

**Struktur- und Funktionsuntersuchungen  
am humanen Interleukin-11-Rezeptorkomplex**

**Von der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften der Rheinisch-  
Westfälischen Technischen Hochschule Aachen zur Erlangung des akademischen  
Grades eines Doktors der Naturwissenschaften genehmigte Dissertation**

vorgelegt von  
Diplom-Chemikerin  
Ingrid Tacke  
aus Neuwied

Berichter: Universitätsprofessor Dr. Peter C. Heinrich  
Universitätsprofessor Dr. Dieter Enders

Tag der mündlichen Prüfung: 13 Februar 2002

„Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Hochschulbibliothek online verfügbar.“

## **Publikationen**

K. Schleinkofer, A. Dingley, I. Tacken, M. Federwisch, G. Müller-Newen, PC. Heinrich, P. Vusio, Y. Jacques, J. Grötzinger.

Identification of the domain in the human interleukin-11 receptor that mediates ligand binding.  
*J Mol Biol.* 2001; 306: 263-74.

I. Kurth, U. Horsten, S. Pflanz, A. Timmermann, A. Küster, H. Dahmen, I. Tacken, PC. Heinrich, G. Müller-Newen.

Importance of the membrane-proximal extracellular domains for activation of the signal transducer glycoprotein 130.

*J Immunol.* 2000; 164: 273-82.

I. Tacken, H. Dahmen, O. Boisteau, S. Minvielle, Y. Jacques, J. Grötzinger, A. Küster, U. Horsten, C. Blanc, FA. Montero-Julian, PC. Heinrich, G. Müller-Newen.

Definition of receptor binding sites on human interleukin-11 by molecular modeling-guided mutagenesis.

*Eur J Biochem.* 1999; 265: 645-55.

S. Pflanz, I. Tacken, J. Grötzinger, Y. Jacques, S. Minvielle, H. Dahmen, PC. Heinrich, G. Müller-Newen.

A fusion protein of interleukin-11 and soluble interleukin-11 receptor acts as a superagonist on cells expressing gp130.

*FEBS Lett.* 1999; 450: 117-22.

## **Förderung**

Stipendium des "Deutschen Akademischen Austauschdienstes" in Bonn  
zum Forschungsaufenthalt in Nantes (Frankreich)  
vom 1/10/2000 bis 31/03/2001

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1.</b>	<b>EINLEITUNG</b>	<b>1</b>
<b>1.1.</b>	<b>ZYTOKINE</b>	<b>1</b>
<b>1.2.</b>	<b>ZYTOKINREZEPTOREN</b>	<b>2</b>
<b>1.3.</b>	<b>DER INTERLEUKIN-11-REZEPTORKOMPLEX</b>	<b>5</b>
1.3.1.	DIE REZEPTORKETTEN IL-11R $\alpha$ UND GP130	5
1.3.2.	LÖSLICHE REZEPTOREN	8
1.3.3.	INTERLEUKIN-11	10
1.3.3.1.	Vorkommen und Funktion	10
1.3.3.2.	Struktur	11
<b>1.4.</b>	<b>ZIELSETZUNG DER ARBEIT</b>	<b>13</b>
<b>2.</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN</b>	<b>15</b>
<b>2.1.</b>	<b>CHEMIKALIEN</b>	<b>15</b>
<b>2.2.</b>	<b>ZYTOKINE UND LÖSLICHE REZEPTOREN</b>	<b>15</b>
<b>2.3.</b>	<b>MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN</b>	<b>16</b>
2.3.1.	BAKTERIENSTÄMME	16
2.3.2.	BAKTERIENKULTUR	17
2.3.3.	ISOLIERUNG VON PLASMID-DNA	18
2.3.3.1.	Midi-/Maxipräparation von Plasmid-DNA	18
2.3.3.2.	Minipräparation von Plasmid-DNA	18
2.3.4.	PCR-REAKTION	18
2.3.5.	SCHNEIDEN VON DNA MIT RESTRIKTIONSENZYMEN	19
2.3.7.	FÄLLUNG VON DNA	19
2.3.8.	REINIGUNG VON DNA DURCH PHENOL/CHLOROFORM-EXTRAKTION	19
2.3.9.	DEPHOSPHORYLIERUNG LINEARISierter DNA	20
2.3.10.	LIGATION VON DNA	20
2.3.11.	HERSTELLUNG KOMPETENTER BAKTERIEN	20
2.3.11.1.	Allgemein	20
2.3.11.2.	Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> K12 GI724	21
2.3.12.	TRANSFORMATION KOMPETENTER BAKTERIEN	21
2.3.13.	GELELEKTROPHORETISCHE AUFTRENNUNG VON NUKLEINSÄUREN	22
2.3.13.1.	Agarose-Gelelektrophorese	22
2.3.13.2.	Isolierung von DNA aus Agarosegelen	22
2.3.14.	GENERATION DER PUNKTMUTANTEN	23
2.3.15.	AUTOMATISCHES SEQUENZIEREN VON DNA MIT DEM ABI PRISM 310 SEQUENZIERER	24
2.3.16.	EXPRESSION VON PROTEINEN MIT DEM TRX-FUSIONSPROTEIN-EXPRESSIONSSYSTEM	25
<b>2.4.</b>	<b>ZELLKULTUR</b>	<b>25</b>
2.4.1.	ZELLINIEN UND DEREN KULTIVIERUNG	25
2.4.2.	EXPRESSION VON PROTEINEN IM BACULOVIRUS-EXPRESSIONSSYSTEM	27
2.4.3.	TRANSFEKTION VON COS7-ZELLEN	27
2.4.4.	INDUKTION DES SHEDDINGS AUF COS7-ZELLEN	28
2.4.5.	BIOAKTIVITÄTSTEST MIT HEPG2-ZELLEN	29
2.4.6.	BIOAKTIVITÄTSTEST MIT BA/F3-GP130-IL-11R $\alpha$ -ZELLEN	29
2.4.7.	BIOAKTIVITÄTSTEST MIT B9-ZELLEN	29

<b>2.5.</b>	<b>PROTEINCHEMISCHE METHODEN</b>	<b>30</b>
2.5.1.	QUANTITATIVE BESTIMMUNG VON PROTEINMENGEN	30
2.5.2.	SODIUMDODECYLSULFAT-POLYACRYLAMID-GELELEKTROPHORESE (SDS-PAGE)	30
2.5.3.	FÄRBUNG VON PROTEINGELEN	30
2.5.3.1.	Coomassie-Färbung	30
2.5.3.2.	Silberfärbung für Proteingele	31
2.5.4.	KONZENTRIEREN UND UMPUFFERN VON PROTEINLÖSUNGEN	31
2.5.5.	PROTEINFÄLLUNG	32
2.5.6.	NACHWEIS DER $\alpha$ -REZEPTORBINDUNG MITTELS ELISA	32
2.5.7.	NACHWEIS DER STAT-DNA-BINDUNG IM ELEKTROPHORETISCHEN MOBILITÄTSSHIFT ASSAY (EMSA)	32
2.5.7.1.	Herstellung von Kernextrakten	32
2.5.7.2.	Radioaktive Markierung doppelsträngiger DNA-Sonden	33
2.5.7.3.	EMSA	34
2.5.8.	PLASMONRESONANZ	35
2.5.8.1.	Immobilisierungstechnik	35
2.5.8.2.	Kinetische Messungen	35
2.5.9.	GELFILTRATION DES SGP130 IN AN- UND ABWESENHEIT VON IL-11R-D3	36
2.5.10.	AUFREINIGUNG VON TRX-IL-11	36
<b>2.6.</b>	<b>IMMUNOLOGISCHE METHODEN</b>	<b>36</b>
2.6.1.	ANTISEREN UND ANTIKÖRPER	36
2.6.2.	WESTERN BLOT-ANALYSE BEI VERWENDUNG VON PVDF-MEMBRANEN	37
2.6.3.	RELATIVE PROTEINBESTIMMUNG MITTELS ELISA	38
2.6.3.1.	Trx-IL-11	38
2.6.3.2.	sIL-11R $\alpha$	39
2.6.3.3.	sgp130	39
2.6.3.4.	IL-6R $\alpha$	40
2.6.4.	DURCHFLUßZYTOMETRIE (FACS-ANALYSE)	40
2.6.5.	IMMUNPRÄZIPITATIONEN	41
2.6.5.1.	Immunpräzipitation des löslichen IL-11R $\alpha$ -Flag mit kovalent an BrCN-Sepharose gebundene Trx-IL-11-Mutanten	41
2.6.5.2.	Immunpräzipitation der Trx-IL-11-Mutanten mit IL-11R $\alpha$ -Flag	41
2.6.5.3.	Nachweis des mit pSVLgp130IgG und Zytokin präzipitierten sIL-11R $\alpha$ -Flag	41
2.6.5.4.	Nachweis des mit sIL-11R $\alpha$ -Flag und Zytokin präzipitierten sgp130	42
2.6.5.5.	Nachweis des IL-11R-D3(C248A) präzipitierten sgp130	42
<b>3.</b>	<b>ERGEBNISSE</b>	<b>43</b>
<b>3.1.</b>	<b>AUSWAHL DER AMINOSÄUREN FÜR DIE POSITIONSGERICHTETE MUTAGENESE DES HUMANEN INTERLEUKIN-11</b>	<b>43</b>
<b>3.2.</b>	<b>GENERIERUNG DER IL-11 MUTANTEN UND DEREN EXPRESSION ALS THIOREDOXIN-FUSIONSPROTEINE</b>	<b>43</b>
<b>3.3.</b>	<b>VERGLEICHENDE BIOAKTIVITÄTSMESSUNGEN VON TRX-IL-11-WILDTYP UND DEN PUNKTMUTANTEN</b>	<b>45</b>
3.3.1.	INDUKTION DER SYNTHESE VON AKUTPHASE-PROTEINEN IN HEPG2-ZELLEN	45
3.3.2.	STIMULATION DER PROLIFERATION VON BA/F3-GP130-IL-11R $\alpha$ -ZELLEN	46
<b>3.4.</b>	<b>DEFINITION DER BINDUNGSSTELLEN DES IL-11 ZUM <math>\alpha</math>-REZEPTOR (SITE 1) UND ZU GP130 (SITES 2 UND 3)</b>	<b>48</b>
3.4.1.	BINDUNG DES TRX-IL-11 UND DER MUTIERTEN PROTEINE AN BA/F3-GP130-IL-11R $\alpha$ -ZELLEN	48
3.4.2.	INTERAKTION VON TRX-IL-11-MUTANTEN MIT DEM IL-11R $\alpha$	49
3.4.3.	INDUKTION DER BILDUNG DES TERNÄRKOMPLEXES DER TRX-IL-11-MUTANTEN MIT sIL-11R $\alpha$ -FLAG UND SGP130	52
3.4.4.	BESTIMMUNG DER SITE 2 DES IL-11 DURCH KARTIEREN DER ANTAGONISTISCHEN ANTIKÖRPER	53

<b>3.5.</b>	<b>VERSTÄRKUNG DER <i>SITE 1</i> ZUR ENTWICKLUNG VON AGONISTEN UND ANTAGONISTEN</b>	<b>56</b>
<b>3.6.</b>	<b>INTERAKTION DER DRITTEN DOMÄNE DES IL-11R<math>\alpha</math> MIT GP130</b>	<b>60</b>
3.6.1.	DER IL-11R $\alpha$ BINDET GP130 NUR DURCH PRÄASSOZIATION VON IL-11	60
3.6.2.	DIE DRITTE DOMÄNE DES IL-11R $\alpha$ BINDET GP130 UNABHÄNGIG VON IL-11	61
3.6.3.	DIE DRITTE DOMÄNE DES IL-11R $\alpha$ BINDET EIN GP130-MONOMER	62
3.6.4.	DIE DRITTE DOMÄNE DES IL-11R $\alpha$ IST BIOLOGISCH AKTIV	63
<b>3.7.</b>	<b><i>SHEDDING</i> DES IL-11R<math>\alpha</math></b>	<b>64</b>
3.7.1.	AUSWAHL DER ZELLTYPEN	64
3.7.2.	<i>SHEDDING</i> AUF COS7-ZELLEN	65
3.7.3.	<i>SHEDDING</i> AUF MAKROPHAGEN	68
<b>4.</b>	<b>DISKUSSION</b>	<b>69</b>
<b>5.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG</b>	<b>78</b>
<b>6.</b>	<b>AUSBLICK</b>	<b>80</b>
<b>7.</b>	<b>LITERATUR</b>	<b>81</b>
<b>8.</b>	<b>ANHANG</b>	<b>89</b>

# 1. Einleitung

## 1.1. Zytokine

Zytokine sind sekretorische Proteine mit niedrigem Molekulargewicht, die als interzelluläre Mediatoren des menschlichen Organismus dienen. Sie regulieren bereits in nano- bis picomolaren Konzentrationen Wachstum, Differenzierung und spezifische Effektorfunktionen der Zielzellen. Ihre immunregulatorische Wirkung zeigt sich in der Kontrolle von Entzündungsprozessen und Akutphase-Reaktionen. Die Kommunikation zwischen Zytokin und Zelle läuft über bestimmte Transmembranrezeptoren an der Zelloberfläche ab, die ihrerseits intrazelluläre Signalkaskaden induzieren. Die Wirkung der Zytokine ist pleiotrop, da eine Vielzahl verschiedener Zelltypen gleiche Rezeptoren tragen und so ein und dasselbe Protein unterschiedliche Antworten auslösen kann. Desweiteren wirken Zytokine redundant, d.h. daß unterschiedliche Zytokine die gleiche biologische Antwort hervorrufen können. Im Gegensatz zu endokrinen Hormonen wirken Zytokine meist lokal und über einen kurzen Zeitraum. Zu den Zytokin-sezernierenden Zellen gehören z.B. Monozyten, Makrophagen, Endothelzellen, Fibroblasten sowie B- und T-Zellen. Die Beschreibung der Funktionen einzelner Zytokine *in vivo* wird dadurch erschwert, daß eine Vielzahl regulatorischer Faktoren, die additiv, synergistisch oder antagonistisch wirken können, für die auftretenden Effekte verantwortlich sind [1].

Die Einteilung der Zytokine in Gruppen erfolgt entweder nach ihrer biologischen Funktion, nach ihrer Struktur oder nach dem Rezeptor, über den sie signalisieren [2]. Funktionell sind drei Gruppen zu nennen: die entzündungsfördernden (pro-inflammatorischen) Zytokine wie Interleukin-1 (IL-1),  $\text{TNF}\alpha$ ,  $\text{IFN}\gamma$  und Interleukin-8 (IL-8), die entzündungshemmenden (anti-inflammatorischen) wie Interleukin-10 (IL-10), Interleukin-4 (IL-4), Interleukin-13 (IL-13) und  $\text{TGF}\beta$  und die Interleukin-6-Typ-Zytokine, die je nach Situation entweder entzündungshemmend oder -fördernd wirken können.

Strukturell unterscheidet man vier Zytokingruppen: die  $4\alpha$ -Helixbündel-Zytokine (z.B. IL-6, IL-11), die langkettigen  $\beta$ -Faltblattzytokine (z.B.  $\text{TNF}\alpha$ , IL-1), die Zytokine mit mindestens zwei antiparallelen  $\beta$ -Faltblättern und einem C-terminalen  $\alpha$ -helicalen Segment (z.B. EGF, IL-8) und die Zytokine mit Mosaikstruktur (z.B. HGF) [2].

Die  $4\alpha$ -Helixbündel-Zytokine zeigen eine jeweils parallele Anordnung der ersten und der letzten beiden Helices. Die antiparallelen Helices A und D bilden einen spitzen Winkel mit den Helices B und C. Zwei Untergruppen stellen die *short chain*- und die *long chain*-Zytokine dar, die sich in Länge und Winkel der Helices unterscheiden.

Die wichtigsten Vertreter der 4 $\alpha$ -Helixbündel-Zytokine sind in Tabelle 1.1 zusammengefaßt.

<i>short chain</i> -Zytokine	<i>IL-2, IL-4, GM-CSF, M-CSF, IL-5,</i> <i>IL-3, IL-7, IL-9, IL-13, IL-15, SCF</i>
<i>long chain</i> -Zytokine	<i>G-CSF, GH, LIF, CNTF, IL-6, Leptin, Epo, OSM</i> <i>IL-11, TPO, PRL, CT-1, CLC</i>

**Tab. 1.1. Die 4 $\alpha$ -Helixbündel-Zytokine**

Die Tertiärstruktur der kursiv gedruckten Zytokine ist bekannt [3-13]

## 1.2. Zytokinrezeptoren

Die Wirkung der Zytokine auf die Zelle wird durch spezifische Oberflächenproteine vermittelt. Die Oligomerisierung dieser Proteine führt zur Aktivierung einer Signalkaskade und nachfolgenden Reaktionen der Zelle [14]. Bislang sind aufgrund struktureller Charakteristika vier Rezeptorfamilien beschrieben worden: die Hämatoetin-, Immunglobulin-, die Tumornekrosefaktor- und die Chemokin-Superfamilie.

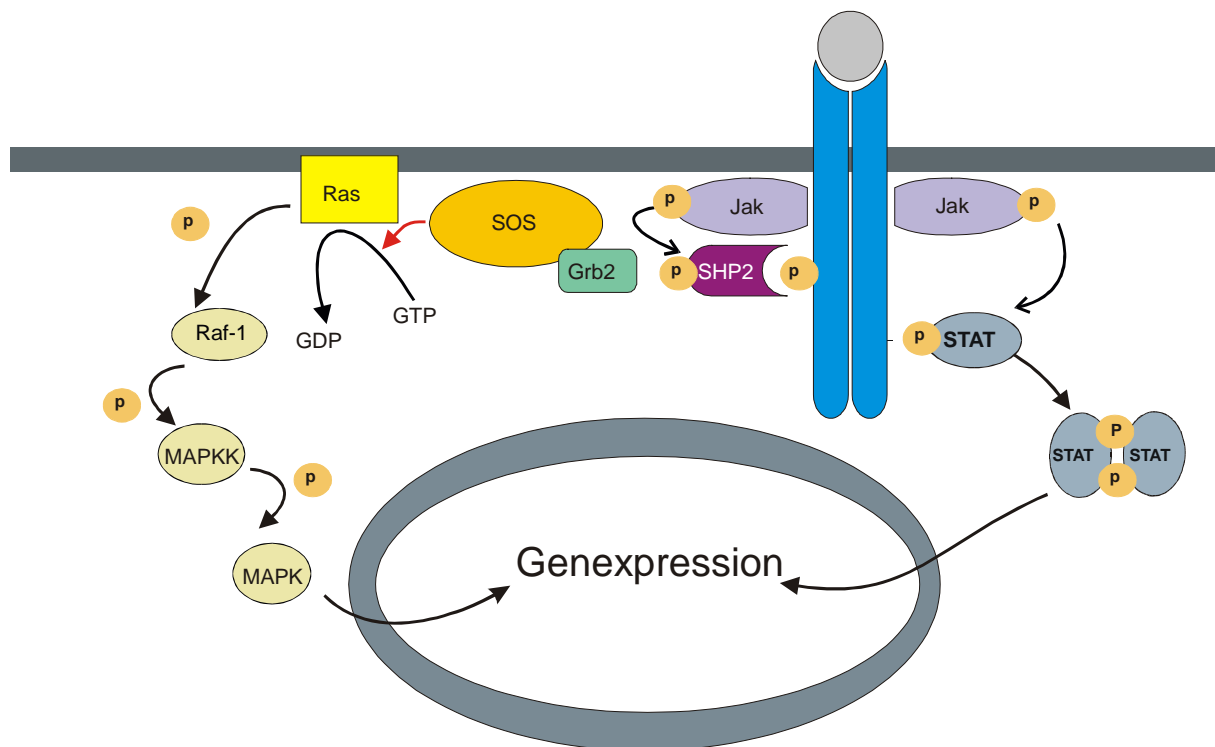
Die **Zytokinrezeptoren** werden aufgrund der strukturellen Eigenschaften ihrer Extrazellulärregion zusammengefaßt. Sie sind Typ I-Transmembranproteine [2], d.h. sie weisen einen N-terminalen Extrazellulärteil, eine Transmembrandomäne und einen C-terminalen zytoplasmatischen Teil auf. Eine Ausnahme bildet der CNTF-Rezeptor (*Ciliary Neurotrophic Factor Receptor*). Er besitzt anstelle der Transmembranregion einen Glykosyl-Phosphatidylinositol-Anker [15]. Die Gruppe läßt sich nochmals in zwei Untergruppen unterteilen:

Die **hämatoetischen Rezeptoren (Klasse I)** bilden Homodimere aus identischen Rezeptorketten (GH-R, PRL-R, Epo-R, G-CSF-R, TPO-R) oder Heterooligomere aus ligandenspezifischen  $\alpha$ -Rezeptoren und den gemeinsam genutzten Rezeptoruntereinheiten gp130 (IL-6R $\alpha$ , IL-11R $\alpha$ , CNTF-R $\alpha$ , LIF-R, OSM-R),  $\beta$ c (IL-3R, GM-CSF-R, IL-5R) oder IL-2R $\gamma$  (IL-2R $\alpha$ , IL-2R $\beta$ , IL-4R, IL-7R, IL-9R, IL-13R, IL-15R). Ein ihnen gemeinsames Merkmal ist ein extrazellulärer, N-terminaler Bereich, der ein oder zwei etwa 200 Aminosäuren große, ligandenbindende Homologiemodule beinhaltet. Diese setzen sich ihrerseits aus zwei Fibronectin-TypIII-Domänen zusammen. Die membrandistale Subdomäne enthält vier konservierte Cysteinreste, die membranproximale ein WSXWS-Motiv. Zusätzlich treten häufig weitere Fibronectin-TypIII- oder Immunglobulin-ähnliche Domänen auf. Im zytoplasmatischen, C-terminalen Bereich können ebenfalls sequenzhomologe, als Box 1 und Box 2 bezeichnete Regionen vorliegen. [9].

Den Vertretern der **Interferon-Rezeptorfamilie (Klasse II)** IFN- $\alpha$ R, IFN- $\beta$ R, TF-R und IL-10R fehlt das WSXWS-Motiv, sie enthalten aber ein zusätzliches, konserviertes Motiv bestehend aus vier Cysteinresten [2] [14].

Die Signaltransduktion erfolgt bei einigen Zytokinen wie Erythropoetin, Prolaktin und Wachstumshormon durch Bildung von homodimeren Rezeptorkomplexen. Weitaus häufiger setzen sich die Zytokinrezeptorkomplexe jedoch aus mehreren verschiedenen Untereinheiten zusammen. Definitionsgemäß werden ligandenbindende Komponenten als  $\alpha$ -Ketten, signaltransduzierende als  $\beta$ -Ketten bezeichnet. Bei manchen Zytokinen, wie IL-2, werden zur Bildung hochaffiner Rezeptorkomplexe zusätzlich  $\gamma$ -Ketten benötigt.

Die zytoplasmatischen Bereiche der Zytokinrezeptoren besitzen keine intrinsische Kinaseaktivität [8], sondern sind mit Tyrosinkinasen der Familie der **Janus-Kinasen (Jak)** assoziiert. Diese phosphorylieren ligandeninduziert verschiedene zytoplasmatische Adapterproteine und leiten so Signale ins Zellinnere weiter [14, 16]. In *Abb. 1.1.* ist ein allgemeines Modell für die Signaltransduktion durch Rezeptoren der Zytokinrezeptor-Superfamilie dargestellt.



**Abb. 1.1. Allgemeines Modell für die Signaltransduktion durch Rezeptoren der Zytokinrezeptor-Superfamilie**  
Die Aktivierung der Genexpression über STATs und die Ras/Raf/MAPK-Kaskade stellen zwei bedeutende Signaltransduktionswege dar.



Die ligandeninduzierte Rezeptor-Oligomerisierung führt zur Aktivierung und Auto- oder Transphosphorylierung der Janus-Tyrosinkinasen, die membranproximal über Box 1 und Box 2 konstitutiv mit der zytoplasmatischen Rezeptorregion assoziiert sind [17]. Nachfolgend kommt es zur Tyrosin-Phosphorylierung der signaltransduzierenden Rezeptoruntereinheit. Die gebildeten Phosphotyrosinreste stellen Bindungsstellen für eine Familie von Transkriptionsfaktoren dar, die als STATs (*signal transducers and activators of transcription*) bezeichnet werden [18-20]. Die Assoziation mit dem Rezeptor erfolgt über die sogenannte *src homology 2*- (SH2)-Domäne der STAT-Faktoren. Am Rezeptor erfolgt anschließend - ebenfalls durch Jak-Kinasen - die Tyrosin-Phosphorylierung der STATs, die in aktivierter Form über ihre SH2-Domänen Homo- oder Heterodimere bilden. Diese Dimere wandern in den Zellkern und binden dort an spezifische Elemente in den *enhancer*-Regionen der Promotoren entsprechender Zielgene und regulieren so deren Transkription.

Für einige Zytokine, z.B. für IL-2 und IL-6, wurde ein weiterer Signaltransduktionsweg beschrieben, der über die Ras/Raf/MAPK (*mitogen activated protein kinase*)-Kaskade verläuft. Nach Rezeptoraktivierung kommt es zur Bindung und Phosphorylierung von SHP2 (*src homology 2 (SH2) domain containing tyrosine phosphatase 2*) [21], welche das Adapterprotein Grb2 rekrutiert. Grb2 ist über seine SH3-Domäne an SOS, den Ras-Guaninnukleotid-*exchange*-Faktor gebunden. Der Grb2/SOS-Komplex wird an die Plasmamembran rekrutiert und aktiviert dort Ras. Nachfolgend kommt es der Reihe nach zur Phosphorylierung und Aktivierung der Serin-Threoninkinasen Raf1, MAPKK (*MAPK kinase*) und MAPK. Letztere phosphoryliert Transkriptionsfaktoren wie c-jun, c-myc, c-fos und NF-IL-6, welche die Expression der Ras-induzierbaren Gene bewirken [22].

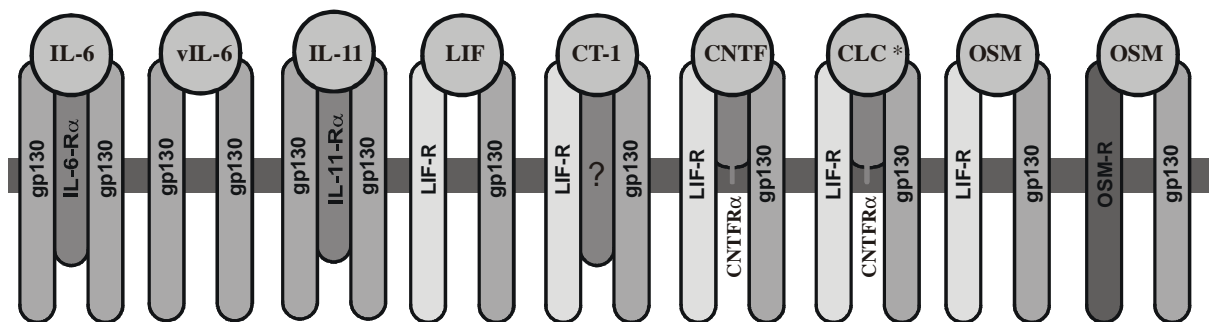
Nach Induktion mit IL-6 konnte außerdem die Aktivierung weiterer Signalmoleküle wie PLC (Phospholipase C), Vav [23], PI3K (Phosphatidylinositol 3 Kinase), PKB (Proteinkinase B), Akt [24, 25] und PKC  $\delta$  (Proteinkinase C) beschrieben werden [26].

### 1.3. Der Interleukin-11-Rezeptorkomplex

#### 1.3.1. Die Rezeptorketten IL-11R $\alpha$ und gp130

Der Interleukin-11-Rezeptorkomplex gehört zu den hetero-oligomeren Zytokin-Rezeptorkomplexen. Er setzt sich aus zwei verschiedenen Typ I-Membranproteinen zusammen: dem Interleukin-11-Rezeptor (IL-11R $\alpha$ ) und dem Signaltransduktor Glykoprotein 130 (gp130). Der IL-11R $\alpha$  bindet zunächst das Interleukin-11 (IL-11), seine zytoplasmatische Domäne löst jedoch kein intrazelluläres Signal aus. Erst die Assoziation mit zwei Rezeptoruntereinheiten gp130, die alleine keine Affinität zu IL-11 zeigen, führt zur Signaltransduktion.

Über die Rezeptoruntereinheit gp130 signalisieren Zytokine, die zu den Interleukin-6-Typ-Zytokinen zusammengefaßt werden (Abb.1.2.): Interleukin-6 (IL-6), virales Interleukin-6 (vIL-6), Interleukin-11 (IL-11), *Leukemia Inhibitory Factor* (LIF), Onkostat M (OSM), *Ciliary Neurotrophic Factor* (CNTF), *Cardiotrophin-1* (CT-1) [17] und das vor kurzem klonierte *Cardiotrophin-like Cytokine* (CLC), auch als *Novel Neurotrophin-1* (NNT-1) oder *B-Cell-Stimulating Factor 3* (BSF-3) bezeichnet. Für die Sezernierung von CLC ist die Expression des *Cytokine-like Factor-1* (CLF) erforderlich [27, 28]. Die IL-6-Typ-Zytokine besitzen Molekulargewichte von ungefähr 20 kDa und eine vorhergesagte oder bereits nachgewiesene 4 $\alpha$ -Helixbündel-Struktur. Sie werden mit Ausnahme von vIL-6, CNTF und CT-1 von Zellen sezerniert. CNTF und CT-1 werden erst nach Verletzung der produzierenden Zelle freigesetzt [17].



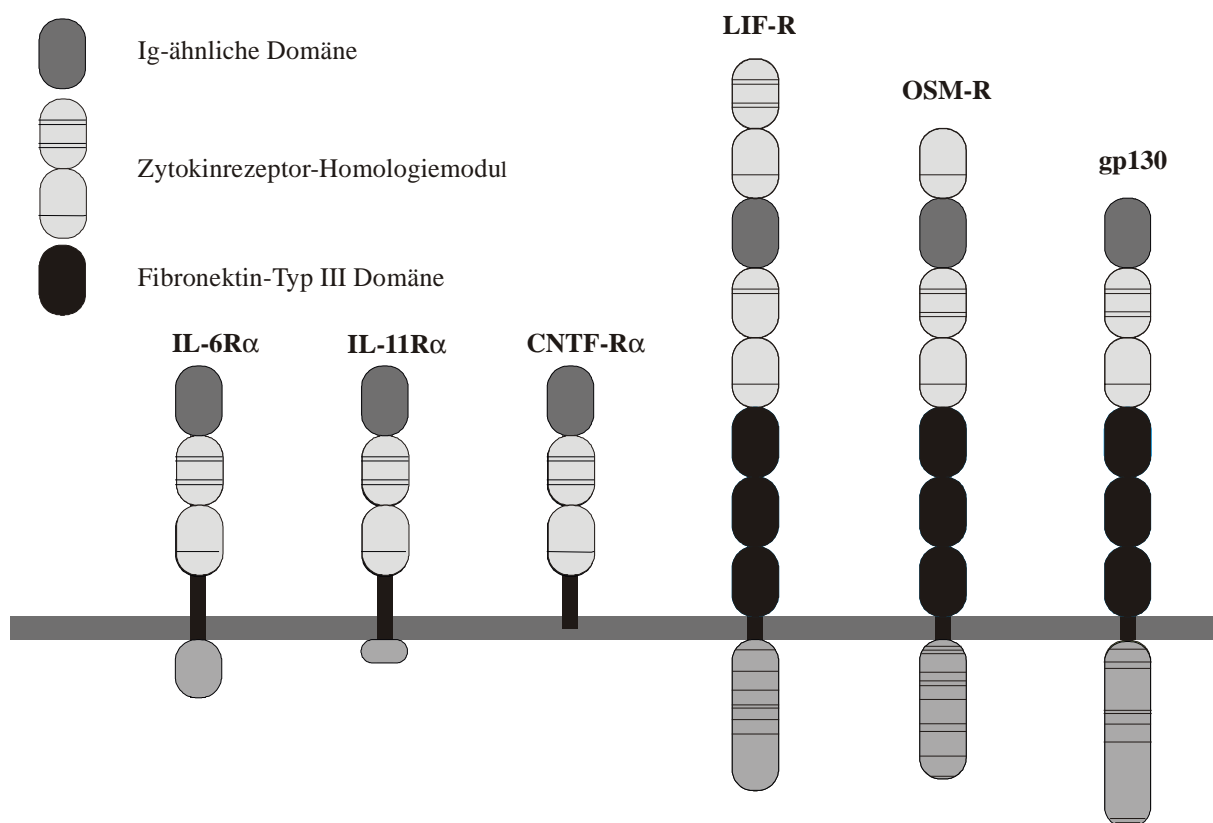
\*) auch bekannt als BSF-3 / NNT-1

#### Abb. 1.2. Rezeptorkomplexe der IL-6-Typ-Zytokine

Die Zytokine IL-6, vIL-6, IL-11, LIF, CNTF, OSM, CT-1 und CLC nutzen die signaltransduzierende Untereinheit gp130. Der LIF-Rezeptor ist an mehreren Komplexen beteiligt. OSM bindet außerdem an Komplexe aus gp130 und dem spezifischen OSM-R.

IL-6 und IL-11 induzieren nach Bindung ihrer  $\alpha$ -Rezeptoren eine gp130-Homodimerisierung. Die exakte stöchiometrische Zusammensetzung dieser Rezeptorkomplexe ist noch nicht geklärt. Eine Dimerisierung des gp130 wäre sowohl durch Bildung eines hexameren (je zwei Zytokine,  $\alpha$ -Rezeptoren, gp130) als auch eines tetrameren Komplexes (ein Zytokin, ein  $\alpha$ -Rezeptor, zwei

gp130) gewährleistet. CT-1, CNTF und CLC/CLF führen nach Bindung ihrer  $\alpha$ -Rezeptoren zur Heterodimerisierung von gp130 und LIF-R [17, 27, 29, 30]. LIF bewirkt durch Rekrutierung des LIF-R und anschließende Bindung von gp130 die Ausbildung eines gp130/LIF-R-Heterodimers. OSM bindet zunächst gp130 und rekrutiert dann LIF-R oder OSM-R. Als einziges Zytokin ist vIL-6 in der Lage, gp130 ohne  $\alpha$ -Rezeptor in einem signalkompetenten Rezeptorkomplex zu homodimerisieren [31]. Während gp130, LIF-R und OSM-R signaltransduzieren können, spielen die zytoplasmatischen Bereiche der  $\alpha$ -Rezeptoren IL-6R $\alpha$ , IL-11R $\alpha$  und CNTF-R $\alpha$  für die Signalweiterleitung keine Rolle [17].



