Protein liegt an der entsprechenden Position ein Serin (S¹⁸⁰) und damit ist kein vergleichbarer hydrophober Bindungspartner konserviert.

Laut des Modells des mL-6R α trägt die erste Aminosäure L¹ des murinen Rezeptors daher zur Stabilität der Region (gebildet von den β -Strängen β C/ β D und dem *loop* L2) wenig bei. Jedoch wird in Anwesenheit von gp130 ein Interaktionspartner zur Verfügung gestellt. Diese einzelne Interaktion trägt dann mit einer Kontaktfläche von etwa 133 Å² zu über 30% des *site* IIIb-Kontaktes und zur Bildung des hexameren Komplexes bei.

4.1.3. Beurteilung der *site* I- und *site* II Kontakte an der IL-6-Bindung im mL-6R α

Die initiale Bildung des Zytokins IL-6 an den IL-6R α erfolgt über die als *site* I bezeichnete Kontaktfläche (vgl. Abschnitt 3.3.4). Wie im Rahmen der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte weisen der humane und murine IL-6R α gravierende Unterschiede in der Stabilität des dimeren Komplexes mit hIL-6.

Im humanen IL-6R α -Protein resultieren 90% der Bindungsenergie aus dem Kontakt von IL-6 zur Domäne D3, wobei die Domäne D3 im Komplex mit IL-6 nicht die Rekrutierung von gp130 vermitteln kann [84]. Das bedeutet, dass im humanen IL-6R α die Domäne D3 ausreicht, um einen Komplex mit IL-6 zu bilden. Dagegen führt beim mL-6R α bereits die Deletion der Ig-ähnlichen Domäne zum Verlust der *site* I-Interaktion, so dass die Bindungsenergie für IL-6 nicht aus Interaktionen dieser Region resultiert.

Anhand des Modells des mL-6R α konnte nach Analyse der Kontaktflächen des murinen IL-6R α mit den Programmen *Molsurfer* und *InterProSurf* eine stärkere Beteiligung von Aminosäuren der Domäne D2 und damit eine Verschiebung des IL-6-Bindungs-*interface* in Richtung der D2-Region gefolgert werden. Besondere Bedeutung kommt dabei den Aminosäuren T¹³³ und N¹³⁴ der *loop*-Region L2 (Teil des Epitops *site* I'; siehe Abbildung 3-14) zwischen den β -Strängen β C und β D zu. Die Resultate aus den Interaktionsstudien und der experimentellen Befunde legen die Interpretation nahe, dass die β -Stränge β C, β D und β F

der Domäne D2 genau ausgerichtet werden müssen, um die an der IL-6-Bindung beteiligten Aminosäuren optimal zu positionieren. Die Disulfidbrücke hat vermutlich besonders im murinen Protein die Aufgabe, die Flexibilität innerhalb der Domäne einzuschränken, indem die Präd1-Region und der β -Strang βF kovalent verknüpft werden. Das erlaubt eine genaue Positionierung der N-terminalen Aminosäuren der Präd1-Region und damit auch die Aminosäuren der *loop* Region, T¹³³ und N¹³⁴, die direkt an der IL-6-Bindung beteiligt sind. Mutationen der Präd1-Region wirken sich somit negativ auf die Stabilität im Bereich der *loop* L2-Region der Domäne D2 und nachweislich auch auf die IL-6-Bindung aus. Um die besondere Bedeutung der Aminosäuren des Epitops *site I'* zu untersuchen, könnten in nachfolgenden Studien diese beiden Aminosäuren mutiert und der Einfluss auf die IL-6-Bindung untersucht werden.

Nach der Bildung eines dimeren Komplexes aus IL-6 und IL-6R α , der über den *site I*-Kontakt gebildet wird, kann gp130 rekrutiert werden. Der nachfolgende Kontakt zum CBM von gp130 erfolgt über die *site II* des IL-6 (Kontakt IIa), der durch Mitwirkung von Aminosäuren der Domäne D3 des IL-6R α (Kontakt IIb) hergestellt wird. Diese Interaktionsfläche erscheint im murinen Rezeptorprotein kleiner als bei den humanen Proteinen. Demnach könnte der *site IIIb*-Interaktion eine größere Bedeutung für die Stabilisierung der IL-6-Bindung zu kommen. Auch der *site III*-Kontakt erfolgt über eine zusammengesetzte Interaktionsfläche zwischen IL-6/ gp130 (*site IIIa*) und IL-6R α / gp130 (*site IIIb*).

4.1.4. Beitrag der ersten Aminosäure des mL-6R α zur *site IIIb*-Kontaktfläche

Im humanen IL-6R α -Protein wurde in der Kristallstruktur eine Interaktion zwischen den Aminosäuren L¹ und F¹⁸³ in der Kristallstruktur nachgewiesen. Diese Bindung wird vermutlich schon während der Proteinfaltung im ER ausgebildet. Der Verlust dieser Interaktion (durch Deletion der Ig-ähnlichen Domäne) ist beim humanen Protein für die Bioaktivität des Rezeptors ohne Bedeutung.

Im Modell des murinen IL-6R α wurden verschiedenen Rotamere für die erste Aminosäure L¹ geprüft, doch diese konnten keinen anderen hydrophoben Bindungspartner in der Domäne D2 kontaktieren. Bei dem beschriebenen Rotamer von L¹ ragt die Seitenkette aus der hydrophilen Oberfläche des Proteins heraus (Abbildung 3-12B/C). Da die Flexibilität durch Peptidbindungen und durch die Beteiligung der nachfolgenden Aminosäuren an hydrophoben Kontakten weiter eingeschränkt ist, wird die Aminosäure relativ stabil in dieser Konformation verbleiben.

Bei Rekrutierung von gp130 kann die Aminosäure L¹ des mL-6R α mit F⁸⁶ in der Ig-ähnlichen Domäne des mgp130 eine weitere stabilisierende Wechselwirkung eingehen. Im humanen gp130 ist ebenfalls eine entsprechende Aminosäure (F⁸⁵) an identischer Position des

Proteins konserviert. Daher könnte das betreffende Phenylalanin im humanen gp130 in einem chimären System (wie bei Verwendung von HepG2 für die Experimente unter Abschnitt 3-4 bereits erfolgt) bei Signaltransduktionsvorgängen die Interaktion vollständig kompensieren. Im humanen Rezeptorkomplex ist diese Aminosäure für die Interaktion von hIL-6R α mit hgp130 vermutlich ohne Bedeutung. Dies lässt sich aber nicht vollständig ausschließen, da weder Varghese *et al.* [81] noch Boulanger *et al.* [79] die Ig-ähnlichen Domäne des hIL-6R α im Komplex mit gp130 untersucht haben.

Um die Rolle der Aminosäure L¹ des IL-6R α und F⁸⁶ von gp130 an der *site* IIIb-Interaktion weiter zu charakterisieren, könnten in weiteren Studien die Effekte von Punktmutationen dieser Aminosäuren näher untersucht werden. Die Auswirkung dieser L¹-Mutation sollte keinen messbaren Einfluss auf die IL-6-Bindung (*site* I-Kontakt) zeigen, sondern die Stabilität des hexameren Komplexes (*site* IIIb) beeinflussen. Diese Mutationen müssten z.B. in Ba/F3-Zellen untersucht werden, die endogen weder IL-6R α noch gp130 exprimieren. Die Punktmutationen in beiden Rezeptoruntereinheiten sollten einen vergleichbaren Effekt auf die Signaltransduktion sowie die Ko-Präzipitation beider Proteine vermitteln.

4.1.5. Elektrostatische Unterschiede bei der IL-6/ IL-6R α -Interaktion

Nicht alle an der Wechselwirkung beteiligten Aminosäuren leisten den gleichen Beitrag zur Bindungsenergie in einem Proteinkomplex. Während hydrophobe Interaktionen in ihrer Summe zur Stabilität beitragen, kann auch eine relativ geringe Anzahl an Aminosäuren über elektrostatische Kräfte die notwendige Energie zur Ligandenbindung vermitteln. In Abbildung 4-1 (Mitte) ist gezeigt, wie die geladenen Aminosäuren auf den Oberflächen von IL-6R α und IL-6 verteilt sind und inwiefern sich deren Positionen im murinen und humanen Protein unterscheiden. Zusätzlich ist eine zwei-dimensionale Projektion der Bindungsflächen von IL-6 und IL6R α beider Spezies dargestellt, in der die Ladungsverteilung in rot (negativ geladen) und blau (positiv geladen) hervorgehoben ist (links). Es ist möglich, dass die fehlende Interaktion von murinem IL-6 mit dem humanen IL-6R α (Spezies-Spezifität) unter anderem auf Unterschieden in der Ladungsverteilung beruht. Dadurch könnten ebenfalls experimentelle Befunde wie die fünffach geringere Affinität für die Interaktion von humanem IL-6 mit murinen Rezeptoruntereinheiten (IL-6R α und gp130) an der Zelloberfläche im Vergleich zur homologen Bindung erklärt werden [130]. Wie bereits erwähnt, ist in Präzipitationsexperimenten darüber hinaus ein dimerer Komplex aus hIL-6 und mIL-6R α ohne gp130 (vermittelt die notwendigen *site* II + *site* III-Kontakte) nicht nachweisbar [123]. Eine Begründung könnte neben dem Verlust von Interaktionsflächen auch eine ungünstigere Positionierung energetisch wichtiger Aminosäuren sein.

Zur Spezies-Spezifität im humanen IL-6-Rezeptorsystem existieren ältere Untersuchungen [131], die auf einem Modell des IL-6R α basieren, welches auf der Kristallstruktur des *growth hormone receptor* Komplex erstellt wurde. Basierend auf der Kristallstruktur und dem verbesserten Modell des mIL-6R α könnte demnach mittels gezielter Mutagenese untersucht werden, ob die Spezifität der Erkennung von murinem und humanem IL-6 durch die Rezeptoren beider Spezies auf einer Inkompatibilität der Oberflächenladungen beruht. Weiterhin könnte versucht werden durch Mutationen an ausgewählten Positionen eine gezielte Veränderung der Oberflächenladungen der Rezeptorproteine durchzuführen, damit eine stärkere Bindung des IL-6 durch das IL-6-RFP erzielt werden kann.

Geladene Aminosäuren an den Interaktionsflächen

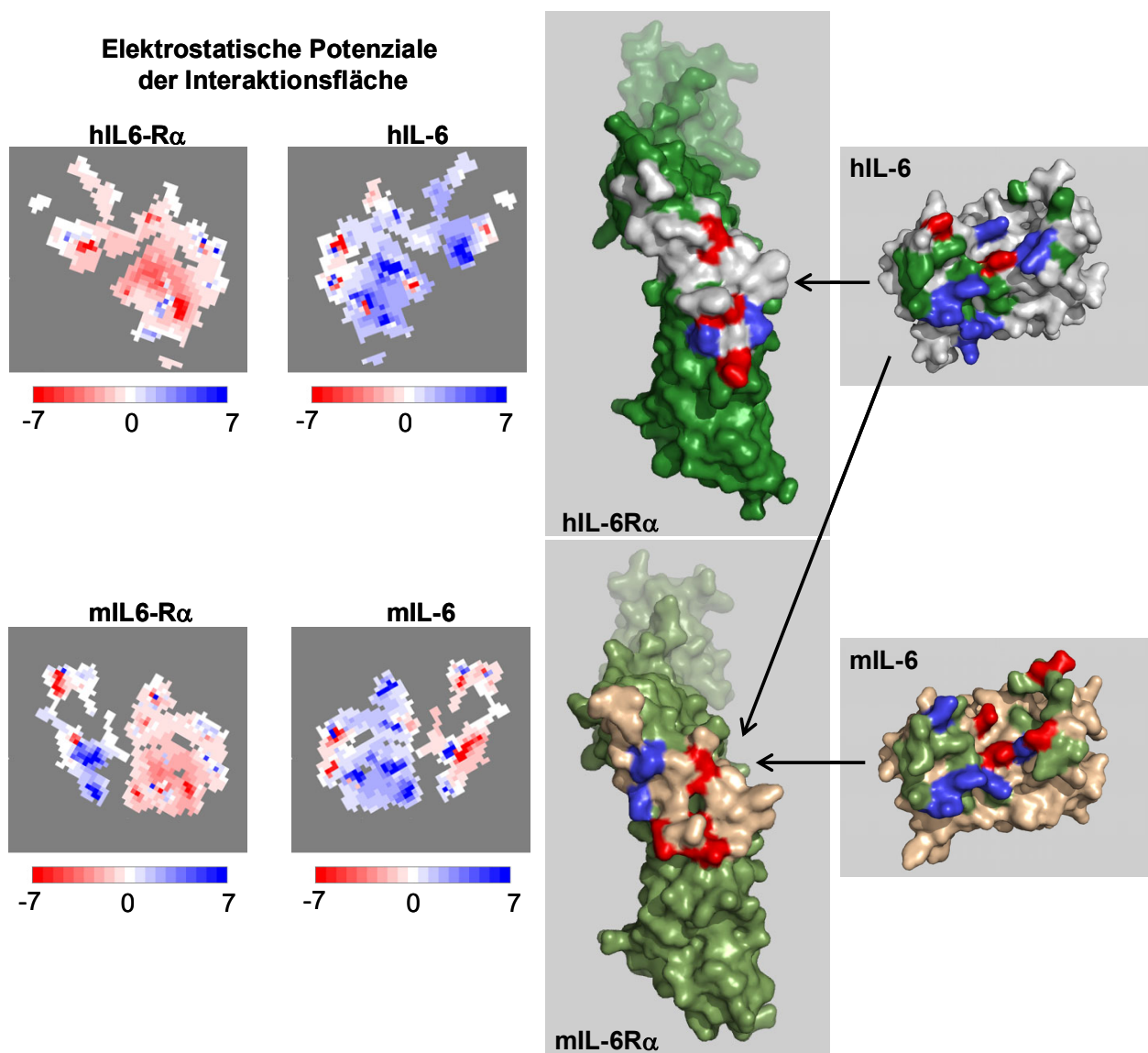


Abbildung 4-1: Unterschiedliche Ladungsverteilung bei IL-6R α und IL-6 bei den murinen und humanen Proteinen