**Abb. 1.3. Schematischer Domänen-Aufbau der Rezeptoren der IL-6-Typ Zytokine**

Die vorhergesagten oder bereits identifizierten Strukturen der einzelnen Domänen der Rezeptoren werden durch die in der Abbildung erläuterten Symbole wiedergegeben.

Die IL-6-Typ Zytokinrezeptoren gehören zu den Klasse I Zytokinrezeptoren (Abb. 1.3.), besitzen also ein Zytokinrezeptor-Homologiemodul. Alle Rezeptoren besitzen N-terminal eine Ig-ähnliche Domäne. Im Fall des LIF-Rezeptors oder OSM-Rezeptors liegt diese zwischen den beiden Zytokinrezeptor-Homologiemodulen. Die signaltransduzierenden Untereinheiten zeichnen sich durch drei zusätzliche membranproximale Fibronectin-Typ III Domänen aus [17].

Der **Signaltransduktor gp130** besteht aus insgesamt 896 Aminosäuren, von denen 597 Reste den extrazellulären Bereich, 22 Reste die Transmembrandomäne und 277 Aminosäuren den zytoplasmatischen Teil bilden [32]. Von 11 potentiellen N-Glykosylierungsstellen sind 9

glykosyliert [33]. Die sechs Domänen der Extrazellulärregion werden mit D1 bis D6 bezeichnet. D1 entspricht der N-terminalen Ig-ähnlichen Domäne, D2 und D3 bilden das Zytokinrezeptor-Homologiemodul und D4 bis D6 entsprechen den membranproximalen Fibronectin-Typ III Domänen (*Abb. 1.3.*). Die drei membranproximalen Domänen spielen eine wichtige Rolle für die Aktivierung des gp130 [34].

Der zytoplasmatische Teil weist membranproximal zwei zu weiteren Zytokinrezeptoren sequenz-homologe, als Box 1 und Box 2 bezeichnete Regionen auf [35], die für die Assoziation der Jaks verantwortlich sind [29]. Kürzlich konnte die Aminosäure Tryptophan 666 im Interbox1/2-Bereich identifiziert werden, die für die Bindung von Jak1 notwendig ist [36]. Neben Jak1, der wichtigsten Janus-Kinase für IL-6-Typ-Zytokine, assoziiert und aktiviert gp130 die Kinasen Jak2 und Tyk2 [37, 38].

Im zytoplasmatischen Bereich von gp130 liegen sechs Tyrosinreste. Die Funktion des ersten, membranproximalen Tyrosins (Y683) ist nicht bekannt. Das folgende Tyrosin 759 bindet SHP2 [21, 39] und vermutlich auch SOCS3 (*suppressor of cytokine signalling 3*). So konnte vor kurzem die Interaktion eines phosphorylierten Peptids der Sequenz des Tyrosinmotivs 759 und SOCS3 nachgewiesen werden [40]. Die Aktivierung von STAT1 und STAT3 erfolgt durch deren Assoziation an die vier membrandistalen, phosphorylierten Tyrosine (Y767, Y814, Y905 und Y915) [41]. Desweiteren wurde die Assoziation weiterer Kinasen wie Fes [42], Btk, Tec [43], Hck [44], Fyn und Lyn [45] an gp130 beschrieben. Im zytoplasmatischen Teil befindet sich ferner ein Di-Leucin-Motiv (Leu786, Leu787), welches wahrscheinlich für die *clathrin coated pits*-vermittelte Endozytose des gp130 sorgt [46]. Die biologische Relevanz des gp130 zeigt die gp130 *knock-out*-Maus, deren Embryonen Abnormalitäten in der Hämatopoese und in der Herzentwicklung aufweisen und ab Tag 12,5 *post coitum* sterben [47].

Der **humane IL-11R $\alpha$**  besteht aus 400 Aminosäuren, von denen die ersten 341 N-terminalen Aminosäuren die extrazelluläre Region darstellen. Die Transmembrandomäne beinhaltet weitere 27 Reste und die intrazelluläre Region die restlichen 32 C-terminalen Aminosäuren [48].

Der extrazelluläre Bereich weist eine ausgeprägte Homologie zum IL-6R $\alpha$  und zum CNTF-R $\alpha$  auf [15]. Er besteht aus drei Domänen, von denen die N-terminale Immunglobulin-ähnlich strukturiert ist, während die zweite und die membran-proximale Domäne mit ihren vier konservierten Cysteinen und der WSXWS-Box die typischen Merkmale des Zytokinrezeptor-Moduls aufweisen.

Durch alternatives Exon-Spleißen entsteht eine zweite Form aus 368 Aminosäuren, welcher der zytoplasmatische Teil fehlt [48]. Da beide Isoformen ähnliche biologische Eigenschaften zeigen, wird vermutet, daß der zytoplasmatische Teil des IL-11R $\alpha$  keine Rolle in der Signaltransduktion spielt [49].

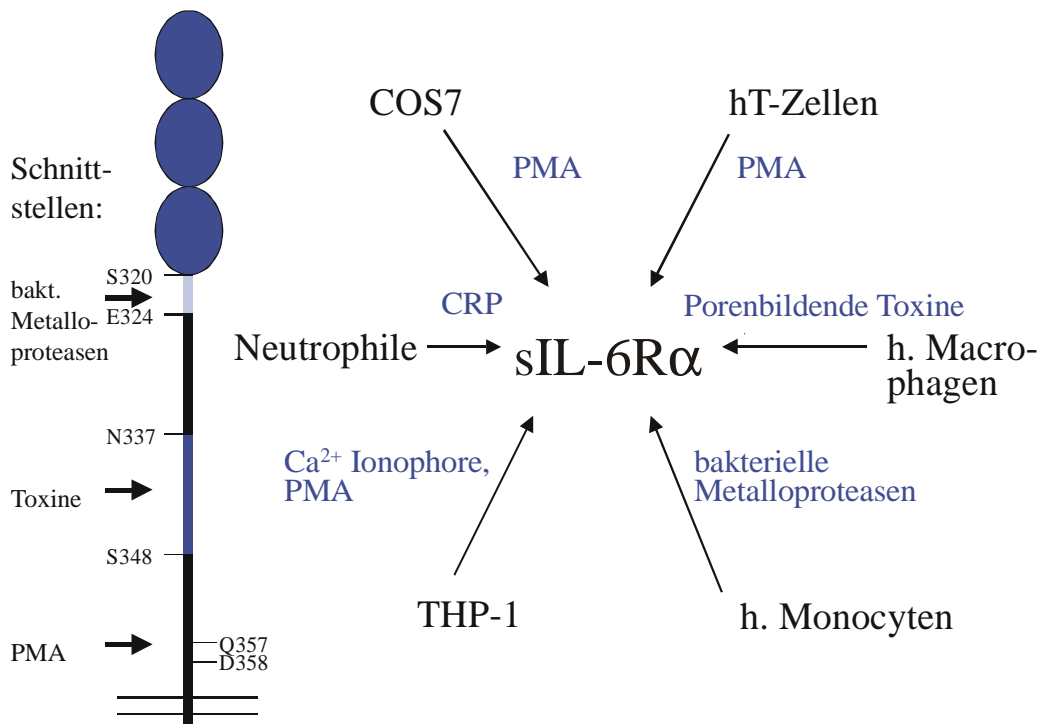
Die mRNAs beider IL-11R $\alpha$ -Formen konnten nebeneinander in humanem Herz-, Muskel- und Plazentagewebe nachgewiesen werden. Sie kommen außerdem in Keratinozyten-Zelllinien, humanen Zelllinien hämatopoetischen Ursprungs und Osteoblasten vor [48].

Die biologische Relevanz des IL-11R $\alpha$  zeigt die IL-11R $\alpha$  *knock-out*-Maus. Die weiblichen Tiere sind als Konsequenz einer beeinträchtigten Trophoplastenimplantation unfruchtbar [50, 51].

### 1.3.2. Lösliche Rezeptoren

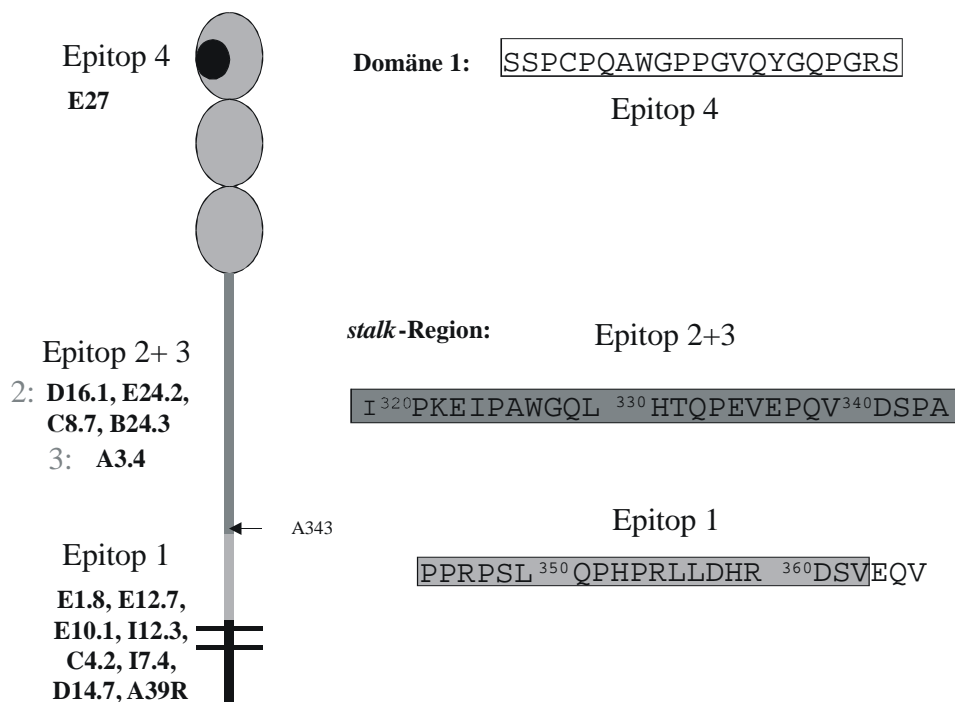
Neben membranständigen Zytokinrezeptoren existiert eine Vielzahl löslicher Rezeptorketten, die im allgemeinen antagonistisch wirken. Sie können durch alternatives Spleißen oder limitierte Proteolyse (*shedding*) entstehen. Das *shedding* des IL-6R $\alpha$  ist auf einer Vielzahl von Zellen beschrieben (*Abb. 1.4.*). Die Schnittstellen befinden sich ausnahmslos im membranproximalen *stalk*-Bereich des Rezeptors. Dessen 46 Aminosäuren verbinden die dritte extrazelluläre Domäne mit der Transmembranregion. Die Schnittstellen variieren je nach Induktor. Während PMA zu einem *shedding* nahe der Membran zwischen den Aminosäuren Q357 und D358 führt, liegt die Schnittstelle der Toxin-induzierten Proteolyse vermutlich zwischen N337 und S348 und bei bakteriellen Metalloproteasen im Bereich der Aminosäuren S320 und E324. Der IL-11R $\alpha$  besitzt ebenso wie der IL-6R $\alpha$  einen *stalk*-Bereich gleicher Länge. Das *alignment* zeigt jedoch kaum Übereinstimmungen. Auch konnte die lösliche Form des IL-11R $\alpha$  *in vivo* noch nicht nachgewiesen werden. Eine in Insektenzellen rekombinant hergestellte, lösliche Form des IL-11R $\alpha$  wirkt wie der sIL-6R $\alpha$  agonistisch.

Kürzlich gelang es C. Blanc, 14 monoklonale IL-11R $\alpha$ -Antikörper zu generieren und zu kartieren (*Abb. 1.5.*), die weitere Untersuchungen zur möglichen Proteolyse des Proteins ermöglichen [52].



**Abb. 1.4. Shedding des IL-6R $\alpha$**

Die limitierte Proteolyse des IL-6R $\alpha$  kann durch eine Vielzahl von Stimuli induziert werden (rechts). Die Schnittstellen befinden sich ausnahmslos im membranproximalen stalk-Bereich und variieren je nach Induktor (links). Während PMA zu einem shedding nahe der Membran zwischen den Aminosäuren Q357 und D358 führt, liegt die Schnittstelle der Toxin-induzierten Proteolyse vermutlich zwischen N337 und S348 und bei bakteriellen Metalloproteasen im Bereich der Aminosäuren S320 und E324. [53-61]



**Abb. 1.5. Kartierung der monoklonalen IL-11R $\alpha$ -Antikörper [52]**

Die monoklonalen IL-11R $\alpha$ -Antikörper werden 4 Epitopen zugeordnet. Das Epitop 4 des IgA-Antikörpers E27 befindet sich im Bereich der Ig-ähnlichen Domäne des Rezeptors. Der stalk-Region sind drei weitere Bindungsepitope zuzuordnen. D16.1, E24.2, C8.7 und B24.3 binden an Epitop 2, das wie Epitop 3 des Antikörpers A3.4 N-terminal zum Arginin 343 des IL-11R $\alpha$  lokalisiert ist. Das Epitop 1 der Antikörper E1.8, E12.7, E10.1, I12.3, C4.2, I7.4, D14.7 und A39R befindet sich zwischen A343 und der Transmembranregion. Die Antikörper der Epitope 1, 2 und 3 sind ausnahmslos IgG-Antikörper.

### 1.3.3. Interleukin-11

#### 1.3.3.1. Vorkommen und Funktion

IL-11 wurde zunächst als ein von der aus Rückenmark isolierten Stromazelllinie PU-34 exprimierter Faktor beschrieben, der die Proliferation der murinen Plasmazytom-Zellen T1165 stimuliert [62]. Weiterführende Studien zeigten, daß IL-11 von alveolaren und bronchialen Epithelzellen sowie einer Vielzahl verschiedener Zellen mesenchymalen Ursprungs wie Chondrozyten, Fibroblasten, Osteoblasten, Stromazellen des Knochenmarks und Synoviozyten gebildet wird [63]. Desweiteren kann IL-11 im Gastrointestinaltrakt, im Zentral-Nervensystem, in der Haut, im Uterus und den Testes nachgewiesen werden.

Die Wirkungen des IL-11 ähneln denen der eng verwandten Zytokine LIF, OSM, CNTF und im besonderen IL-6 [63-71]. In *Tabelle 1.2.* sind die pleiotropen Wirkungen des IL-11 zusammengefaßt.

Akutphase-Reaktion	- Induktion der Synthese von Akutphase-Proteinen in Hepatozyten [72]
Hämatopoese	- Thrombopoese und Megakaryogenese [73] - Differenzierung erythroider und myeloider Vorläuferzellen zu Makrophagen [74-76] - Wachstumsinhibition myeloider leukämischer Zellen
Immunregulation	- Differenzierung von B-Zellen zu Antikörper-sezernierenden Plasmazellen [77] - Reifung und Aktivierung von Makrophagen [75]
Knochenstoffwechsel	- Stimulation der Osteoklastenbildung [78]
Magen-/ Darmtrakt	- Regeneration verletzter Schleimhaut [79, 80]
Nervensystem	- neuronale Differenzierung von PC12-Zellen [81]
Fertilität	- Trophoplastenimplantation [50, 51]

**Tab. 1.2. Die pleiotropen Wirkungen von Interleukin-11**

Rekombinantes IL-11 ist ein wertvolles Therapeutikum und kann aufgrund seiner thrombopoetischen Aktivität eine Chemotherapie-induzierte Thrombozytopenie lindern [82].

### 1.3.3.2. Struktur

Das unreife IL-11 besteht aus 199 Aminosäuren und beinhaltet eine Signalsequenz von 21 Aminosäuren [2, 62]. Das berechnete Molekulargewicht der prozessierten Form beträgt 19 kDa. N-Glycosylierungsstellen sind nicht vorhanden [62, 83]. Obwohl die Prolin- und Leucin-Anteile mit 12 bzw. 23% außergewöhnlich hoch sind und strukturstabilisierende Cysteine fehlen, überwiegt der helicale Charakter der Sekundärstruktur. Eine Tertiärstruktur ist noch nicht bekannt. Höchstwahrscheinlich gehört IL-11 zu den 4 $\alpha$ -Helixbündel-Zytokinen [84].

Erste Struktur- und Funktionsuntersuchungen wurden 1995 von Czupryn et al. [84, 85] veröffentlicht. Chemische Modifikationen, wie Alkylierung und homologe Mutationen des M80, führen zu einem 25-fachen Verlust der Bioaktivität des IL-11. Bei Modifikation der beiden Lysine 63 und 120 sinkt die biologische Aktivität um den Faktor 3. Werden die vier C-terminalen Aminosäuren deletiert, fällt die Aktivität auf nur 4% der des Wildtyp-IL-11. Fehlen acht oder mehr Aminosäuren des C-Terminus, ist das Zytokin biologisch inaktiv. Mittels *alanine-scanning*-Mutagenese [84] wurden ausgehend vom N-Terminus die Aminosäuren 31 bis 63 und ausgehend vom C-Terminus die Aminosäuren 152 bis 199 bezüglich ihres Einflusses auf die proliferierende Wirkung des IL-11 auf die murinen Plasmacytom-Zellen T10 hin untersucht. Aus diesen Befunden schließen Czupryn et al., daß die Aminosäuren der postulierten D-Helix A174, I177, G180, L181, T184, L185 und L192 im Inneren des Zytokins liegen und so Einfluß auf die Tertiärstruktur des IL-11 nehmen, während die Aminosäuren R172, H175, D186, W187 und R190 Voraussetzung für dessen Bioaktivität sind. Zugeordnet werden diese bioaktivitätsrelevanten Reste der bis jetzt noch nicht definierten *site 1*, der Bindungsregion des IL-11 zum  $\alpha$ -Rezeptor, zu der auch die Aminosäure M80 des AB-loops gezählt wird [85]. In der Region zwischen dem P35 und dem K63 befinden sich mehrere Aminosäuren, wie P35, E38, L39, L44, R47, L50, T53, R54, L56, und R61, die ebenfalls relevant für die Bioaktivität sind und der Bindungsregion zum gp130 (*site 2*) zugeordnet werden [84].

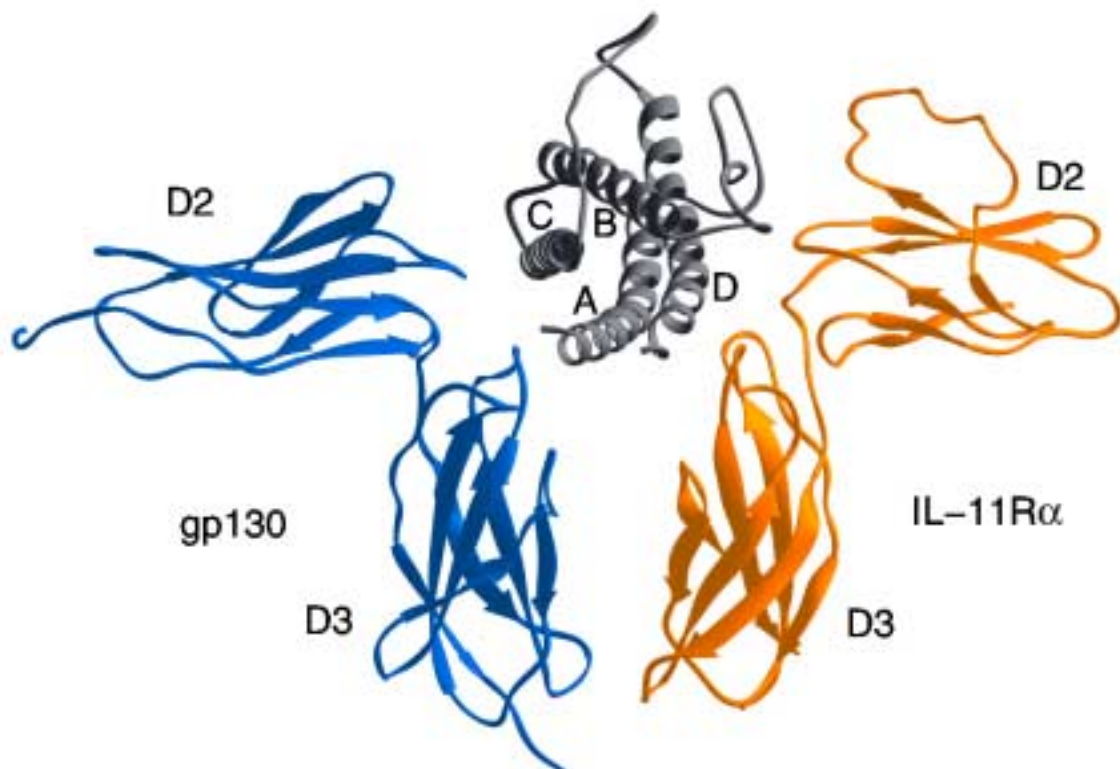
Jedoch stellen diese Zuordnungen ohne Kenntnis der Tertiärstruktur des IL-11 nur Vermutungen dar. In den zitierten Studien wurde nur die Bioaktivität der Mutanten untersucht und nicht zwischen der Beeinflussung der Bindung zu IL-11R $\alpha$  (*site 1*) oder gp130 (*sites 2* und *3*) unterschieden.

In Anlehnung an die bereits gelöste Tertiärstruktur des CNTF [6] hat J. Grötzinger mittels *molecular modelling* ein Strukturmodell des IL-11 entwickelt (Abb. 1.7). Eine von Czupryn [84] postulierte Minihelix im AB-loop liegt nicht vor. Mit Hilfe dieses Modells konnte in Analogie zu den jeweiligen drei Rezeptorinteraktions-*sites* der Zytokine IL-6, CNTF und LIF [86-88] vorhergesagt werden, welche Aminosäuren mit dem IL-11R $\alpha$  und gp130 in Kontakt treten. Die



site 1 des IL-11 interagiert vermutlich mit dem IL-11R $\alpha$  und besteht voraussichtlich aus Aminosäuren der C-terminalen Bereiche des AB-loops und der D-Helix.

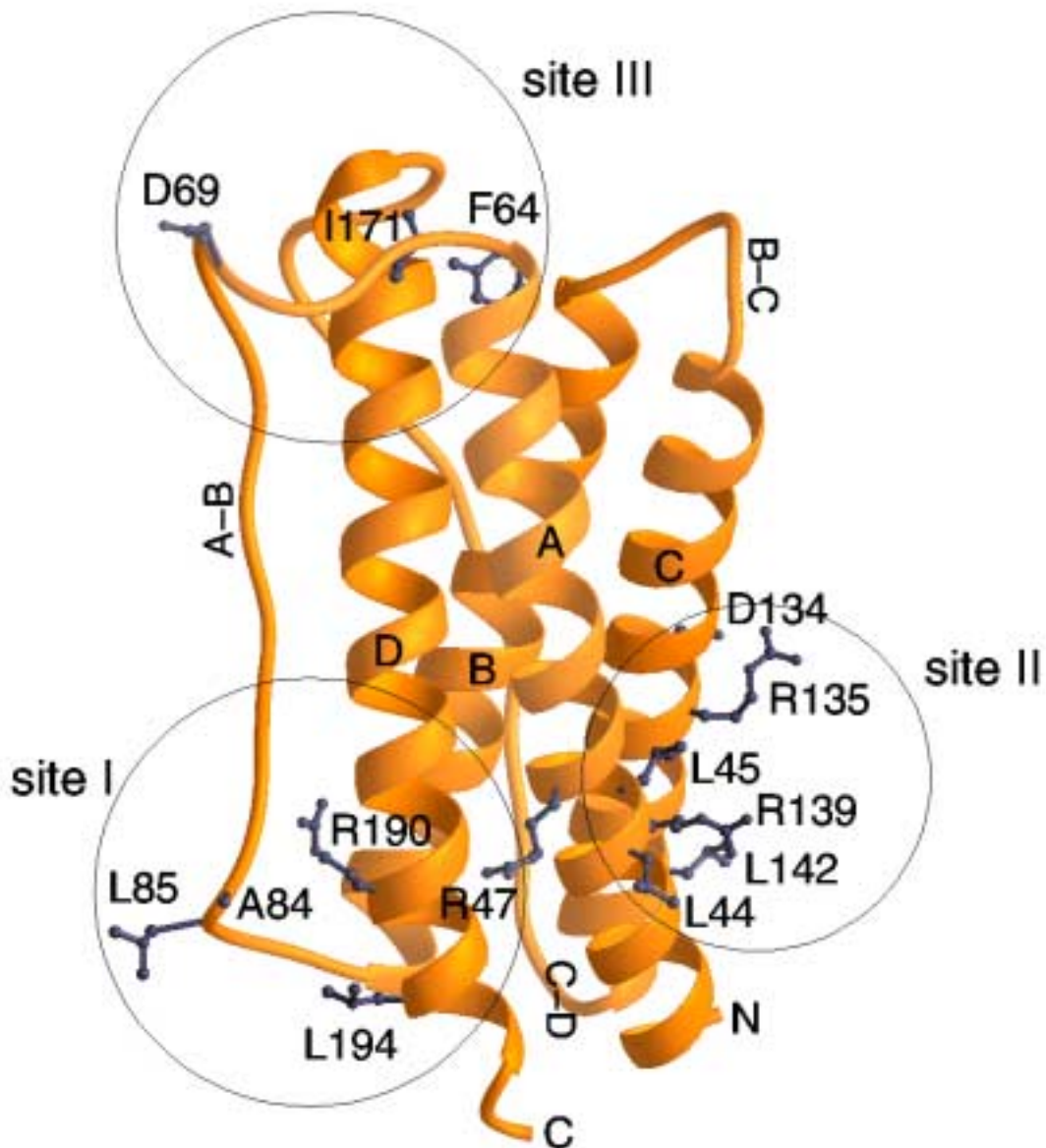
Über die Struktur der Liganden-Rezeptorkomplexe der hämatopoetischen Rezeptorfamilie ist nur wenig bekannt. Die Röntgenkristallstrukturen des gesamten löslichen Komplexes waren zu Beginn dieser Arbeit nur vom GH/GH-R-Komplex [89] und vom GH/Prolaktin-Rezeptorkomplex [90] aufgeklärt. Auf der Grundlage des GH/GH-R-Komplexes wurde ein Modell des IL-6/IL-6R $\alpha$ /gp130-Komplexes erstellt [86]. Ausgehend von diesem Modell konnte im folgenden ein verwandter Ternärkomplex des IL-11 [91] mit einem IL-11R $\alpha$ -Molekül und einer gp130 Rezeptoruntereinheit vorgeschlagen werden (Abb. 1.6.). Beide Komplexmodelle weisen dieselbe Architektur auf. Die stöchiometrischen Verhältnisse dieser signaltransduzierenden Komplexe wurden bislang nicht aufgeklärt und konnten so in der Darstellung nicht berücksichtigt werden. Man vermutet, daß entweder zwei 1:1:1-Komplexe durch Assoziation einen hexameren Komplex bilden, oder ein IL-11-Molekül einen IL-11R $\alpha$  und zwei gp130 bindet (Tetramer). In beiden Modellen wäre die zur Signaltransduktion notwendige Dimerisierung zweier gp130-Untereinheiten gewährleistet.



**Abb. 1.6. Modell des IL-11/IL-11R $\alpha$ /gp130-Ternärkomplexes [91]**  
Die Architektur entspricht der des IL-6/IL-6R $\alpha$ /gp130-Ternärkomplexes.

## 1.4. Zielsetzung der Arbeit

IL-11 zählt zu den langkettigen IL-6-Typ-Zytokinen, die allesamt über die Rezeptoruntereinheit gp130 signalisieren. Seine Aminosäuresequenz zeigt eine Übereinstimmung von 30% mit der Sequenz des CNTF. Durch *molecular modelling* gelang es, ein Modell des IL-11 (Abb. 1.7.) zu entwerfen und durch Vergleich mit dem ebenfalls über einen ternären Rezeptorkomplex signalisierenden IL-6 die wahrscheinlichen Bindungsstellen des IL-11-Rezeptors (*site 1*) und des gp130 (*site 2+3*) vorherzusagen [86].



**Abb. 1.7. Strukturmodell des IL-11**

IL-11 gehört wahrscheinlich zu den langkettigen 4 $\alpha$ -Helixbündel-Zytokinen. Die vier Helices werden durch zwei lange AB- und CD-loops sowie einen kurzen BC-loop verbunden. Es liegt keine Minihelix im AB-loop vor. Die Aminosäuren R47, A84, L85, R190 und L194 werden der site 1, die Seitenketten L44, L45, D134, R135, R139 und L142 der site 2 und die Aminosäuren F64, D69 und I171 der site 3 zugeordnet.

## Ziele der vorliegenden Arbeit waren:

- **Definition der sites des IL-11:** Hierzu sollten - zuzüglich zu acht bereits hergestellten Punktmutanten (Diplomarbeit) - sechs ausgewählte, in einer der drei vermutlichen Bindungsregionen punktmutierte IL-11-Mutanten generiert werden. *Abb. 1.7.* zeigt alle vierzehn ausgewählten Aminosäuren in einem Modell des IL-11. Die Bioaktivität der nach Expression vorliegenden, mutierten Proteine sollte durch Regulation der Akutphase-Proteinsynthese in HepG2-Hepatomzellen und durch Proliferationstests mit Ba/F3-gp130-IL-11R $\alpha$ -Zellen bestimmt werden. Das  $\alpha$ -Rezeptorbindungsverhalten und die Ternärkomplexbildung der Punktmutanten sollte untersucht werden. Anschließend sollten die Bindungsregionen des IL-11 zum IL-11R $\alpha$  (*site 1*) und zu gp130 (*sites 2* und *3*) definiert werden.
- **Kartieren der monoklonalen IL-11-Antikörper mAb618, E33, H2 und H56:** Die monoklonalen Antikörper H2, H56 und E33 unterdrücken die biologische Aktivität von humanem IL-11. Mittels Plasmonresonanz sollten die Affinitäten dieser Antikörper und des von R&D bezogenen monoklonalen Antikörpers mAb618 zu den punktmutierten, humanen Thioredoxin (Trx)-IL-11 Fusionsproteinen gemessen werden. Aminosäuren des IL-11, die den Epitopen der Antikörper angehören, sollten definiert werden.
- **Verstärkung der site 1 zur Entwicklung von Agonisten und Antagonisten:** Die Definition der *site 1* als  $\alpha$ -Rezeptorbindungsepitop führte im folgenden zur gezielten Auswahl weiterer Aminosäuren für die Mutagenese. Die Bindung des IL-11 zum IL-11R $\alpha$  über die *site 1* sollte zur Entwicklung von Agonisten und Antagonisten verstärkt werden. Die Punktmutanten H182L und D186V wurden zur Vergrößerung des hydrophoben *patches* ausgewählt. Sie sollten generiert, ihre proliferative Wirkung auf B9-Zellen und ihre Vermittlung der Akutphase-Proteinsynthese auf HepG2-Zellen - sowohl quantitativ, als auch im kinetischen Verlauf - bestimmt werden. Ihr  $\alpha$ -Rezeptorbindungsverhalten sollte mittels Immunpräzipitation untersucht werden.
- **Interaktion von IL-11R-D3 mit gp130:** Vermutlich wird die Rezeptorkoordination des IL-11, analog zum IL-6-Rezeptorkomplex, verstärkt durch Bindung von Aminosäuren der D-Helix an die dritte Domäne des IL-11R $\alpha$  gebildet. In der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, inwieweit die Interaktion des IL-11 an die dritte Domäne des Rezeptors hinreichend zur  $\alpha$ -Rezeptor- bzw. Ternärkomplexbildung ist und ob durch sie eine Signaltransduktion induziert werden kann.
- **Shedding des IL-11R $\alpha$ :** Eine lösliche Form des IL-11R $\alpha$  konnte *in vivo* bis heute nicht nachgewiesen werden. Mit Hilfe der monoklonalen Antikörper des IL-11R $\alpha$  sollte dessen Exposition und - falls vorhanden - dessen *shedding* auf Zellenoberflächen untersucht werden.

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Chemikalien

Alle Chemikalien wurden in *pro analysi*-Qualität eingesetzt und stammten von den Firmen AGS (Heidelberg), BioRad (München), Boehringer (Mannheim), DuPont (Dreieich), Eppendorf (Hamburg), Fluka (Neu-Ulm), Invitrogen (Leek, Niederlande), Merck (Darmstadt), Millipore (Eschborn), New England Biolabs (Schwalbach), Pharmacia (Freiburg), Qiagen (Hilden), Roth (Karlsruhe), Sartorius (Göttingen), Serva (Heidelberg), Sigma (Deisenhofen) und Whatman (Maidstone, England).

Alle Enzyme wurden von den Firmen Boehringer oder AGS bezogen und gemäß Herstellerangaben eingesetzt.

Zur Isolierung der Plasmid-DNA wurde ein Kit der Firma Qiagen benutzt.

Die Radiochemikalie Tran-[<sup>35</sup>S]-label stammte von der Firma ICN Biochemicals (Meckenheim). [<sup>32</sup>P]dATP wurde von Hartmann Analytic (Braunschweig) bezogen.

Alle Puffer und Medien wurden in wässriger Lösung (Qualität: Millipore) angesetzt. In der Methodenbeschreibung wird näher auf die verwendeten Chemikalien eingegangen.

### 2.2. Zytokine und lösliche Rezeptoren

IL-6 rekombinantes humanes IL-6 wurde nach der Methode von Arcone *et al.* [92] hergestellt und freundlicherweise von A. Küster und B. Scherag (Institut für Biochemie, RWTH Aachen) zur Verfügung gestellt; die spezifische Aktivität betrug  $2 \times 10^6$  BSF2 (*B-cell stimulatory factor 2*) U/mg

IL-11 rekombinantes humanes IL-11 wurde von Genetics Institute (Cambridge, MA USA) und TEBU (Frankfurt) bezogen

Trx-IL-11 rekombinantes Fusionsprotein aus Thioredoxin (N-terminal) und humanem Interleukin-11 wurde in *E. coli* exprimiert [93]

- IL-3 konditionierter, mIL-3 enthaltender Kulturüberstand der X63Ag8-653BPV-mIL-3-Zellen (RPMI/IL-3) wurde von A. Küster (Institut für Biochemie, RWTH Aachen) zur Verfügung gestellt
- sIL6-R $\alpha$  die lösliche Form des IL-6R $\alpha$  wurde rekombinant im Baculovirus-Expressionssystem hergestellt [94] und von A. Küster und W. Frisch (Institut für Biochemie, RWTH Aachen) zur Verfügung gestellt
- sIL-11R $\alpha$ -Flag die Herstellung der rekombinant im Baculovirus-Expressionssystem exprimierten löslichen Form des IL-11R $\alpha$ , versehen mit einem Flag-Epitop, erfolgte wie bei Dahmen [93] beschrieben; der durch dieses Verfahren erhaltene Zellüberstand enthielt ca. 20  $\mu$ g/ml sIL-11R $\alpha$ -Flag; die Abschätzung der Proteinkonzentration erfolgte über Auftrennung der Proteine mit Hilfe der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) mit anschließender Silberfärbung des Gels
- sgp130 lösliche Form des gp130 wurde rekombinant im Baculovirus-Expressionssystem hergestellt und von A. Küster (Institut für Biochemie, RWTH Aachen) zur Verfügung gestellt
- sIL-11R-D3 (C248A) die um 19 C-terminale Aminosäuren verlängerte, in *E. coli* exprimierte IL-11 Rezeptordomäne D3 - deren einziges, nicht an der Ligandenbindung beteiligtes Cystein 248 zur Vermeidung von Dimerisationen durch Alanin ersetzt ist - wurde rekombinant in *E. coli* hergestellt [91] und von K. Schleinkofer (Institut für Biochemie, RWTH Aachen) zur Verfügung gestellt

## 2.3. Molekularbiologische Methoden

### 2.3.1. Bakterienstämme

- K12 GI724 Bakterienstamm, der zur Klonierung, Amplifizierung und Expression von Trx-IL-11 und Mutanten verwendet wurde
- JM83 Bakterienstamm, der zur Klonierung und Amplifizierung von Plasmiden verwendet wurde

XL1Blue            Bakterienstamm, der zur Klonierung und Amplifizierung von Plasmiden verwendet wurde

MC1063/P3        Bakterienstamm, der zur Amplifizierung von pCDM8-IL-6R $\alpha$  verwendet wurde

### 2.3.2. Bakterienkultur

Bakterien wurden bei 37°C auf LB-Agar oder in LB-Flüssigmedium bei 225 rpm kultiviert. Zur Selektion wurden transformierte Klone, die ein Plasmid mit Ampicillin-Resistenzgen enthielten, mit 100  $\mu$ g/ml Ampicillin (Sigma) kultiviert. Die Dauerlagerung erfolgte in 15-%igem Glycerin (Roth) in LB- bzw. RM-Medium bei –80°C.

Transformierte Bakterien des Stamms *E. coli* K12 GI724 wurden bei 30°C in RM-Medium, ebenfalls mit 100  $\mu$ g/ml Ampicillin, kultiviert.

RM-Medium            6 g/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
                              3 g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
                              0,5 g/l NaCl  
                              1 g/l NH<sub>4</sub>Cl  
                              20 g/l Kasein-Hydrolysat (Difco)  
                              0,095 g/l MgCl<sub>2</sub>  
                              1 % Glycerin  
                              0,1 g/l Ampicillin

RM-Agar              RM-Medium mit 1,5 % Agar

LB-Medium            (pH 7,0)  
                              10 g/l NaCl  
                              5 g/l Hefeextrakt (Difco)  
                              10 g/l Bactotrypton (Difco)

LB-Agar              LB-Medium mit 1,5% Agar

### 2.3.3. Isolierung von Plasmid-DNA

#### 2.3.3.1. Midi-/Maxipräparation von Plasmid-DNA

Die Isolierung der Plasmid-DNA im präparativen Maßstab (50 - 500 µg) erfolgte mit Hilfe des *QIAGEN Plasmid Maxi bzw. Midi Kits* (Qiagen, Hilden) nach Herstelleranleitung. Die DNA wurde luftgetrocknet und anschließend in destilliertem, sterilem Wasser aufgenommen. Die genaue DNA-Konzentration wurde ermittelt (Kapitel 2.3.6.) und durch Zugabe der entsprechenden Menge Wasser auf 1 µg/µl eingestellt. Die so hergestellte DNA konnte für Transfektionen, Klonierungen und Sequenzierungen eingesetzt werden.

#### 2.3.3.2. Minipräparation von Plasmid-DNA

Die Minipräparation der Plasmid-DNA diente der schnellen Charakterisierung rekombinanter Plasmide und erfolgte mit Hilfe des *QIAprep Spin-Miniprep Kits* (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers.

Die so erhaltene DNA wurde mittels Restriktionsschnitt analysiert und bei Eignung bei -20°C gelagert.

### 2.3.4. PCR-Reaktion

In einem PCR-Reaktionsgefäß wurden 1 - 10 ng DNA-Matrize, 0,1 - 0,5 nmol *primer* und 0,5 µl dNTPs (je 250 µM dATP, dGTP, dCTP, dTTP) mit 0,5 U *Taq*-Polymerase in 50 µl wässriger Lösung versetzt und im Thermocycler folgenden Schritten unterworfen:

1. Denaturierung:	2 min	94°C
35 Zyklen:		
<i>primer</i> -Bindung:	2 min	50°C
Extension:	2 min	72°C
Denaturierung:	1 min	94°C
letzte Extension:	5 min	72°C

### **2.3.5. Schneiden von DNA mit Restriktionsenzymen**

Für einen analytischen Restriktionsschnitt wurden 0,5 bis 1 µg DNA, für eine präparative Restriktion bis zu 15 µg DNA eingesetzt. Die Menge an eingesetztem Restriktionsenzym variierte zwischen 1 U und 10 U pro µg DNA. Bei einem doppelten Verdau wurden bei geeigneter Enzymkombination zwei Enzyme gleichzeitig eingesetzt. Die Auswahl des Puffers erfolgte nach den Angaben der Enzymhersteller. Die Menge an zugesetztem Wasser und Puffer wurden so gewählt, daß das Enzym in einer Verdünnung von 1:10 bis 1:20 und der Puffer in einer Verdünnung von 1:10 vorlagen. Die Restriktion dauerte eine Stunde bei 37°C (Ausnahme BssH II: 50°C) .

### **2.3.6. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren**

Zur Bestimmung der DNA-Konzentrationen wurden photometrische Messungen in 1 ml Quarzküvetten durchgeführt [95]. Die Nukleinsäurelösungen wurden je nach Bedarf 1:800, 1:400 oder 1:200 verdünnt. Die Extinktion (E) der Lösungen wurde bei 260 nm und 280 nm bestimmt. Die  $E_{260} = 1$  entspricht einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA. Mit Hilfe des Quotienten  $E_{260}/E_{280}$  können Aussagen über die Reinheit der DNA-Lösung getroffen werden. Der Wert sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

Zur Konzentrationsabschätzung geringerer Mengen DNA ( $< 0,5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) wurde eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt und die Menge aufgrund der Leuchtintensität und Dicke der Bande im Vergleich zu einem definierten Marker im UV-Licht abgeschätzt.

### **2.3.7. Fällung von DNA**

Die Fällung von DNA aus wäßriger Lösung gelingt durch Zugabe von 2 Volumen Ethanol und 1/10 Volumen einer 3M Natriumacetatlösung (pH 5,2) und anschließender 30-minütiger Inkubation auf Eis [95].

### **2.3.8. Reinigung von DNA durch Phenol/Chloroform-Extraktion**

Waren DNA-Lösungen mit Proteinen, wie z.B. Restriktionsenzymen verunreinigt, so extrahierte man diese durch Zugabe eines Phenol/Chloroform-Gemisches (1:1) [95]. Geringe Mengen des Phenols lösten sich hierbei in der wäßrigen Phase, konnten aber durch Waschen mit Chloroform entfernt werden.



### **2.3.9. Dephosphorylierung linearisierter DNA**

Durch diese Dephosphorylierung des linearisierten Vektors wird bei der nachfolgenden Ligation bevorzugt das Fremd-DNA-Fragment eingebaut, somit steigt die Effizienz der Klonierung [95]. Die Dephosphorylierung von 100 - 200 ng DNA erfolgte eine Stunde mit 1 U alkalischer Phosphatase (Boehringer) und des mitgelieferten 10x Puffers bei 37 °C. Das linearisierte Plasmid wurde anschließend durch Phenol/Chloroform-Extraktion von der Phosphatase befreit, über eine Agarose-Gelelektrophorese aufgereinigt und isoliert.

### **2.3.10. Ligation von DNA**

DNA Fragmente, die über komplementäre Enden verfügen, können in Gegenwart von ATP durch die T4-DNA-Ligase (Boehringer) verknüpft werden [95]. Es wurden 10-50 ng linearisierter, dephosphorylierter Vektor und ein 2-10facher Überschuß an Insert eingesetzt. Die Ligationen wurden 2 h bei RT oder 16 h bei 15°C durchgeführt. 10 µl des rekombinanten Vektors wurden in kompetente *E. coli* transformiert.

### **2.3.11. Herstellung kompetenter Bakterien**

#### 2.3.11.1. Allgemein

500 ml LB-Medium wurden mit 5 ml Vorkultur angeimpft, so daß die OD<sub>600</sub> der Lösung 0,03 - 0,1 betrug. Bei einer optischen Dichte von 0,3 bis 0,6 ließ man die Kultur auf 4°C abkühlen. In einem 50 ml-Falcon-Gefäß sedimentierte man die Zellen bei 2000 g für 10 min. Die Bakterien wurden in 4 - 5 ml eiskaltem TSB-Puffer resuspendiert und 10 min bei 4°C inkubiert. Die Suspension wurde aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend bei -80°C gelagert. Die so behandelten Zellen konnten über mehrere Monate für die Transformation verwendet werden.

TSB-Puffer	LB-Medium (Kapitel 2.3.2)
	+ 10% PEG (w/v)
	+ 5% DMSO
	+ 10 mM MgSO <sub>4</sub>
	+ 10 mM MgCl <sub>2</sub>

### 2.3.11.2. Herstellung kompetenter *E. coli* K12 GI724

Die Bakterien *E. coli* K12 GI724 wurden über Nacht bei 37°C auf LB-Agar-Platten kultiviert, anschließend wurden 5 ml SOB-Medium mit einer Kolonie angeimpft und 12-16 h bei 37°C und 225 rpm inkubiert. 250 ml SOB-Medium wurden mit der Hälfte der Vorkultur versetzt, bis zu einer  $OD_{550} = 0,6$  wiederum bei 37°C geschüttelt und dann 30 min im Eisbad gekühlt. Die folgenden Schritte wurden unter permanenter Kühlung auf 0-4°C durchgeführt. Nach Zentrifugieren bei 2000 g wurde das Sediment in 10 ml FSB-Lösung resuspendiert, nach einer Inkubationszeit von 15 min erneut zentrifugiert und in 1,3 ml FSB-Lösung aufgenommen. Unter Schwenken wurden 65 µl DMSO zur Bakteriensuspension getropft. Nach 15 min Inkubation wiederholte man die Zugabe. Die kompetenten Zellen wurden aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -70°C gelagert.

SOB-Medium (pH 7,0)    0,5 g/l NaCl  
                              5 g/l Hefeextrakt (Difco)  
                              20 g/l Bactotrypton (Difco)  
                              2,5 mM KCl  
                              10 mM MgCl<sub>2</sub>

FSB-Medium (pH 6,4)    10 mM Kaliumacetat  
                              45 mM MnCl<sub>2</sub> · 4 H<sub>2</sub>O  
                              10 mM CaCl<sub>2</sub> · 2 H<sub>2</sub>O  
                              100 mM KCl  
                              3 mM [(NH<sub>3</sub>)<sub>6</sub>Co]Cl<sub>3</sub>  
                              1 % Glycerin

### **2.3.12. Transformation kompetenter Bakterien**

1-10 ng Plasmid wurden mit 100 µl kompetenten Bakterien erst 30 min auf Eis, dann eine Minute lang im Wasserbad auf 42°C und anschließend 2 min bei 0-4°C inkubiert. Den Transformationsansatz, versetzt mit 500 µl LB-Medium kultivierte man zur Expression des Resistenzgens 30 min bei 37°C und 225 rpm (*E. coli* K12 GI724: 800 µl SOC-Medium, 30°C). Je 100 µl Bakteriensuspension wurden auf LB-Agarplatten mit geeigneten Antibiotika ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert (*E. coli* K12 GI724: RM-Agar, 30°C).

SOC-Medium                      SOB-Medium mit 20% Glukose

### **2.3.13. Gelelektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren**

#### 2.3.13.1. Agarose-Gelelektrophorese

Die DNA Fragmente wurden auf 1% Agarosegelen (SEAKEM LE Agarose, Biozym) in TAE Laufpuffer durch Spannungen bis 150 Volt der Größe nach aufgetrennt. Als Referenz diente die mit *EcoRI* / *HindIII* geschnittene DNA des  $\lambda$ -Phagen. Dem Agarosegel wurde Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 0,1  $\mu\text{g/ml}$  zugesetzt, um die DNA-Banden auf einem UV-Leuchttisch ( $\lambda=366\text{nm}$ ) sichtbar zu machen und so eine Fotodokumentation zu ermöglichen.

1x TAE-Puffer	0,04 M TRIS-Base
	1 m M EDTA
	5 mM Natriumacetat
	20 mM Essigsäure

#### 2.3.13.2. Isolierung von DNA aus Agarosegelen

Die gewünschte DNA-Bande wurde aus dem Agarosegel ausgeschnitten. Die Isolierung von DNA aus Agarosegelfragmenten erfolgte mit Hilfe von "GenElute<sup>TM</sup> Agarose Spin Columns" der Firma Supelco.

Die "GenElute<sup>TM</sup> Agarose Spin Column" wurde mit 100  $\mu\text{l}$  TE-Puffer equilibriert und anschließend mit dem Agarosegelfragment, das die DNA enthielt, beladen. Die Säule wurde auf ein Eppendorfreaktionsgefäß platziert und 10 min bei 20000 g zentrifugiert. Die Reinigung des Fragments erfolgte durch Ethanol-/ Natriumacetatfällung.

TE-Puffer	(pH 8)
	10 mM TRIS
	1 mM EDTA

### 2.3.14. Generation der Punktmutanten

Die Punktmutation wurden in die cDNA des humanen IL-11 mittels SOE (*splicing by overlapping extension*)-PCR [96, 97] eingeführt. Bis auf R47E enthielten alle der zur Mutagenese verwendeten Oligonukleotide weitere, stille Mutationen, die je eine zusätzliche Restriktionsschnittstelle zur zügigen Identifikation der mutierten Klone kodierten. Die folgendenden Oligonukleotide und die entsprechenden *antisense* Oligonukleotide wurden verwendet (eingeführte Punktmutationen sind kursiv, Restriktionsschnittstellen sind unterstrichen):

L44D: CAGCACCGTAGATCTGACCCGCTCTCTCCTGGCGG;  
L45D: TGGACAGCACAGTACTCGATACCCGCTCTC;  
R47E: GCTCCTGACCGAATCTCTCCTGGCGGACAC;  
F64D: GCTGAGGGACAAGGATCCAGCTGACGGGGACCACAACC;  
D69K: ACAAATTCCCCGCGGACGGGAAACACAACCTGG;  
A84D: AGTGCGGGGGATCTGGGCGCGCTTACAGCTCC;  
L85D: TGGCGGGGCAGATGGCGCGCTTACAGCTCC;  
D134L: CCCTGCAGGCGCGCTGCTCCGGCTGCTGCGCC;  
R135E: CCCTGCAGGCGCGCTTGGACGAGCTGCTGCGC;  
R139E: CAGGCCCGACTCGATCGGCTGCTGCGCGAGCTGCAGCTC;  
L142D: GGCTGCTGCGTGACTGCAGGACCTGATGTCC;  
I171D: AGCCTGGGGGGGCGACAGGGCTGCGCACGCCATCC;  
H182L: GGGGCTGCTGTTAACACTTGACTGGGCCGTGAGGGG;  
D186V: GCACCTGACACTAGTCTGGGCCGTGAGGGGACTG;  
R190E: CTGGGCCGTGGAAGGCCTGCTGCTGCTGC;  
L194D: GGGCCGTGAGAGGCCTGCTGGATCTGAAGACTC.

Alle Konstrukte wurden neben der Identifizierung der Restriktionsschnitte durch DNA-Sequenzierung (ABIprism 310, Applied Biosystems/Perkin Elmer) analysiert (Kapitel 2.3.15.).

### 2.3.15. Automatisches Sequenzieren von DNA mit dem ABIprism 310 Sequenzierer

Das Prinzip der automatischen Markierung beruht auf der Anregung und Detektion fluoreszenzmarkierter Didesoxynukleotide, die in einer vorgeschalteten PCR die entstandenen DNA-Stränge terminieren und gleichzeitig markieren. Die Sequenzierung erfolgte mit einem ABIprism Modell 310 Sequenzierer (PE Biosystems, Weiterstadt). Zur Präparation der DNA-Proben wurde das *ABIprism Ready Reaction DyeDeoxy Terminator Cycle Sequencing Kit* (PE Biosystems, Weiterstadt) verwendet.

PCR-Ansatz	4,0 µl Terminator Ready Reaction Mix
	0,6 - 1,2 µg doppelsträngige DNA
	3 - 10 pmol Oligonukleotid
	ad 20 µl H <sub>2</sub> O

Die DNA wurde während 25 Reaktionszyklen in einem Thermocycler amplifiziert. Ein Reaktionszyklus bestand aus der Denaturierung der DNA (96°C, 20 sec), der Hybridisierung der Oligonukleotide an die homologe Zielsequenz (20 sec) bei einer Temperatur, die 2°C unter dem errechneten Schmelzpunkt lag, und der DNA-Elongation, bei der die Verlängerung des freien 3'-OH-Endes der Oligonukleotide durch die *AmpliTaq* Polymerase erfolgte (4 min, 60°C).

Zur Errechnung des Schmelzpunktes der an die DNA zu hybridisierenden Oligonukleotide wurden je GC-Paar 4°C und AT-Paar 2°C eingesetzt.

Nach der Amplifikation wurde die DNA gefällt, indem man der Lösung 80 µl Wasser, 10 µl 3 M Na-Acetat (pH 5,2) und 200 µl 100%iges Ethanol zusetzte. Das DNA-Präzipitat wurde mit kaltem, 70%igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in *Template Suppression Reagent* (PE Biosystems, Weiterstadt) aufgenommen. Die Proben wurden 2 min bei 90°C denaturiert. Die Auftrennung der DNA-Fragmente erfolgte mittels Kapillarelektrophorese in einem ABIprism 310 Sequenzierer.

### 2.3.16. Expression von Proteinen mit dem Trx-Fusionsprotein-Expressionssystem

*E. coli* K12 GI 724-Zellen, die den zu exprimierenden Vektor enthielten, wurden auf einer RM-Agarplatte ausgestrichen und über Nacht bei 30°C kultiviert. Mit einem der gewachsenen Klone wurde eine Vorkultur von 2 ml RM-Medium angeimpft und weitere 12-16 h bei 30°C und 225 rpm inkubiert. Man versetzte 15 ml Induktionsmedium mit 1,5 ml der Vorkultur und kultivierte die Bakterien bei gleichen Bedingungen bis zu einer OD<sub>550</sub> von 0,5. Zur späteren Kontrolle wurde 1 ml entnommen und bei 0°C aufbewahrt. Den restlichen Ansatz induzierte man mit Tryptophanlösung (Endkonzentration 100 µg/ml) und inkubierte weitere 3 h bei 37°C. Nach beendeter Expression wurde wiederum die OD bestimmt, die Zellen wurden auf 0-4°C gekühlt, abzentrifugiert, in einem so berechneten Volumen *osmotic shock*-Lösung I resuspendiert, daß die OD<sub>550</sub> 5,0 betrug, 10 min auf Eis inkubiert und nochmals abzentrifugiert. Man resuspendierte die Zellen im gleichen Volumen *osmotic shock*-Lösung II, wie zuvor in *osmotic shock*-Lösung I, inkubierte weitere 10 min auf Eis und zentrifugierte abermals. Die Kontrolle, ob sich das exprimierte Protein im Überstand befand, erfolgte durch vergleichende SDS-Polyacrylamidgелеlektrophorese von Überständen und Sedimenten lysierter Zellen vor und nach der Expression. Die Trx-IL-11 oder mutierte Fusionsproteine in hoher Konzentration enthaltenden Überstände wurden mit Centriprep 3 (Amicon) aufkonzentriert, auf PBS umgepuffert und nach Bestimmung ihres Gehaltes an Zytokin in die nachfolgenden Experimente eingesetzt.

<i>osmotic shock</i> -Lösung I	<i>osmotic shock</i> -Lösung II
	20% Succrose
<i>osmotic shock</i> -Lösung II	20mM Tris/HCl (pH 8,4)
	2,5mM EDTA

## 2.4. Zellkultur

### 2.4.1. Zelllinien und deren Kultivierung

Ba/F3	nicht adhärent wachsende, IL-3-abhängige prä-B Zelllinie der Maus, Kultivierung in DMEM-Medium mit IL-3
Ba/F3-gp130-IL-11R $\alpha$	Ba/F3-Zelllinie, stabil transfiziert mit den cDNAs für humanes gp130 und den humanen IL-11R $\alpha$ 1, Kultivierung in DMEM-Medium mit IL-11
B9	nichtadhärent wachsende B-Lymphozyten-Hybridom-Zelllinie der Maus, Kultur in IMEM-Medium

HepG2	adhärent wachsende, humane Hepatom-Zelllinie (ATCC HB 8065), Kultur in DMEM/NUT-MIX.F-12
COS7	adhärent wachsende Affennierenzellen; zur Verfügung gestellt von Dr. I. Kerr (London, England), Kultivierung in DMEM-Medium
HeLa 229	Humane Cervix-Karzinom-Zelllinie, Kultivierung in DMEM-Medium
Monocyten	primäre humane Monocyten; zur Verfügung gestellt von A. Nimmesgern (Institut für Biochemie, RWTH Aachen)
Makrophagen	primäre humane Makrophagen; zur Verfügung gestellt von A. Nimmesgern (Institut für Biochemie, RWTH Aachen)
Sf-158	Insektenzelllinie aus dem Ovar von <i>Spodoptera frugiperda</i> (ATCC CRL 1711), Kultur in Sf-900 II Medium, serumfrei

Die Kultivierung der Säugerzellen erfolgte auf Petrischalen bei 37°C in wassergesättigter Atmosphäre mit 5% CO<sub>2</sub> und die Anzucht der Insektenzellen in verschlossenen Zellkulturflaschen ohne CO<sub>2</sub>-Begasung. Zur Subkultivierung wurde das Kulturmedium abgesaugt und die Säugerzellen durch einminütige Trypsin/EDTA-Exposition von der Kulturplatte abgelöst, in Kulturmedium aufgenommen und in gewünschter Verdünnung auf Kulturplatten verteilt. Insektenzellen wurden mit einem Plastikschaber vom Untergrund gelöst. Eine Langzeitlagerung der Zellen erfolgte nach Zugabe von 10% DMSO und 10% FKS in Kulturmedium in flüssigem Stickstoff.

### Zellkulturmaterialien

DMEM, Flüssigmedium mit Glukose, Glutamax und Pyruvat	(Gibco)
DMEM/NUT-MIX.F-12, Flüssigmedium mit Glutamax	(Gibco)
RPMI 1640 Flüssigmedium	(Gibco)
IMEM, Flüssigmedium mit Glutamax, ohne Zusätze	(Cytogen)
MEM	(Gibco)
Sf-900 II Medium, serumfrei	(Gibco)
Penicillin (10.000U)/Streptomycin (10 mg)	(Cytogen)
Trypsin/EDTA-Lösung	(Cytogen)
mykoplasmenfreies fötales Kälberserum (FKS)	(Seromed)
Phosphate Buffered Saline (PBS):	0,2 M NaCl, 2,5 mM KCl 8 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>

Die Komplettmedien enthielten hitze-inaktiviertes 10 % FKS (für Ba/F3-gp130-IL-11R $\alpha$ -Zellen 2%), 60 mg/l Penicillin und 100 mg/l Streptomycin. Dem Medium für Ba/F3-Zellen wurde außerdem 5% konditionierter, mIL-3 enthaltender Kulturüberstand der X63Ag8-653BPV-mIL-3-Zellen zugegeben (RPMI/IL-3). Die Insektenzellen wurden serumfrei und ohne Antibiotika in Sf-900 II kultiviert.

#### **2.4.2. Expression von Proteinen im Baculovirus-Expressionssystem**

Die Ektodomänen des IL-11R $\alpha$ , versehen mit einem Flag-Epitop, wurden in Sf-158-Zellen mit Hilfe des Baculovirussystems exprimiert. Die cDNA des rekombinanten Zielproteins lag hierbei im nukleären Polyhedrosisvirus (AcNPV) des Insekts *Autographa californica* vor.

Eine zu 75 % konfluente Kulturflasche mit Sf158-Zellen wurde zur Proteinproduktion mit 1 ml einer hochtitrigen Lösung (moi von 10 bis 20) rekombinanter Baculoviren infiziert und 3 Tage inkubiert. Der Überstand mit den exprimierten Proteinen wurde abgenommen, mittels Zentrifugation und anschließender Filtration durch einen Sterilfilter der Porengröße 0,2  $\mu$ m von zellulären und viralen Partikeln befreit und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt. Die Proteinexpression wurde durch *Western Blot*-Analyse überprüft.

#### **2.4.3. Transfektion von COS7-Zellen**

COS7-Zellen einer zu 80 - 100% konfluenten Zellkulturschale (Durchmesser: 10 cm) wurden zweimal mit PBS gewaschen und das vorbereitete Transfektionsgemisch anschließend auf die Platten gegeben. Ein Gasaustausch wurde durch Umwickeln der Platten mit Parafilm verhindert. Es folgte eine Inkubation für 80 min im Brutschrank. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und anschließend mit 6 ml 10% DMSO in PBS 1 min inkubiert. Es folgte zweimaliges Waschen mit PBS. Die Zellen wurden bis zum nächsten Tag in DMEM 10% FKS inkubiert und dann 1:3 ausgesät. Nach weiteren 24 h erfolgten die entsprechenden Versuche.

Transfektionsgemisch	7,5 ml FKS-freies Medium, 3 ml DEAE-Dextran (Amersham Pharmacia Biotech), 20 $\mu$ g DNA 6 $\mu$ l Chloroquin (100 mM) (Sigma).
----------------------	--



#### 2.4.4. Induktion des *sheddings* auf COS7-Zellen

COS7-Zellen wurden mit dem Expressionsvektor pKCSR(hIL-11R $\alpha$ ) bzw. dem pSVL(IL-6R $\alpha$ ) transient transfiziert (Kapitel 2.4.3.). Sodann erfolgte die Zugabe von PMA ( $10^{-7}$  M) ins Medium. Man inkubierte 30 min, 1h, 2h und 3h mit PMA. Unstimulierte Zellen dienten als Negativkontrolle. Die Zellen detektierte man mittels Durchflußzytometrie auf ihre Rezeptor-Oberflächenexpression. Der IL6-R $\alpha$  wurde mit dem BR-6-Antikörper, der IL-11R $\alpha$  mit dem E24.2 detektiert. Die Zellüberstände wurden mittels etablierter IL-6R $\alpha$ - und IL-11R $\alpha$ -ELISA auf freigesetzte lösliche Rezeptoren hin untersucht.

Zur Detektion mittels Autoradiographie wurden transient transfizierte COS7-Zellen 15 min mit MEM-Mangelmedium und 4 Stunden mit Tran( $^{35}$ S)label in Mangelmedium kultiviert. Die Zellen wurden gewaschen und durch Gabe von DMEM ohne bzw. mit PMA ( $10^{-7}$  M) 1h stimuliert. Die kultivierten Zellen wurden zweimal mit kaltem PBS gewaschen und in 1 ml kaltem Lysispuffer (+ Protease-Inhibitoren) 30 min bei 4°C lysiert. Die Überstände wurden abgenommen und hochtourig zentrifugiert. Den IL-6R $\alpha$  präzipitierte man mit an Protein A-Sepharose gebundenem BN-12, den IL-11R $\alpha$  mit kovalent an BrCN-Sepharose gekoppeltem Trx-IL-11. Die Immunkomplexe wurden mehrmals mit PBS-Tween gewaschen, in Laemmli-Puffer aufgenommen, durch SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Autoradiographie detektiert.

Mangelmedium	MEM	
	5 ml/500 ml 100x L-Leucin für MEM	(Gibco)
	5 ml/500 ml 100x L-Arginin für MEM	(Gibco)
	5 ml/500 ml 100x Glukose für MEM	(Gibco)
	5 ml/500 ml 100x Inositol für MEM	(Gibco)
	0,2% BSA	
	10 mM HEPES	
Lysispuffer	50 mM Tris	
	100 mM NaCl	
	0,1% Nonidet-P40	
	1 mM NaF	
	15% Glycerin	
	Protease-Inhibitoren:	
	Aprotinin, Leupeptin, Pepstatin (je 10 $\mu$ g/ml)	
	1 mM EDTA	
	750 $\mu$ M PMSF	
	1 mM Na <sub>2</sub> VO <sub>4</sub>	

#### **2.4.5. Bioaktivitätstest mit HepG2-Zellen**

Zur Überprüfung der Bioaktivität des sIL-11R $\alpha$  und der IL-11-Punktmutanten wurde die Veränderung der Expression des Akutphase-Proteins  $\alpha$ 1-Antichymotrypsin in HepG2-Zellen gemessen. Hierzu wurden die HepG2-Zellen in DMEM/F12-Medium in Mikrotiterplatten (Falcon) kultiviert, bis ein ca. 70% konfluentes Monolayer vorlag. Nach 18-stündiger Inkubation mit den zu untersuchenden Proteinen wurden die Zellen 15 min mit MEM-Mangelmedium und 4h mit Tran(<sup>35</sup>S)label in Mangelmedium kultiviert. Die radioaktiv markierten Überstände wurden auf eine mit  $\alpha$ 1-Antichymotrypsin-Antikörpern beschichtete Mikrotiterplatte gegeben und 3h bei 37°C inkubiert. Die Immunkomplexe wurden mehrmals mit PBS-Tween gewaschen, in Laemmli-Puffer aufgenommen, durch SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Autoradiographie detektiert.

PBS-Tween

PBS-Puffer mit 0.5 % Tween 20

#### **2.4.6. Bioaktivitätstest mit Ba/F3-gp130-IL-11R $\alpha$ -Zellen**

Zur Überprüfung der Bioaktivität der IL-11-Punktmutanten wurde die Veränderung der Proliferation von Ba/F3-gp130-IL-11R $\alpha$ -Zellen gemessen. Hierzu wurde in einer *96well*-Platte (Falcon) eine Verdünnungsreihe der zu untersuchenden Mutante in je 70  $\mu$ l DMEM-Medium angelegt. Als Positivkontrollen dienten Verdünnungsreihen mit Trx-IL-11-Wildtyp, Negativkontrollen enthielten keine Zytokinlösung. Zu jedem Ansatz wurden 50  $\mu$ l Ba/F3-gp130-IL-11R $\alpha$ -Zellsuspension mit einer Konzentration von  $4 \cdot 10^5$  Zellen/ml gegeben. Nach 72 h Kultivierung bei 37°C wurde die Proliferation mittels XTT-Test (Boehringer) nach Angaben des Herstellers bestimmt. Die photometrische Messung der Extinktion erfolgte am SLT-ELISA-Reader.

#### **2.4.7. Bioaktivitätstest mit B9-Zellen**

Zur Untersuchung der Proliferation der B9-Zellen wurden Verdünnungsreihen der Zytokine in Gegenwart von 1  $\mu$ g/ml IL-11R $\alpha$ -Flag in 100  $\mu$ l Medium vorgelegt. Als Positivkontrollen dienten Verdünnungsreihen mit Trx-IL-11-Wildtyp, Negativkontrollen enthielten keine Zytokinlösung. Zu jedem Ansatz wurden 50  $\mu$ l B9-Zellsuspension mit einer Konzentration von  $4 \cdot 10^5$  Zellen/ml gegeben. Nach 72 h Kultivierung bei 37°C wurde die Proliferation ebenfalls mittels XTT-Test nach Herstellerangaben bestimmt.

## 2.5. Proteinchemische Methoden

### 2.5.1. Quantitative Bestimmung von Proteinmengen

Die Proteinmengenbestimmung wurde mit Hilfe des BioRad-„Protein-assay“ durchgeführt. 200 µl BioRad-Reagenz wurden mit 800 µl wäßriger Proteinlösung gemischt. In Plastik-Mikroküvetten wurde die optische Dichte (OD) bei 595 nm im Photometer Ultraspec Plus (Pharmacia Biotechnology) bestimmt. Die Proteinkonzentration der Probe entspricht bei einer optischen Dichte von  $OD_{595} = 1,00018 \mu\text{g/ml}$ .

### 2.5.2. Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die elektrophoretische Auftrennung der Proteine nach ihrer molaren Masse erfolgte nach der Methode von Laemmli in Multigel-Apparaturen der Firma Biometra. Kurzzeitiges Erhitzen der Proteinlösungen in Probenpuffer auf 95°C löste die eventuell vorhandenen Disulfidbrücken und bewirkte die Denaturierung der Proteine. 10-20 µl der zu analysierenden Proben wurden auf ein Polyacrylamidgel (Trenngel 10- oder 15-%ig) aufgetragen und bei einer konstanten Stromstärke bis zu 35 mA aufgetrennt.