Vergleich der Position geladener Aminosäuren der als *site I* bezeichneten Kontaktflächen auf IL-6 und IL-6R α in der „open book“ Darstellung. Die Liganden können durch „umklappen“ wie bei einem Buch auf die Kontaktfläche „geklappt“ werden. Negative Ladungen sind in blau und positive Ladungen sind entsprechend in rot dargestellt. Ungeladene Bereiche sind jeweils in der Farbe des Interaktionspartners hervorgehoben. Zusätzlich ist die durch das Programm *Molsurfer* berechnete Ladungsverteilung für die Interaktionsfläche zwischen IL-6R α und IL-6 gezeigt.

4.2. Möglichkeiten zur Optimierung der Rezeptorfusionsprotein-Strategie

4.2.1. Auswirkungen von Deletionen auf die Oberflächen-Potenziale am Beispiel des IL-6R α

In Analogie zu den Studien, die mit Deletionsmutanten des humanen IL-6R α durchgeführt wurden [64], konnte das von Ancey *et al.* [101] beschriebene Fusionsprotein die IL-6-Bindung über die Domänen des CBM (D2 und D3) des IL-6R α vermitteln. In diesem Zusammenhang ist ebenfalls die Frage interessant, welche Konsequenzen Deletionen in der Ig-ähnlichen Domäne auf das Rezeptorprotein hat.

In Abbildung 4-2 werden die elektrostatischen Oberflächenpotenziale über das Programm *swiss-PDB-viewer* [116] für den humanen IL-6R α (Abbildungen 4-2A-C) und den murinen IL-6R α (Abbildung 4-2 D-F) dargestellt und miteinander verglichen. Deutlich zeigt die unterschiedliche Ladungsverteilung in beiden Proteinen, dass gerade die Aminosäuren an der Oberfläche eines Proteins evolutionär weniger konserviert sind. Durch die Ko-Evolution von Rezeptor und Ligand können die Aminosäuren, die an der Interaktion mit Bindungspartnern beteiligt sind, erheblich variieren. Auf konservierten Aminosäuren, die z.B. β -Stränge des Proteins ausbilden, lastet ein Evolutionsdruck, weil die Sekundärstruktur eng mit der Funktion des Proteins verknüpft ist.

Betrachtet man die Auswirkungen der Deletion der relativ kleinen PräD1-Region oder einer vollständigen Proteindomäne, so zeigen sich für beide Proteine Veränderungen der Oberfläche.

Anhand der Abbildungen 4-2A und D wird für beide Spezies gezeigt, dass die Aminosäuren der PräD1-Region die Oberfläche der D2-Domäne des IL-6R α deutlich prägen. Entfernt man diese Aminosäuresequenz (durch ein grünes Rechteck wird die Position der deletierten Aminosäuren angedeutet) wie in Abbildungen 4-2B und 4-2E gezeigt, wird der Anteil an positiv geladenen Aminosäuren auf der Oberfläche drastisch reduziert und bei beiden Proteinen hydrophobe Epitope (dargestellt in weiß) freigelegt. Steigt die Hydrophobizität eines Proteins an, so wird es im Allgemeinen weniger löslich und könnte unspezifische Wechselwirkungen eingehen und häufig auch an Bioverfügbarkeit verlieren.

Die Simulation der vollständigen Deletion der Domäne D1 zeigt, dass bei beiden Proteinen eine positive Ladung (dargestellt in blau) an der Domänengrenze D1/D2 freigelegt werden.

Durch die Deletion können somit Epitope geschaffen werden, die das Protein immunogen machen.

Daher scheint es ratsam, für einen möglichen therapeutischen Einsatz eines Fusionsproteins die Konsequenzen einer Deletion von Proteindomänen zugunsten des Vorteils eines geringeren Molekulargewichtes zu überdenken.

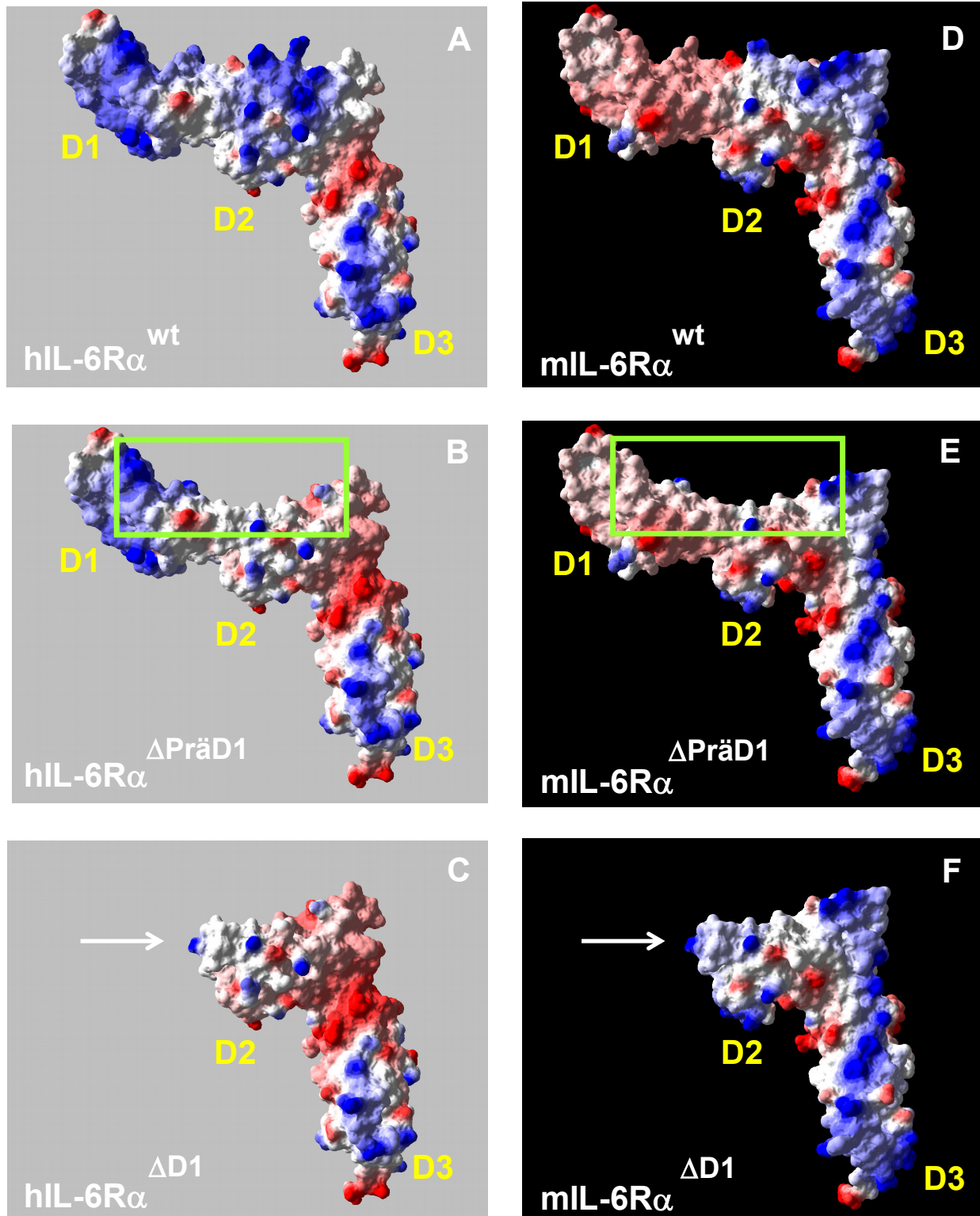


Abbildung 4.2 Darstellung der elektrostatischen Oberflächen-Potenziale des humanen und murinen IL-6R α ^{wt}

Die Oberflächenladung des IL-6R α wt des Menschen (grauer Hintergrund; Abbildungen A-C) und der Maus (schwarzer Hintergrund; Abbildungen D-F) sind im Vergleich dargestellt. Die Deletion der PräD1-Region (dargestellt in B und E; Deletion durch ein grünes Rechteck fokussiert) oder der gesamten Ig-ähnlichen Domäne (C und F) zeigen unterschiedliche Auswirkungen beim murinen und humanen IL-6R α . In Rot sind negativ geladene Bereiche markiert, in Blau solche mit positiver Ladung. Die Berechnung der Oberflächen-Potenziale und deren Darstellung erfolgten mit dem Programm *Swiss -Pdb-viewer*.

4.2.2. Verbesserung pharmakologischer Eigenschaften des mL-6-RFP

Protein-*tags* dienen nicht nur dem Nachweis oder der Aufreinigung eines rekombinanten Proteins, sondern können sogar funktionelle Eigenschaften vermitteln. Durch den Einsatz einer Kombination aus V5- und 6xHis-*tag* für das mL-6-RFP ist eine kostengünstige Möglichkeit entstanden, rekombinantes Protein durch Affinitätschromatographie (über Ni-Sepharose) aufzureinigen.

Eine Alternative zum V5-6xHis-*tag* könnte ein so genanntes F_c-*tag* darstellen, das auf Domänen des konstanten Teils eines Antikörpers (C_H2 und C_H3) basiert. Das F_c-*tag* ermöglicht nicht nur die Aufreinigung des Proteins über die Affinität zu bakteriellem Protein A, sondern könnte dem Fusionsprotein ebenfalls zusätzliche biologische Aktivitäten verleihen: Strukturell würde das F_c-*tag* zur Dimerisierung des Proteins führen und das Vorliegen eines präformierten RFP- Komplexes fördern und damit die *site* III Interaktion begünstigen.

Ein weiterer Vorteil eines F_c-*tags* ist dessen günstige Pharmakokinetik. Die Halbwertszeit eines Proteins im Plasma hat einen großen Einfluss auf die zu verabreichende Dosis und damit auch auf mögliche Nebeneffekte. Niedermolekulare Inhibitoren weisen zumeist eine rasche *clearance* auf, d.h. sie werden schnell mit dem Harn ausgeschieden. Makromoleküle wie Proteine (mit einem MG > 60 kDa) sind im Plasma relativ stabil, können jedoch in der Zirkulation durch Mikropinozytose z.B. von Zellen des vaskulären Epithels aufgenommen werden. Dieser Mechanismus stellt nach unserer Vorstellung den Weg dar, über den der Komplex aus IL-6 und dem Fusionsprotein aus der Zirkulation entfernt werden kann. IgG-Antikörper werden ebenfalls über diesen Weg aufgenommen, können jedoch über ihre konstante Region an F_c-Rezeptoren in Endosomen binden und durch *recycling* an die Zelloberfläche zurückkehren. Die künstlichen F_c-*tags* vermitteln diesen Vorgang ebenfalls, was eine günstigere Pharmakokinetik für ein Fusionsprotein bedingen könnte. [132]. Dieser Mechanismus birgt jedoch auch die Gefahr, dass ein Komplex aus IL-6 gebunden an das Fusionsprotein (mit F_c-*tag*) zu lange in der Zirkulation bleibt, was Effektorfunktionen oder die Bildung von Autoantikörpern fördern könnte.

Eine weitere Methode zur Verlängerung von Protein-Halbwertszeiten besteht in der sog. PEGylierung (d.h. einer Modifikation mit Polyethylenglykol). Derartige Modifikationen können

allerdings auch die Funktion des Proteins stark beeinträchtigen [133]. Daher muss das Inhibitor-Design für jedes neue Protein optimiert werden.