Als Größenstandard diente der *Rainbow-Marker* (Amersham Pharmacia Biotech).

Probenpuffer	0,125 M Tris/HCl, pH 6,8
	20 % Glycerin
	10 % Mercaptoethanol
	4 % SDS
	0,002 % Bromphenolblau
	50 ml H <sub>2</sub> O

10 x SDS-Laufpuffer	0,25 % Tris
	1,92 M Glycin
	1 % SDS

### 2.5.3. Färbung von Proteingelen

#### 2.5.3.1. Coomassie-Färbung

Mit der Coomassie-Färbung können Proteinmengen bis zu 200 ng nachgewiesen werden. Das Polyacrylamidgel wurde 1 h bei Raumtemperatur in Coomassie-Lösung gefärbt. Bei der anschließenden Entfärbung blieb der Farbstoff an den Proteinen gebunden. Das Gel wurde bei 70°C im Vakuum getrocknet.

Entfärbelösung	50 vol-% Methanol 40 vol-% Wasser 10 vol-% Essigsäure
Coomassie-Färbelösung	Entfärbelösung mit 0,25 % Coomassie Blue G250

### 2.5.3.2. Silberfärbung für Proteingele

Die Silberfärbung ist wesentlich empfindlicher als die Coomassie-Färbung. Es können noch Proteinmengen von 5 ng nachgewiesen werden.

Das Polyacrylamidgel wurde 0,5 bis 3h in einer wäßrigen Lösung von 30% Ethanol mit 10% Eisessig fixiert, eine Minute mit Fixierlösung vorbehandelt, dreimal mit Wasser gewaschen, mit der Silbernitratlösung 20 min imprägniert, wiederum gewaschen und anschließend in Entwicklerlösung gegeben. Bei ausreichender Intensität der Proteinbanden erfolgte die Zugabe der Stopplösung (0,01 M EDTA).

Fixierlösung	30 vol-% Ethanol 0,5 M Na-Acetat 0,5 % Glutaraldehyd 0,2 % Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> 0,5 vol-% Eisessig
Silbernitratlösung	0,1 % AgNO <sub>3</sub> 0,01 % Formaldehyd
Entwicklerlösung	2,5 % Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 0,01 % Formaldehyd 4 mg Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub>

### **2.5.4. Konzentrieren und Umpuffern von Proteinlösungen**

Proteinlösungen wurden mit Hilfe der Centriprep-3 Zentrifugenröhrchen der Firma Amicon aufkonzentriert und mit den PD-10 Säulen von Pharmacia in PBS umgepuffert. Die Durchführungen erfolgten nach Herstellerangaben. Vor und nach jedem Schritt wurden die Proteinkonzentrationen überprüft (Kapitel 2.5.1.).

### 2.5.5. Proteinfällung

Zur Fällung versetzte man eine Proteinlösung mit dem gleichen Volumen 20-%iger Trichlor-essigsäure und inkubierte eine Stunde auf Eis. Nach hochtouriger Zentrifugation wurde der Überstand verworfen, das Sediment mit Aceton (-20°C) gewaschen, getrocknet und zur gelelektrophoretischen Analyse in Laemmli-Puffer aufgenommen.

### 2.5.6. Nachweis der $\alpha$ -Rezeptorbindung mittels ELISA

Auf 96well-Mikrotiterplatten (Greiner, Germany) wurden pro well 50 ng des in PBS gelösten, chimären Proteins sIL-11R-IL-2 bei 4°C gebunden. Nach 24 h blockierte man 1 h mit 3% BSA in PBS und inkubierte die gebundenen Proteine bei RT 3 h mit je 100 ml Trx, Trx-IL-11 und den zu untersuchenden Mutanten. Hierzu wurden Verdünnungsreihen der Proteine in PBS angelegt. Nach dreimaligem Waschen mit PBS-Tween inkubierte man die gebundenen Proteine 2 h bei 20°C mit 100  $\mu$ l IL-11-Antikörper-Lösung (R&D). Nach erneutem Waschen erfolgte die einstündige Inkubation mit 100 ml einer Peroxidase-Lösung (Immunotech). Man wusch wiederum und gab 100 ml der Entwicklerlösung in jedes well. Die Farbreaktion unter Lichtausschluß wurde nach 10 minütiger Entwicklung durch Zugabe von 50 ml 2M Schwefelsäure gestoppt. Die Absorption bei 450 nm wurde mit einem ELISA reader (Molecular Device) bestimmt.

polyklonaler, biotinylierter Ziege-anti-IL-11 Antikörper	500ng/ml in PBS versetzt mit 0,2% BSA
Streptavidin-konjugierte Peroxidase	1:50.000, versetzt mit 0,2% BSA
Entwicklerlösung	0,1 M Natriumacetat-Puffer (pH 5.5) 1% tetra-Methylbenzidin 0.1% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>

### 2.5.7. Nachweis der STAT-DNA-Bindung im Elektrophoretischen Mobilitätsshift Assay (EMSA)

#### 2.5.7.1. Herstellung von Kernextrakten

HepG2-Zellen wurden mit Zytokinen und löslichem Rezeptor definierter Konzentrationen stimuliert. Danach wusch man die Zellen zweimal mit kaltem PBS/Vanadat und löste sie mit einem Gummischaber von der Platte. Die Zellen wurden in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß durch Zentrifugation (5 min, 220 g) sedimentiert und in 400  $\mu$ l Puffer A resuspendiert. Nach 10-minütiger Inkubation auf Eis wurden die Zellen mechanisch durch Vortexen (10 sec) aufgebrochen und erneut zentrifugiert. Das Sediment wurde in 100  $\mu$ l Puffer C aufgenommen

und 20 min auf Eis inkubiert. Die kernproteinhaltige Fraktion konnte nach Zentrifugation (2 min, 10.000 g) mit dem Überstand abgenommen werden. Der Proteingehalt in den Kernextrakten wurde wie in Kapitel 2.5.1. bestimmt.

PBS/Vanadat	PBS 100 $\mu$ M Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>
Puffer A	10 mM HEPES-KOH pH 7,8 1,5 mM MgCl <sub>2</sub> 10 mM KCl 0,5 mM DTT 0,2 mM PMSF 1 mM Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>
Puffer C	20 mM HEPES-KOH, pH 7,8 1,5 mM MgCl <sub>2</sub> 420 mM NaCl 0,2 mM EDTA 25% (v/v) Glycerin 0,5 mM DTT 0,2 mM PMSF

#### 2.5.7.2. Radioaktive Markierung doppelsträngiger DNA-Sonden

Zur Bestimmung der STAT1- und STAT3-Aktivierung in Kernextrakten wurde eine radioaktiv markierte, doppelsträngige m67SIE-DNA-Sonde verwendet. Diese synthetische DNA-Sequenz enthält das sis-induzierbare Element (SIE) des humanen c-fos-Promotors. Die Einführung einer Mutation (m67) bewirkt, daß STAT1 und STAT3 mit gleich hoher Affinität binden können [98]. Die radioaktive Markierung doppelsträngiger DNA erfolgte durch Auffüllen 5'-überhängender Enden mit dem Klenow-Enzym (1 U) (LaRoche Diagnostics GmbH, Mannheim) unter Verwendung von [<sup>32</sup>P]α-dATP. Der Reaktionsansatz wurde 30 min bei 37°C inkubiert. Die freien Nukleotide wurden mit Hilfe des *Qiaquick Nucleotide Removal Kits* der Firma Qiagen (Hilden) abgetrennt. Die eingebaute Radioaktivität wurde im β-Counter bestimmt.

m67SIE: 5'-GATTGACGGGAACTG-3' (die STAT-Bindungsregion ist unterstrichen)

### 2.5.7.3. EMSA

Die auf 10 µg/9,5 µl eingestellten Kernextrakte wurden zur Ermittlung der STAT-Aktivität mit 10,5 µl Reaktionsgemisch und mit 30.000 cpm der radioaktiven m67SIE-DNA-Sonde 10 min bei RT inkubiert. Dabei kam es zur Bindung aktivierter STAT-Faktoren an die DNA-Sequenz. Die Protein-DNA-Komplexe wurden dann in einem 4,5%igen nativen Polyacrylamid-Gel aufgetrennt. Die Elektrophorese wurde mit 200 V über eine Laufstrecke von insgesamt 20 cm durchgeführt. Der verwendete Laufpuffer (0,25x TBE) wurde mit Hilfe einer Pumpe kontinuierlich bis zum Erreichen einer Lauffront von 12 cm umgewälzt. Danach wurde die Pumpe abgeschaltet. Nach der Elektrophorese wurde das Gel 15 min in 10 vo-% Methanol/10 vol-% Eisessig fixiert und unter Vakuum getrocknet. Die Protein-DNA-Komplexe konnten mit Hilfe der Autoradiographie sichtbar gemacht werden. Eine quantitative Auswertung erfolgte mit dem Phosphorimager Storm 840 (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA, USA).

Reaktionsgemisch	4 µl 5x Gelshift-Puffer 0,1 µl 1 M DTT 0,2 µl 200 mM PMSF 1 µl Poly(dI-dC) (1 mg/ml) 2 µl BSA (1 mg/ml) 2,2 µl H <sub>2</sub> O 1 µl m67SIE-DNA-Sonde
5x Gelshift-Puffer	50 mM HEPES-KOH, pH 7,8 5 mM EDTA 25 mM MgCl <sub>2</sub> 50% Glycerin
5x TBE	1 M Tris, pH 8,3 830 mM Borsäure 10 mM EDTA
Gellösung	6,75 ml 40 vol-% Acrylamidlösung (19:1) 4,5 g Glycerin 3 ml 5x TBE 45 ml H <sub>2</sub> O 400 µl APS (10 %) 40 µl TEMED

## 2.5.8. Plasmonresonanz

### 2.5.8.1. Immobilisierungstechnik

Die Immobilisierung des Liganden erfolgte auf dem im BIAcore eingelegten CM5 Sensorchip. Dieser besteht aus einer Glasplatte, die mit einem dünnen Goldfilm beschichtet ist. An diesen Goldfilm ist die Carboxy-methyl-dextran-Matrix mit Hilfe eines Linkers gebunden. Der Chip wurde kontinuierlich mit HBS-Puffer umspült. Zunächst aktivierte man die Oberflächenmatrix durch Injektion von EDC-NHS. Sodann wurde 1 µg Substrat, das in 10 mM Natriumacetat-Puffer pH 5,0 vorlag, gekoppelt und der Chip durch Injektion von 1 M Ethanolamin-hydrochlorid pH 8,5 abgesättigt. Nach Waschen mit 10mM Glycin-HCl pH 1,8 konnte der Chip für Bindungsstudien eingesetzt werden. Die erfolgreiche Immobilisierung des Liganden wird kontinuierlich durch Messung der *resonance units* (RU) im Sensorgramm überwacht.

HBS-Puffer	10 mM HEPES, pH 7,4 150 mM NaCl 3,4 mM EDTA 0,005% Surfactant P20
EDC-NHS	50 mM N-Hydroxysuccinimid 200mM N-ethyl-N'-(dimethyl-aminopropyl)-carbodiimid

### 2.5.8.2. Kinetische Messungen

- Die Assoziation der punktmutierten Trx-IL-11 (1 - 10µg/ml) an die Chip-gekoppelten IL-11-Antikörper wurde in HBS-Puffer bei einer Flußrate von 10 µl/min bei RT für 5 min aufgenommen. Der Chip wurde weitere 15 min mit HBS-Puffer beschickt (Dissoziation). Nach jedem Lauf regenerierte man 30s den Chip mit 5mM HCl.
- Zur Assoziation von Trx-IL-11, H182L und D186V an den α-Rezeptor wurde der IL-11Rα-Antikörper E24.2 an den Chip gebunden. Dieser Chip wurde erst mit 10µg/ml IL-11Rα-Flag in HBS-Puffer bei einer Flußrate von 10 µl/min bei RT für 5 min und direkt im Anschluß mit dem Zytokin (10µg/ml) beschickt (Assoziation). Der Chip wurde weitere 15 min mit HBS-Puffer beschickt (Dissoziation). Nach jedem Lauf regenerierte man den Chip 30 sec mit 5mM HCl. Das gemessene Resonanzsignal des Kontrollkanals subtrahierte man vom gemessenen Resonanzsignal des Probenkanals. Die resultierenden Assoziations- und Dissoziationskurven wurden mit Hilfe des BIAEvaluation Software Paskets (BIAcore) ausgewertet.



## 2.5.9. Gelfiltration des sgp130 in An- und Abwesenheit von IL-11R-D3

900 µl (~1 µg) sgp130-haltiger Baculoüberstand wurden 1 h bei 4 °C mit oder ohne 2,5 µg IL-11R-D3 inkubiert und dann hochohrtig zentrifugiert. Den Überstand filtrierte man mit einer konstanten Flußrate von 1ml/min über eine equilibrierte Superdex 75-Säule (Pharmacia). Die Fraktionsgröße betrug 1 ml. Die einzelnen Fraktionen wurden auf ihren Gehalt an sgp130 (ELISA) und IL-11R-D3 (Western-Blot) hin untersucht.

Elutionspuffer	20 mM Tris, pH 8,0
	1 nM EDTA
	150 mM NaCl

## 2.5.10. Aufreinigung von Trx-IL-11

Trx-IL-11 wurde wie in Kapitel 2.3.16 beschrieben exprimiert und 10 ml der Trx-IL-11-Lösung mit Centriprep 3 (Amicon) auf 0,5 ml konzentriert. Die Proteinlösung wurde hochohrtig zentrifugiert, 15 Stunden bei 4°C gegen *osmotic shock*-Lösung II dialysiert und erneut zentrifugiert. Den Überstand gab man mit einer konstanten Flußrate von 1ml/min auf eine equilibrierte Ionentauscher Q2-Säule (Bio-Rad) und eluierte mit einem Laufpuffer linearen Salzgradientens (maximal 0,5 M NaCl) mit einer konstanten Flußrate von 0,5 ml/min. Die einzelnen Fraktionen wurden auf ihren Gehalt an Trx-IL-11 mittels Silbergel und Western-Blot-Analyse hin untersucht.

## 2.6. Immunologische Methoden

### 2.6.1. Antisera und Antikörper

Kaninchen-anti-Maus Ig	polyklonales Antiserum gegen den konstanten Bereich von Maus Immunglobulin (DAKO, Glostrup, Dänemark)
Ziege-anti-Maus Ig	polyklonales Antiserum gegen den konstanten Bereich von Maus Immunglobulin, HRP-konjugiert (DAKO, Glostrup, Dänemark)
R-Phycoerythrin-konjugierter anti-Maus-Ig Antikörper	Ziege-anti-Maus-Ig, (Fab') <sub>2</sub> -Fragmente, R-Phycoerythrin-konjugiert (Dianova, Hamburg)
α1-Antichymotrypsin-Antikörper	polyklonaler α1-Antichymotrypsin-Antikörper des Kaninchens (Dako, Dänemark)

C4.2, E24.2	monoklonale Antikörper gegen die Extrazellulärregion des IL-11R $\alpha$ , zur Verfügung gestellt von Dr. Felix A. Montero-Julian, Immunotech, (Marseille, Frankreich) [52]
E24.2-biot.	biotinylierter, monoklonaler Antikörper gegen die Extrazellulärregion des IL-11R $\alpha$ , zur Verfügung gestellt von Dr. Felix A. Montero-Julian, Immunotech, (Marseille, Frankreich) [52]
Anti-Flag-M2	monoklonaler Antikörper M2 für das Flag-Epitop des IL-11R $\alpha$ (Integra Biosciences)
Anti-Flag-M2-biot.	monoklonaler Antikörper M2 für das Flag-Epitop des IL-11R $\alpha$ , biotinyliert (Eastman Kodak Company)
Trx-Antikörper	monoklonaler Antikörper für das Trx-Epitop des Trx-IL-11-Fusionsproteins (Invitrogen)
B-S12	Mischung von zwei verschiedenen Antikörpern gegen die zweite und dritte Domäne des gp130 [99, 100]
B-P4	monoklonaler Antikörper gegen die vierte Domäne des gp130 [99]
B-R6, BN-12	monoklonale Antikörper gegen den extrazellulären Teil des IL-6R $\alpha$ [99]

Die Antikörper B-S12, B-P4, B-R6 und BN-12 wurden freundlicherweise von Dr. J. Wijdenes (Diacclone, Besançon, Frankreich) zur Verfügung gestellt.

### 2.6.2. Western Blot-Analyse bei Verwendung von PVDF-Membranen

Die mittels SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden mit Hilfe der *Semi-Dry-Western-Blot*-Methode auf eine PVDF-Membran (Gelman Sciences, Roßdorf) transferiert (Kyhse-Andersen, 1984). Diese wurden 30 min mit TBS-N (10% BSA) abgesättigt, dann zwei Stunden mit dem spezifischen Erstantikörper in TBS-N (1% BSA) bei RT inkubiert und mit TBS-N gewaschen. Auf die halbstündige Inkubation mit dem Peroxidase-konjugierten Zweitantikörper in TBS-N (1% BSA) folgte nach wiederholtem Waschen die Anfärbung mit Hilfe des ECL-Detektionssystems (*enhanced chemiluminescence*, Amersham Pharmacia Biotech) nach Herstellerangaben. Die Detektion erfolgte durch Exposition der lumineszierenden Membran auf einem ECL-Film. Die Expositionsdauer betrug einige Sekunden bis 15 min.

Falls eine Gegenfärbung des Western-Blots durch einen anderen Antikörper stattfinden sollte, wurden die gebundenen Immunkomplexe durch 30 minütige Inkubation bei 70°C mit einem *stripping* Puffer von der Membran gelöst und eine zweite Western-Blot-Analyse im Anschluss daran durchgeführt.

Verdünnung der Antikörper:	
monoklonaler Maus-anti-Trx-Antikörper	1:5000
monoklonaler Maus-anti-hIgG1 Antikörper	1:1000
HRP-konjugierter Zweitantikörpers	1:2000
Kathodenpuffer	25 mM Tris-Base, pH 9,4 0,04 M $\epsilon$ -Aminocapronsäure 0,01% SDS
Anodenpuffer I	0,3 M Tris/HCl, pH 10,4
Anodenpuffer II	25 mM Tris/HCl, pH 10,4
TBS-N	20 mM Tris/HCl, pH 7,6 140 mM NaCl 0,1% Nonidet-P40
<i>stripping</i> Puffer	62,5 mM Tris, pH 6,7 2% SDS 100 mM $\beta$ -Mercaptoethanol

### **2.6.3. Relative Proteinbestimmung mittels ELISA**

#### **2.6.3.1. Trx-IL-11**

Um die Bioaktivitäten der einzelnen Zytokinmutanten vergleichen zu können, wurden bei den Proliferations- und Akutphase-Proteinexpressionsversuchen gleiche Mengen des zu untersuchenden Proteins eingesetzt. Dafür wurden die relativen Zytokinkonzentrationen der *osmotic shock*-Lösungen und der konzentrierten und umgepufferten Proteinlösungen mittels ELISA bestimmt.

Mit 200 ng Gesamtprotein (Konzentrationsbestimmung Kapitel 2.5.1.) wurde auf einer Mikrotiterplatte Verdünnungsreihen der Trx-IL-11-Mutanten in je 100  $\mu$ l PBS aufgestellt und über Nacht bei RT beschichtet. Die Oberfläche der Platte wurde 2 h mit je 200  $\mu$ l einer 3%igen BSA-Lösung in PBS abgesättigt. Hiernach erfolgte die zweistündige Inkubation mit dem Trx-Antikörper bei 37°C. Man wusch viermal mit 200  $\mu$ l PBS-Tween und inkubierte bei RT 30 min mit dem zweiten Antikörper. Nach wiederholtem Waschen wurde die ELISA-Platte mit je 100  $\mu$ l der frisch hergestellten Mischung aus 0,1 M Natriumacetat (pH 5,5), 1% TNB-Stammlösung (10 mg TNB/ ml DMSO) und 0,1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (3%-ig) 15-30 min entwickelt und dann mit 100  $\mu$ l Stopplösung (2 M Schwefelsäure) versetzt. Die photometrische Messung der Extinktion erfolgte am SLT-ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 450nm.

Verdünnung der Antikörper:

monoklonaler Maus-anti-Trx-Antikörper	1:5000
HRP-konjugierter Zweitantikörpers	1:2000

### 2.6.3.2. sIL-11R $\alpha$

Zur Konzentrationsbestimmung des sIL-11R $\alpha$  wurde eine Mikrotiterplatte mit 100 $\mu$ l/*well* C4.2-Lösung über Nacht inkubiert. Die Oberfläche der Platte wurde 1 h mit je 200  $\mu$ l einer 3%igen BSA-Lösung in PBS abgesättigt. Hiernach erfolgte die zweistündige Inkubation der Probenlösung (100 $\mu$ l/*well*) bei RT. Man wusch viermal mit 200  $\mu$ l PBS-Tween und inkubierte bei RT 30 min mit 50 $\mu$ l Zweitantikörper-Lösung. Nach wiederholtem Waschen inkubierte man 30 min mit HRP-Lösung. Die Detektion erfolgte wie beim Trx-IL-11-ELISA.

Verdünnung der Antikörper:

monoklonaler IL-11R $\alpha$ -Antikörper C4.2	5 $\mu$ g/ml in PBS
Zweitantikörper-Lösung	1 $\mu$ g/ml biotinylierter IL-11R $\alpha$ -Antikörper E24.2 1% BSA in PBS
HRP-Lösung	HRP 1:10.000 in PBS (1% BSA)

### 2.6.3.3. sgp130

Zur Konzentrationsbestimmung des gp130 wurde eine Mikrotiterplatte mit 100 $\mu$ l/*well* Erstantikörper-Lösung über Nacht inkubiert. Die Oberfläche der Platte wurde 1 h mit je 200  $\mu$ l Blockierpuffer abgesättigt. Hiernach erfolgte die zweistündige Inkubation der mit 50 $\mu$ l Zweitantikörper-Lösung versetzten Probenlösung (100 $\mu$ l/*well*) bei 37°C. Man wusch viermal mit 200  $\mu$ l PBS-Tween und inkubierte bei RT 30 min mit HRP-Lösung. Die Detektion erfolgte wie beim Trx-IL-11-ELISA.

Blockierpuffer	1M Tris/HCl pH 7,7 20 % Saccharose 0,1 % Natriumazid
----------------	--

Probenlösung	Probe in 100 $\mu$ l PBS (1% BSA)
--------------	-----------------------------------

Verdünnung der Antikörper:

Erstantikörper-Lösung	monoklonaler gp130-Antikörper B-P4 (5 $\mu$ g/ml in PBS)
Zweitantikörper-Lösung	biotinylierter gp130-Antikörper BT2 (5 $\mu$ g/ml) 1% BSA in PBS
HRP-Lösung	HRP 1:10.000 in PBS (1% BSA)

#### 2.6.3.4. IL-6R $\alpha$

Die Konzentrationsbestimmung des IL-6R $\alpha$  erfolgte wie beim gp130.

Blockierpuffer	PBS (1% BSA)
Probenlösung	Probe in PTG-Puffer
PTG-Puffer	0,02 % Gelantine in PBS-Tween
Verdünnung der Antikörper:	
Erstantikörper-Lösung	monoklonaler IL-6R $\alpha$ -Antikörper BN-12 (5 $\mu$ g/ml in PBS)
Zweitantikörper-Lösung	1 $\mu$ g/ml biotinylierter IL-6R $\alpha$ -Antikörper BR6 1% BSA in PBS
HRP-Lösung	HRP 1:10.000 in PBS (1% BSA)

#### **2.6.4. Durchflußzytometrie (FACS-Analyse)**

Für die Durchflußzytometrie wurden pro Ansatz  $2,5 \times 10^5$  bis  $1 \times 10^6$  Zellen eingesetzt. Die zu untersuchenden Zellen wurden geerntet, indem sie - wenn es sich um adhärenente Zellen handelte - mit PBS/EDTA von der Platte gespült wurden. Bei nicht-adhärenenten Zellen wurde die Zellsuspension eingesetzt. Die Zellen wurden abzentrifugiert und dreifach mit kaltem PBS/5% FKS gewaschen, in 100  $\mu$ l PBS/5% FKS mit 1  $\mu$ g eines spezifischen Antikörpers für 20 min auf Eis inkubiert und anschließend mit PBS/5% FKS gewaschen. Zur Detektion der an die Zellen gebundenen Antikörper folgte eine 30 minütige Inkubation mit einer 1:50-Verdünnung eines R-Phycoerythrin-konjugierten F(ab')<sub>2</sub> Fragments eines Ziege-anti-Maus IgG bei 4°C unter Lichtausschluß. Die Zellen wurden erneut mit PBS/5% FKS gewaschen und in PBS/5%FKS resuspendiert.  $10^4$  Zellen wurden in einem FACSCalibur (Becton Dickinson, Heidelberg) analysiert.

Zur Untersuchung des Bindungsverhaltens der punktmutierten Trx-IL-11-Proteine inkubierte man Ba/F3-gp130-IL-11R $\alpha$ -Zellen für 4 h in zytokinfreiem Kulturmedium vor. Nach dreimaligem Waschen versetzte man je  $2,5 \times 10^5$  Zellen in einer 48-well Microtiterplatte für 2–3 h bei 37 °C mit zytokinhaltigem Kulturmedium. Die Zellen wurden wiederum dreimal mit PBS gewaschen und geerntet. Sodann wurde die Durchflußzytometrie wie beschrieben durchgeführt.

PBS/EDTA	PBS (10 mM EDTA)
----------	------------------

## **2.6.5. Immunpräzitationen**

### 2.6.5.1. Immunpräzitation des löslichen IL-11R $\alpha$ -Flag mit kovalent an BrCN-Sepharose gebundene Trx-IL-11-Mutanten

Gleiche Mengen Trx, I171D und R190E wurden nach Herstellerangaben kovalent an BrCN-aktivierte Sepharose (Pharmacia) gebunden. Die Sepharose inkubierte man bei 4°C über Nacht mit 500 $\mu$ l sIL-11R $\alpha$ -Flag-haltigem Überstand Polyhedrosisvirus (AcNPV)-transfizierter Sf-158-Zellen (Baculoüberstand). Nach dreimaligem Waschen mit PBS-Tween löste man an die Sepharose gebundene Proteine durch Zugabe von 2x Laemmli-Probenpuffer und 5 minütige Inkubation bei 95°C. Die Proteine trennte man mittels SDS-PAGE auf, transferierte sie auf eine PVDF-Membran und wies dort das Trx-IL-11 bzw. den sIL-11R $\alpha$ -Flag mit den entsprechenden Antikörpern nach.

PBS-Tween	1 l PBS
	500 $\mu$ l Tween-20

### 2.6.5.2. Immunpräzitation der Trx-IL-11-Mutanten mit IL-11R $\alpha$ -Flag

Definierte Mengen Trx-IL-11 bzw. dessen Mutanten wurden mit 500  $\mu$ l sIL-11R $\alpha$ -Flag-haltigem Baculoüberstand (etwa 10  $\mu$ g) versetzt. Nach Inkubation bei 4°C über Nacht wurden die  $\alpha$ -Rezeptorkomplexe hochtourig zentrifugiert, mit dem an die Protein A-Sepharose (0,5 mg/ml) gebundenen IL-11R $\alpha$ -Antikörper E24.2 präzipitiert und zweimal mit PBS-Tween gewaschen. Durch Aufkochen der Sepharose in 2x Laemmli-Probenpuffer denaturierte man den Komplex und trennte die Proteine mittels SDS-PAGE auf. Nach der Elektrophorese transferierte man die Proteine auf eine PVDF-Membran und wies dort das Zytokin über seinen Trx-Anteil nach.

### 2.6.5.3. Nachweis des mit pSVLgp130IgG und Zytokin präzipitierten sIL-11R $\alpha$ -Flag

COS7-Zellen wurden transient mit einem das pSVLgp130IgG-Fusionsprotein kodierenden Expressionsvektor transfiziert (Kapitel 2.4.3.). Nach einem Wechsel des Mediums akkumulierten die rekombinanten Proteine für 2 Tage im Überstand (10 ml). Nach 48 h präzipitierte man das lösliche gp130 bei 4°C für 12 h unter Zugabe von 1% TNET Puffer über den konstanten IgG1-Teil an Protein A-Sepharose (0,5 mg/ml). Die Sepharose wurde danach sedimentiert, mit TNET gewaschen und in 650  $\mu$ l TNET-Puffer resuspendiert. Zur Bildung der ternären Komplexe wurde das an die Sepharose gebundene sgp130IgG mit 150  $\mu$ l Trx-IL-11 oder dessen Mutanten (etwa 3  $\mu$ g) und 200  $\mu$ l sIL-11R $\alpha$ -Flag-haltigem Baculoüberstand (etwa 4  $\mu$ g) versetzt. Nach erneuter Inkubation bei 4°C über Nacht wurden die ternären Komplexe aus sgp130IgG, sIL-11R $\alpha$ -Flag

und Trx-IL-11 bzw. dessen Mutanten über die Protein A-Sepharose präzipitiert und zweimal mit TNET gewaschen. Durch Aufkochen der Sepharose in 2x Laemmli-Probenpuffer denaturierte man den ternären Komplex und trennte die Proteine mittels SDS-PAGE auf. Nach der Elektrophorese transferierte man die Proteine auf eine PVDF-Membran und wies dort den sIL-11R $\alpha$ -Flag über sein Flag-Epitop nach.

TNET	250 mM Tris/HCl, pH 7,5
	140 mM NaCl
	5 mM EDTA
	1% Triton X100
	2 mM Methionin

#### 2.6.5.4. Nachweis des mit sIL-11R $\alpha$ -Flag und Zytokin präzipitierten sgp130

Zur Bildung der ternären Komplexe versetzte man 750 $\mu$ l sgp130-haltigen Baculoüberstand (etwa 1,5  $\mu$ g) mit 150  $\mu$ l Trx-IL-11 oder dessen Mutanten (etwa 3  $\mu$ g) und 200  $\mu$ l sIL-11R $\alpha$ -Flag-haltigem Baculoüberstand (etwa 4  $\mu$ g). Nach Inkubation bei 4°C über Nacht wurden die ternären Komplexe aus sgp130, sIL-11R $\alpha$ -Flag und Trx-IL-11 bzw. dessen Mutanten hochtourig zentrifugiert, mit dem an die Protein A-Sepharose (0,5 mg/ml) gebundenen IL-11R $\alpha$ -Antikörper E24.2 präzipitiert und zweimal mit PBS-Tween gewaschen. Durch Aufkochen der Sepharose in 2x Laemmli-Probenpuffer denaturierte man den ternären Komplex und trennte die Proteine mittels SDS-PAGE auf. Nach der Elektrophorese transferierte man die Proteine auf eine PVDF-Membran und wies dort das sgp130 mit dem B-P4-Antikörper nach.

#### 2.6.5.5. Nachweis des IL-11R-D3(C248A) präzipitierten sgp130

Zur Komplexbildung inkubierte man 4  $\mu$ g aufgereinigte IL-11R-D3(C248A) in An- oder Abwesenheit von 750 $\mu$ l sgp130-haltigen Baculoüberstand (etwa 1,5  $\mu$ g) und von 150  $\mu$ l Trx-IL-11 (etwa 3  $\mu$ g). Nach Inkubation bei 4°C über Nacht wurden die Komplexe hochtourig zentrifugiert, mit dem an die Protein A-Sepharose (0,5 mg/ml) gebundenen IL-11R $\alpha$ -Antikörper E24.2 präzipitiert und zweimal mit PBS-Tween gewaschen. Durch Aufkochen der Sepharose in 2x Laemmli-Probenpuffer denaturierte man die gebundenen Proteine und trennte sie mittels SDS-PAGE auf. Nach der Elektrophorese transferierte man die Proteine auf eine PVDF-Membran und wies dort das sgp130 mit dem B-P4-Antikörper, Trx-IL-11 mit einem Trx-Antikörper nach.

### **3. Ergebnisse**

#### **3.1. Auswahl der Aminosäuren für die positionsgerichtete Mutagenese des humanen Interleukin-11**

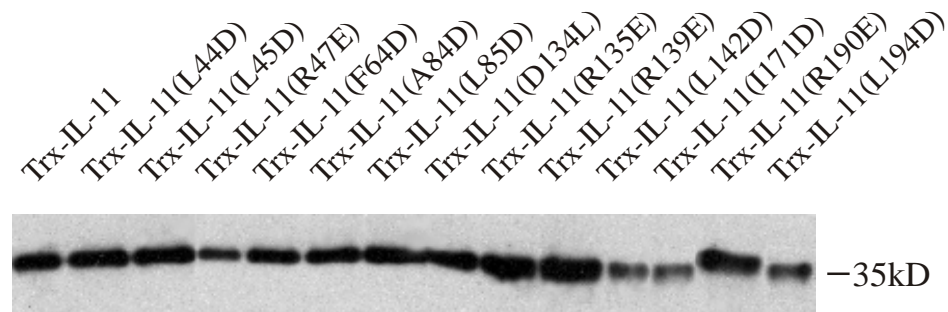
Basierend auf dem Modell des IL-11 konnte in Analogie zu den jeweiligen drei Rezeptorinteraktionsstellen des IL-6, CNTF und LIF [86-88] vorhergesagt werden, welche Aminosäuren mit dem IL-11R $\alpha$  und gp130 in Kontakt treten (*Abb. 1.7*). Die *site 1* des IL-11 interagiert vermutlich mit dem IL-11R $\alpha$  und besteht voraussichtlich aus Aminosäuren der C-terminalen Bereiche des AB-loops und der D-Helix, zuzüglich des exponierten Arginins 47 der A-Helix. Anhand des Modells wurden fünf Seitenketten ausgewählt: R47 der A-Helix, A84 und L85 im AB-loop und die C-terminalen Reste R190 und L194. Im Falle des IL-6 ermöglichen *site 2* und *site 3* den Kontakt mit dem gp130-Homodimer. Die *site 2* des IL-6, des LIF und des CNTF besteht aus Resten der A-Helix und der C-Helix. Die exponierten Seitenketten L44 und L45 in der A-Helix des IL-11 sind Kandidaten für eine hydrophobe Interaktion mit gp130, die möglicherweise von den Seitenketten D134, R135 und R139 der C-Helix abgeschirmt wird. Zusätzlich wurde die exponierte Aminosäure L142 der C-Helix für die Mutagenese ausgewählt. Die zweite Bindungsregion des IL-6 zu gp130 bzw. die Bindungsregion des LIF und des CNTF zum LIFR (*site 3*) setzt sich aus den N-terminalen Anteilen der D-Helix und des AB-loops zusammen. Deshalb wurden die im Modell exponierten Reste F64 und D69 im AB-loop und I171 am Anfang der D-Helix des IL-11 zur positionsgerichteten Mutagenese ausgewählt.

#### **3.2. Generierung der IL-11 Mutanten und deren Expression als Thioredoxin-Fusionsproteine**

Um die Bedeutung der im Modell ausgesuchten Aminosäuren zu untersuchen - sowohl in Hinblick auf die biologische Aktivität, als auch auf die Rezeptorbindung des IL-11 - wurden die entsprechenden Seitenketten mittels positionsgerichteter Mutagenese ausgetauscht. Zur maximalen Störung der vorhergesagten Rezeptorbindungsregionen wurden hierbei hydrophobe Aminosäuren durch die geladene Asparaginsäure, Asparaginsäure 134 durch Leucin und alle übrigen geladenen Seitenketten durch entgegengesetzt geladene Reste (Lysin oder Glutaminsäure) ersetzt. Nach Überprüfung der Expressionsvektoren durch DNA-Sequenzierung konnten humanes IL-11 und 14 seiner Mutanten (L44D, L45D, R47E, F64D, D69K, A84D, L85D, D134L, R135E, R139E, L142D, I171D, R190E, L194D) als Thioredoxin (Trx)-Fusionsproteine in *E. coli* exprimiert werden. Die Expression des humanen IL-11 Wildtyps als Trx-Fusionsprotein und seine funktionelle Charakterisierung wurde bereits beschrieben [96, 97].



Diese Untersuchungen zeigten auch, daß das N-terminal gebundene Trx keine Auswirkung auf die nach IL-11-Gabe untersuchten Effekte hat. Die Trx-Fusionsproteine werden im Periplasma der Bakterien angereichert und können durch osmotischen Schock freigesetzt werden. Mit Ausnahme von D69K konnten alle Mutanten durch Western-Blot-Analyse im Überstand der osmotisch geschockten Bakterien nachgewiesen werden (Abb. 3.1.).



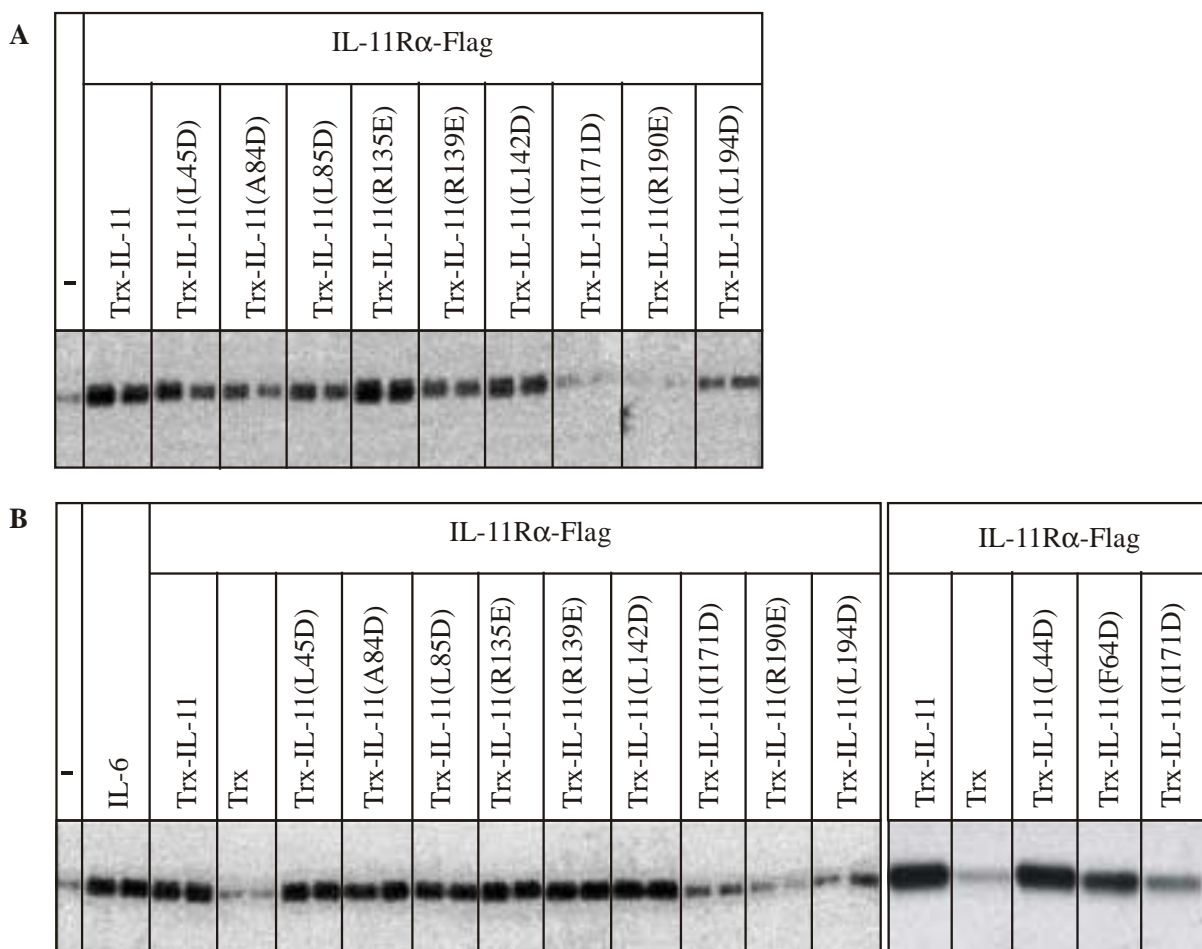
**Abb. 3.1. Westen-Blot-Analyse der Expression des Trx-IL-11-Fusionsproteins und der punktmutierten Proteine**  
 Die mit den Expressionsvektoren für Trx-IL-11 oder dessen Mutanten transformierten Bakterien wurden nach induzierter Expression der rekombinanten Proteine osmotisch geschockt, die Überstände mittels SDS-PAGE aufgetrennt und durch Western-Blot-Analyse mit dem Trx-Antikörper detektiert.

Die Mutante D69K lag vollständig in der unlöslichen Fraktion vor (nicht gezeigt), da die eingeführte Punktmutation zum Ausfallen des Proteins durch Aggregation oder Denaturierung führt. Die molekulare Masse aller detektierten Proteine stimmt mit dem berechneten Wert von 35 kDa - der Summe von 21 kDa des IL-11 und 14 kDa des Trx - gut überein. Im Falle des R190E führt die durch die Punktmutation eingeführte negative Ladung zu einer leicht verringerten elektrophoretischen Mobilität. Die Konzentrationen der Trx-IL-11 Mutanten wurden abgeschätzt und befanden sich in derselben Größenordnung. Zur weiteren Untersuchung wurden die Überstände auf PBS umgepuffert. Die Konzentrationen der rekombinanten Proteine konnten mittels eines auf die Erkennung des Trx-Anteils des Fusionsproteins - das nicht von der Punktmutation betroffen ist - basierenden ELISA-Tests genau bestimmt werden.

### 3.3. Vergleichende Bioaktivitätsmessungen von Trx-IL-11-Wildtyp und den Punktmutanten

#### 3.3.1. Induktion der Synthese von Akutphase-Proteinen in HepG2-Zellen

Als ein erster Nachweis zur Bestimmung der Bioaktivitäten der Trx-IL-11-Mutanten sollte die Induktion des Akutphaseproteins  $\alpha$ 1-Antichymotrypsin in der humanen Hepatomzelle HepG2 untersucht werden. Da HepG2-Zellen den membrangebundenen IL-11R $\alpha$  nicht exprimieren, erforderte deren Stimulation mit IL-11 die Anwesenheit des sIL-11R $\alpha$  [101]. Der lösliche humane IL-11R $\alpha$ , dem die Transmembrandomäne und der zytoplasmische Teil des IL-11R $\alpha$  fehlt, konnte wie bereits beschrieben [97] aus Baculovirus-infizierten Insektenzellen gewonnen werden.



**Abb. 3.2. Induktion der  $\alpha$ 1-Antichymotrypsin-Synthese in HepG2-Zellen durch Trx-IL-11 und Mutanten in Gegenwart des sIL-11R $\alpha$ -Flag**

HepG2-Zellen wurden, wie in der Abbildung angegeben, mit (A) 0,5  $\mu$ g/ml (14,3 nM) oder (B) 2  $\mu$ g/ml (57,2 nM) Zytokin in Gegenwart des sIL-11R $\alpha$ -Flag (1  $\mu$ g/ml) stimuliert. Unstimulierte oder mit IL-6 (200 U/ml) stimulierte Zellen dienten als Kontrollen. Nach metabolischer Markierung der neu synthetisierten Proteine durch Zugabe von [ $^{35}$ S]Methionin/Cystein wurde  $\alpha$ 1-Antichymotrypsin aus den Überständen präzipitiert, durch SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Autoradiographie detektiert.

*Abb. 3.2.B.* zeigt, daß Trx-IL-11 in Kombination mit sIL-11R $\alpha$ -Flag die Synthese des  $\alpha$ 1-Antichymotrypsin - in vergleichbarer Intensität zu der durch IL-6 hervorgerufenen Antwort - induziert. Trx führt in Gegenwart des sIL-11R $\alpha$  zu keiner Stimulation der Akutphase-Proteinsynthese. Dies bestätigt, daß der IL-11-Anteil des Trx-IL-11-Fusionsproteins für die Bioaktivität verantwortlich ist. Mit Ausnahme von R135E und L142D zeigen in niedrigen Zytokinkonzentrationen alle Mutanten eine deutliche Abnahme der Bioaktivität im Vergleich zum Wildtyp (*Abb. 3.2.A.*). Im Falle der Punktmutanten I171D und R190E war die Induktion des  $\alpha$ 1-Antichymotrypsins besonders reduziert. Die Mutante R135E zeigte im Vergleich zu Trx-IL-11 eine etwas erhöhte Bioaktivität. Bei einer vierfach höheren Konzentration der mutierten Proteine führten alle Punktmutanten - mit Ausnahme von I171D, R190E und L194D - zu Bioaktivitäten vergleichbar dem Wildtyp.

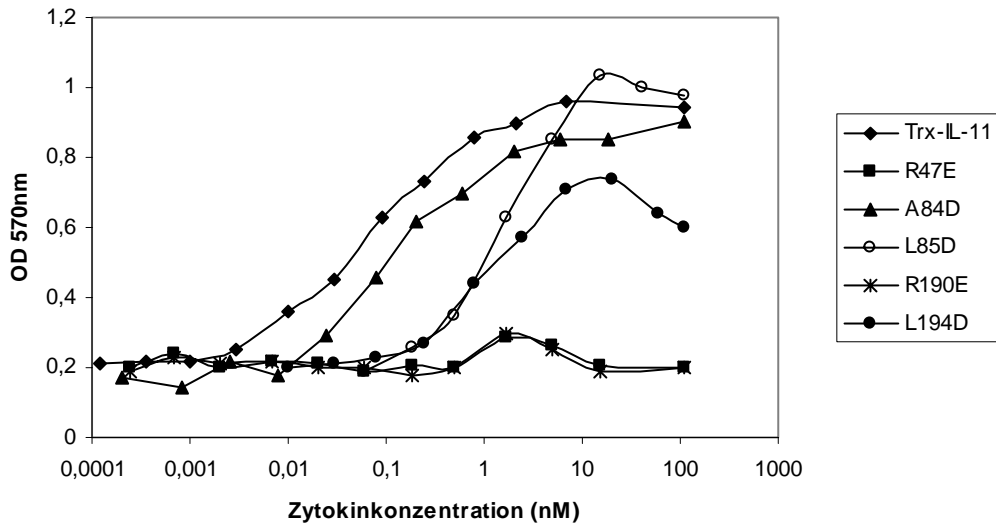
### **3.3.2. Stimulation der Proliferation von Ba/F3-gp130-IL-11R $\alpha$ -Zellen**

IL-11 wirkt als Wachstumsfaktor hämatopoetischer Zellen [63]. Die dosisabhängige Proliferation der Ba/F3-gp130-IL-11R $\alpha$ -Zellen - eine murine prä-B Zelllinie, die nach stabiler Transfektion mit den entsprechenden Rezeptorketten in Abhängigkeit von IL-11 proliferiert [49] - diente als Maß für die Bioaktivität der IL-11-Mutanten (*Abb. 3.3.*). Die Punktmutanten der *site 1* R47E und R190E zeigten lediglich eine Restaktivität nahe der Detektionsgrenze. Wie auch bereits bei den HepG2-Zellen beobachtet, induzieren selbst bei hohen Zytokinkonzentrationen weder F64D, I171D (*site 3*), noch L194D (*site 1*) eine maximale Antwort und können deshalb nur als partielle Agonisten angesehen werden.

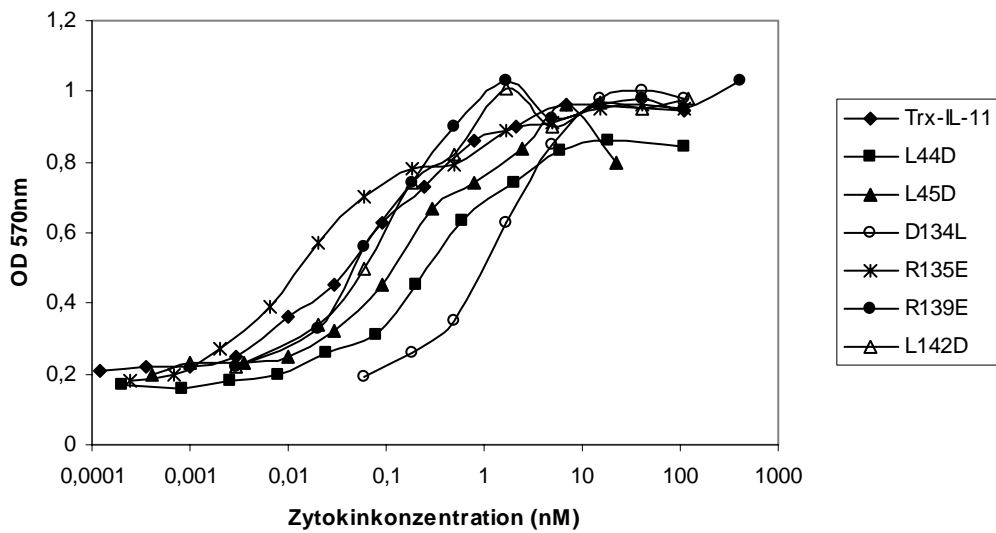
Desweiteren zeigen F64D und I171D glockenförmige Konzentrations-Proliferationskurven, die als Eigenantagonismus interpretiert werden können. Im Vergleich zu Trx-IL-11 liegen die EC50 Werte der drei Mutanten deutlich höher (F64D: 20-fach, I171D: 37-fach, L194D: 18-fach; *Tab. 3.1.*), was auf eine verminderte Affinität zu den Rezeptorkomponenten hindeutet.

Die Mutanten L85D und D134L zeigten ebenfalls deutlich erhöhte EC50-Werte (19-fach), erreichten jedoch bei hohen Dosen Proliferationsantworten, die der des Wildtyps entsprechen. Die Aktivitäten von L44D, L45D und A84D waren geringfügig reduziert (acht-, vier- und dreifache Erhöhung der EC50). Die Proliferationsantworten, die von R139E und L142D induziert wurden, unterschieden sich kaum von der des Trx-IL-11. Die erhöhte Aktivität des R135E - die bereits auf HepG2-Zellen beobachtet wurde - bestätigte sich auf den Ba/F3-gp130-IL-11R $\alpha$ -Zellen. Die EC50 dieser Mutante ist halbiert.

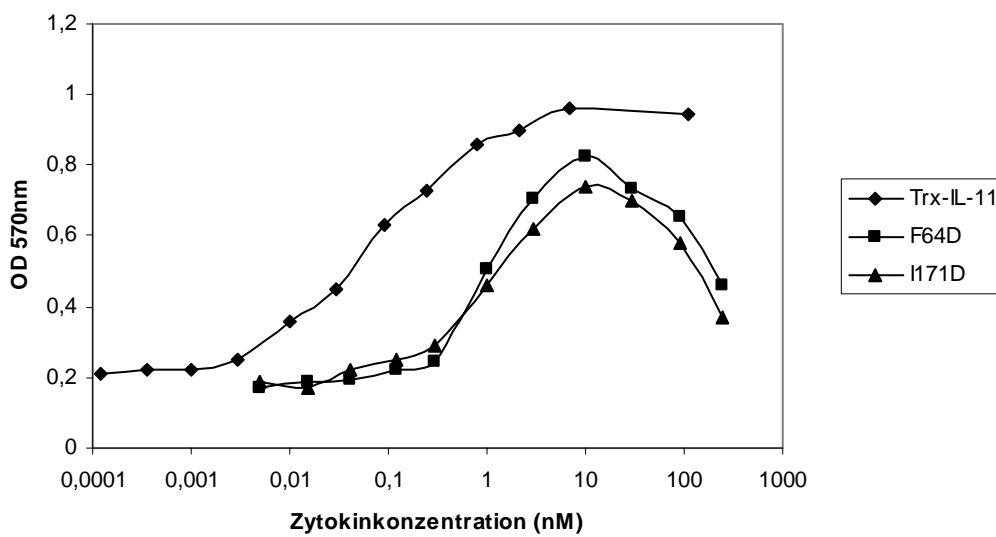
site1



site2



site3



**Abb. 3.3. Proliferation der Ba/F3-gp130-IL-11R $\alpha$ -Zellen nach Stimulation mit Trx-IL-11 und Mutanten**  
Ba/F3-gp130-IL-11R $\alpha$ -Zellen wurden 3 Tage mit steigenden Konzentrationen an Trx-IL-11 und Mutanten, wie in der Abbildung angegeben, stimuliert. Die Proliferation der Zellen wurde mit Hilfe des XTT-Tests gemessen: (oben) site 1-Mutanten; (mitte) site 2-Mutanten; (unten) site 3-Mutanten.

Protein	vorhergesagtes Bindungsepitop	EC50 (nM)	Relative Aktivität (% Wildtyp)
Trx-IL-11		0,071	100
R47E	<i>site 1</i>	>10	<0,7
A84D	<i>site 1</i>	0,23	31
L85D	<i>site 1</i>	1,34	5
R190E	<i>site 1</i>	>10	<0,7
L194D	<i>site 1</i>	1,3	5
L44D	<i>site 2</i>	0,6	12
L45D	<i>site 2</i>	0,26	27
D134L	<i>site 2</i>	1,3	5
R135E	<i>site 2</i>	0,033	215
R139E	<i>site 2</i>	0,071	100
L142D	<i>site 2</i>	0,085	84
F64D	<i>site 3</i>	1,5	5
I171D	<i>site 3</i>	2,65	3

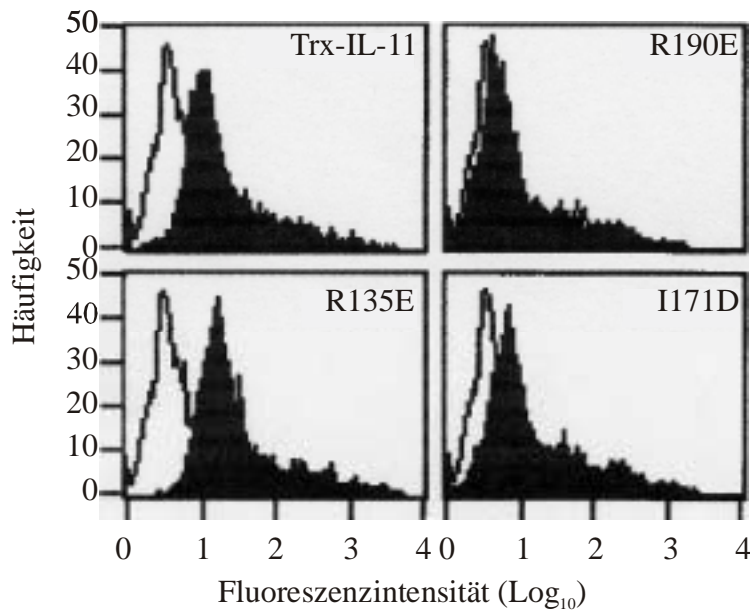
**Tab. 3.1. Proliferative Aktivität der IL-11-Mutanten auf Ba/F3-gp130-IL-11R $\alpha$ -Zellen**

Die Konzentration EC50 ist diejenige Konzentration eines Proteins, welche die halbmaximale Proliferationsantwort induziert. Die relative Aktivität ergibt sich somit aus dem Quotienten dieser EC50 und der EC50 des Trx-IL-11-Wildtyps.

### 3.4. Definition der Bindungsstellen des IL-11 zum $\alpha$ -Rezeptor (*site 1*) und zu gp130 (*sites 2 und 3*)

#### 3.4.1. Bindung des Trx-IL-11 und der mutierten Proteine an Ba/F3-gp130-IL-11R $\alpha$ -Zellen

Um einen ersten Hinweis auf den Zusammenhang der Bioaktivitäten und der Rezeptorbindung der punktmutierten Proteine zu erhalten, wurden I171D (*site 3*, stark reduzierte Bioaktivität), R190E (*site 1*, schwache Bioaktivität) und R135E (*site 2*, erhöhte Bioaktivität) ausgesucht, um ihre Bindung an Ba/F3-gp130-IL-11R $\alpha$ -Zellen - die beide Rezeptorketten exprimieren - zu messen. Die Zellen inkubierte man mit gleichen Mengen Trx-IL-11 oder punktmutierter Proteine und bestimmte deren Bindung mittels Durchflußzytometrie (FACS-Analyse) unter Verwendung eines Trx-Antikörpers (Abb. 3.4.).



**Abb. 3.4. Bindung des Trx-IL-11 und ausgewählter Mutanten an Ba/F3-gp130-IL-11R $\alpha$ -Zellen**

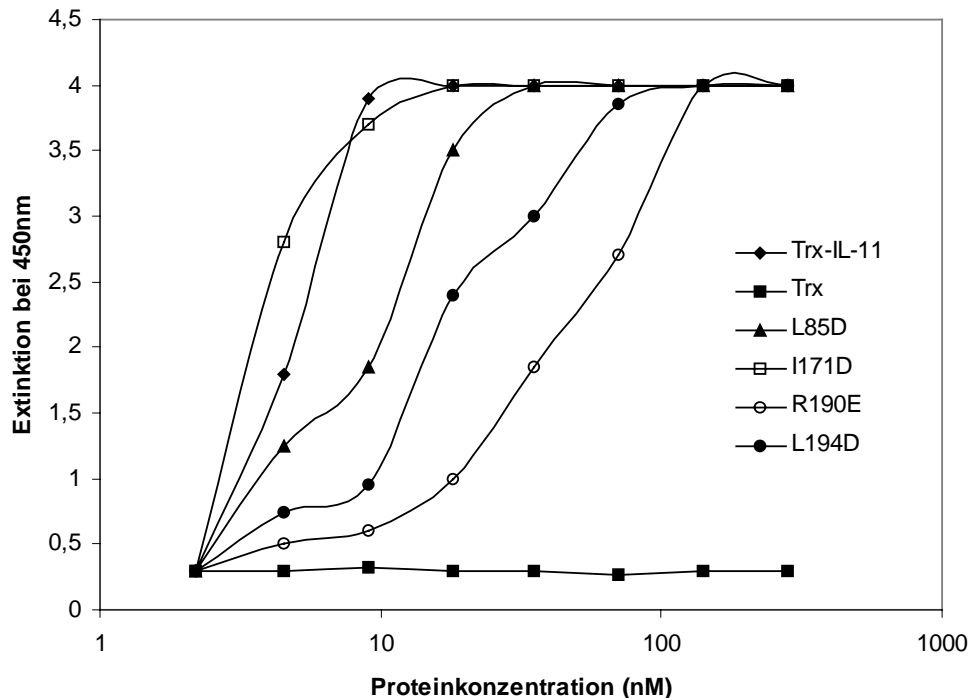
Ba/F3-gp130-IL-11R $\alpha$ -Zellen wurden - wie in der Abbildung angegeben - mit 15nM Trx-IL-11 oder ausgewählten Mutanten inkubiert. Die Detektion des gebundenen Trx-IL-11 erfolgte mittels Durchflußzytometrie. Negativkontrollen in Abwesenheit des Zytokins sind als helle Histogramme dargestellt.

Im Vergleich zu Trx-IL-11 zeigte die *site 1*-Mutante R190E eine stark reduzierte Bindung an die Ba/F3-gp130-IL-11R $\alpha$ -Zellen. Dieser Befund korreliert mit ihrem Bioaktivitätsverlust. Im Fall der hyperaktiven *site 2*-Mutante R135E ist das Detektionsmaximum im Vergleich zum Wildtyp zu höheren Fluoreszenzintensitäten verschoben. Dies spricht für eine verstärkte Rezeptorbindung dieser Punktmutante. Die Rezeptorbindung der Mutante I171D wies lediglich eine geringfügige Beeinträchtigung auf, obwohl diese eine stark reduzierte Bioaktivität in zwei verschiedenen Bioassays zeigte.

### 3.4.2. Interaktion von Trx-IL-11-Mutanten mit dem IL-11R $\alpha$

Zur Untersuchung, in welchem Maße die Bindung des IL-11 an seinen  $\alpha$ -Rezeptor durch die Punktmutationen beeinflusst ist, wählte man Trx-IL-11, die *site 1*-Mutanten geringer Bioaktivität R190E, L194D und L85D, wie auch die schwach aktive *site 3*-Mutante I171D für eine auf der ELISA-Technik basierende IL-11R $\alpha$ -Bindungsstudie aus (Abb. 3.5.). Gereinigtes lösliches IL-11R $\alpha$ -IL-2 Fusionsprotein wurde auf einer 96-well Mikrotiterplatte immobilisiert und mit steigenden Konzentrationen von Trx-IL-11 oder dessen Punktmutanten inkubiert. Die Interaktion der Zytokine mit dem gebundenen sIL-11R $\alpha$ -IL-2 Fusionsprotein wurde mittels der bereits beschriebenen ELISA-Technik gemessen. Die Bindung des I171D zum sIL-11R $\alpha$ -IL-2 Fusionsprotein entsprach der des Trx-IL-11, wohingegen die Bindung des R190E und des

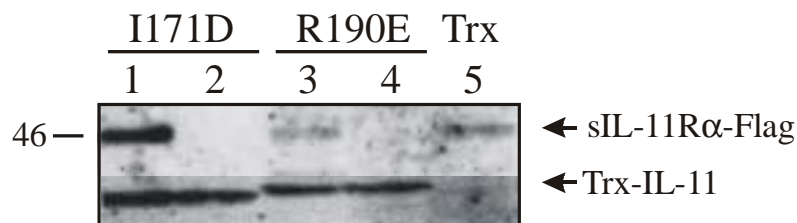
L194D zum sIL-11R $\alpha$ -IL-2 stark reduziert war. L85D zeigte eine signifikante Abnahme der Affinität zum  $\alpha$ -Rezeptor, die der reduzierten Bioaktivität dieser Mutante entspricht.



**Abb. 3.5. Bindung des Trx-IL-11 und ausgewählter Mutanten an das sIL-11R $\alpha$ -IL-2 Fusionsprotein**

Gereinigtes lösliches IL-11R $\alpha$ -IL-2 Fusionsprotein wurde auf einer 96-well Mikrotiterplatte immobilisiert und mit steigenden Konzentrationen von Trx-IL-11 oder dessen Punktmutanten inkubiert. Die Interaktion der Zytokine mit dem gebundenen sIL-11R $\alpha$ -IL-2 Fusionsprotein wurde mittels ELISA-Technik gemessen.

Einige dieser Ergebnisse bestätigten sich in einer zweiten Binärkomplex-Bildungsstudie. Gleiche Mengen I171D, R190E und Trx wurden kovalent an BrCN-aktivierte Sepharose gebunden und zur Präzipitation von sIL-11R $\alpha$ -Flag verwendet (Abb. 3.6.).

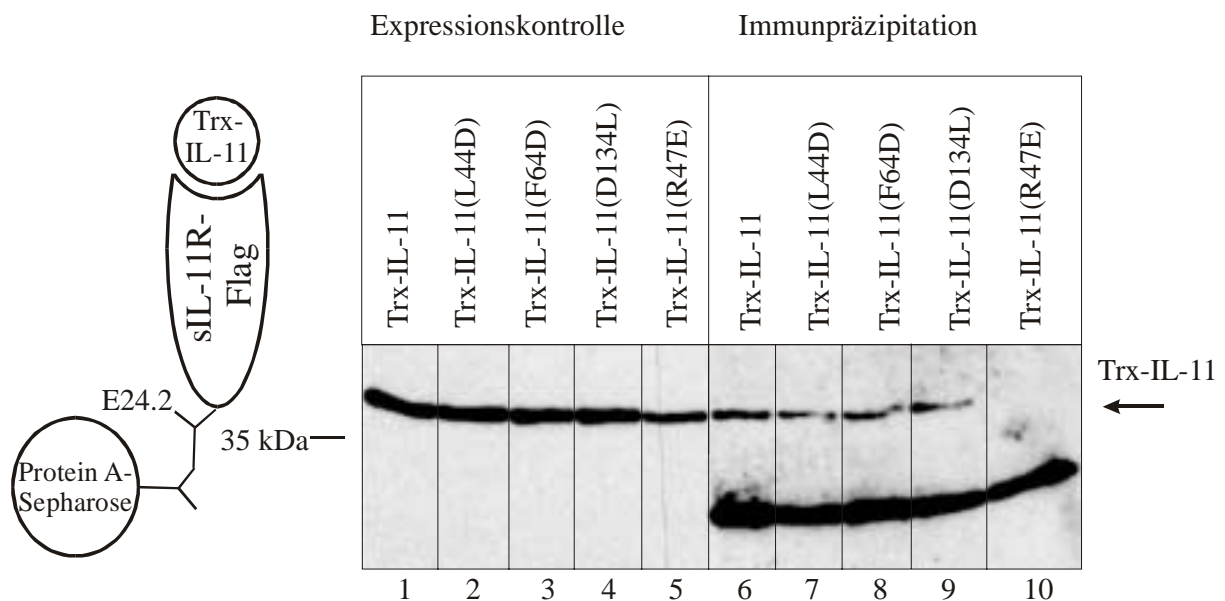


**Abb. 3.6. Bindung des Trx-IL-11 und ausgewählter Mutanten an den sIL-11R $\alpha$ -Flag**

Gleiche Mengen I171D, R190E und Trx wurden kovalent an BrCN-aktivierte Sepharose gebunden und zur Präzipitation des sIL-11R $\alpha$ -Flag eingesetzt. Die Kontrollspuren 2 und 4 verdeutlichen, daß sich die Konzentrationen beider Trx-IL-11-Mutanten vor der Immobilisierung entsprachen. Die gebundenen Proteine wurden durch Inkubation der Sepharose in Gelladepuffer abgelöst, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und durch Western-Blot-Analyse mit Trx- und Flag-Antikörpern detektiert (Spuren 1, 3 und 5).

Die Kontrollspuren 2 und 4 verdeutlichen, daß sich die Konzentrationen beider Trx-IL-11-Mutanten vor der Immobilisierung entsprachen. R190E (Spur 3) und Trx (Spur 5) präzipitierten kaum nachweisbare Mengen des sIL-11R $\alpha$ -Flag. Im Gegensatz dazu ließ sich der sIL-11R $\alpha$ -Flag mit immobilisiertem I171D copräzipitieren (Spur 1). Dies beweist, daß die  $\alpha$ -Rezeptorbindungsdomäne dieser Mutante von der Punktmutation weitgehend unbeeinflußt ist. Zusätzlich führte die Inkubation der Sepharose mit dem Gelladepuffer nach Lämmli zur Aufnahme des copräzipitierten sIL-11R $\alpha$ -Flag zu einer teilweisen Ablösung der immobilisierten Mutanten (Spuren 1 und 3) und diente somit als interne Kontrolle dieses Experimentes.

Nach Generierung monoklonaler IL-11R $\alpha$ -Antikörper durch C. Blanc (Marseille) konnte ein effizienterer Immunpräzipitationsansatz zum Nachweis der  $\alpha$ -Rezeptorbindung etabliert werden. Der Antikörper E24.2 bindet denaturierten wie nativen IL-11R $\alpha$  an einem Epitop im Linkerbereich des Proteins ohne Beeinträchtigung der Zytokinbindung. *Abb. 3.7.* zeigt die Expressionskontrolle des Trx-IL-11 und der punktmutierten Proteine (Spuren 1-5). Trx-IL-11 und sämtliche Mutanten wurden in vergleichbarer Konzentration als lösliche Trx-IL-11-Fusionsproteine im Immunpräzipitationsexperiment (Spuren 6-10) eingesetzt.



**Abb. 3.7. Bindung des Trx-IL-11 und ausgewählter Mutanten an den sIL-11R $\alpha$ -Flag**

Die Spuren 1-5 zeigen die Expressionskontrolle des Trx-IL-11 und der punktmutierten Proteine (links). Der lösliche IL-11R $\alpha$  wurde mit E24.2 über einen polyklonalen Zweitantikörper an Protein-A-Sepharose gebunden und mit gleichen Mengen Trx-IL-11 bzw. den Mutanten L44D, F64D, D134L und R47E inkubiert. Die gebundenen Proteine wurden durch Inkubation der Sepharose in Gelladepuffer abgelöst, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und durch Western-Blot-Analyse mit dem Trx-Antikörper detektiert.