4.3. Bewertung der mIL-6-RFP-Strategie im Vergleich mit anderen Ansätzen

Neben den unter Abschnitt 1.4 beschriebenen Anti-IL-6-Therapien werden von verschiedenen Arbeitsgruppen unterschiedliche Konzepte zur Hemmung IL-6-vermittelter Antworten bei bestimmten humanen Erkrankungen vorgelegt, in denen diesem Zytokin eine Rolle in der Pathogenese zugewiesen werden kann. Abbildung 4.3 soll einen Überblick über verschiedene Ansätze liefern, die zur Hemmung von IL-6 etabliert wurden.

Neben dem Zytokin IL-6 wird auch der IL-6R α als Zielmolekül für eine Anti-IL-6-Therapie definiert. Grund hierfür ist, dass Erkrankungen, in denen erhöhte IL-6-Konzentrationen im Plasma auftreten, gleichzeitig mit einer Erhöhung der Konzentration an löslichem IL-6R α einher gehen. Der lösliche IL-6R α kann bereits im Serum gesunder Individuen nachgewiesen werden und liegt im Mittelwert bei 100 ng/ml. Individuelle Abweichungen sind erheblich und variieren zwischen 50 und 230 ng/ml. Bei bestimmten Erkrankungen wie dem multiplen Myelom werden im Mittelwert 190 ng/ml sIL-6R α nachgewiesen. Diese hohen Werte resultieren jedoch eher aus der hohen Varianz der Messwerte (50-900 ng/ml) der Stichprobe der Patienten, die für die Studien ausgewählt wurden [70]. Die Bedeutung des löslichen IL-6R α liegt darin, dass Zellpopulationen von IL-6/IL-6R α -Komplexen stimuliert werden können, die den membranständigen IL-6R α nicht exprimieren. Lösliche Formen des gp130 können diesen Effekt neutralisieren, jedoch bleibt bei den entsprechenden Erkrankungen die sgp130-Konzentration im Serum konstant.

Mit der jetzigen Datenlage kann noch nicht abschließend definiert werden, welche Rolle der lösliche IL-6R α in der Pathogenese bestimmter Erkrankungen spielt. Wie in Abschnitt 3.7.3. gezeigt wurde, ist das mIL-6-RFP ebenfalls in der Lage das „*transsignaling*“ zu unterbinden, indem es IL-6 effektiver zu binden vermag als der lösliche IL-6-Rezeptor.

4.3.1. Lösliches gp130

Bei sgp130-F_c handelt es sich um einen löslichen Rezeptor, der aus den extrazellulären Domänen D1-D6 des gp130 mit F_c-tag (Abbildung 4-3B) zusammengesetzt ist. Im Gegensatz zum IL-6R α , der agonistische Eigenschaften vermittelt, ist sgp130 als „Inhibitor“ des IL-6-*transsignalings* beschrieben worden [75,99]

Die Autoren sehen als Ursache für die Progression bestimmter Erkrankung nicht die erhöhte IL-6-Konzentrationen, sondern dass löslicher IL6R α das eigentliche Problem darstellt, da es Zellen responsiv für das Zytokin macht, die den membranständigen Rezeptor nicht tragen. Für diese These spricht, dass IL-6 und IL-6R α -Serumkonzentrationen in den gleichen

Erkrankungen erhöht sind. Dieser Inhibitor hat jedoch einen Schwachpunkt: sgp130 kann nur Komplexe aus IL-6/IL-6R α binden; jedoch ist die Affinität zu IL-6 zu gering, so dass das Zytokin nicht direkt neutralisiert werden kann. Das beschriebene Molekül befindet sich z.Z. noch in der präklinischen Phase. In Tiermodellen zu chronisch inflammatorischen Erkrankungen konnten positive Effekte nachgewiesen werden [134].

4.3.2. Anti-IL-6R α -Antikörper

Tocilizumab/ MRA ist ein humanisierten anti-IL-6R α -Antikörper (Abbildung 4-3A) und hat bereits (für Europa) die Zulassung zur Behandlung der Castleman Erkrankung erhalten. Die klinische Phase für MRA zur Behandlung der Juvenilen Rheumatoiden Arthritis und Rheumatoiden Arthritis ist bereits (in Japan) abgeschlossen und weitere Anwendungsbereiche werden in klinischen Studien erprobt. Tocilizumab wird daher neben der Anti-TNF-Therapie zur Behandlung dieser Erkrankungen eingesetzt (Übersichtsartikel: [135]).

In Abschnitt 3.7.2. wurde demonstriert, dass das mIL-6-RFP wesentlich potenter die IL-6-abhängige Proliferation von B9-Zellen hemmt als ein inhibitorischer Antikörper gegen mIL-6R α . Bezogen auf identische Zytokinkonzentrationen war eine ca. 65-fach höhere Dosis des Antikörpers im Vergleich zum mIL-6-RFP zur Hemmung des Zellwachstums notwendig. Hier stellt sich natürlich die Frage, wie dieses Experiment interpretiert werden kann. Ein Argument liefert die hohe Affinität des mIL-6-RFP zum Zytokin IL-6, die vergleichbar mit den Werten für den membranständigen Rezeptorkomplex sein dürfte. Zusätzlich existieren auf jeder Zelloberfläche zahlreiche Bindungsstellen für den Antikörper, die alle blockiert werden müssen, um Signaltransduktionsvorgänge zu inhibieren.

Im Vergleich zur Anti-IL-6R α -Therapie sollte sich durch den Einsatz eines IL-6-Inhibitors wie dem mIL-6-RFP die pharmakologisch notwendige Dosis verringern lassen, die verabreicht werden muss um biologische Antworten zu hemmen.

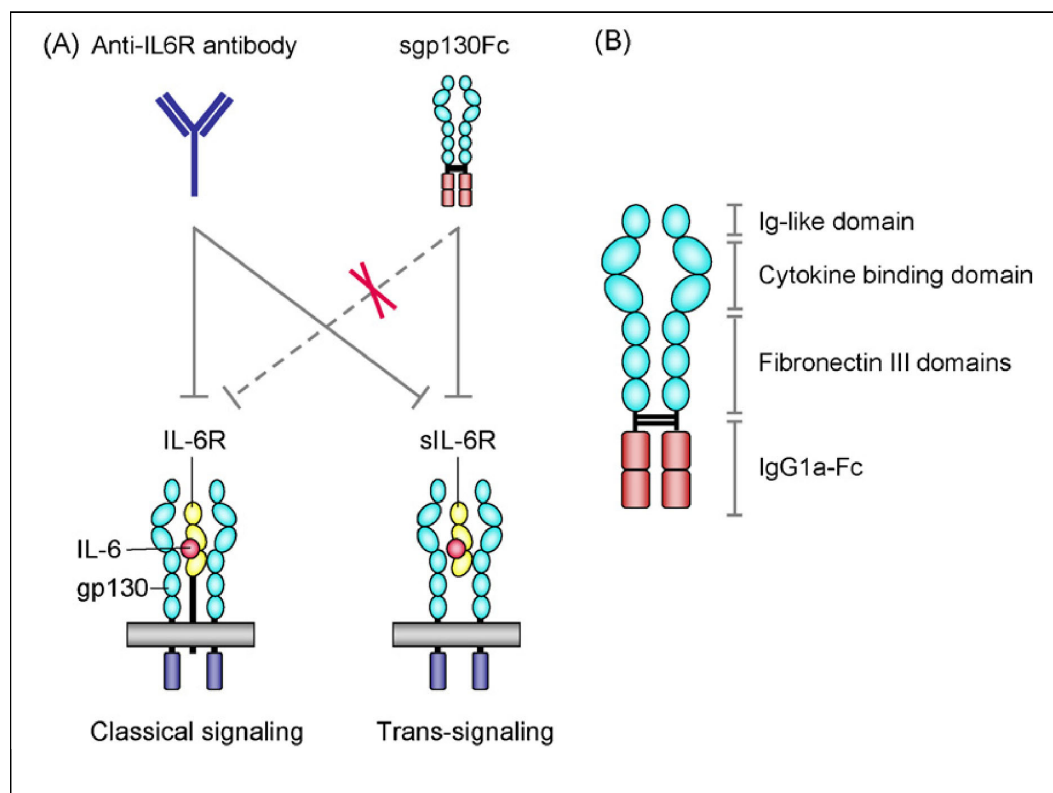
4.3.3. mIL-6-RFP/ „cytokine-trap“

Zeitgleich haben unsere Arbeitsgruppe und Economides *et al.* [100] ein Konzept vorgeschlagen, bei dem IL-6 durch fusionierte Rezeptoren inhibiert wird.

Im Ansatz von Economides *et al* [100] wurde der gesamte Extrazellulärbereich sowohl des hIL-6R α als auch des hgp130 mit C-terminalem Fc-tag ko-exprimiert (Abbildung 4-3C). Da alle Domänen der Rezeptorproteine verwendet wurden sind ähnliche elektrostatische und thermodynamische Eigenschaften der Proteine im Vergleich zum membranständigen Rezeptor wahrscheinlich. Dieser Ansatz ist dem unseren sehr ähnlich, da er theoretisch eine Assoziation von IL-6 mit picomolarer Affinität ermöglicht.

Eine Schwachstelle des Konzeptes ist einerseits, dass sich während der Koexpression neben den IL-6-neutralisierenden Heterodimeren aus IL-6R α -F_c/gp130-F_c auch (gp130-F_c)₂ und (IL-6R α -F_c)₂ Homodimere ausbilden, die ebenfalls pharmakologisch aktiv sind, im Fall des (IL-6R α -F_c)₂ agonistisch wirken. Andererseits ist die proximale Sequenz des IL-6R α ebenfalls in der „IL-6-trap“ enthalten. Diese Sequenz enthält u. A. Schnittstellen für Metalloproteasen der ADAM-Familie, die die lösliche Form des Rezeptors generieren.

Beim Rezeptorfusionsprotein-Ansatz kann durch den Austausch des V5-6xHis-*tag* (Abbildung 4-3E) gegen ein F_c-*tag* (Abbildung 4-3D) eine bessere Pharmakokinetik erreicht werden, da mIL-6-RFP-F_c durch das *tag* ebenfalls an F_c-Rezeptoren in Endosomen binden und durch *recycling* wieder in das Serum gelangen könnte. Darüber hinaus würde das Fusionsprotein durch das F_c-*tag* dimerisieren und als präformierter Komplex vorliegen. Dies könnte die Ligandenbindung positiv beeinflussen, weil der Übergang zum energetisch günstigen hexameren Komplex strukturell gefördert würde. Der Nutzen einer solchen Modifikation müsste jedoch experimentell überprüft werden, da sich das Molekulargewicht des mIL6-RFP drastisch vergrößern würde.



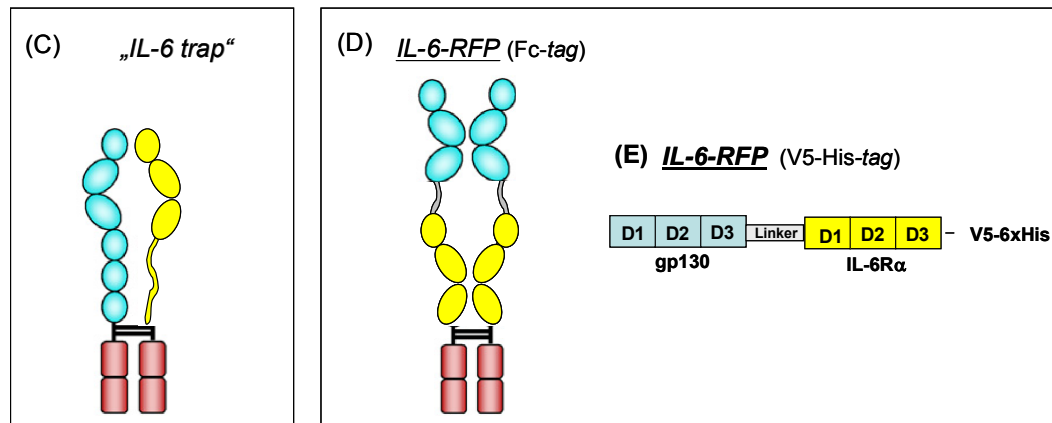


Abbildung 4-3 A-E Übersicht über Inhibitoren für Anti-IL-6-Therapien

A-B Vergleich eines Anti-IL-6R α -Antikörpers mit sgp130F_c in ihrer Wirkung. Die Autoren sehen den Nachteil der Verwendung eines Antikörpers darin, dass gleichermaßen die Signaltransduktion durch membranständige Rezeptoren als auch lösliche Rezeptoren gehemmt wird.

C zeigt das von Economides *et al.* [100] zur IL-6-Bindung generierte Molekül, das konzeptionell dem Fusionsprotein-Ansatz sehr ähnelt.