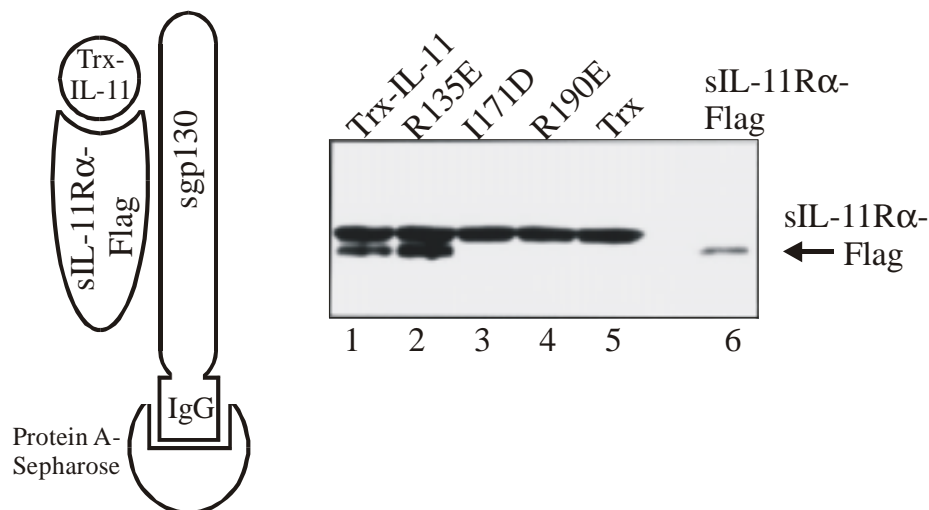
Gleiche Mengen des löslichen IL-11R $\alpha$ -Flag wurden mit E24.2 an Protein-A-Sepharose gebunden und mit Trx-IL-11 bzw. den Mutanten L44D, F64D, D134L und R47E inkubiert. Der



Trx-IL-11-Anteil der copräzipitierten Zytokine wurde immundetektiert. Trx-IL-11 ist wie die *site 2* (L44D und D134L) und *site 3* (F64D) zugeordneten Punktmutanten in der Lage, den  $\alpha$ -Rezeptor zu binden. Der Austausch der Aminosäure R47 an der *site 1* führt im Gegensatz dazu zum vollständigen Affinitätsverlust des Trx-IL-11 zu seinem spezifischen Rezeptor.

### 3.4.3. Induktion der Bildung des Ternärkomplexes der Trx-IL-11-Mutanten mit sIL-11R $\alpha$ -Flag und sgp130

Die Mutanten R135E (*site 2*), I171D (*site 3*) und R190E (*site 1*) wurden ausgewählt, um ihre Fähigkeit zur Bildung des Ternärkomplexes mit IL-11R $\alpha$  und gp130 zu überprüfen. Lösliches gp130, exprimiert als IgG-Fusionsprotein (sgp130-IgG) in transient transfizierten COS-7-Zellen, wurde aus den Zellüberständen mit Protein A-Sepharose präzipitiert. Gleiche Mengen der mit sgp130-IgG beladenen Sepharose inkubierte man mit gleichen Mengen des sIL-11R $\alpha$ -Flag und Trx-IL-11 bzw. den mutierten Proteinen (Abb. 3.8.).



**Abb. 3.8. Induktion der Ternärkomplexbildung durch Trx-IL-11 und mutierte Proteine**

Lösliches gp130 wurde als IgG-Fusionsprotein in transient transfizierten COS-7-Zellen exprimiert und mit Protein A-Sepharose – wie im Schema und in der Abbildung dargestellt – in Gegenwart von sIL-11R $\alpha$ -Flag und Trx-IL-11 bzw. den mutierten Proteinen präzipitiert. Copräzipitierter sIL-11R $\alpha$ -Flag wurde im Western-Blot mit einem Flag-Antikörper detektiert. Als Kontrolle diente aufs Gel aufgetragener sIL-11R $\alpha$ -Flag.

Die gebildeten Ternärkomplexe ließen sich durch Copräzipitation des sIL-11R $\alpha$ -Flag nachweisen. Die Bande bei 50 kDa konnte in allen Präzipitationsexperimenten beobachtet werden und entspricht vermutlich einem aus dem fetalen Kälberserum präzipitierten Antikörper. Da in Anwesenheit von Trx keine Copräzipitation des sIL-11R $\alpha$ -Flag durch sgp130 beobachtet werden konnte (Spur 5), stellt seine Copräzipitation in Anwesenheit des Trx-IL-11 den Nachweis der Ternärkomplexbildung dar (Spur 1). Die hyperaktive *site 2*-Mutante R135E copräzipitiert größere Mengen des sIL-11R $\alpha$ -Flag als Trx-IL-11 (vergleiche Spuren 1 und 2). Dies spricht für

die Bildung eines Ternärkomplexes erhöhter Affinität. Die Mutanten schwacher Bioaktivität I171D und R190E sind nicht in der Lage, Ternärkomplexe zu bilden. In Anwesenheit von I171D (Spur 3) bzw. R190E (Spur 4) konnte mit sgp130 kein sIL-11R $\alpha$ -Flag copräzipitiert werden. Wie in Kapitel 3.4.2. gezeigt, ist I171D im Gegensatz zur *site 1*-Mutante R190E in der Lage, den sIL-11R $\alpha$  zu binden. Deshalb kann geschlußfolgert werden, daß der I171D- $\alpha$ -Rezeptorkomplex sgp130 nicht mehr bindet und die Aminosäure I171 tatsächlich einer gp130 Bindungs*site* (*site 3*) zugeordnet werden kann.

#### **3.4.4. Bestimmung der *site 2* des IL-11 durch Kartieren der antagonistischen Antikörper**

In den Kapiteln 3.2 und 3.3.1 konnten die Bindungsepitope des IL-11 zum  $\alpha$ -Rezeptor (*site 1*) und zu einem gp130 (*site 3*) eindeutig definiert werden.

Die Bestimmung der zweiten gp130 Bindungsdomäne (*site 2*) erwies sich als schwieriger, da keine der sechs Punktmutationen (L44D und L45D in der A-Helix; D134L, R135E, R139E und L142D in der C-Helix) die Bildung eines signaltransduzierenden Ternärkomplexes verhinderte. Auch die Mutante D134L, die mit einer im Vergleich zum Wildtyp 19-fach erhöhten EC<sub>50</sub> die deutlichste Abnahme der Bioaktivität zeigte, erreichte bei hohen Dosen Proliferationsantworten auf Ba/F3-gp130-IL-11R $\alpha$ -Zellen, die der des Wildtyps entsprechen. Dieser bereits beim IL-6 bekannte Befund ist jedoch kein Beweis, daß die *site 2* nicht wie vermutet aus den Seitenketten der A- und der C-Helices gebildet wird. Vielmehr könnten Mehrfachmutationen zum Bioaktivitätsverlust nötig sein. In dieser Arbeit wurde nun ein anderer Ansatz zur Bestimmung der *site 2* gewählt. Wie beispielsweise beim gp130 bekannt, binden monoklonale Antikörper mit antagonistischer Wirkung spezifisch an die Domänen, welche die Komplexbildung gewährleisten. C. Blanc konnte zeigen, daß die monoklonalen Antikörper H2, H56 und E33 die biologische Aktivität von humanem IL-11 unterdrücken. Auch binden sie das Fusionsprotein IL-11R/FP [102], bestehend aus den Domänen 2 und 3 des IL-11R $\alpha$  und humanem IL-11. Da IL-11R/FP als Dimer vorliegt und deshalb die *site 1* des IL-11-Anteils einer weiteren Bindung nicht mehr zugänglich ist, binden die monoklonalen IL-11-Antikörper voraussichtlich an Epitope, die von der *site 1* des IL-11 verschieden sind.

Mittels Plasmonresonanz wurden die Affinitäten dieser Antikörper und des von R&D bezogenen monoklonalen Antikörpers mAb618 zu den punktmultierten Trx-hIL-11 Fusionsproteinen gemessen. In einem ersten Schritt immobilisierte man die Antikörper auf dem im BIAcore eingelegten CM5 Sensorchip. Die Differenz, die sich aus den Resonanzsignalen der *baselines* des modifizierten gegenüber dem unmodifizierten Sensorchip ergibt, ist ein Maß für die Immobilisierung. Für die meisten Liganden empfiehlt sich ein Immobilisierungsgrad von etwa 5kRU (5

ng/mm<sup>2</sup>). Werte von 10804 RU (sIL-11R $\alpha$ -IL-2), 5702 RU (mAb 618), 7989 RU (E33), 7267 RU (H2) und 4800 RU (H56) zeigten, daß sämtliche Liganden in ausreichender Menge gekoppelt wurden und die Chips bei Bindungsstudien verwendet werden konnten. Die Assoziation Trx-IL-11-Wildtyp und Punktmutanten (1-10 $\mu$ g/ml) an die gekoppelten IL-11-Antikörper wurde bei einer Flußrate von 10  $\mu$ l/min für 5 min aufgenommen. Der Chip wurde weitere 15 min gespült (Dissoziation). Das gemessene Resonanzsignal des Kontrollkanals subtrahierte man vom gemessenen Resonanzsignal des Probenkanals. Die resultierenden Assoziations- und Dissoziationskurven wurden mit Hilfe des *BIAEvaluation Software Pakets* (BIAcore) ausgewertet.

		mAb 618	E33	H2	H56
	Trx-IL-11	ka = 3,85*10 <sup>5</sup> kd = 3,06*10 <sup>-4</sup> KD = 8,0*10 <sup>-10</sup>	ka = 3,27*10 <sup>5</sup> kd = 1,13*10 <sup>-3</sup> KD = 3,45*10 <sup>-9</sup>	ka = 8,27*10 <sup>5</sup> kd = 4,26*10 <sup>-4</sup> KD = 5,2*10 <sup>-10</sup>	ka = 7,65*10 <sup>5</sup> kd = 4,18*10 <sup>-4</sup> KD = 5,5*10 <sup>-10</sup>
<i>site 1</i>	A84D	ka = 3,17*10 <sup>5</sup> kd = 1,85*10 <sup>-3</sup> KD = 5,84*10 <sup>-9</sup>	ka = 1,85*10 <sup>5</sup> kd = 2,2*10 <sup>-3</sup> KD = 1,19*10 <sup>-8</sup>	ka = 2,28*10 <sup>5</sup> kd = 3,59*10 <sup>-4</sup> KD = 1,58*10 <sup>-9</sup>	ka = 2,94*10 <sup>5</sup> kd = 3,4*10 <sup>-4</sup> KD = 1,16*10 <sup>-9</sup>
	L85D	ka = 9,02*10 <sup>5</sup> kd = 1,51*10 <sup>-3</sup> KD = 1,67*10 <sup>-9</sup>	ka = 1,56*10 <sup>5</sup> kd = 1,99*10 <sup>-3</sup> KD = 1,28*10 <sup>-8</sup>	ka = 1,15*10 <sup>5</sup> kd = 3,48*10 <sup>-4</sup> KD = 3,02*10 <sup>-9</sup>	ka = 1,23*10 <sup>5</sup> kd = 3,11*10 <sup>-4</sup> KD = 2,52*10 <sup>-9</sup>
	H182L	ka = 3,68*10 <sup>5</sup> kd = 5,06*10 <sup>-4</sup> KD = 1,37*10 <sup>-9</sup>	ka = 2,06*10 <sup>5</sup> kd = 1,15*10 <sup>-3</sup> KD = 5,58*10 <sup>-9</sup>	ka = 4,82*10 <sup>5</sup> kd = 4,53*10 <sup>-4</sup> KD = 9,4*10 <sup>-10</sup>	ka = 4,21*10 <sup>5</sup> kd = 4,7*10 <sup>-4</sup> KD = 1,11*10 <sup>-9</sup>
	D186V	ka = 7,59*10 <sup>5</sup> kd = 4,5*10 <sup>-4</sup> KD = 5,9*10 <sup>-10</sup>	ka = 2,86*10 <sup>5</sup> kd = 9,05*10 <sup>-4</sup> KD = 3,17*10 <sup>-9</sup>	ka = 3,68*10 <sup>5</sup> kd = 5,06*10 <sup>-4</sup> KD = 3,7*10 <sup>-10</sup>	ka = 4,81*10 <sup>5</sup> kd = 2,38*10 <sup>-4</sup> KD = 5,0*10 <sup>-10</sup>
	R190E	ka = 3,23*10 <sup>5</sup> kd = 2,72*10 <sup>-3</sup> KD = 8,42*10 <sup>-9</sup>	ka = 2,64*10 <sup>5</sup> kd = 2,77*10 <sup>-3</sup> KD = 1,05*10 <sup>-8</sup>	ka = 1,78*10 <sup>5</sup> kd = 3,26*10 <sup>-4</sup> KD = 1,83*10 <sup>-9</sup>	ka = 2,38*10 <sup>5</sup> kd = 3,26*10 <sup>-4</sup> KD = 1,37*10 <sup>-9</sup>
	L194D	ka = 3,45*10 <sup>5</sup> kd = 2,31*10 <sup>-3</sup> KD = 6,7*10 <sup>-9</sup>	ka = 5,48*10 <sup>5</sup> kd = 2,99*10 <sup>-3</sup> KD = 7,28*10 <sup>-9</sup>	ka = 2,92*10 <sup>5</sup> kd = 4,61*10 <sup>-4</sup> KD = 1,58*10 <sup>-9</sup>	ka = 3,84*10 <sup>5</sup> kd = 4,64*10 <sup>-4</sup> KD = 1,21*10 <sup>-9</sup>

**Tab. 3.2.A. Bindung der monoklonalen IL-11-Antikörper an Trx-IL-11 und ausgewählte site 1-Mutanten**  
Mittels Plasmonresonanz bestimmte man die Gleichgewichtskonstanten  $K_D$ , die Dissoziationskonstanten  $k_d$  und die Assoziationskonstanten  $k_a$  der Wechselwirkungen zwischen den Punktmutanten und den an Sensorchips immobilisierten monoklonalen hIL-11 Antikörpern mAb 618, E33, H2 und H56. Alle vier Antikörper erkennen humanes IL-11 und die an site 1 mutierten Proteine in vergleichbarer Weise.

		mAb 618	E33	H2	H56
	Trx-IL-11	ka = $3,85 \cdot 10^5$ kd = $3,06 \cdot 10^{-4}$ KD = $8,0 \cdot 10^{-10}$	ka = $3,27 \cdot 10^5$ kd = $1,13 \cdot 10^{-3}$ KD = $3,45 \cdot 10^{-9}$	ka = $8,27 \cdot 10^5$ kd = $4,26 \cdot 10^{-4}$ KD = $5,2 \cdot 10^{-10}$	ka = $7,65 \cdot 10^5$ kd = $4,18 \cdot 10^{-4}$ KD = $5,5 \cdot 10^{-10}$
site 2	L44D	ka = $7,45 \cdot 10^5$ kd = $8,11 \cdot 10^{-4}$ KD = $1,09 \cdot 10^{-9}$	ka = $3,05 \cdot 10^5$ kd = $1,15 \cdot 10^{-3}$ KD = $3,79 \cdot 10^{-9}$	ka = $5,72 \cdot 10^5$ kd = $4,32 \cdot 10^{-4}$ KD = $7,6 \cdot 10^{-10}$	ka = $4,87 \cdot 10^5$ kd = $4,4 \cdot 10^{-4}$ KD = $9,0 \cdot 10^{-10}$
	L45D	ka = $2,96 \cdot 10^3$ kd = $5,42 \cdot 10^{-4}$ KD = $1,83 \cdot 10^{-9}$	ka = $2,08 \cdot 10^5$ kd = $1,03 \cdot 10^{-3}$ KD = $4,96 \cdot 10^{-9}$	ka = $4,47 \cdot 10^5$ kd = $3,26 \cdot 10^{-4}$ KD = $7,3 \cdot 10^{-10}$	ka = $3,36 \cdot 10^5$ kd = $4,04 \cdot 10^{-4}$ KD = $1,20 \cdot 10^{-9}$
	D134L	ka = $1,09 \cdot 10^6$ kd = $6,63 \cdot 10^{-4}$ KD = $6,1 \cdot 10^{-10}$	keine Assoziation meßbar	ka = $7,05 \cdot 10^5$ kd = $2,89 \cdot 10^{-4}$ KD = $4,1 \cdot 10^{-10}$	ka = $6,62 \cdot 10^5$ kd = $3,35 \cdot 10^{-4}$ KD = $5,1 \cdot 10^{-10}$
	R135E	keine Assoziation meßbar	keine Assoziation meßbar	keine Assoziation meßbar	keine Assoziation meßbar
	R139E	keine Assoziation meßbar	ka = $4,18 \cdot 10^5$ kd = $3,89 \cdot 10^{-2}$ KD = $9,3 \cdot 10^{-8}$	keine Assoziation meßbar	keine Assoziation meßbar
	L142D	ka = $1,47 \cdot 10^5$ kd = $1,99 \cdot 10^{-2}$ KD = $1,3 \cdot 10^{-7}$	ka = $2,02 \cdot 10^5$ kd = $2,79 \cdot 10^{-3}$ KD = $1,4 \cdot 10^{-8}$	ka = $1,69 \cdot 10^5$ kd = $1,1 \cdot 10^{-3}$ KD = $6,5 \cdot 10^{-9}$	ka = $1,53 \cdot 10^5$ kd = $1,03 \cdot 10^{-3}$ KD = $6,7 \cdot 10^{-9}$
site 3	I171D	ka = $5,71 \cdot 10^3$ kd = $2,51 \cdot 10^{-4}$ KD = $4,4 \cdot 10^{-8}$	ka = $1,64 \cdot 10^5$ kd = $5,51 \cdot 10^{-4}$ KD = $3,4 \cdot 10^{-9}$	ka = $1,85 \cdot 10^5$ kd = $4,71 \cdot 10^{-5}$ KD = $2,5 \cdot 10^{-10}$	ka = $2,37 \cdot 10^5$ kd = $4,49 \cdot 10^{-5}$ KD = $1,9 \cdot 10^{-10}$

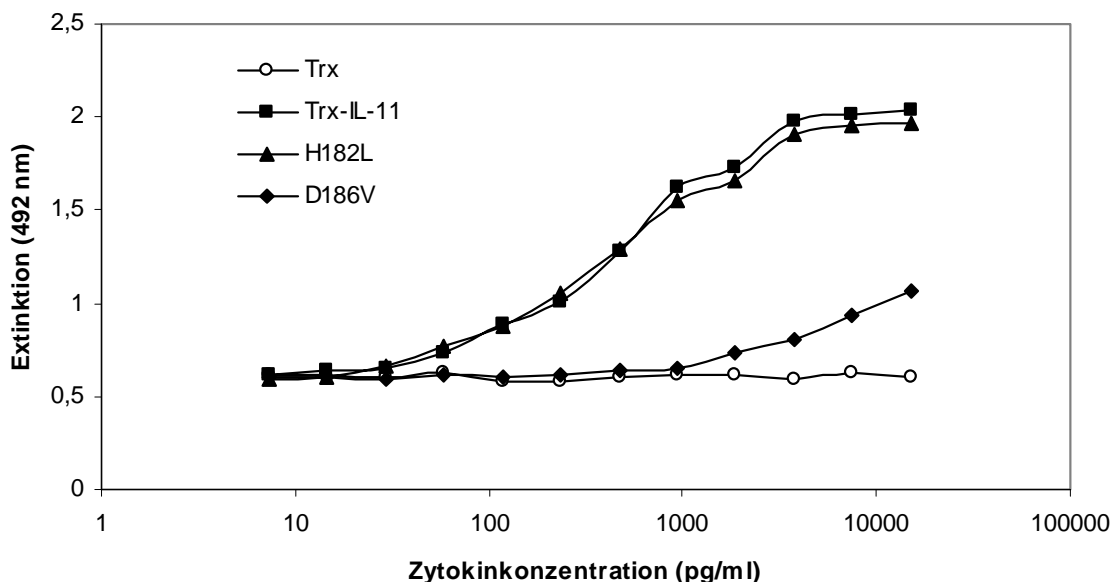
**Tab. 3.2.B. Bindung der monoklonalen IL-11-Antikörper an Trx-IL-11 und ausgewählte site 2 und 3-Mutanten**  
Mittels Plasmonresonanz bestimmte man die Gleichgewichtskonstanten  $K_D$ , die Dissoziationskonstanten  $k_d$  und die Assoziationskonstanten  $k_a$  der Wechselwirkungen zwischen den Punktmutanten und den an Sensorchips immobilisierten monoklonalen hIL-11 Antikörpern mAb 618, E33, H2 und H56. Während alle vier Antikörper humanes IL-11 und die an site 3 mutierten Proteine in vergleichbarer Weise erkennen, ist die Bindung der an site 2 mutierten Proteine gestört.

Die Tabellen 3.2.A. und B. zeigen die Gleichgewichtskonstanten  $K_D$ , die Dissoziationskonstanten  $k_d$  und die Assoziationskonstanten  $k_a$  der Punktmutanten. Alle vier Antikörper erkennen humanes IL-11 und die an site 1 bzw. site 3 mutierten Proteine in vergleichbarer Weise. Im Gegensatz dazu ist die Bindung einiger an site 2 mutierten Proteine gestört. Während alle vier

Antikörper noch in der Lage sind, die mutierten Zytokine L44D, L45D und L142D zu detektieren, erkennen die Antikörper mAb618, H2 und H56 bei diesen Plasmonresonanzstudien nicht die Trx-IL-11 Mutanten R135E und R139E. Der Antikörper E33 versagt bei den Proteinen D134L und R135E, erkennt aber die Mutante R139E. Diese Befunde zeigen, daß die Antikörper IL-11 durch Blockierung der Aminosäuren D134, R135 und R139 inaktivieren. Diese Seitenketten stellen also das zweite Bindungsepitop der signaltransduzierenden Untereinheit dar.

### 3.5. Verstärkung der *site 1* zur Entwicklung von Agonisten und Antagonisten

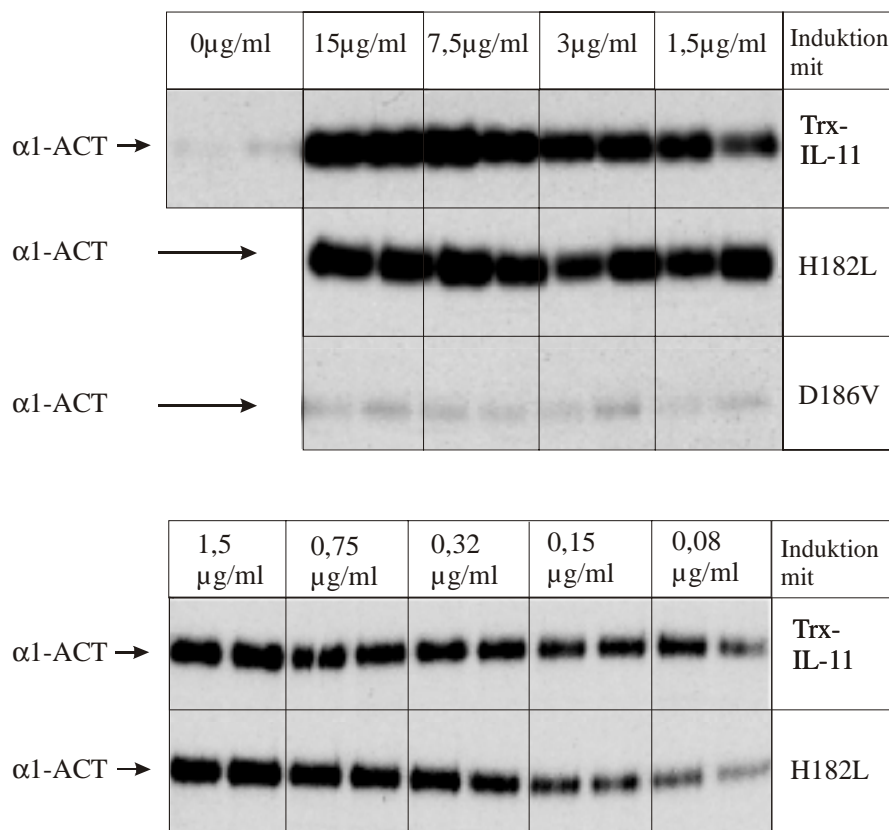
Nachdem nun die drei Bindungsepitope des IL-11 zu seinen Rezeptorketten definiert sind, ist die Generierung von Agonisten und Antagonisten nach rationalen Gesichtspunkten ermöglicht. Mit der Punktmutation R135E ist eine Verstärkung der Bindung des gp130 an der *site 2*, mit I171D eine Schwächung an *site 3* realisiert. Um noch potentere Proteine zu synthetisieren, steht nun die Stärkung der Bindung des  $\alpha$ -Rezeptors im Vordergrund. Anhand des IL-11-Strukturmodells erfolgte die Identifikation der geladenen Seitenketten H182 und D186. Ihr Ersatz durch ungeladene Aminosäuren sollte zur Verstärkung hydrophober Wechselwirkungen zwischen Zytokin und  $\alpha$ -Rezeptor beitragen. Die punktmultierten Proteine H182L und D186V wurden in *E. coli* als Thioredoxin-Fusionsproteine in vergleichbarer Menge zum Wildtyp exprimiert.



**Abb. 3.9. Proliferation der B9-Zellen nach Stimulation mit Trx-IL-11 und Mutanten**

B9-Zellen wurden in Gegenwart von IL-11Ra-Flag ( $1\mu\text{g/ml}$ ) mit steigenden Konzentrationen an Trx, Trx-IL-11 und Mutanten wie in der Abbildung angegeben stimuliert. Die Proliferation der Zellen wurde mit Hilfe des XTT-Tests gemessen.

In Gegenwart des löslichen  $\alpha$ -Rezeptors wurde ihre proliferative Wirkung auf B9-Zellen und die Induktion der Akutphase-Proteinsynthese am Beispiel des  $\alpha 1$ -Antichymotrypsin in HepG2-Zellen bestimmt. *Abb. 3.9.* zeigt die konzentrationsabhängige Proliferation der B9-Zellen nach Stimulation mit Trx, Trx-IL-11 und den zwei Punktmutanten. Der Ersatz von D186 durch Valin führte zu einem deutlichen Aktivitätsverlust des Zytokins. Austausch H182L hatte keinen Einfluß auf die proliferative Wirkung des IL-11. Die Induktion der  $\alpha 1$ -Antichymotrypsin-Synthese ist in *Abb. 3.10.* dargestellt. Auch hier zeigte D186V kaum Bioaktivität. Die Signalstärken entsprachen sowohl bei niedrigen als auch bei hohen Konzentrationen dem Basalwert. Die Bioaktivität der Punktmutante H182L entsprach der des Wildtyps. Die Induktion von  $\alpha 1$ -Antichymotrypsin durch H182L und Trx-IL-11 zeigte eine vergleichbare Konzentrationsabhängigkeit.

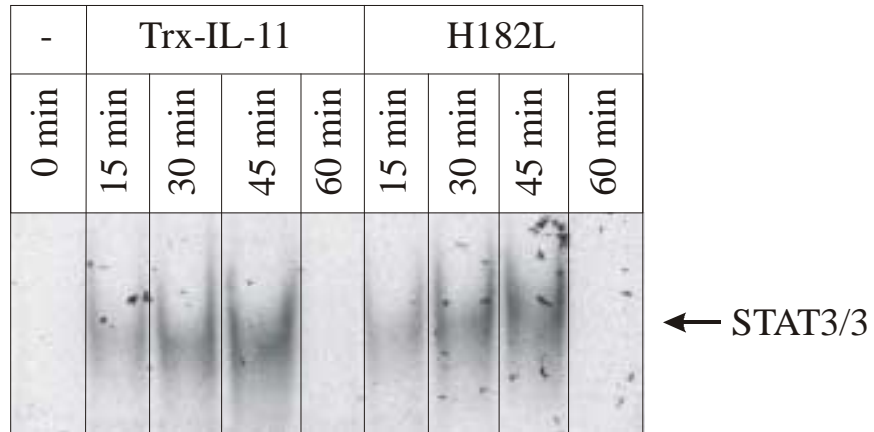


**Abb. 3.10. Induktion der  $\alpha 1$ -Antichymotrypsin-Synthese in HepG2-Zellen durch Trx-IL-11, H182L oder D186V in Gegenwart des *sIL-11R $\alpha$* -Flag**

HepG2-Zellen wurden, wie in der Abbildung angegeben, mit Trx-IL-11, H182L oder D186V in Gegenwart des *sIL-11R $\alpha$* -Flag (1µg/ml) stimuliert. Unstimulierte Zellen dienten als Kontrolle. Nach metabolischer Markierung der neu synthetisierten Proteine durch Zugabe von [<sup>35</sup>S]Methionin/Cystein wurde  $\alpha 1$ -Antichymotrypsin aus den Überständen präzipitiert, durch SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Autoradiographie detektiert.

Nachdem mit der Aminosäure D186 neben R190 eine wichtige Seitenkette der *site 1* Interaktion gefunden war und die Stimulation der Proliferation sowie die Akutphase-Proteininduktion keine signifikante Erhöhung durch die Mutation H182L erfuhren, stellte sich die Frage, ob die Signal-

transduktion nach Induktion mit Wildtyp und H182L einer unterschiedlichen Kinetik unterliegen. *Abb. 3.11.* zeigt die Aktivierung von STAT3 in unstimulierten HepG2-Zellen (Spur 1) und nach Inkubation mit Trx-IL-11 bzw. H182L für 15, 30, 45 sowie 60 Minuten.

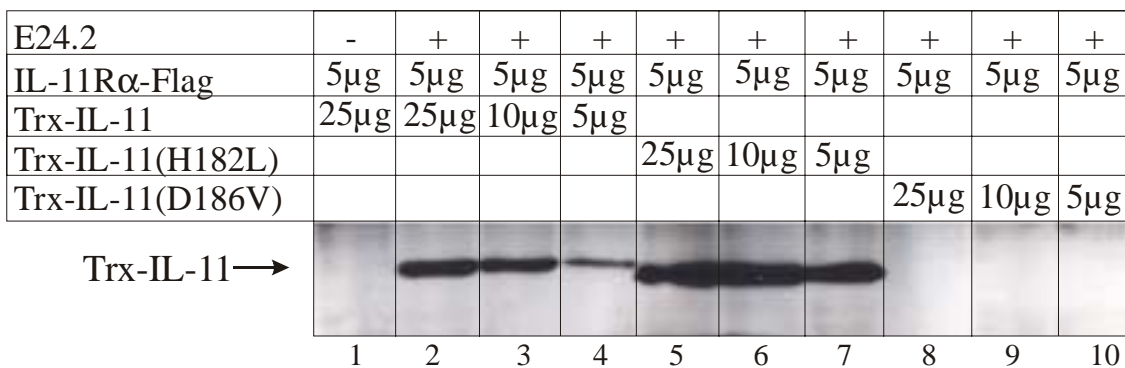


**Abb. 3.11. Nachweis der STAT3-DNA-Bindung nach Stimulation von HepG2-Zellen mit Trx-IL-11 oder H182L in Gegenwart des sIL-11R $\alpha$ -Flag**

HepG2- Zellen wurden, wie in der Abbildung angegeben, 15, 30, 45 oder 60 min mit Trx-IL-11 bzw. H182L in Gegenwart des sIL-11R $\alpha$ -Flag (1 $\mu$ g/ml) stimuliert. Unstimulierte Zellen dienten als Kontrolle. Die kernprotein-haltige Zellfraktion wurde isoliert und mit der radioaktiven m67SIE-DNA-Sonde inkubiert. Die Protein-DNA-Komplexe wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und mittels Autoradiographie detektiert.

Die Kinetiken der STAT3-Aktivierung nach Trx-IL-11 bzw. H182L-Gabe waren identisch. Die Signale nahmen jeweils bis zum Maximum bei 45 Minuten zu. Nach 60 Minuten war der Signalweg abgeschaltet. Die Signalintensitäten waren vergleichbar.

Nach Bestimmung ihrer Bioaktivitäten war zu vermuten, daß die Punktmutante H182L den IL-11R $\alpha$  wie der Wildtyp binden konnte, während die Bindung des IL-11 an den  $\alpha$ -Rezeptor durch die Punktmutation D186V empfindlich gestört wurde. Zur Überprüfung dieser These wurden je 5 $\mu$ g des  $\alpha$ -Rezeptors mit dem Antikörper E24.2 an Protein-A-Sepharose gebunden und mit je 5 $\mu$ g, 10 $\mu$ g bzw. 25 $\mu$ g Zytokin inkubiert.

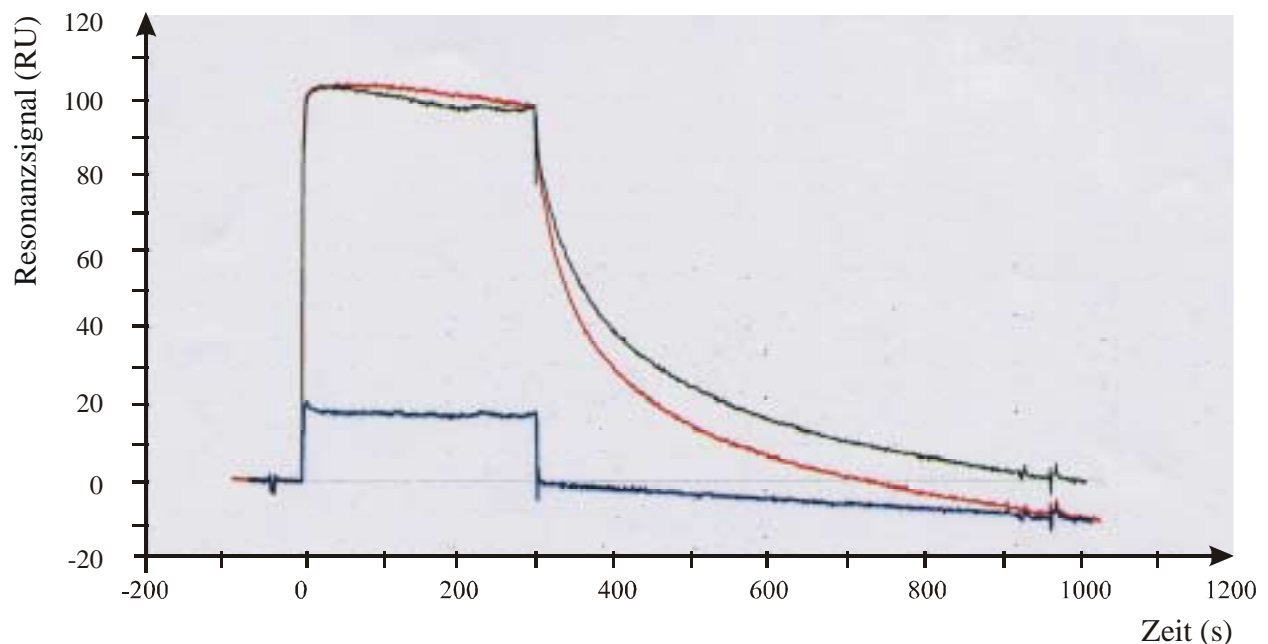


**Abb. 3.12. Bindung von Trx-IL-11, H182L und D186V an den sIL-11R $\alpha$ -Flag**

Der lösliche IL-11R $\alpha$ -Flag wurde mit E24.2 an Protein-A-Sepharose gebunden und, wie in der Abbildung angegeben, mit Trx-IL-11 bzw. den Mutanten inkubiert (Schema *Abb. 3.7.*). Nach der Präzipitation wurden die gebundenen Proteine durch Inkubation der Sepharose in Gelladepuffer abgelöst, mittels SDS-PAGE aufgetrennt und durch Western-Blot-Analyse mit dem Trx-Antikörper detektiert.