E zeigt das mIL-6-RFP wie es im Rahmen der vorgelegten Dissertation aufgrund struktureller Untersuchungen entwickelt wurde und eine vorgeschlagene Variante **D** die unter 4.2.2. diskutiert wurde.

In gelb sind die Domänen des IL-6R α und in türkis die verwendeten Domänen des gp130 gezeigt. Das Fc-tag, bzw. die Domänen (C_H2 und C_H3), die auf den konstanten Teils eines Antikörpers zurückgehen, sind in rot dargestellt (modifiziert nach [135])

5. AUSBLICK

5.1. *in vivo* Nachweis der Wirkung von mIL-6-RFP

Die Charakterisierung des mIL-6-RFP zeigt, dass dieser Inhibitor hochwirksam und spezifisch für IL-6 ist. Aufgrund der hohen Homologie der Aminosäuresequenz des IL-6R α zwischen den Spezies Mensch, Maus und Ratte ist das mIL-6-RFP Arten-übergreifend wirksam. Darüber hinaus konnte nun *in vivo* gezeigt werden, dass das Fusionsprotein endogen, d.h. im lebenden Organismus exprimiert und ausreichend sezerniert wird, sowie im Serum stabil ist. Damit steht ein Inhibitor zur Verfügung, der es ermöglicht, spezifisch IL-6 zu hemmen und somit den Beitrag dieses Zytokins in der Pathogenese bestimmter Erkrankungen zu untersuchen.

Für bestimmte humane Erkrankungen wie der rheumatoiden Arthritis oder endzündliche Darmerkrankungen existieren etablierte Tiermodelle, in denen die Krankheiten künstlich induziert werden und die Wirksamkeit neuer Therapien getestet werden kann. Hier könnte das mIL-6-RFP entweder als rekombinantes Protein verabreicht oder im Rahmen eines viralen Expressionssystems im Versuchstier exprimiert werden. Durch den Einsatz des mIL-6-RFP im Rahmen verschiedener Tiermodelle könnte das Konzept der Inhibition von Zytokinen durch „fusionierte Rezeptoren“ validiert werden. Langfristig könnten diese Untersuchungen die Grundlage zur Entwicklung einer neuartigen und effektiven Anti-IL-6-Therapie für den Einsatz beim Menschen führen.

5.2. Übertragbarkeit des Fusionsprotein-Konzeptes auf Inhibitoren für andere Zytokine

Die in der vorliegenden Arbeit vorgestellte gentechnische Herstellung des mIL-6-RFP zeigt, dass die Entwicklung derartiger makromolekularer Inhibitoren auf weitere IL-6-Typ-Zytokine ausdehnen lässt. Generell kann man die Generierung von Inhibitoren durch Fusion von Rezeptoruntereinheiten auf die Hemmung jedes Zytokins ausweiten, das mit Transmembranproteinen interagiert. Der Erfolg dieser Strategie hängt in großem Maße von den Proteinstruktur-Daten ab, die die Grundlagenforschung liefert.

Es stellt sich natürlich die Frage, ob die erworbenen Kenntnisse auf andere Zytokine der IL-6-Typ-Familie übertragen werden können. Rezeptoren der Klasse I sind durch konservierte Disulfidbrücken innerhalb des CBM gekennzeichnet. Wie am Beispiel des mIL-6R α demonstriert wurde, kann es zusätzliche Disulfidbrücken geben, die von funktioneller Relevanz sind. Eine solche Domänenübergreifende Disulfidbrücke wie beim IL-6R α ist kein Sonderfall, sondern tritt auch bei anderen Rezeptoren der gp130-Familie auf, wie kürzlich für den LIFR [136] nachgewiesen wurde. Die Deletion solcher Disulfidbrücken

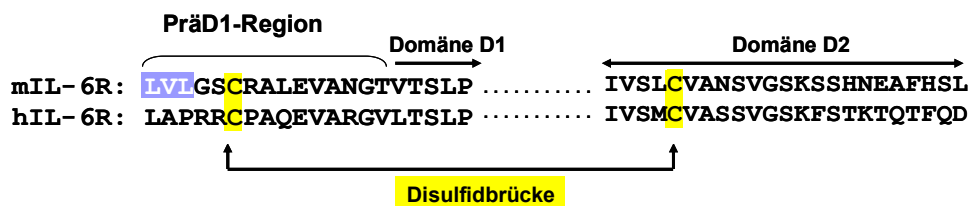
könnte ebenfalls die Funktion des CBM beeinträchtigen und so zum Funktionsverlust des Proteins führen.

Beschränkt man die Betrachtung weiter auf die Zytokine der IL-6-Superfamilie, die über gp130-Homodimere in Verbindung mit Alpha-Rezeptoren signalisieren (IL-6 und IL-11), so erkennt man durch einen einfachen Sequenzvergleich der betreffenden Rezeptoren, dass wenig Homologie im Bereich der Präd1-Region besteht.

Die Rezeptoren des Zytokins IL-11 weisen ebenfalls an Position 6 ein konserviertes Cystein auf, jedoch steht in der vergleichbaren Region der Domäne D2 kein Bindungspartner für die Ausbildung einer Disulfidbrücke (wie im IL-6R α) zur Verfügung.

Im Falle des CNTFR α kann keine erkennbare Sequenzidentität nachgewiesen werden, die einen Rückschluss auf funktionelle und strukturelle Übereinstimmungen zum IL-6R α gestattet. Außerdem signalisieren die beiden IL-6-Typ-Zytokine Neuropeitin und CNTF über den CNTFR α , was die Spezifität des Inhibitors einschränken würde. Darüber hinaus ist die Rezeptorarchitektur dieser Proteine wesentlich komplexer, da neben dem Alpha-Rezeptor zwei weitere Untereinheiten (LIFR und gp130) rekrutiert werden. Wie sich eine Fusion auf die Fusion von drei Rezeptor-Untereinheiten auswirken würde, kann man nur schwer vorhersagen.

Daher muss als Prototyp für die Fusion stets von vollständigen Ektodomänen der Rezeptoren ausgegangen werden, die ggf. verkürzt werden können. Besondere strukturelle Erfordernisse bestimmter Rezeptoren müssen dabei stets im Einzelfall ermittelt werden, wie im Fall des murinen IL-6R α im Vergleich zum humanen Protein in der vorliegenden Arbeit gezeigt wurde.



Vergleichbare Region weiterer Alpha-Rezeptoren der IL-6-Typ-Zytokine:

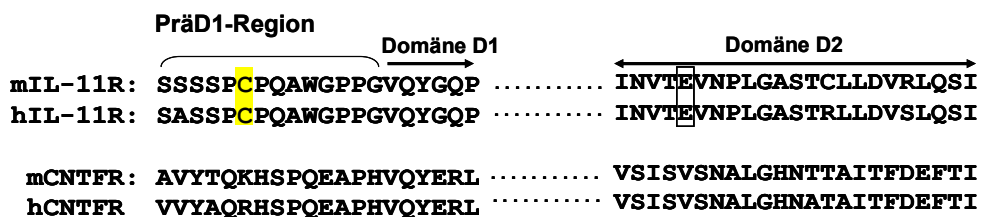


Abbildung 5-1: Ausschnitt aus einem *sequential alignment* von IL-6R α , IL-11R α und CNTFR α -Proteinen des Menschen und der Maus.

Die Alpha-Rezeptoren für IL-6, IL-11 und CNTF weisen untereinander nur geringe Homologie auf. Der Ausschnitt zeigt den aminoterminalen Bereich der Proteine und ein Segment der Domäne D2. Die Alpha-Rezeptoren für IL-11 besitzen –homolog zum IL-6R α – nur an einer Position ein konserviertes Cystein (gelb unterlegt). In der Domäne D2 können in der entsprechenden Region keine weiteren Cysteine lokalisiert werden. An dieser Position liegt mit Glutaminsäure (schwarz eingerahmt) kein Bindungspartner zur Ausbildung einer Disulfidbrücke (gelb unterlegt) wie im humanen IL-6R α vor. Der CNTFR weist keine der für den IL-6R α beschriebenen Motive auf und könnte daher in dieser Region strukturell sehr unterschiedlich sein. Weitere strukturell bedeutsame Sequenzmotive, wie das LVL-Motiv des murinen Rezeptors (blau unterlegt), können auch bei anderen Alpha-Rezeptoren auftreten.

6. ZUSAMMENFASSUNG

6.1 Untersuchungen zur Funktion des mL-6R α

Die IL-6R α -Proteine des Menschen und der Maus zeigen trotz einer Homologie von 54% (auf Basis der Aminosäure-Sequenz) funktionelle Unterschiede bei der Ligandenbindung. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnten für die Ligandenbindung essentielle Motive identifiziert werden, die außerhalb des CBM lokalisiert sind.

Während beim humanen IL-6R α die singuläre Domäne D3 des hIL-6R α zur IL-6-Bindung ausreicht [84], konnte im Rahmen dieser Arbeit für das murine Protein nachgewiesen werden, dass die Kombination der Domänen D2 und D3 - die das CBM des Rezeptors bilden, zur Ligandenbindung nicht ausreichend sind.

Anhand eines Modell des mL-6R α , welches auf kristallographischen Daten des humanen IL-6-Rezeptorkomplexes basiert, konnten zwei funktionell relevante Aminosäure-Motive identifiziert und ihre Funktion näher charakterisiert werden. Die Motive sind in einer kurzen Region lokalisiert, die der Ig-ähnlichen Domäne vorgelagert ist und als *PräD1-Region* bezeichnet wurde. Eine vergleichbare Region ist ebenfalls im humanen Protein vorhanden, aber dort kann keine äquivalente Funktion zugeordnet werden.

Über *life cell imaging* und durchflusszytometrische Messungen konnte nachgewiesen werden, dass Cystein C⁶ des mL-6R α , Bindungspartner einer konservierten Disulfidbrücke, essentiell für die Oberflächenexpression des Proteins ist. Durch Präzipitationsstudien mit mutierten mL-6R α -Domänen im Rahmen eines „Fusionsprotein“-Ansatzes wurde gezeigt, dass Deletion oder Substitution des Cystein C⁶ der PräD1-Region einen dominant negativen Effekt sowohl auf die Lokalisation (Oberflächenexpression), als auch auf die Funktion des Proteins ausüben.

Ein weiteres funktionell wichtiges Motiv des mL-6R α stellen drei hydrophobe N-terminale Aminosäuren (LVL-Motiv) dar. Basierend auf einem Modell wurde für die erste Aminosäure L¹ des mL-6R α eine intermolekulare Interaktion mit einem konservierten Phenylalanin F⁸⁶ in der Domäne D1 von gp130 postuliert, über die eine zusätzliche *site* IIIb-Interaktion ermöglicht wird. Für die nachfolgenden Aminosäuren wurde eine stärkere intramolekulare Interaktion mit Aminosäuren der Domäne D2 angenommen. Die Substitution dieses Motivs führte bei vergleichbarer Oberflächenexpression zu einer messbaren Reduktion der Aktivierung des JAK/STAT-Signaltransduktionsweges. Isolierte Proteindomänen des mL-6R α , die diese Mutation aufweisen, zeigten ebenfalls eine reduzierte IL-6-Bindung.

6.2. Konstruktion des IL-6-Inhibitors

Basierend auf den Untersuchungen zur Struktur des IL-6-Rezeptor-Komplexes konnten die an der Ligandenbindung beteiligten Domänen definiert und durch Fusion ein spezifischer Inhibitor erzeugt werden. Dieser basiert auf den Domänen D1-3 des mIL-6R α und D1-3 des mgp130, welche über einen geeigneten Polypeptid-*Linker* fusioniert wurden. Das mIL-6-RFP ist in der Lage Interleukin-6 verschiedener Spezies mit vergleichbarer Effizienz zu hemmen, während keine Inhibition strukturell verwandter Zytokine der 4 α -Helix-Bündel-Familie nachweisbar war. Darüber zeigte das mIL-6-RFP *in vitro* bezogen auf gleiche molare Protein-Menge eine 30-fach stärkere Hemmung der IL-6-abhängigen Proliferation von B9-Zellen als ein antagonistischer mIL-6R α -Antikörper. Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass das mIL-6-RFP in der Lage ist biologische Antworten zu unterdrücken, die über den löslichen IL-6-Rezeptor vermittelt werden. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde ebenfalls eine Strategie zur Optimierung der Sekretion des Fusionsproteins etabliert. *In vivo* konnte 72 h nach Transfektion eines Expressionsplasmids zwischen 0,4- 0,7 ng/ml mIL-6-RFP im Serum der Versuchstiere nachgewiesen werden, was auf eine ausreichende Stabilität des Proteins hindeutet.

Mit dem mIL-6-RFP steht ein somit ein potenter IL-6-Inhibitor, auch für den tierexperimentellen Einsatz zur Verfügung, welcher

- in verschiedenen Tiermodellen (Maus/ Ratte) zu bestimmten humanen Erkrankungen getestet werden kann, um die Rolle von IL-6 in dysregulierten Zytokin-Netzwerken spezifisch zu charakterisieren
- als neuartiger makromolekularer Inhibitor in einer Anti-IL-6-Therapie eingesetzt werden kann.

7. LITERATURVERZEICHNIS

1. Kriegler M, Perez C, DeFay K, Albert I, Lu SD. *A novel form of TNF/cachectin is a cell surface cytotoxic transmembrane protein: ramifications for the complex physiology of TNF.* **Cell.** 1988;53:45-53
2. Bonewald LF, Wakefield L, Oreffo RO, Escobedo A, Twardzik DR, Mundy GR. *Latent forms of transforming growth factor-beta (TGF beta) derived from bone cultures: identification of a naturally occurring 100-kDa complex with similarity to recombinant latent TGF beta.* **Mol Endocrinol.** 1991;5:741-51
3. Ibelgaufts H. *Lexikon Zytokine.* **Medikon Verlag München.** 1992:12-3,156-7, 244-51
4. Löffler G, Petrides PE, Heinrich PC. *Biochemie & Pathobiochemie.* **Springer Verlag.** 2007;8. Auflage
5. Bommer J, Alexiou C, Muller-Buhl U, Eifert J, Ritz E. *Recombinant human erythropoietin therapy in haemodialysis patients--dose determination and clinical experience.* **Nephrol Dial Transplant.** 1987;2:238-42
6. Schwertschlag US, Trepicchio WL, Dykstra KH, Keith JC, Turner KJ, Dorner AJ. *Hematopoietic, immunomodulatory and epithelial effects of interleukin-11.* **Leukemia.** 1999;13:1307-15
7. Nash PT, Florin TH. *Tumour necrosis factor inhibitors.* **Med J Aust.** 2005;183:205-8
8. Bencsath M, Blaskovits A, Borvendeg J. *Biomolecular cytokine therapy.* **Pathol Oncol Res.** 2003;9:24-9
9. Wilkinson N, Jackson G, Gardner-Medwin J. *Biologic therapies for juvenile arthritis.* **Arch Dis Child.** 2003;88:186-91
10. Bazan JF. *Neuropoietic cytokines in the hematopoietic fold.* **Neuron.** 1991;7:197-208
11. Kishimoto T. *Interleukin-6: discovery of a pleiotropic cytokine.* **Arthritis Res Ther.** 2006;8 Suppl 2:S2
12. Zilberstein A, Ruggieri R, Korn JH, Revel M. *Structure and expression of cDNA and genes for human interferon-beta-2, a distinct species inducible by growth-stimulatory cytokines.* **Embo J.** 1986;5:2529-37
13. Sehgal PB, Zilberstein A, Ruggieri RM, May LT, Ferguson-Smith A, Slate DL, Revel M, Ruddle FH. *Human chromosome 7 carries the beta 2 interferon gene.* **Proc Natl Acad Sci U S A.** 1986;83:5219-22
14. Sehgal PB, May LT, Tamm I, Vilcek J. *Human beta 2 interferon and B-cell differentiation factor BSF-2 are identical.* **Science.** 1987;235:731-2
15. Haegeman G, Content J, Volckaert G, Derynck R, Tavernier J, Fiers W. *Structural analysis of the sequence coding for an inducible 26-kDa protein in human fibroblasts.* **Eur J Biochem.** 1986;159:625-32
16. Nordan RP, Pumphrey JG, Rudikoff S. *Purification and NH2-terminal sequence of a plasmacytoma growth factor derived from the murine macrophage cell line P388D1.* **J Immunol.** 1987;139:813-7
17. Okada M, Kitahara M, Kishimoto S, Matsuda T, Hirano T, Kishimoto T. *IL-6/BSF-2 functions as a killer helper factor in the in vitro induction of cytotoxic T cells.* **J Immunol.** 1988;141:1543-9

18. Kikutani H, Taga T, Akira S, Kishi H, Miki Y, Saiki O, Yamamura Y, Kishimoto T. *Effect of B cell differentiation factor (BCDF) on biosynthesis and secretion of immunoglobulin molecules in human B cell lines.* **J Immunol.** 1985;134:990-5
19. Geiger T, Andus T, Bauer J, Northoff H, Ganter U, Hirano T, Kishimoto T, Heinrich PC. *Cell-free-synthesized interleukin-6 (BSF-2/IFN-beta 2) exhibits hepatocyte-stimulating activity.* **Eur J Biochem.** 1988;175:181-6
20. Ritchie DG, Fuller GM. *Hepatocyte-stimulating factor: a monocyte-derived acute-phase regulatory protein.* **Ann N Y Acad Sci.** 1983;408:490-502
21. Sad S, Marcotte R, Mosmann TR. *Cytokine-induced differentiation of precursor mouse CD8+ T cells into cytotoxic CD8+ T cells secreting Th1 or Th2 cytokines.* **Immunity.** 1995;2:271-9
22. Ericson SG, Zhao Y, Gao H, Miller KL, Gibson LF, Lynch JP, Landreth KS. *Interleukin-6 production by human neutrophils after Fc-receptor cross-linking or exposure to granulocyte colony-stimulating factor.* **Blood.** 1998;91:2099-107
23. Melani C, Mattia GF, Silvani A, Care A, Rivoltini L, Parmiani G, Colombo MP. *Interleukin-6 expression in human neutrophil and eosinophil peripheral blood granulocytes.* **Blood.** 1993;81:2744-9
24. Marz P, Cheng JG, Gadiant RA, Patterson PH, Stoyan T, Otten U, Rose-John S. *Sympathetic neurons can produce and respond to interleukin 6.* **Proc Natl Acad Sci U S A.** 1998;95:3251-6
25. Cichy J, Rose-John S, Pryjma J, Travis J. *Effect of soluble interleukin-6 receptor on interleukin-6 synthesis in human skin fibroblasts.* **Biochem Biophys Res Commun.** 1996;227:318-21
26. Fujisawa H, Wang B, Sauder DN, Kondo S. *Effects of interferons on the production of interleukin-6 and interleukin-8 in human keratinocytes.* **J Interferon Cytokine Res.** 1997;17:347-53
27. Xin X, Cai Y, Matsumoto K, Agui T. *Endothelin-induced interleukin-6 production by rat aortic endothelial cells.* **Endocrinology.** 1995;136:132-7
28. Ishimi Y, Miyaura C, Jin CH, Akatsu T, Abe E, Nakamura Y, Yamaguchi A, Yoshiki S, Matsuda T, Hirano T, et al. *IL-6 is produced by osteoblasts and induces bone resorption.* **J Immunol.** 1990;145:3297-303
29. Cumberbatch M, Dearman RJ, Kimber I. *Constitutive and inducible expression of interleukin-6 by Langerhans cells and lymph node dendritic cells.* **Immunology.** 1996;87:513-8
30. Campbell IL, Cutri A, Wilson A, Harrison LC. *Evidence for IL-6 production by and effects on the pancreatic beta-cell.* **J Immunol.** 1989;143:1188-91
31. May LT, Helfgott DC, Sehgal PB. *Anti-beta-interferon antibodies inhibit the increased expression of HLA-B7 mRNA in tumor necrosis factor-treated human fibroblasts: structural studies of the beta 2 interferon involved.* **Proc Natl Acad Sci U S A.** 1986;83:8957-61
32. Hirano T, Yasukawa K, Harada H, Taga T, Watanabe Y, Matsuda T, Kashiwamura S, Nakajima K, Koyama K, Iwamatsu A, et al. *Complementary DNA for a novel human interleukin (BSF-2) that induces B lymphocytes to produce immunoglobulin.* **Nature.** 1986;324:73-6
33. Burger R, Neipel F, Fleckenstein B, Savino R, Ciliberto G, Kalden JR, Gramatzki M. *Human herpesvirus type 8 interleukin-6 homologue is functionally active on human myeloma cells.* **Blood.** 1998;91:1858-63
34. Moore PS, Boshoff C, Weiss RA, Chang Y. *Molecular mimicry of human cytokine and cytokine response pathway genes by KSHV.* **Science.** 1996;274:1739-44
35. Nicholas J, Ruvolo VR, Burns WH, Sandford G, Wan X, Ciuffo D, Hendrickson SB, Guo HG, Hayward GS, Reitz MS. *Kaposi's sarcoma-associated human herpesvirus-8 encodes homologues of macrophage inflammatory protein-1 and interleukin-6.* **Nat Med.** 1997;3:287-92

36. D'Auria L, Bonifati C, Mussi A, D'Agosto G, De Simone C, Giacalone B, Ferraro C, Ameglio F. *Cytokines in the sera of patients with pemphigus vulgaris: interleukin-6 and tumour necrosis factor-alpha levels are significantly increased as compared to healthy subjects and correlate with disease activity.* **Eur Cytokine Netw.** 1997;8:383-7
37. Yamamura M, Yamada Y, Momita S, Kamihira S, Tomonaga M. *Circulating interleukin-6 levels are elevated in adult T-cell leukaemia/lymphoma patients and correlate with adverse clinical features and survival.* **Br J Haematol.** 1998;100:129-34
38. Sakamoto K, Arakawa H, Mita S, Ishiko T, Ikei S, Egami H, Hisano S, Ogawa M. *Elevation of circulating interleukin 6 after surgery: factors influencing the serum level.* **Cytokine.** 1994;6:181-6
39. Damas P, Ledoux D, Nys M, Vrindts Y, De Groote D, Franchimont P, Lamy M. *Cytokine serum level during severe sepsis in human IL-6 as a marker of severity.* **Ann Surg.** 1992;215:356-62
40. Baumann H, Jahreis GP, Sauder DN, Koj A. *Human keratinocytes and monocytes release factors which regulate the synthesis of major acute phase plasma proteins in hepatic cells from man, rat, and mouse.* **J Biol Chem.** 1984;259:7331-42
41. Castell JV, Gomez-Lechon MJ, David M, Andus T, Geiger T, Trullenque R, Fabra R, Heinrich PC. *Interleukin-6 is the major regulator of acute phase protein synthesis in adult human hepatocytes.* **FEBS Lett.** 1989;242:237-9
42. Madhok R, Crilly A, Watson J, Capell HA. *Serum interleukin 6 levels in rheumatoid arthritis: correlations with clinical and laboratory indices of disease activity.* **Ann Rheum Dis.** 1993;52:232-4
43. Mahida YR, Kurlac L, Gallagher A, Hawkey CJ. *High circulating concentrations of interleukin-6 in active Crohn's disease but not ulcerative colitis.* **Gut.** 1991;32:1531-4
44. Yoshizaki K, Matsuda T, Nishimoto N, Kuritani T, Taeho L, Aozasa K, Nakahata T, Kawai H, Tagoh H, Komori T, et al. *Pathogenic significance of interleukin-6 (IL-6/BSF-2) in Castleman's disease.* **Blood.** 1989;74:1360-7
45. Brandt SJ, Bodine DM, Dunbar CE, Nienhuis AW. *Dysregulated interleukin 6 expression produces a syndrome resembling Castleman's disease in mice.* **J Clin Invest.** 1990;86:592-9
46. Linker-Israeli M, Deans RJ, Wallace DJ, Prehn J, Ozeri-Chen T, Klinenberg JR. *Elevated levels of endogenous IL-6 in systemic lupus erythematosus. A putative role in pathogenesis.* **J Immunol.** 1991;147:117-23
47. Hyams JS, Fitzgerald JE, Treem WR, Wyzga N, Kreutzer DL. *Relationship of functional and antigenic interleukin 6 to disease activity in inflammatory bowel disease.* **Gastroenterology.** 1993;104:1285-92
48. Grossman RM, Krueger J, Yourish D, Granelli-Piperno A, Murphy DP, May LT, Kupper TS, Sehgal PB, Gottlieb AB. *Interleukin 6 is expressed in high levels in psoriatic skin and stimulates proliferation of cultured human keratinocytes.* **Proc Natl Acad Sci U S A.** 1989;86:6367-71
49. Zhang XG, Klein B, Bataille R. *Interleukin-6 is a potent myeloma-cell growth factor in patients with aggressive multiple myeloma.* **Blood.** 1989;74:11-3
50. Mouawad R, Benhammouda A, Rixe O, Antoine EC, Borel C, Weil M, Khayat D, Soubrane C. *Endogenous interleukin 6 levels in patients with metastatic malignant melanoma: correlation with tumor burden.* **Clin Cancer Res.** 1996;2:1405-9
51. Tamm I, Cardinale I, Krueger J, Murphy JS, May LT, Sehgal PB. *Interleukin 6 decreases cell-cell association and increases motility of ductal breast carcinoma cells.* **J Exp Med.** 1989;170:1649-69
52. Twillie DA, Eisenberger MA, Carducci MA, Hseih WS, Kim WY, Simons JW. *Interleukin-6: a candidate mediator of human prostate cancer morbidity.* **Urology.** 1995;45:542-9