Nach der Präzipitation wurde der Thioredoxin-Anteil der gebundenen Zytokine immundetektiert (Abb. 3.12.). Wie erwartet ließ sich das Protein D186V nicht mit dem IL-11R $\alpha$ -Flag kopräzipitieren (Spuren 8-10). Das Bindungsepitop des  $\alpha$ -Rezeptors, die *site 1*, war wirkungsvoll gestört. Gegenüber dem Wildtyp (Spuren 2-4) zeigte die Punktmutation H182L (Spuren 5-7) überraschenderweise - trotz vergleichbarer Bioaktivität beider Proteine - eine deutlich verstärkte Bindung des  $\alpha$ -Rezeptors.

Zur genauen Analyse der H182L- $\alpha$ -Rezeptorbindung dienten Plasmonresonanz-Messungen. In einem ersten Schritt wurde der monoklonale Antikörper E24.2 auf einem Sensorchip immobilisiert. Sodann erfolgte die Beschickung des Chips zunächst mit 10 $\mu$ g/ml IL-11R $\alpha$ -Flag in HBS-Puffer und nachfolgend mit Trx-IL-11 (10 $\mu$ g/ml) oder den punktmultierten Proteinen H182L bzw. D186V.



**Abb. 3.13. Plasmonresonanz-Messung der Bindung von Trx-IL-11, H182L und D186V an den sIL-11R $\alpha$ -Flag**  
Der monoklonale Antikörper E24.2 wurde auf einem Sensorchip immobilisiert. Sodann erfolgte die Beschickung des Chips zunächst mit 10 $\mu$ g/ml IL-11R $\alpha$ -Flag in HBS-Puffer bei einer Flußrate von 10  $\mu$ l/min für 5 min und nachfolgend zur Zeit  $t=0$ s bis 300s mit 10 $\mu$ g/ml Trx-IL-11 (rot) oder den punktmultierten Proteinen H182L (grün) bzw. D186V (blau) gleicher Konzentration (Assoziation). Der Chip wurde weitere 15 min mit HBS-Puffer beschickt (Dissoziation; Zeit  $t=300$ s bis 1000s). Nach jedem Lauf regenerierte man den Chip 30 sec mit 5mM HCl.

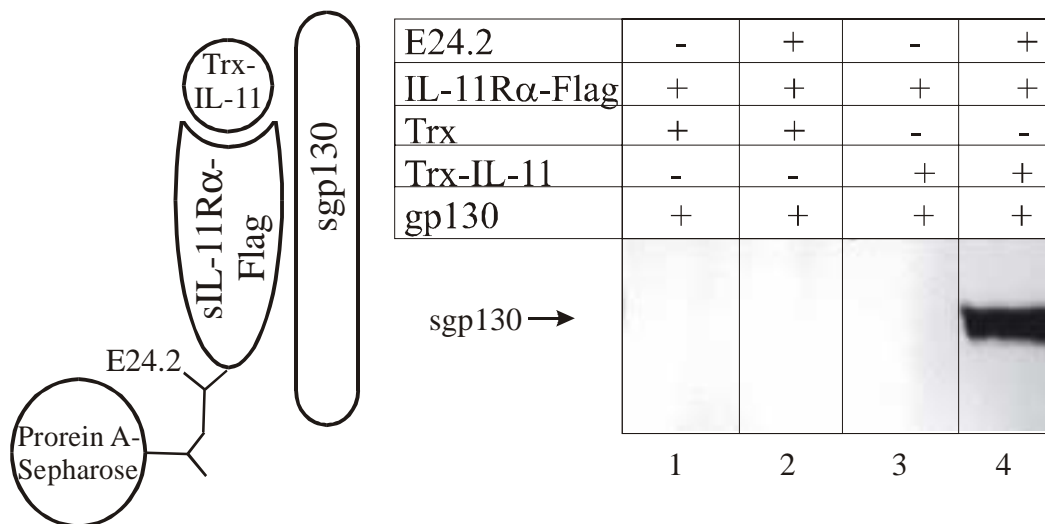
Abb. 3.13. zeigt, daß D186V kaum in der Lage war, den IL-11R $\alpha$ -Flag zu binden. Die Assoziation ( $t=0$ -300s) von H182L an den  $\alpha$ -Rezeptor entsprach der des Wildtyps. Die Dissoziation ( $t=300$ -1000s) des punktmultierten Proteins war jedoch deutlich verlangsamt. Dies zeigt, daß die in der Immunpräzipitation nachgewiesene verstärkte  $\alpha$ -Rezeptorbindung des H182L aus einer unveränderten Assoziation und einer verminderten Dissoziation resultierte.



### 3.6. Interaktion der dritten Domäne des IL-11R $\alpha$ mit gp130

#### 3.6.1. Der IL-11R $\alpha$ bindet gp130 nur durch Präassoziation von IL-11

Es ist bereits bekannt, daß der Aktivierung des IL-11-Rezeptorkomplexes die Präformation des IL-11/IL-11R $\alpha$ -Komplexes vorangeht, der daraufhin zwei signaltransduzierende Untereinheiten gp130 bindet. Mittels Immunpräzipitation kann gezeigt werden, daß der lösliche IL-11R $\alpha$  mit gp130 nicht alleine, sondern erst im Komplex mit IL-11 assoziiert. Löslicher IL-11R $\alpha$ -Flag, exprimiert in Insektenzellen, wurde über den spezifischen Antikörper E24.2 mit Protein A-Sepharose präzipitiert. Gleiche Mengen der mit sIL-11R $\alpha$  beladenen Sepharose wurden in Anwesenheit von Thioredoxin bzw. Trx-IL-11 mit gleichen Mengen sgp130, exprimiert in Insektenzellen, inkubiert und präzipitiert. Gebundenes gp130 wurde anschließend immun-detektiert. *Abb. 3.14.* zeigt, daß der sIL-11R $\alpha$ -Flag gp130 nur in Gegenwart von Trx-IL-11 bindet (Spur 4).



**Abb. 3.14. Nachweis des Ternärkomplexes aus Trx-IL-11, sIL-11R $\alpha$ -Flag und sgp130**

Der lösliche IL-11R $\alpha$ -Flag wurde mit E24.2 an Protein-A-Sepharose gebunden und mit Trx oder Trx-IL-11 in An- bzw. Abwesenheit des sgp130 inkubiert. Die gebundenen Proteine wurden durch Inkubation der Sepharose in Gelladepuffer abgelöst und mittels SDS-Page aufgetrennt. Copräzipitiertes sgp130 wurde im Western-Blot mit dem BP4-Antikörper detektiert.

### 3.6.2. Die dritte Domäne des IL-11R $\alpha$ bindet gp130 unabhängig von IL-11

In Kapitel 3.4.2. konnte gezeigt werden, daß die *site 1* des IL-11 das Bindungsepitop des  $\alpha$ -Rezeptors darstellt. Dieses Epitop bildet sich vorrangig aus Seitenketten der D-Helix, die laut Modell analog zum IL-6-Rezeptorkomplex mit Aminosäuren der dritten, membranproximalen Domäne des  $\alpha$ -Rezeptors (D3) interagieren. Die Bindung der Aminosäuren des AB-loops an die zweite Domäne des IL-11R $\alpha$  (D2) ist von geringerer Bedeutung. Schleinkofer et al. konnten mit dem Protein IL-11R-D3(C248A) zeigen, daß die dritte Domäne des  $\alpha$ -Rezeptors IL-11 binden kann [91]. Es stellt sich somit die Frage, ob die Bildung des IL-11/IL-11R-D3(C248A)-Komplexes hinreichend zur Bildung des Ternärkomplexes mit gp130 ist. Lösliche IL-11R-D3(C248A), exprimiert in *E. coli*, wurde über den spezifischen Antikörper E24.2 an Protein A-Sepharose gebunden. Gleiche Mengen der mit sIL-11R-D3(C248A) beladenen Sepharose wurden in Anwesenheit von Thioredoxin bzw. Trx-IL-11 mit gleichen Mengen sgp130, exprimiert in Insektenzellen, inkubiert. Gebundenes gp130 wurde präzipitiert und anschließend immundetektiert.

E24.2	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+
IL-11R-D3	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+
Trx	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
Trx-IL-11	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-
gp130	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+
sgp130 →										
Trx-IL-11 →										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10

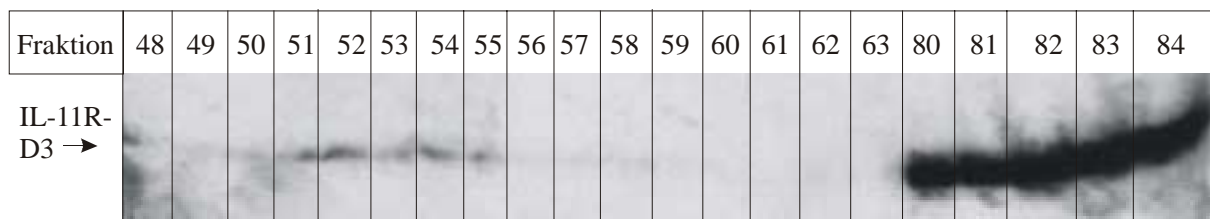
**Abb. 3.15. Induktion der Ternärkomplexbildung durch Trx-IL-11, die lösliche IL-11R-D3 und sgp130**

Die lösliche IL-11R-D3 wurde mit E24.2 an Protein-A-Sepharose gebunden und, wie in der Abbildung dargestellt, mit Trx oder Trx-IL-11 in An- bzw. Abwesenheit des sgp130 inkubiert (siehe Schema Abb. 3.14). Die gebundenen Proteine wurden präzipitiert, anschließend durch Inkubation der Sepharose in Gelladepuffer abgelöst und mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Copräzipitiertes sgp130 wurde im Western-Blot mit dem monoklonalen Antikörper BP4, Trx-IL-11 mit einem Trx-Antikörper detektiert.

Abb. 3.15. zeigt, daß die dritte Domäne des IL-11R $\alpha$  tatsächlich gp130 in Anwesenheit von Trx-IL-11 zu binden vermag (Spur 7). Gebundenes Trx-IL-11 wurde ebenfalls detektiert. Überraschenderweise konnte eine Bindung des gp130 an die D3 des IL-11R $\alpha$  bereits in Abwesenheit des Zytokins nachgewiesen werden (Spuren 3 und 10).

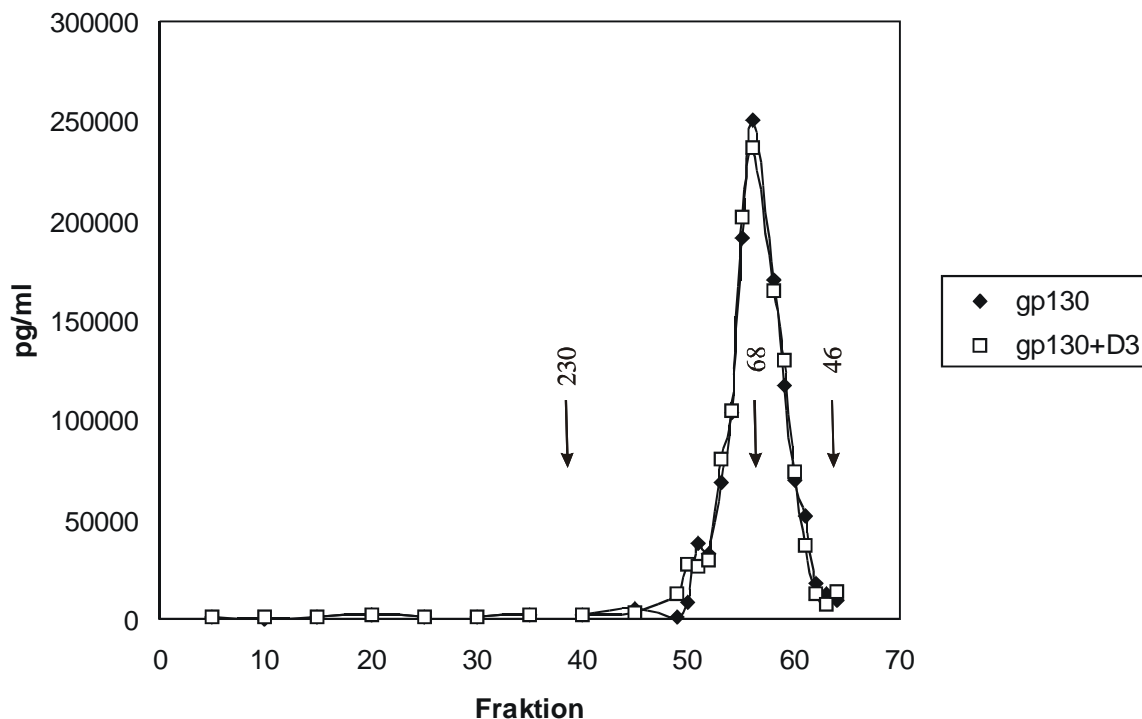
### 3.6.3. Die dritte Domäne des IL-11R $\alpha$ bindet ein gp130-Monomer

Mittels Immunpräzipitation konnte in Kapitel 3.6.2. überraschenderweise gezeigt werden, daß die dritte Domäne des IL-11R $\alpha$  bereits alleine, in Abwesenheit des Zytokins, gp130 bindet. Dieser Befund läßt keine Aussage zu, ob nur ein Molekül gebunden oder gp130 dimerisiert wird. Eine Gelfiltration sollte diese Frage klären. sgp130 wurde alleine oder nach Vorinkubation mit IL-11R-D3(C248A) auf eine Sephadex-Säule gegeben. Die einzelnen Fraktionen der Gelfiltration in Gegenwart des IL-11R-D3 wurden mittels Western-Blot-Analyse auf die Anwesenheit der IL-11R-D3(C248A) untersucht (Abb. 3.16.A.).



**Abb. 3.16.A. Gelfiltration des sgp130 in Anwesenheit der IL-11R-D3(C248A)**

Die Proteine der Fraktionen wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt. IL-11R-D3(C248A) wurde im Western-Blot mit dem E24.2-Antikörper detektiert und befindet sich vorrangig im Durchflußvolumen der Säule (Fraktionen 80-84). Die Detektion der IL-11R-D3 in den Fraktionen 51-55 deutet die Bindung der dritten Domäne des IL-11R an sgp130 an.



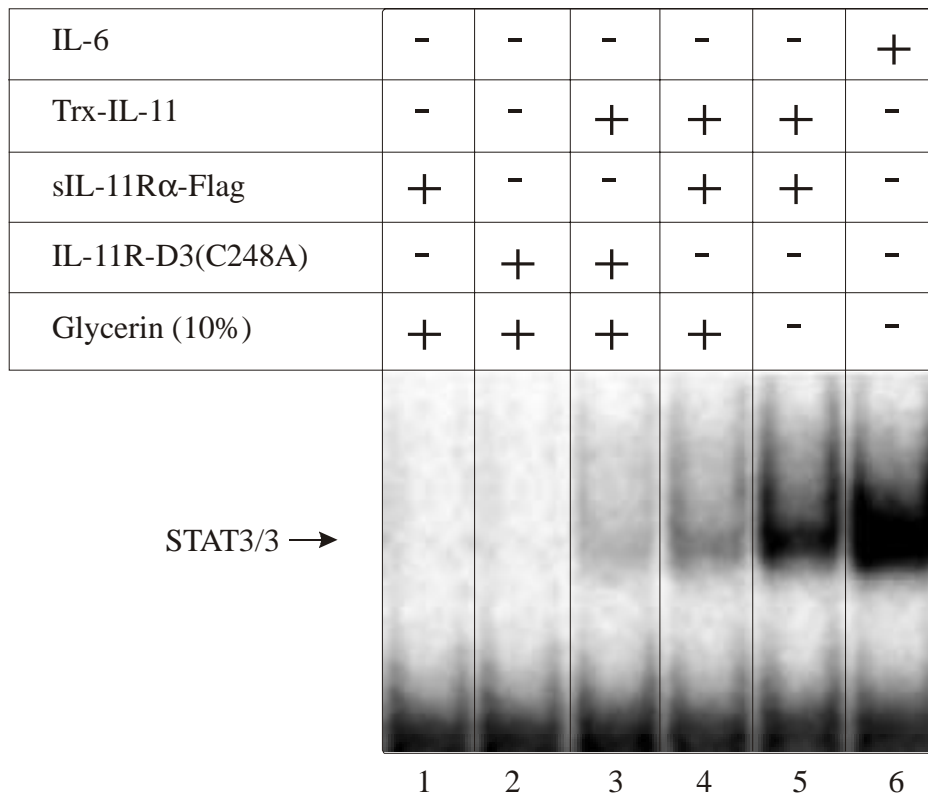
**Abb. 3.16.B. Gelfiltration des sgp130 in An- und Abwesenheit des IL-11R-D3(C248A)**

Die Konzentrationen an sgp130 der einzelnen Fraktionen bestimmte man mit einem ELISA. Es ist kein signifikanter Unterschied im Elutionsverhalten des sgp130 in An- und Abwesenheit von IL-11R-D3(C248A) zu erkennen.

Die *Abb. 3.16.A.* zeigt, daß sich das 14 kD-große Protein seinem geringen Molgewichtes entsprechend in den hinteren Fraktionen 80-84 befand. Die Detektion der IL-11R-D3(C248A) in den Fraktionen 51-55 deutet die Bindung der dritten Domäne des IL-11R $\alpha$  an sgp130 an. Die Konzentrationen an sgp130 der einzelnen Fraktionen bestimmte man mit einem ELISA (*Abb. 3.16.B.*). Es war kein signifikanter Unterschied im Elutionsverhalten des sgp130 in An- und Abwesenheit von IL-11R-D3 zu erkennen. Da kein Komplex doppelter Molmasse detektiert wurde, war gp130 in Gegenwart von der dritten  $\alpha$ -Rezeptordomäne nicht dimerisiert, sondern lag als Monomer vor.

#### **3.6.4. Die dritte Domäne des IL-11R $\alpha$ ist biologisch aktiv**

In den Kapiteln 3.4.2. und 3.4.3. konnte gezeigt werden, daß die dritte Domäne des IL-11R $\alpha$  mit IL-11 und gp130 einen Ternärkomplex bildet und zusätzlich in Abwesenheit des Zytokins eine gp130-Rezeptorkette assoziiert. Es stellt sich die Frage, ob diese Bindungen signaltransduktionskompetente Komplexe darstellen. Die Bestimmung der Bioaktivität der IL-11R-D3 wurde durch die thermische Instabilität des Proteins erschwert. Bereits ab 20°C geht ein Teil des Proteins in den denaturierten Zustand über [91]. Somit ist die Durchführung von langwierigen Proliferations- oder Akutphase-Proteinsynthese-Tests nicht möglich. Durch Zugabe von 10% Glycerin ins Medium kann die Temperaturstabilität der IL-11R-D3 um 13°C erhöht werden [91]. Als Nachweis einer möglichen Aktivität wurde die STAT-Aktivierung in HepG2-Zellen nach 15 minütiger Induktion bei 30°C gewählt (*Abb. 3.17.*). Die Inkubation der Zellen mit 2  $\mu$ g/ml sIL-11R $\alpha$ -Flag und 10% Glycerin im Medium diente als Negativkontrolle (Spur 1), die Stimulationen mit 10 ng/ml IL-6 (Spur 6) bzw. 20 $\mu$ g/ml Trx-IL-11 und 2  $\mu$ g/ml sIL-11R $\alpha$ -Flag in An- (Spur 4) und Abwesenheit von 10% Glycerin im Medium (Spur 5) als Positivkontrollen. Ein Vergleich der Spuren 4 und 5 zeigt, daß die STAT-Aktivierung durch Glycerin vermindert wird. Spur 3 zeigt, daß die dritte Domäne des IL-11R $\alpha$  (10  $\mu$ g/ml) tatsächlich in der Lage ist, mit Trx-IL-11 (20  $\mu$ g/ml) einen signaltransduzierenden Rezeptorkomplex zu bilden. Für IL-11R-D3(C248A) alleine (10  $\mu$ g/ml), ohne Zytokin, konnte keine Bioaktivität auf HepG2-Zellen nachgewiesen werden (Spur 2).



**Abb. 3.17. STAT-Aktivierung in HepG2-Zellen**

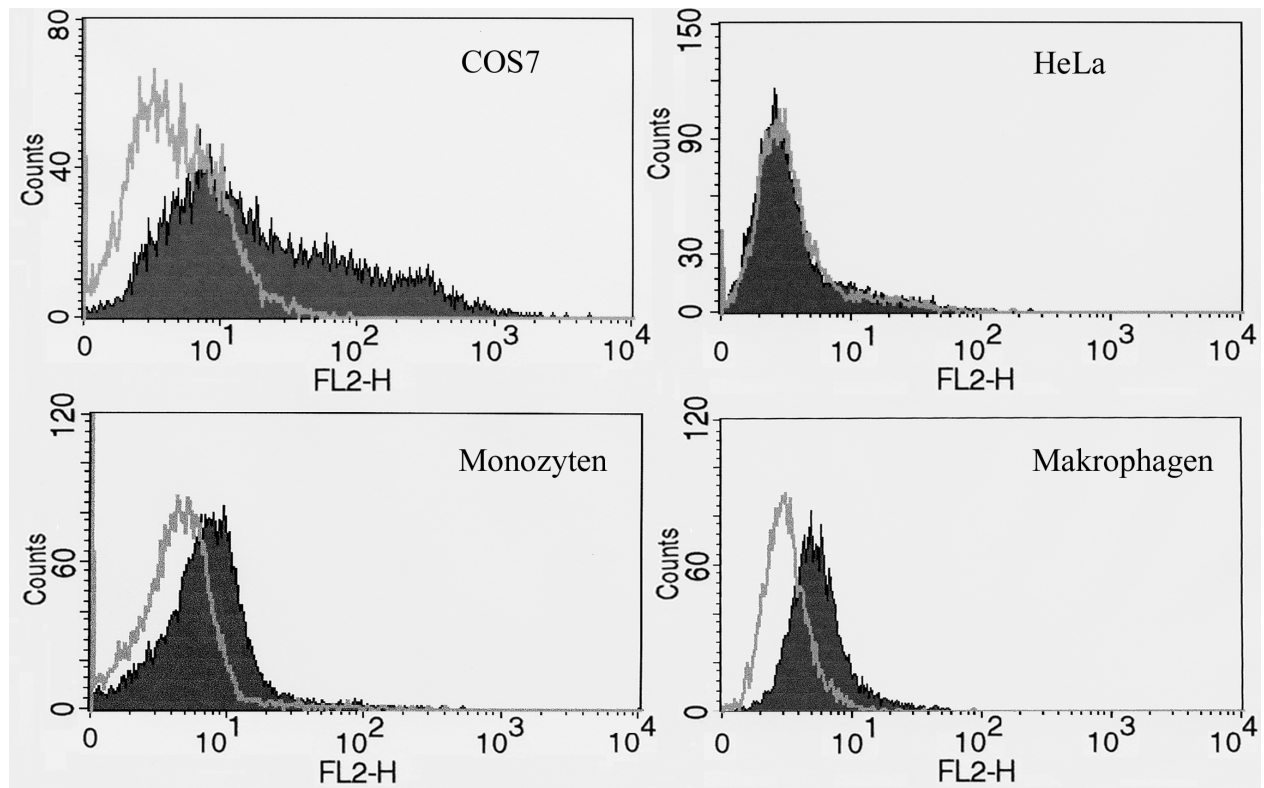
HepG2- Zellen wurden bei 30°C wie in der Abbildung angegeben 15 min stimuliert. Mit IL-6 stimulierte Zellen dienten als Kontrolle. Die kernproteinhaltige Zellfraktion wurde isoliert und mit der radioaktiven m<sup>67</sup>SIE-DNA-Sonde inkubiert. Die Protein-DNA-Komplexe wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und mittels Autoradiographie detektiert.

### 3.7. Shedding des IL-11R $\alpha$

#### 3.7.1. Auswahl der Zelltypen

Es existieren zwei membranständige Formen der spezifischen Rezeptorkette des IL-11, die durch alternatives Spleißen entstehen. Eine lösliche Form konnte *in vivo* bis heute nicht nachgewiesen werden. Eine Quantifizierung der IL-11R $\alpha$ -Expression war zunächst nur mit Hilfe von Northern Blots oder durch Bioaktivitätstests möglich. Mit Hilfe der monoklonalen Antikörper des IL-11R $\alpha$  (Immunotech, Marseille [52]) wurde es möglich, dessen Oberflächenexpression und - falls vorhanden - dessen *shedding* auf Zelloberflächen zu untersuchen. *Shedding* bezeichnet den Vorgang der limitierten Proteolyse, der zur Freisetzung des löslichen Rezeptors führt. Da der IL-11R $\alpha$  nicht ubiquitär exprimiert wird, sollten zuerst Zelltypen gefunden werden, die diese Rezeptorkette tragen. Zum einen wurden HeLa-Zellen, Monozyten und Makrophagen mittels Durchflußzytometrie auf die Anwesenheit des membranständigen IL-11R $\alpha$  hin untersucht. Zum zweiten wurden COS7-Zellen mit dem Expressionsvektor pKCSR(hIL-11R $\alpha$ ) transient transfiziert. Zur Detektion wurde der dem Epitop 2 zugeordnete Antikörper E24.2 verwendet.

Abb. 3.18. zeigt, daß die transfizierten COS7- Zellen ebenso wie primäre Monozyten und Makrophagen den IL-11R $\alpha$  exprimieren. Die in unserem Labor kultivierten HeLa-Zellen tragen jedoch keinen membranständigen IL-11R $\alpha$ .



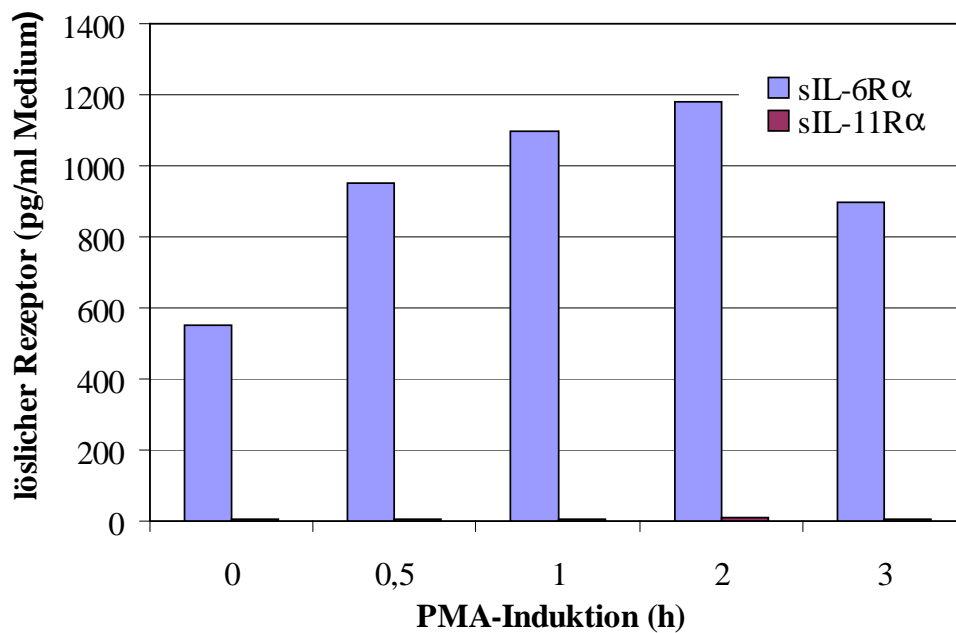
**Abb. 3.18. Detektion des membranständigen IL-11R $\alpha$  auf verschiedenen Zelltypen**

Die mit dem Expressionsvektor pKCSR(hIL-11R $\alpha$ ) transient transfizierten COS7-Zellen (oben links), HeLa-Zellen (oben rechts), Monozyten (unten links) und Makrophagen (unten rechts) wurden durchflußzytometrisch auf die Oberflächenexpression des membranständigen IL-11R $\alpha$  hin untersucht. Die Detektion erfolgte mit dem IL-11R $\alpha$ -Antikörper E24.2 (gefülltes Histogramm). Als Negativkontrolle diente ein IgG1-Antikörper (leeres Histogramm).

### 3.7.2. Shedding auf COS7-Zellen

COS7-Zellen, die mit dem Expressionsvektor pKCSR(hIL-11R $\alpha$ ) oder dem pSVL(IL-6R $\alpha$ ) transient transfiziert waren, inkubierte man 30 min, 1h, 2h und 3h mit PMA ( $10^{-7}$  M), da der Phorbolester durch Aktivierung von Proteinkinase C als *shedding*-Induktor wirken kann [53]. Unstimulierte Zellen dienten als Negativkontrolle. Die Zellüberstände wurden mittels IL-6R $\alpha$ - und IL-11R $\alpha$ -ELISA auf freigesetzte lösliche Rezeptoren hin untersucht. Abb. 3.19. zeigt, daß von der Zelloberfläche abgespaltener sIL-6R $\alpha$  stimulationsunabhängig und in verstärktem Maße nach PMA-Stimulation im Medium nachgewiesen werden konnte. In den Überständen der IL-11R $\alpha$ -exprimierenden COS7-Zellen ließ sich kein löslicher Rezeptor detektieren. Durch limitierte Proteolyse membranständiger Rezeptorketten sollte neben der Zunahme löslicher Proteine im Überstand eine Abnahme der Rezeptorenzahl auf der Zelloberfläche meßbar sein.

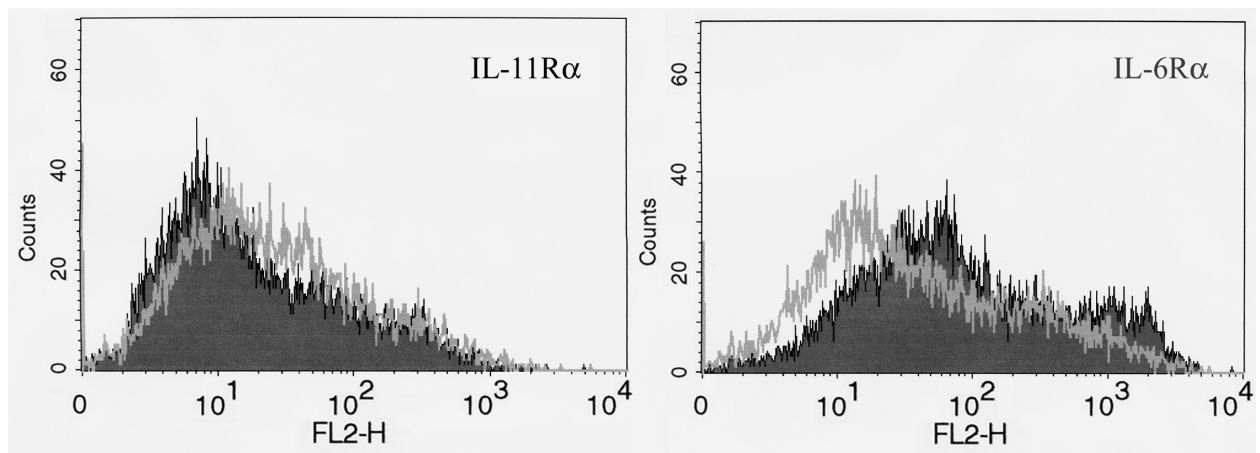
Die Zellen wurden deshalb mittels Durchflußzytometrie auf eine Veränderung der Oberflächenexposition der  $\alpha$ -Rezeptoren analysiert.



**Abb. 3.19. sIL-6R $\alpha$  und sIL-11R $\alpha$  nach PMA-Stimulation in COS7-Zellüberständen**

Konzentration der löslichen  $\alpha$ -Rezeptoren in Überständen transfizierter COS7-Zellen ohne und nach PMA-Stimulation ( $10^{-7}$  M). Die Detektionen erfolgten mit Hilfe etablierter ELISAs.

Während sich die Oberflächenexpression des IL-6R $\alpha$  nach einstündiger Induktion des *sheddings* durch PMA-Stimulation ( $10^{-7}$  M) deutlich verringerte, ist keine Abnahme der IL-11R $\alpha$ -Konzentration festzustellen (Abb. 3.20.). Diese Ergebnisse lassen vermuten, daß nach Stimulation der PKC in COS7-Zellen das *shedding* des IL-6R $\alpha$  induziert wird, während keinerlei Proteolyse des IL-11R $\alpha$  stattfindet.