53. Miles SA, Rezai AR, Salazar-Gonzalez JF, Vander Meyden M, Stevens RH, Logan DM, Mitsuyasu RT, Taga T, Hirano T, Kishimoto T, et al. *AIDS Kaposi sarcoma-derived cells produce and respond to interleukin 6*. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 1990;87:4068-72
54. Gause A, Scholz R, Klein S, Jung W, Diehl V, Tesch H, Hasenclever D, Pfreundschuh M. *Increased levels of circulating interleukin-6 in patients with Hodgkin's disease*. **Hematol Oncol**. 1991;9:307-13
55. Fishman D, Faulds G, Jeffery R, Mohamed-Ali V, Yudkin JS, Humphries S, Woo P. *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**. 1998;102:1369-76
56. Iacopetta B, Grieu F, Joseph D. *The -174 G/C gene polymorphism in interleukin-6 is associated with an aggressive breast cancer phenotype*. **Br J Cancer**. 2004;90:419-22
57. Berger FG. *The interleukin-6 gene: a susceptibility factor that may contribute to racial and ethnic disparities in breast cancer mortality*. **Breast Cancer Res Treat**. 2004;88:281-5
58. Hitzler JK, Martinez-Valdez H, Bergsagel DB, Minden MD, Messner HA. *Role of interleukin-6 in the proliferation of human multiple myeloma cell lines OCI-My 1 to 7 established from patients with advanced stage of the disease*. **Blood**. 1991;78:1996-2004
59. Kastrinakis NG, Gorgoulis VG, Foukas PG, Dimopoulos MA, Kittas C. *Molecular aspects of multiple myeloma*. **Ann Oncol**. 2000;11:1217-28
60. Bazan JF. *Structural design and molecular evolution of a cytokine receptor superfamily*. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 1990;87:6934-8
61. Heinrich PC, Behrmann I, Haan S, Hermanns HM, Muller-Newen G, Schaper F. *Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation*. **Biochem J**. 2003;374:1-20
62. Martens AS, Bode JG, Heinrich PC, Graeve L. *The cytoplasmic domain of the interleukin-6 receptor gp80 mediates its basolateral sorting in polarized madin-darby canine kidney cells*. **J Cell Sci**. 2000;113 (Pt 20):3593-602
63. Yamasaki K, Taga T, Hirata Y, Yawata H, Kawanishi Y, Seed B, Taniguchi T, Hirano T, Kishimoto T. *Cloning and expression of the human interleukin-6 (BSF-2/IFN beta 2) receptor*. **Science**. 1988;241:825-8
64. Yawata H, Yasukawa K, Natsuka S, Murakami M, Yamasaki K, Hibi M, Taga T, Kishimoto T. *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**. 1993;12:1705-12
65. Vollmer P, Oppmann B, Voltz N, Fischer M, Rose-John S. *A role for the immunoglobulin-like domain of the human IL-6 receptor. Intracellular protein transport and shedding*. **Eur J Biochem**. 1999;263:438-46
66. Mullberg J, Oberthur W, Lottspeich F, Mehl E, Dittrich E, Graeve L, Heinrich PC, Rose-John S. *The soluble human IL-6 receptor. Mutational characterization of the proteolytic cleavage site*. **J Immunol**. 1994;152:4958-68
67. Mullberg J, Schooltink H, Stoyan T, Gunther M, Graeve L, Buse G, Mackiewicz A, Heinrich PC, Rose-John S. *The soluble interleukin-6 receptor is generated by shedding*. **Eur J Immunol**. 1993;23:473-80
68. Muller-Newen G, Köhne C, HKeul R, Hemman U, Muller-Esterl W, Wijdenes J, Brakenhoff JP, Heinrich PC. *Purification and characterization of the soluble interleukin-6 receptor from human plasma and identification of an isoform generated through alternative splicing*. **Eur J Biochem**. 1996;236:837-42
69. Peters M, Jacobs S, Ehlers M, Vollmer P, Mullberg J, Wolf E, Brem G, Meyer zum Buschenfelde KH, Rose-John S. *The function of the soluble interleukin 6 (IL-6) receptor in vivo: sensitization of*

- human soluble IL-6 receptor transgenic mice towards IL-6 and prolongation of the plasma half-life of IL-6.* **J Exp Med.** 1996;183:1399-406
70. Gaillard JP, Bataille R, Brailly H, Zuber C, Yasukawa K, Attal M, Maruo N, Taga T, Kishimoto T, Klein B. *Increased and highly stable levels of functional soluble interleukin-6 receptor in sera of patients with monoclonal gammopathy.* **Eur J Immunol.** 1993;23:820-4
71. Honda M, Yamamoto S, Cheng M, Yasukawa K, Suzuki H, Saito T, Osugi Y, Tokunaga T, Kishimoto T. *Human soluble IL-6 receptor: its detection and enhanced release by HIV infection.* **J Immunol.** 1992;148:2175-80
72. Coulie PG, Stevens M, Van Snick J. *High- and low-affinity receptors for murine interleukin 6. Distinct distribution on B and T cells.* **Eur J Immunol.** 1989;19:2107-14
73. Moritz RL, Ward LD, Tu GF, Fabri LJ, Ji H, Yasukawa K, Simpson RJ. *The N-terminus of gp130 is critical for the formation of the high-affinity interleukin-6 receptor complex.* **Growth Factors.** 1999;16:265-78
74. Kurth I, Horsten U, Pflanz S, Timmermann A, Kuster A, Dahmen H, Tacke I, Heinrich PC, Müller-Newen G. *Importance of the membrane-proximal extracellular domains for activation of the signal transducer glycoprotein 130.* **J Immunol.** 2000;164:273-82
75. Narazaki M, Yasukawa K, Saito T, Ohsugi Y, Fukui H, Koishihara Y, Yancopoulos GD, Taga T, Kishimoto T. *Soluble forms of the interleukin-6 signal-transducing receptor component gp130 in human serum possessing a potential to inhibit signals through membrane-anchored gp130.* **Blood.** 1993;82:1120-6
76. Diamant M, Rieneck K, Mechti N, Zhang XG, Svensson M, Bendtzen K, Klein B. *Cloning and expression of an alternatively spliced mRNA encoding a soluble form of the human interleukin-6 signal transducer gp130.* **FEBS Lett.** 1997;412:379-84
77. Sharkey AM, Dellow K, Blayney M, Macnamee M, Charnock-Jones S, Smith SK. *Stage-specific expression of cytokine and receptor messenger ribonucleic acids in human preimplantation embryos.* **Biol Reprod.** 1995;53:974-81
78. Saito M, Yoshida K, Hibi M, Taga T, Kishimoto T. *Molecular cloning of a murine IL-6 receptor-associated signal transducer, gp130, and its regulated expression in vivo.* **J Immunol.** 1992;148:4066-71
79. Boulanger MJ, Chow DC, Brevnova EE, Garcia KC. *Hexameric structure and assembly of the interleukin-6/IL-6 alpha-receptor/gp130 complex.* **Science.** 2003;300:2101-4
80. Somers W, Stahl M, Seehra JS. *1.9 Å crystal structure of interleukin 6: implications for a novel mode of receptor dimerization and signaling.* **Embo J.** 1997;16:989-97
81. Varghese JN, Moritz RL, Lou MZ, Van Donkelaar A, Ji H, Ivancic N, Branson KM, Hall NE, Simpson RJ. *Structure of the extracellular domains of the human interleukin-6 receptor alpha-chain.* **Proc Natl Acad Sci U S A.** 2002;99:15959-64
82. Chow D, He X, Snow AL, Rose-John S, Garcia KC. *Structure of an extracellular gp130 cytokine receptor signaling complex.* **Science.** 2001;291:2150-5
83. Paonessa G, Graziani R, De Serio A, Savino R, Ciapponi L, Lahm A, Salvati AL, Toniatti C, Ciliberto G. *Two distinct and independent sites on IL-6 trigger gp 130 dimer formation and signalling.* **Embo J.** 1995;14:1942-51
84. Ozbek S, Grotzinger J, Krebs B, Fischer M, Wollmer A, Jostock T, Mullberg J, Rose-John S. *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.** 1998;273:21374-9
85. Grotzinger J, Kernebeck T, Kallen KJ, Rose-John S. *IL-6 type cytokine receptor complexes: hexamer, tetramer or both?* **Biol Chem.** 1999;380:803-13

86. Grotzinger J. *Molecular mechanisms of cytokine receptor activation*. **Biochim Biophys Acta**. 2002;1592:215-23
87. Schwantner A, Dingley AJ, Ozbek S, Rose-John S, Grotzinger J. *Direct determination of the interleukin-6 binding epitope of the interleukin-6 receptor by NMR spectroscopy*. **J Biol Chem**. 2004;279:571-6
88. Hermanns HM, Muller-Newen G, Heinrich PC, Haan S. *Bow to your partner for signaling*. **Nat Struct Mol Biol**. 2005;12:476-8
89. Skiniotis G, Boulanger MJ, Garcia KC, Walz T. *Signaling conformations of the tall cytokine receptor gp130 when in complex with IL-6 and IL-6 receptor*. **Nat Struct Mol Biol**. 2005;12:545-51
90. Heinrich PC, Behrmann I, Muller-Newen G, Schaper F, Graeve L. *Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway*. **Biochem J**. 1998;334 (Pt 2):297-314
91. Demartis A, Bernassola F, Savino R, Melino G, Ciliberto G. *Interleukin 6 receptor superantagonists are potent inducers of human multiple myeloma cell death*. **Cancer Res**. 1996;56:4213-8
92. Sporeno E, Savino R, Ciapponi L, Paonessa G, Cabibbo A, Lahm A, Pulkki K, Sun RX, Toniatti C, Klein B, Ciliberto G. *Human interleukin-6 receptor super-antagonists with high potency and wide spectrum on multiple myeloma cells*. **Blood**. 1996;87:4510-9
93. Brakenhoff JP, de Hon FD, Fontaine V, ten Boekel E, Schooltink H, Rose-John S, Heinrich PC, Content J, Aarden LA. *Development of a human interleukin-6 receptor antagonist*. **J Biol Chem**. 1994;269:86-93
94. Mihara M, Kasutani K, Okazaki M, Nakamura A, Kawai S, Sugimoto M, Matsumoto Y, Ohsugi Y. *Tocilizumab inhibits signal transduction mediated by both mL-6R and sIL-6R, but not by the receptors of other members of IL-6 cytokine family*. **Int Immunopharmacol**. 2005;5:1731-40
95. Wendling D, Racadot E, Wijdenes J. *Treatment of severe rheumatoid arthritis by anti-interleukin 6 monoclonal antibody*. **J Rheumatol**. 1993;20:259-62
96. Klein B, Wijdenes J, Zhang XG, Jourdan M, Boiron JM, Brochier J, Liautard J, Merlin M, Clement C, Morel-Fournier B, et al. *Murine anti-interleukin-6 monoclonal antibody therapy for a patient with plasma cell leukemia*. **Blood**. 1991;78:1198-204
97. Trikha M, Corringham R, Klein B, Rossi JF. *Targeted anti-interleukin-6 monoclonal antibody therapy for cancer: a review of the rationale and clinical evidence*. **Clin Cancer Res**. 2003;9:4653-65
98. Hayashi M, Rho MC, Enomoto A, Fukami A, Kim YP, Kikuchi Y, Sunazuka T, Hirose T, Komiyama K, Omura S. *Suppression of bone resorption by madindoline A, a novel nonpeptide antagonist to gp130*. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 2002;99:14728-33
99. Muller-Newen G, Kuster A, Hemmann U, Keul R, Horsten U, Martens A, Graeve L, Wijdenes J, Heinrich PC. *Soluble IL-6 receptor potentiates the antagonistic activity of soluble gp130 on IL-6 responses*. **J Immunol**. 1998;161:6347-55
100. Economides AN, Carpenter LR, Rudge JS, Wong V, Koehler-Stec EM, Hartnett C, Pyles EA, Xu X, Daly TJ, Young MR, Fandl JP, Lee F, Carver S, McNay J, Bailey K, Ramakanth S, Hutabarat R, Huang TT, Radziejewski C, Yancopoulos GD, Stahl N. *Cytokine traps: multi-component, high-affinity blockers of cytokine action*. **Nat Med**. 2003;9:47-52
101. Ancey C, Kuster A, Haan S, Herrmann A, Heinrich PC, Muller-Newen G. *A fusion protein of the gp130 and interleukin-6Ralpha ligand-binding domains acts as a potent interleukin-6 inhibitor*. **J Biol Chem**. 2003;278:16968-72

102. Coulie PG, Vink A, Van Snick J. *A monoclonal antibody specific for the murine IL-6-receptor inhibits the growth of a mouse plasmacytoma in vivo*. **Curr Top Microbiol Immunol**. 1990;166:43-6
103. Vink A, Coulie P, Warnier G, Renaud JC, Stevens M, Donckers D, Van Snick J. *Mouse plasmacytoma growth in vivo: enhancement by interleukin 6 (IL-6) and inhibition by antibodies directed against IL-6 or its receptor*. **J Exp Med**. 1990;172:997-1000
104. Arcone R, Pucci P, Zappacosta F, Fontaine V, Malorni A, Marino G, Ciliberto G. *Single-step purification and structural characterization of human interleukin-6 produced in Escherichia coli from a T7 RNA polymerase expression vector*. **Eur J Biochem**. 1991;198:541-7
105. Weiergraber O, Hemmann U, Kuster A, Muller-Newen G, Schneider J, Rose-John S, Kurschat P, Brakenhoff JP, Hart MH, Stabel S, et al. *Soluble human interleukin-6 receptor. Expression in insect cells, purification and characterization*. **Eur J Biochem**. 1995;234:661-9
106. Bradford MM. *A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*. **Anal Biochem**. 1976;72:248-54
107. Laemmli UK. *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4*. **Nature**. 1970;227:680-5
108. Kyshe-Anderson J. *Electroblotting of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose*. **J Biochem. Biophys. Meth.** 1984;10:203-9
109. Andrews NC, Faller DV. *A rapid micropreparation technique for extraction of DNA-binding proteins from limiting numbers of mammalian cells*. **Nucleic Acids Res**. 1991;19:2499
110. Wagner BJ, Hayes TE, Hoban CJ, Cochran BH. *The SIF binding element confers sis/PDGF inducibility onto the c-fos promoter*. **Embo J**. 1990;9:4477-84
111. Vriend G. *WHAT IF: a molecular modeling and drug design program*. **J Mol Graph**. 1990;8:52-6
112. Gabdouliline RR, Wade RC, Walther D. *MolSurfer: a macromolecular interface navigator*. **Nucleic Acids Research**. 2003;31:3349-51
113. Negi SS, Kolokoltsov AA, Schein CH, Davey RA, Braun W. *Determining functionally important amino acid residues of the E1 protein of Venezuelan equine encephalitis virus*. **J Mol Model**. 2006;12:921-9
114. <http://www.biochem.ucl.ac.uk/bsm/PP/server>.
115. DeLano WL. *The PyMOL Molecular Graphics System*. **DeLano Scientific, Palo Alto, CA, USA**. 2002
116. Guex N, Peitsch MC. *SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling*. **Electrophoresis**. 1997;18:2714-23
117. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. *Basic local alignment search tool*. **J Mol Biol**. 1990;215:403-10
118. Kozak M. *An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs*. **Nucleic Acids Res**. 1987;15:8125-48
119. Kozak M. *Pushing the limits of the scanning mechanism for initiation of translation*. **Gene**. 2002;299:1-34
120. Pugsley AP. *The complete general secretory pathway in gram-negative bacteria*. **Microbiol Rev**. 1993;57:50-108
121. Pflanz S, Timans JC, Cheung J, Rosales R, Kanzler H, Gilbert J, Hibbert L, Churakova T, Travis M, Vaisberg E, Blumenschein WM, Mattson JD, Wagner JL, To W, Zurawski S, McClanahan TK,

- Gorman DM, Bazan JF, de Waal Malefyt R, Rennick D, Kastelein RA. *IL-27, a heterodimeric cytokine composed of EB13 and p28 protein, induces proliferation of naive CD4(+) T cells.* **Immunity.** 2002;16:779-90
122. Emanuelsson O, Brunak S, von Heijne G, Nielsen H. *Locating proteins in the cell using TargetP, SignalP and related tools.* **Nat Protoc.** 2007;2:953-71
123. Jostock T, Mullberg J, Ozbek S, Atreya R, Blinn G, Voltz N, Fischer M, Neurath MF, Rose-John S. *Soluble gp130 is the natural inhibitor of soluble interleukin-6 receptor transsignaling responses.* **Eur J Biochem.** 2001;268:160-7
124. Cole AR, Hall NE, Treutlein HR, Eddes JS, Reid GE, Moritz RL, Simpson RJ. *Disulfide bond structure and N-glycosylation sites of the extracellular domain of the human interleukin-6 receptor.* **J Biol Chem.** 1999;274:7207-15
125. Haan S, Kortylewski M, Behrmann I, Muller-Esterl W, Heinrich PC, Schaper F. *Cytoplasmic STAT proteins associate prior to activation.* **Biochem J.** 2000;345 Pt 3:417-21
126. Kortylewski M, Komyod W, Kauffmann ME, Bosserhoff A, Heinrich PC, Behrmann I. *Interferon-gamma-mediated growth regulation of melanoma cells: involvement of STAT1-dependent and STAT1-independent signals.* **J Invest Dermatol.** 2004;122:414-22
127. Kube D, Holtick U, Vockerodt M, Ahmadi T, Haier B, Behrmann I, Heinrich PC, Diehl V, Tesch H. *STAT3 is constitutively activated in Hodgkin cell lines.* **Blood.** 2001;98:762-70
128. Gearing DP, Comeau MR, Friend DJ, Gimpel SD, Thut CJ, McGourty J, Brasher KK, King JA, Gillis S, Mosley B, et al. *The IL-6 signal transducer, gp130: an oncostatin M receptor and affinity converter for the LIF receptor.* **Science.** 1992;255:1434-7
129. Mitsuyama K, Sata M, Rose-John S. *Interleukin-6 trans-signaling in inflammatory bowel disease.* **Cytokine Growth Factor Rev.** 2006;17:451-61
130. Coulie PG, Vanhecke A, Van Damme J, Cayphas S, Poupart P, De Wit L, Content J. *High-affinity binding sites for human 26-kDa protein (interleukin 6, B cell stimulatory factor-2, human hybridoma plasmacytoma growth factor, interferon-beta 2), different from those of type I interferon (alpha, beta), on lymphoblastoid cells.* **Eur J Immunol.** 1987;17:1435-40
131. Grotzinger J, Kurapkat G, Wollmer A, Kalai M, Rose-John S. *The family of the IL-6-type cytokines: specificity and promiscuity of the receptor complexes.* **Proteins.** 1997;27:96-109
132. Carter PJ. *Potent antibody therapeutics by design.* **Nat Rev Immunol.** 2006;6:343-57
133. Fishburn C. *The pharmacology of PEGylation: Balancing PD with PK to generate novel therapeutics.* **J Pharm Sci.** 2008 Jan 15; [Epub ahead of print]. 2008
134. Atreya R, Mudter J, Finotto S, Mullberg J, Jostock T, Wirtz S, Schutz M, Bartsch B, Holtmann M, Becker C, Strand D, Czaja J, Schlaak JF, Lehr HA, Autschbach F, Schurmann G, Nishimoto N, Yoshizaki K, Ito H, Kishimoto T, Galle PR, Rose-John S, Neurath MF. *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.** 2000;6:583-8
135. Rose-John S, Waetzig GH, Scheller J, Grotzinger J, Seegert D. *The IL-6/sIL-6R complex as a novel target for therapeutic approaches.* **Expert Opin Ther Targets.** 2007;11:613-24
136. Huyton T, Zhang JG, Luo CS, Lou MZ, Hilton DJ, Nicola NA, Garrett TP. *An unusual cytokine:Ig-domain interaction revealed in the crystal structure of leukemia inhibitory factor (LIF) in complex with the LIF receptor.* **Proc Natl Acad Sci U S A.** 2007;104:12737-42

8. ANHANG

8-1 *SignalP-NeuralNetwork*-Resultat für Abspaltung von Signalpeptide

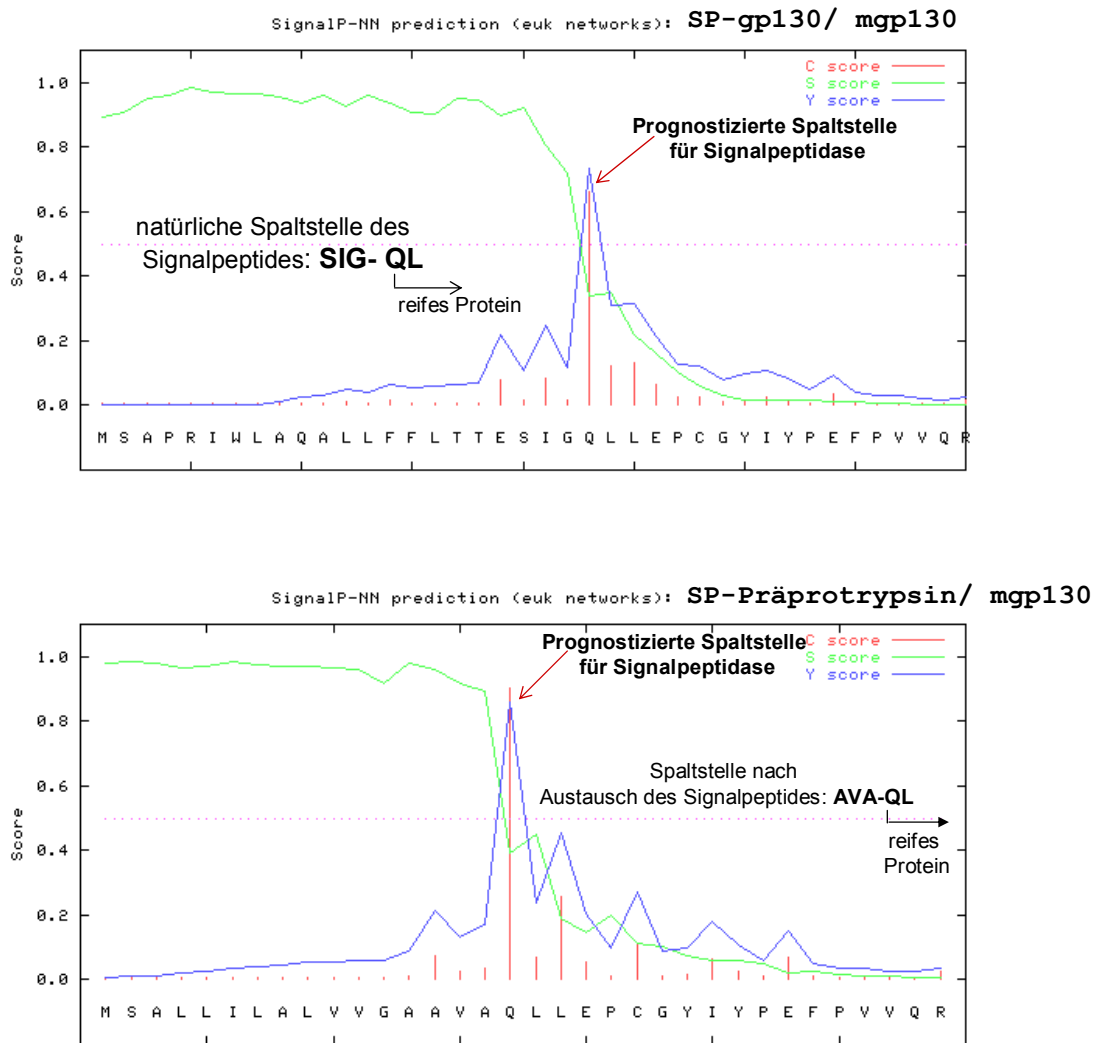


Abbildung 8-1: Graphische Darstellung der *SignalP-NeuralNetwork* Resultate zur Vorhersage der Spaltstelle verschiedener Signalpeptide in Kombination mit murinem gp130

Für die Verwendung des Präprotrypsin-Signalpeptids (PPT-SP) (untere Graphik) wird eine identische Spaltstelle wie für die Signalsequenz des mgp130 (obere Graphik) vorhergesagt. Die Spaltung erfolgt bei max. Y-score (Wert max. Hydrophobizität).

8.2. Auflistung der an Interaktionen beteiligte Aminosäuren und Größen der Interaktionsflächen

Tabelle 2: Die *site* I-Kontaktfläche (IL-6R α / IL-6)

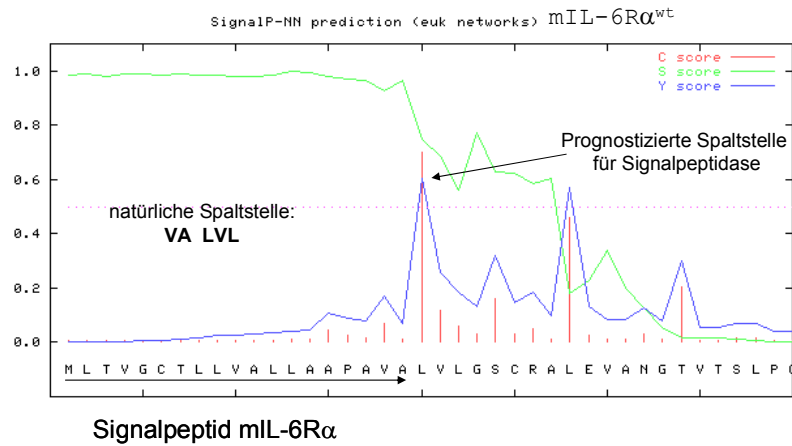
hIL-6Rα		mIL-6Rα	
InterProSurf		Molsurfer/PPI	
Aminosäure	Oberfläche (Å ²)	Aminosäure	Aminosäure
L108	74,41	L108	L104
		F134	I130
N136	115,80	N136	T132
P162	64,31	P162	T133
E163	20,19	E163	N134
G164	34,26	G164	L159
S166	47,78	S166	E160
F168	56,10	F168	G161
Q190	9,97	Q190	K163
		C192	Y165
		G193	H187
		S228	L189
F229	73,27	F229	K190
		Y230	S225
		R231	Y226
		R233	Y227
		D253	L228
		L254	E274
		E278	E275
F279	25,37	F279	L276
		Q281	D277
			L278
Gesamtfläche: 521,5 Å²		644,3 Å²	
InterProSurf		Molsurfer/PPI	
Aminosäure	Oberfläche (Å ²)	Aminosäure	Aminosäure
L104	72,14	L104	L104
		I130	I130
		T132	T132
T133	98,16	T133	T133
N134	57,41	N134	N134
L159	55,22	L159	L159
E160	8,05	E160	E160
G161	19,50	G161	G161
K163	42,44	K163	K163
Y165	46,97	Y165	Y165
H187	45,58	H187	H187
		L189	L189
K190	71,85	K190	K190
		S225	S225
Y226	75,48	Y226	Y226
Y227	12,64	Y227	Y227
L228	61,65	L228	L228
		E274	E274
E275	52,80	E275	E275
L276	15,25	L276	L276
		D277	D277
		L278	L278
Gesamtfläche: 735,1 Å²		834,0 Å²	

Tabelle 3: Die *site* IIb-Kontaktfläche (IL-6R α / gp130-CBM)

hIL-6R α		mIL-6R α	
InterProSurf		Molsurfer/PPI	
Aminosäure	Oberfläche (Å ²)	Aminosäure	Aminosäure
		N211	R208
R213	18,14	R213	R210
W214	45,47	W214	W211
R242	92,51	R242	Y235
S243	15,59	S243	P237
T245	86,85	T245	W239
		F246	S240
T247	8,83	T247	E242
		T248	F243
W249	84,51	W249	T244
		M250	V245
K252	146,05	K252	L246
		D253	L247
H261	97,35	H261	P249
D262	60,95	D262	V250
W264	151,88	W264	H258
		S265	D259
			L261
			R262
			V264
Gesamtfläche: 403,4 Å²		733,1 Å²	Gesamtfläche: 322,4 Å²
			618,2 Å²

8-3 SignalP-NeuralNetwork-Resultate für die Vorhersage der Abspaltung des Signalpeptides bei mL-6R α -Mutanten

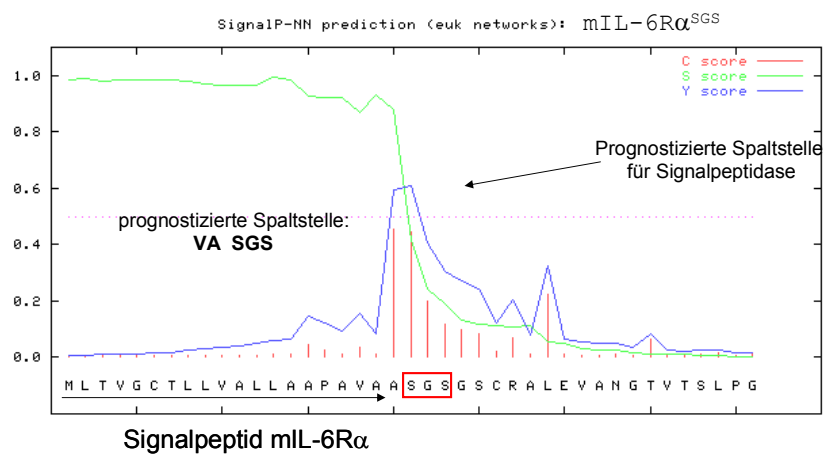
(A) mL-6R α ^{wt} und mL-6R α ^{Δ D1 + Präd1}

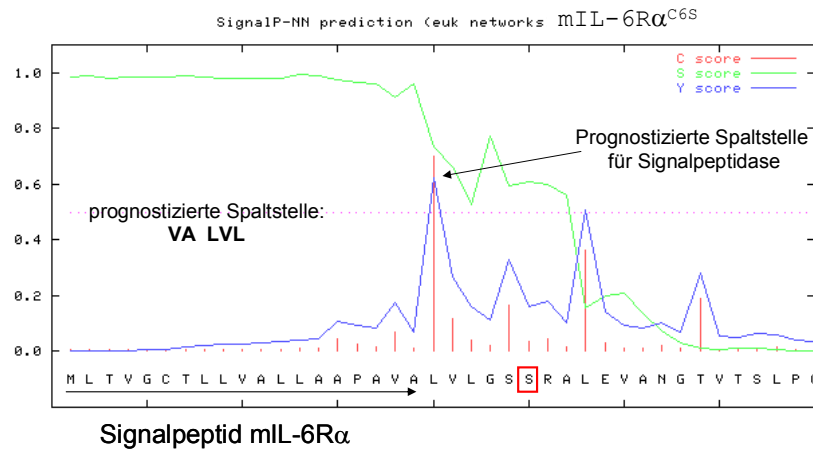


(B) mL-6R α ^{SGS}

besondere Anmerkungen zur Herstellung der IL-6R α -Mutante:

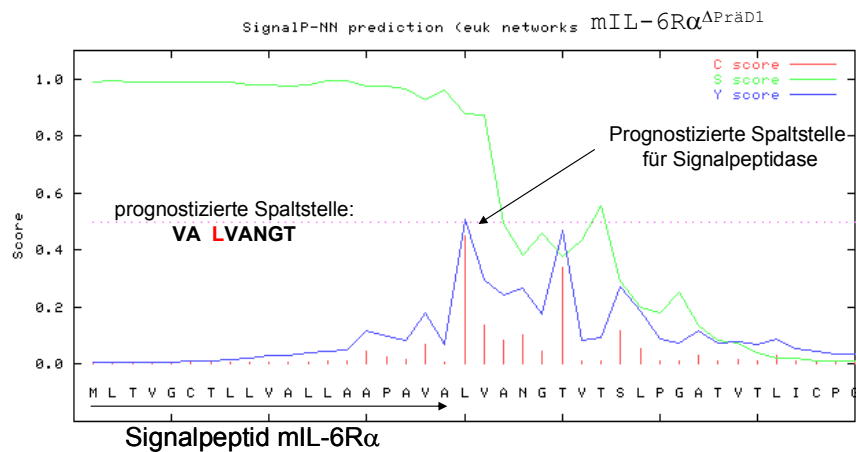
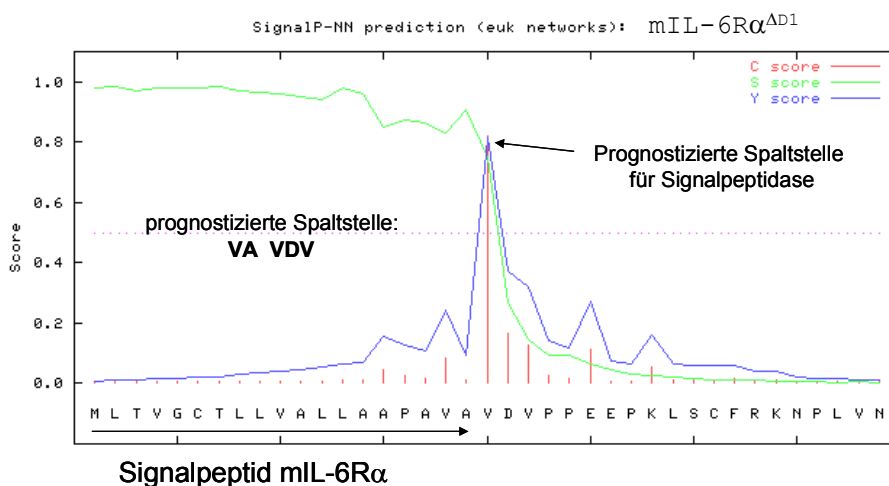
Durch PCR-Mutagenese wurde der Sequenz des Signalpeptides C-terminal ein zusätzliches Alanin eingefügt, um ein reifes Protein mit den N-terminalen Aminosäuren SGS zu erhalten; ohne diese zusätzliche Aminosäure wird eine Deletion prognostiziert. Die zusätzliche Aminosäure ist nicht im reifen Protein enthalten



(C) mIL-6R α ^{C6S}(D) mIL-6R α ^{APräd1}

besondere Anmerkung zur Herstellung der IL-6R α -Mutante:

Durch PCR-Mutagenese wurde der Sequenz des Signalpeptides C-terminal zusätzlich die Aminosäure Leucin zugefügt, welches auch nach Splatung im reifen Protein enthalten ist; es wurde darauf geachtet diese Mutation mit dem mIL-6R α ^{wt}-Protein vergleichbar zu halten. Die N-terminalen Aminosäuren LVA dieser Deletionsmutante kommen der Sequenz des Wildtyp-Proteins (LVL) sehr nahe.

E) mIL-6R α ^{AD1}



Danksagung

Mein uneingeschränkter Dank gilt Herrn Professor em. Dr. rer. nat. Peter C. Heinrich für seine uneingeschränkte Unterstützung und sein stetes Interesse an der Entwicklung des Projektes.

Gleichermaßen möchte ich auch Herrn Priv.-Doz. Dr. rer. nat. C. Peterhänsel meinen Dank aussprechen, der das Ko-Referat für die vorliegende Dissertation übernommen hat.

Professor Dr. rer. nat. Gerhard Müller-Newen möchte ich für die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und die Möglichkeit zur Entwicklung eigener Ideen danken.

Besonders möchte Priv.-Doz. Dr. rer. nat. S. Haan für die Erstellung des Strukturmodells des mIL-6R α und für die vielen konstruktiven Diskussionen, seinen Ideenreichtum und ansteckenden Optimismus danken.

Gleichermaßen möchte ich Dr. med. Stefan Wüller danken. Nicht nur die kompetente „Expedition in die Welt der fluoreszenten Dinge“, sondern ebenfalls für seine konstruktiven Ideen und seine Hilfsbereitschaft.

Ferner danke ich Dr. med. Peter Boor (Institut für Nephrologie und Immunologie, Universitätsklinikum RWTH Aachen) für seinen Einsatz bei der Durchführung der Tierexperimente.

Den Mitarbeitern von Labor 13 danke ich für die freundliche Aufnahme als „Exil-Labor 10er“. Besonders möchte ich Marlies Kauffmann für ihre Hilfe und die vielen kompetenten Ratschläge danken.

An dieser Stelle möchte ich ganz herzlich allen Mitgliedern des Labors und natürlich auch meinem „Heimatlabor“ meinen Dank aussprechen: Für ihre Hilfsbereitschaft und einfach für die vielen kleinen Dinge, die ein gutes Miteinander ausmachen und die gemeinsame Zeit so unvergesslich gemacht haben.

Ganz herzlich danke ich Dr. rer. nat. Carin Jansen und René Eulenfeld für die Durchsicht des Manuskriptes.

Am meisten bin ich meinen Eltern und meinen Freunden zu Dank verpflichtet, die mich stets motiviert und mit unendlicher Geduld die ganze Zeit ertragen haben.



Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Monique Yvonne Wiesinger
Geburtsdatum	29.06.1974
Geburtsort	Würselen
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	deutsch

Schulausbildung

1980 - 1984	Gemeinschafts-Grundschule II / Baesweiler
1984 - 1993	Gymnasium der Stadt Baesweiler

Schulabschluss Allgemeine Hochschulreife

Hochschulstudium

10/ 1993- 09/ 2004	Fachrichtung: Biologie, RWTH Aachen
09/ 2003- 09/ 2004	Diplomarbeit am Institut für Biochemie der RWTH Aachen

Studienabschluss Diplom-Biologin

wissenschaftliche Tätigkeit

seit 10/ 2004	wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Biochemie der RWTH-Aachen
---------------	---------------------------------------------------------------------------

21.07.08	Tag der mündlichen Doktorprüfung
----------	----------------------------------