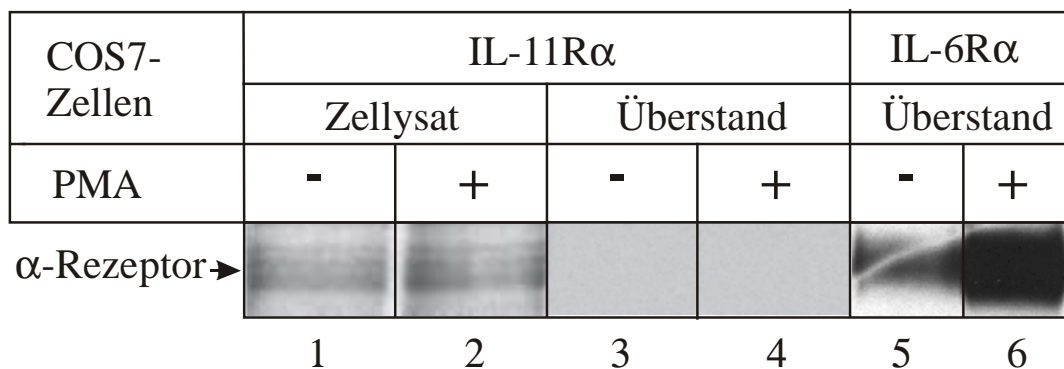


**Abb. 3.20. Membranständiger IL-6R $\alpha$  und IL-11R $\alpha$  nach PMA-Stimulation auf COS7-Zellen**

Die mit dem Expressionsvektor pKCSR(hIL-11R $\alpha$ ) (linkes Histogramm) oder dem pSVL(IL-6R $\alpha$ ) (rechtes Histogramm) transient transfizierten COS7-Zellen wurden unstimuliert (gefülltes Histogramm) bzw. nach einstündiger Inkubation mit PMA-haltigem Medium ( $10^{-7}$  M) bei 37°C (leeres Histogramm) durchflußzytometrisch auf die Oberflächenexposition der  $\alpha$ -Rezeptoren hin untersucht. Die Detektionen erfolgten mit dem IL-6R $\alpha$  Antikörper BR-6 oder dem IL-11R $\alpha$ -Antikörper E24.2.



Da sich das Bindungsepitop des E24.2 in der *stalk*-Region befindet, kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, daß sich eine mögliche Proteolyse des Proteins N-terminal zu diesem Epitop vollzieht und somit (a) der lösliche Rezeptor von dem C.4.2/E24.2-Sandwich-ELISA nicht erkannt wird und (b) der intakte  $\alpha$ -Rezeptor und der durch *shedding* entstehende, auf der Membran verbleibende Rezeptor-"Stumpf" in der Durchflußzytometrie detektiert werden. Um dieses mögliche Detektionsproblem der Antikörper auszuschließen, wurde der Effekt von PMA auf die mit dem Expressionsvektor pKCSR(hIL-11R $\alpha$ ) oder dem pSVL(IL-6R $\alpha$ ) transfizierten COS7-Zellen mittels Autoradiographie ausgewertet (Abb. 3.21.). Mit Tran(<sup>35</sup>S)label markierte Zellen wurden ohne oder mit PMA (10<sup>-7</sup> M) 1h stimuliert. Den IL-6R $\alpha$  präzipitierte man aus den Überständen mit an Protein A-Sepharose gebundenen BN-12-Antikörper, den IL-11R $\alpha$  aus den Überständen und Zellysaten mit kovalent an BrCN-Sepharose gekoppeltem Trx-IL-11. Der im Überstand detektierte IL-6R $\alpha$  diente als Positivkontrolle. Der lösliche Rezeptor konnte sowohl bei unstimulierten Zellen (Spur 5) als auch in erhöhter Konzentration nach PMA-Stimulation (Spur 6) nachgewiesen werden. Bei COS7(IL-11R $\alpha$ )-Zellen wurde weder im Überstand unstimulierter (Spur 3) noch PMA-stimulierter Zellen (Spur 4) löslicher IL-11R $\alpha$  detektiert. In den Zellysaten unstimulierter (Spur 1) und stimulierter (Spur 2) COS7(IL-11R $\alpha$ )-Zellen wurde IL-11R $\alpha$  vergleichbarer Konzentration in Form der drei typischen Banden unterschiedlich glycosylierter Rezeptorketten nachgewiesen.



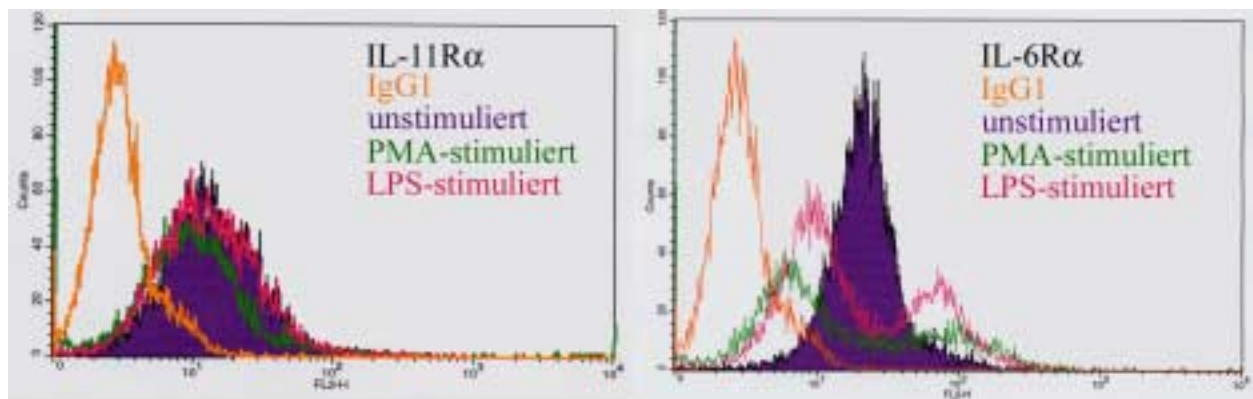
**Abb. 3.21. IL-6R $\alpha$  und IL-11R $\alpha$ -Detektion nach PMA-Stimulation von COS7-Zellen**

Die mit dem Expressionsvektor pKCSR(hIL-11R $\alpha$ ) oder dem pSVL(IL-6R $\alpha$ ) transient transfizierten, mit Tran(<sup>35</sup>S)label markierten COS7-Zellen wurden unstimuliert belassen oder mit PMA (10<sup>-7</sup> M) 1h stimuliert. Den IL-6R $\alpha$  präzipitierte man aus den Überständen mit an Protein A-Sepharose gebundenen BN-12-Antikörper, den IL-11R $\alpha$  aus den Überständen und Zellysaten mit kovalent an BrCN-Sepharose gekoppeltem Trx-IL-11. Die Immunkomplexe wurden mehrmals mit PBS-Tween gewaschen, in Laemmli-Puffer aufgenommen, durch SDS-PAGE aufgetrennt und mittels Autoradiographie detektiert.



### 3.7.3. Shedding auf Makrophagen

Auf humanen Makrophagen wurde bereits das *shedding* des IL-6R $\alpha$  nach Stimulation mit porenbildenden Toxinen beschrieben [61]. In Kapitel 3.7.1. wurde gezeigt, daß Makrophagen den IL-11R $\alpha$  exprimieren. PMA wurde auf anderen Zelltypen als Proteolyse-Stimulus beschrieben. Über seinen Einfluß oder den des LPS auf die Bildung der löslichen Rezeptoren sIL-6R $\alpha$  und sIL-11R $\alpha$  bei Makrophagen ist nichts bekannt. Makrophagen wurden unstimuliert bzw. nach einstündiger Inkubation mit PMA- oder LPS-haltigem Medium ( $10^{-7}$  M) durchflußzytometrisch auf die Oberflächenexpression der  $\alpha$ -Rezeptoren hin untersucht (Abb. 3.22.). Die Detektion erfolgte mit dem IL-11R $\alpha$ -Antikörper E24.2 oder dem IL-6R $\alpha$  Antikörper BR-6. Die Oberflächenexpression des IL-11R $\alpha$  (linke Abbildung) ist sowohl nach Stimulation mit PMA (grünes Histogramm) als auch nach Induktion mit LPS (rotes Histogramm) der Expression unstimulierter Makrophagen vergleichbar (gefülltes Histogramm). Dieser Befund läßt schließen, daß weder PMA noch LPS zur Proteolyse des IL-11R $\alpha$  auf Makrophagen führt. Im Vergleich antworten die Zellen auf beide Stimuli deutlich mit einer verminderten Oberflächenexpression des IL-6R $\alpha$ , die auf ein *shedding* hindeutet (rechte Abbildung; linke Population). Sowohl PMA als auch LPS stellen also *shedding*-Induktoren für Makrophagen dar. Nach der Induktionsdauer von einer Stunde reagiert ein Teil der Zellen bereits durch erhöhte IL-6R $\alpha$ -Expression (rechte Population).



**Abb. 3.22. Membranständiger IL-6R $\alpha$  und IL-11R $\alpha$  nach PMA- oder LPS-Stimulation auf Makrophagen**  
Makrophagen wurden - wie in der Abbildung angegeben - unstimuliert bzw. nach einstündiger Inkubation mit PMA- oder LPS-haltigem Medium ( $10^{-7}$  M) durchflußzytometrisch auf die Oberflächenexpression der  $\alpha$ -Rezeptoren hin untersucht. Die Detektion erfolgte mit dem IL-11R $\alpha$ -Antikörper E24.2 (linkes Histogramm) oder dem IL-6R $\alpha$  Antikörper BR-6 (rechtes Histogramm). Als Negativkontrolle diente ein IgG1-Antikörper (gelbes Histogramm).

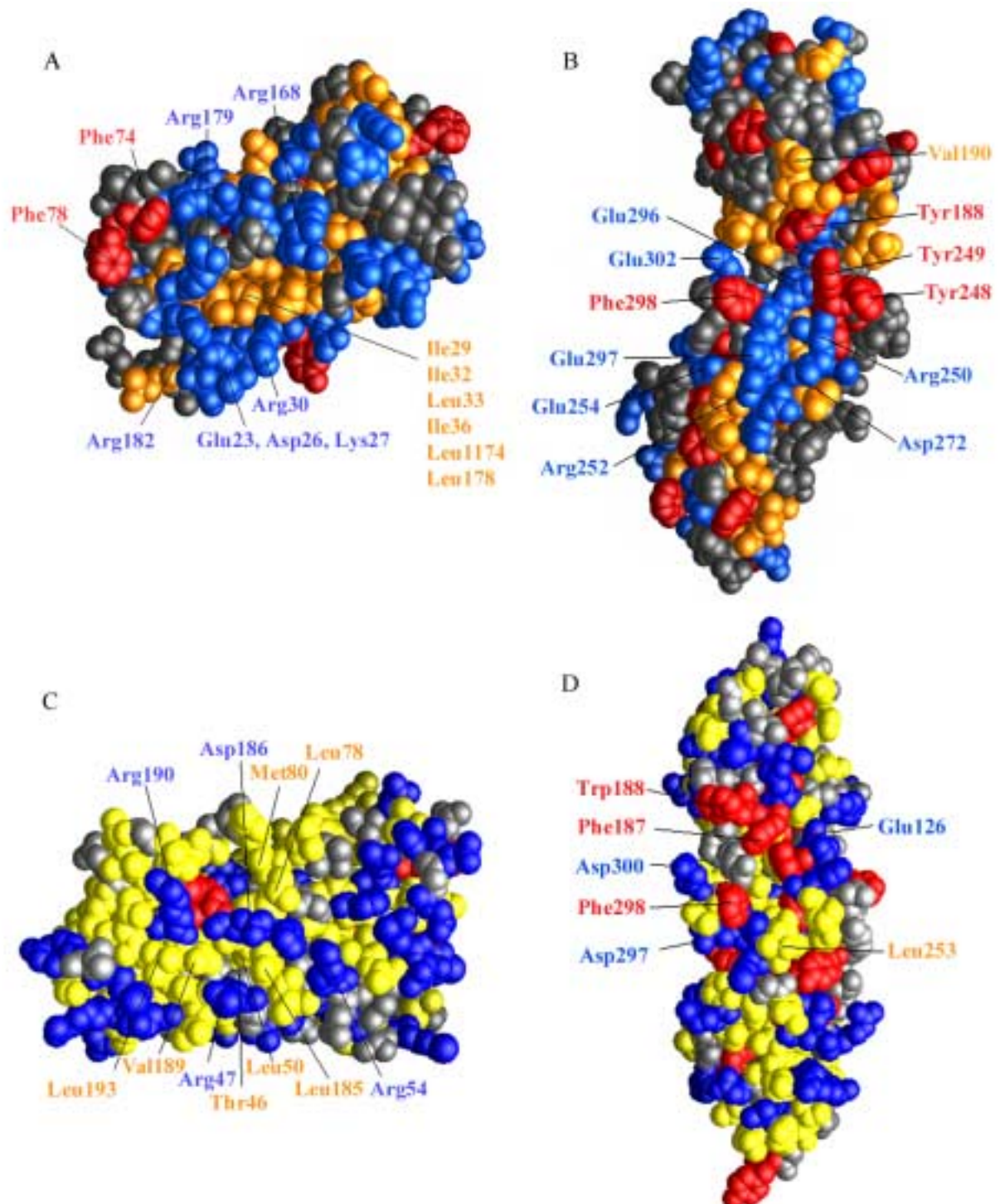
## 4. Diskussion

Eine der Aufgabenstellungen der vorliegenden Arbeit war die Identifizierung der Rezeptorbindungsepitope des humanen IL-11. Die Strategie kann wie folgt zusammengefaßt werden: (1) Basierend auf den bekannten Strukturen der verwandten Zytokine IL-6, CNTF und LIF entstand durch Homologiestudien ein Strukturmodell des humanen IL-11. Anhand dieses Modells und der bekannten Rezeptorbindungsepitope des IL-6 wurden Aminosäuren, die potentielle Kandidaten der Interaktion mit dem Rezeptor darstellen, zur Mutagenese ausgewählt. (2) Die punktmutierten Proteine wurden als Trx-Fusionsproteine in *E. coli* exprimiert (3) ihre Bioaktivitäten bestimmt und (4) Mutanten veränderter Bioaktivitäten für Rezeptorbindungsstudien selektiert. Bis heute dient die Struktur des humanen Wachstumshormons GH, gebunden an den löslichen Rezeptor GHR [89] als Paradigma für die Rezeptorrekrutierung der  $\alpha$ -helikalen Zytokine. Belegt durch Mutagenesestudien [103] ist gezeigt, daß die Energie der Zytokin-Rezeptorbindung hauptsächlich aus hydrophoben Wechselwirkungen einiger apolarer Seitenketten resultiert, die durch umgebende polare oder geladene Aminosäuren abgeschirmt werden. Polare und geladene Seitenketten garantieren die Spezifität der Interaktion durch Wasserstoffbrückenbildung und elektrostatische Wechselwirkungen. Um die Bindung des IL-11 an die Rezeptorketten wirkungsvoll zu stören, ersetzte man apolare Aminosäuren durch geladene und geladene durch entgegengesetzt geladene Reste. Die Auswirkung der Mutation auf die Faltung und Stabilität der Proteine ist gering, da nur Aminosäureseitenketten ausgewählt wurden, die sich laut Modell auf der Proteinoberfläche befinden. Tatsächlich konnten alle Proteine - mit einer Ausnahme (D69K) - als lösliche Proteine in vergleichbarer Menge zum Wildtyp exprimiert werden.

In der vorliegenden Arbeit konnte die *site 1* des IL-11 eindeutig als das IL-11R $\alpha$  Bindungsepitop identifiziert werden. Fünf von sechs *site 1*-Mutanten zeigten eine deutlich reduzierte Bioaktivität im Vergleich zum Wildtyp, einhergehend mit einer reduzierten Affinität zum IL-11R $\alpha$  (R47E, L85D, D186V, R190E und L194D). Die Aminosäure A84 scheint an dieser Interaktion nur nebensächlich beteiligt zu sein. Ihr Ersatz durch Asparaginsäure führt lediglich zu einer gering verminderten Aktivität des IL-11.

Frühere Studien zeigten, daß Reste des C-terminalen Bereiches der D-Helix Voraussetzung für Bioaktivität sind [84]. Weiterführend konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, daß der Grund der verminderten Aktivität der *site 1*-Mutanten der Verlust ihrer Fähigkeit ist, effizient IL-11R $\alpha$  zu binden. Als Konsequenz sind diese mutierten Proteine ebenfalls nicht in der Lage,

gp130 zu rekrutieren, da gp130 nur an den präformierten Komplex aus IL-11 und IL-11R $\alpha$  bindet.



**Abb. 4.1. Vergleich der  $\alpha$ -Rezeptorbindungsepitope im IL-6- und IL-11-Rezeptorkomplex**

Die dreidimensionalen Präsentationen zeigen die komplementären Bindungsepitope von Zytokin und  $\alpha$ -Rezeptor: (A) site 1 des hIL-6, (B) das vermutliche Bindungsepitop des hIL-6R $\alpha$  für hIL-6 [104], (C) site 1 des hIL-11, (D) das vermutliche Bindungsepitop des hIL-11R $\alpha$  für hIL-11. Die Seitenketten wurden nach ihren chemischen Eigenschaften unterschieden: aromatisch, rot; hydrophob, gelb; hydrophil, blau; polar-ungeladen, grau.

Die Bindungsstelle des IL-11 zu seinem  $\alpha$ -Rezeptor wird also hauptsächlich von exponierten Aminosäuren des C-terminalen Bereiches der D-Helix, von Arginin 47 der A-Helix und benachbarten Resten des AB-loops gebildet (Abb. 4.1.C.). Die Aminosäuren R47E, R190E und D186V umschließen eine schmale, tiefe, hydrophobe Tasche, die von den Seitenketten T46, L50, L185, V189 und L193 ausgekleidet wird, und vermitteln so die Spezifität der Rezeptorbindung. Die Betrachtung des Strukturmodells läßt vermuten, daß die stark exponierte Aminosäure F298 des Rezeptors in diese hydrophobe Tasche des Zytokins ragt und so die Interaktion ermöglicht (Abb. 4.1.D.). Dieser Phenylalaninrest ist ebenfalls im homologen IL-6-Rezeptorkomplex konserviert (Abb. 4.1.B.) und bewirkt dort den zentralen Kontakt mit einer hydrophoben Tasche im IL-6 (Abb. 4.1.A.), bestehend aus den Seitenketten I29, I32, L33 und I36 der A-Helix und L174 und L178 der D-Helix [104]. Unterstützt wird die  $\alpha$ -Rezeptorbindung des IL-6 durch einen hydrophoben Cluster, bestehend aus den Phenylalaninen 74 und 78 im AB-loop des Zytokins und den Aminosäuren F248, Y249 und Y188 des Rezeptors. Das deutlich exponierte Arginin 47 des IL-11 entspricht dem ebenfalls bindungsrelevanten R30 im IL-6. All diese Studien zeigen, daß die Architektur des IL-11-Rezeptorkomplexes der des IL-6 eng verwandt ist und daß die *site 1* das  $\alpha$ -Rezeptor-Bindungssepitop darstellt. Die Spezifität der einzelnen IL-6-Typ Zytokine zu ihren jeweiligen  $\alpha$ -Rezeptoren wird durch die polaren, die hydrophobe Bindungstasche umschließenden Aminosäuren gewährleistet.

Betrachtungen des IL-11-Strukturmodells führten zur Identifikation einer weiteren hydrophoben Stelle. Die Reste des N-terminalen Bereiches der D-Helix (I171) und des C-terminalen Bereiches des AB-loops (F64, P65) könnten der *site 3*, der Bindungsregion zu einem gp130, angehören. Störungen in dieser hydrophoben Region durch Einfügen geladener Aminosäuren (I171D oder F64D) führten zu punktmutierten Proteinen stark reduzierter Bioaktivitäten, die immer noch in der Lage sind, IL-11R $\alpha$  zu binden, aber die wirkungsvolle Rekrutierung von gp130 verhindern. Dies zeigt, daß es sich bei der *site 3* des IL-11 tatsächlich um ein gp130-Bindungssepitop handelt. Einen weiteren interessanten Befund stellt der Selbst-Antagonismus dieser Punktmutanten bei hohen Konzentrationen dar. Einen ähnlichen dosisabhängigen Befund beobachtete man beim humanen Wachstumshormon, das seinen Rezeptor über zwei Bindungssepitope unterschiedlicher Affinität homodimerisiert [105]. Dies läßt vermuten, daß durch Einführung der Punktmutation die Interaktion mit gp130 an der *site 3* geschwächt ist und die Bindung des gp130 an der intakten *site 2* bevorzugt ist. Aufgrund dessen besetzen die gp130 Moleküle bei höheren Konzentrationen des Zytokins bevorzugt die *site 2* und verhindern so die Homodimerisierung von gp130.

Überraschenderweise führten die Aminosäuren, die an der *site 2* zur Mutagenese ausgewählt waren, nicht zur Definition der zur Bindung des gp130 notwendigen Seitenketten. Keine der sechs Punktmutationen (L44D und L45D in der A-Helix; D134L, R135E, R139E und L142D in der C-Helix) verhinderte die Bildung eines signaltransduzierenden Ternärkomplexes. Die deutlichste Abnahme der Bioaktivität zeigte die Mutante D134L mit einer im Vergleich zum Wildtyp 19-fach erhöhten EC50. D134L erreichte jedoch bei hohen Dosen Proliferationsantworten auf Ba/F3-gp130-IL-11R $\alpha$ -Zellen, die der des Wildtyps entsprechen. Die Aktivitäten von L44D und L45D waren geringfügig reduziert (acht- und vierfache Erhöhung des EC50). Die Mutante R135E zeigte sogar eine zweifach erhöhte Aktivität, verbunden mit einer verstärkten Anlagerung des sgp130 im Ternärkomplex. Dies läßt vermuten, daß es sich bei der *site 2* tatsächlich um ein gp130 Bindungsepitop handelt. Czupryn et al. führten in ihren Studien einen Alanin *scan* der A-Helix durch und fanden für die Punktmutanten L44A eine Bioaktivität von 2 % der Wildtypaktivität, für L45A von 30% [84]. Es gelang nicht, durch Einfügen einer geladenen Aminosäure in die entsprechenden Positionen (L44D, L45D) den störenden Effekt der Mutation zu verstärken. An dieser Position scheint die Natur der eingeführten Seitenkette einen geringen Einfluß auf die Aktivität des Proteins zu haben. Für das Nichtauffinden einer für die Rekrutierung des gp130 essentiellen Seitenkette an der *site 2* gibt es zwei Erklärungsmöglichkeiten. Zum einen könnte die Position der *site 2* nicht exakt konserviert sein und somit wurden die entsprechenden Aminosäuren nicht zur Mutagenese ausgewählt. Dieser Erklärungsansatz erscheint jedoch unwahrscheinlich, da aufgrund der Vielzahl an Mutanten die IL-11-Oberfläche großflächig abgedeckt wurde. Alternativ könnte die Interaktion des gp130 an der *site 2* des IL-11 von geringer Spezifität und schwacher Affinität sein. Dies zeigt die Beobachtung, daß die *site 3*-Mutante I171D in Gegenwart des sIL-11R $\alpha$  keinen Ternärkomplex mit löslichem gp130 über die intakte *site 2*-Interaktion bildet. Desweiteren stellt die *site 2* das allgemeine gp130 Bindungsepitop der IL-6-Typ Zytokine dar, dem ein eindeutiges Motiv oder eine konservierte Oberflächenstruktur fehlt. Im Fall des IL-6 konnte gezeigt werden, daß die Kombination von mehreren Mutationen an der *site 2* nötig ist, um eine deutliche Erniedrigung ihrer Affinität zu gp130 zu erreichen [106].

Ein weiterer Ansatz zur Identifizierung von Bindungsstellen stellt das Kartieren der Epitope antagonistischer Antikörper dar. Im Rahmen unseres EU-geförderten Forschungsprojektes gelang es C. Blanc, monoklonale IL-11 und IL-11R $\alpha$  Antikörper zu generieren [52]. Die IL-11 Antikörper E33, H2 und H56 stören die Bindung zwischen  $\alpha$ -Rezeptor und Zytokin (*site 1*) nicht, unterdrücken aber dennoch die proliferative Wirkung des humanen IL-11 auf Ba/F3-gp130-IL-11R Zellen [52]. Mit Hilfe der punktmutierten Proteine konnte nun nachgewiesen werden, daß die Aminosäuren D134 und R135 zum Epitop des E33 gehören. H2 und H56 teilen

sich mit dem käuflichen Antikörper mAb618 ein Epitop, dem die Reste R135 und R139 angehören. Aufgrund der antagonistischen Wirkung der Antikörper kann argumentiert werden, daß diese Seitenketten der *site 2* des IL-11 zugeordnet werden müssen und ein deutlicher Verlust der Bioaktivität nur durch Kombination mehrerer Punktmutationen erreicht werden kann.

Einen interessanten Befund des Antik rperkartierens stellt die Sonderstellung des E33 dar. Im Gegensatz zu allen anderen Antikörpern ist er humanspezifisch und versagt trotz 88%iger Sequenzidentität beider Zytokine die Bindung des murinen IL-11. Begründet ist diese Spezifität in der Bindung an die Asparaginsäure 134, die im murinen IL-11 durch eine Glutaminsäure ersetzt ist. *Abb. 4.1.* zeigt vergleichend die Sequenzen der C-Helices des humanen und murinen IL-11 im Bereich der *site 2*.

	121		131		141
IL-11 human	TLEPEL <u>G</u> TLQ		ARLD <u>R</u> LLRRL		QLLMSRLALP
IL-11 murin	TLEPEL <u>G</u> ALQ		ARL <u>E</u> RLLRRL		QLLMSRLALP

**Abb. 4.1.** *Vergleich der Sequenzen des humanen und murinen IL-11 im Bereich der site 2*  
Dargestellt sind die Aminosäuren 121 bis 150 der C-Helix. Die nicht-konservierten Aminosäuren sind unterstrichen.

Die ausgeprägte Homologie der beiden Proteine im Bereich der dem Bindungsepitop von H2 und H56 angehörenden Aminosäuren R135 und R139 erklärt die Kreuzreaktivität der Antikörper.

Die Rezeptorbindungsepitope des murinen IL-11 wurden in einer parallelen Studie definiert [107]. In dieser Studie wurde ebenfalls die Aminosäure R169 (entsprechend dem R190 im humanen IL-11) im C-terminalen Bereich der D-Helix als notwendig für die Interaktion mit IL-11R  identifiziert. Wie auch im humanen IL-11 sind die Reste des AB-loops für die  -Rezeptorbindung von geringerer Bedeutung. Interessanterweise gelang es Barton et al [107] ebenfalls nicht, eine einzelne Aminosäure in der *site 2* des murinen IL-11 zu identifizieren, die wichtig für die Interaktion mit gp130 ist. Die Doppelmutante R111A/L115A (entsprechend der R132 und L136 im humanen IL-11) zeigte eine deutlich verringerte Bioaktivität. Außerdem lässt der Nachweis der  -Rezeptorbindung vermuten, daß Reste der C-Helix tatsächlich in die gp130 Bindung der *site 2* involviert sind. Die *site 2* Mutante R118A (entspricht der Position R139 im humanen IL-11) zeigte ebenfalls eine zweifach erhöhte Bioaktivität wie die Punktmutante R135E. W147 (W168 im humanen IL-11) konnte als wichtige Seitenkette der gp130 Interaktion an der *site 3* definiert werden. Diese Aminosäure befindet sich dem I150 benachbart, das dem I171 im humanen IL-11 entspricht und das hier als notwendig für die gp130 Bindung identifiziert wurde. Zusammenfassend kann geschlossen werden, daß im humanen und murinen IL-11 die funktionellen Epitope konserviert sind.

Die allgemeine Ansicht, daß IL-11 über Homodimerisierung von gp130 signalisiert, wurde durch eine Beobachtung von Neddermann et al. [108] in Frage gestellt. In einem Immunpräzipitationsexperiment löslicher Rezeptorproteine induzierte IL-11 im Gegensatz zu IL-6 keine Dimerisierung des löslichen gp130. Dieser Befund könnte ein Hinweis sein, daß IL-11 über eine weitere, noch nicht identifizierte Rezeptoruntereinheit signalisiert. Da die *site 3* als gp130 Bindungssepitop identifiziert ist, sollte diese mögliche Rezeptorkette an die *site 2* des IL-11 binden. Eine alternative Erklärung der Beobachtung von Neddermann et al. ist, daß das zweite gp130 an die *site 2* des IL-11 mit relativ niedriger Affinität gebunden und deshalb nicht copräzipitiert wird. Diese Vermutung wird von der Beobachtung unterstützt, daß die Einführung der Punktmutation R135E an *site 2* zur Bildung eines Ternärkomplexes erhöhter Affinität führt. Es kann nicht ausgeschlossen werden, daß in Abhängigkeit der auf der Zelloberfläche exprimierten Rezeptorproteine IL-11 alternativ über ein gp130 Homodimer oder über Bildung eines Heterodimers aus gp130 und dem noch nicht identifizierten Rezeptor signalisiert. Eine entsprechende Promiskuität ist im Falle des OSM beschrieben, das zuerst über ein Heterodimer aus gp130 und LIFR signalisierend beschrieben wurde [109]. Später konnte gezeigt werden, daß OSM alternativ über eine Heterodimer bestehend aus gp130 und dem unlängst klonierten OSM-Rezeptor signalisiert [30].

Die Definition der Rezeptorbindungsepitope des humanen IL-11 eröffnet Perspektiven zum rationalen Design von Antagonisten und Hyperagonisten. Da rekombinantes IL-11 als thrombopoetische Substanz den Weg in die Klinik gefunden hat (Neumega®), sind hyperagonistische Mutanten wie R135E von Interesse. Effizientere Agonisten können durch Entwicklung von IL-11-Varianten mit erhöhter Affinität zu beiden Rezeptorketten entstehen. In dieser Zytokinfamilie ist die Kombination von Punktmutationen an *site 1* (zur Stärkung der Interaktion zum nicht-signalisierenden  $\alpha$ -Rezeptor) mit Mutationen an den *sites 2* und *3* (zur Störung der Interaktion zur signaltransduzierenden Rezeptorkette gp130) ein Standardansatz zur Entwicklung von Antagonisten [110]. Da in dieser Arbeit die Bindungssepitope des IL-11 definiert wurden, sind die Voraussetzungen für entsprechende Entwicklungen geschaffen. Um die Bindung des IL-11 an seinen spezifischen Rezeptor zu verstärken, wurde die hydrophobe Tasche des IL-11 vergrößert. Tatsächlich gelang es, mittels Ersatz des Histidins 182 durch Leucin die Bindung des  $\alpha$ -Rezeptors deutlich zu verstärken. Auch wenn diese Punktmutante eine dem Wildtyp vergleichbare Bioaktivität aufweist, kann sie mit Punktmutationen der *site 2* und *3* kombiniert werden und stellt so einen wichtigen Schritt zur Agonisten- und Antagonistengenerierung dar.

Wie zuvor diskutiert, sind die Mechanismen der  $\alpha$ -Rezeptorerkennung über die *site 1* bei den Zytokinen IL-11, IL-6 und GH vergleichbar, der Aufbau des signaltransduzierenden Komplexes jedoch verschieden. Das Wachstumshormon koordiniert über seine beiden Rezeptorbindungsregionen *site 1* und *2* zwei Rezeptorketten. Hierbei ist das Epitop auf beiden GHR-Molekülen identisch. Das Zytokin weist zwei unterschiedliche Rezeptorbindungsepitope auf [9, 89, 103]. Die freien Energien beider Interaktionen unterscheiden sich ebenfalls. Während GH seinen spezifischen Rezeptor lediglich über zwei Epitope rekrutiert, existieren für IL-11 und IL-6 drei unterschiedliche Rezeptorbindungsepitope. Im Gegensatz zum GH signaltransduzieren die an die *site 1* dieser Zytokine rekrutierten spezifischen Rezeptoren nicht. Je ein gp130-Molekül bindet an *site 2* und an *site 3*. *Site 3* besitzt kein Äquivalent im GH. Die Bindungen der Zytokine zu ihren spezifischen Rezeptoren an *site 1* unterscheiden sich nicht nur in ihrer Spezifität, sondern auch in der Lage ihres Schwerpunktes. Im GH/GHR-Komplex tragen der *AB-loop* und die D-Helix des Zytokins sowie beide Rezeptordomänen gleichwertig zur Bindung bei [89]. Im IL-6-Rezeptorkomplex sind sowohl die Seitenketten des *AB-loops* als auch die Reste der D-Helix von Bedeutung. Das Ligandenbindungsepitop des Rezeptors ist jedoch mit einem Anteil von 90% der Bindungsenergie in Richtung der dritten, membranproximalen Domäne verschoben [111]. Dennoch ist diese Domäne nach Ligandenbindung nicht hinreichend zur Ausbildung eines signaltransduzierenden Ternärkomplexes. Die Ig-ähnlichen Domänen (D1) von IL-6R $\alpha$  und IL-11R $\alpha$  sind für die Ligandenbindung ohne Bedeutung [59, 102]. Das molekulare Modell des IL-11-Rezeptorkomplexes zeigt, daß der *AB-loop* des IL-11 kürzer ist als der des IL-6 und seine Aminosäureseitenketten daher weniger zur zweiten Domäne des  $\alpha$ -Rezeptors exponiert sind. Es ist zu vermuten, daß die Rezeptorkoordination des IL-11 verstärkt durch Bindung von Aminosäuren der D-Helix an die D3 des IL-11R $\alpha$  vermittelt wird. Die  $K_D$ -Werte der Bindungen des gesamten löslichen Rezeptors (IL-11R $\alpha$ ) bzw. der isolierten dritten Domäne (IL-11R $\alpha$ -D3) zu IL-11 liegen in gleichen Größenordnungen [91]. Dagegen beträgt die Bindungsaffinität der C-terminalen Domäne des IL-6R $\alpha$  zu IL-6 lediglich 10% der des gesamten  $\alpha$ -Rezeptors zum Zytokin [94, 111]. Es stellte sich deshalb die Frage, inwieweit diese Interaktion des IL-11 mit der dritten Domäne des  $\alpha$ -Rezeptors hinreichend zur Ternärkomplexbildung ist und ob durch sie eine Signaltransduktion induziert werden kann. Zur experimentellen Überprüfung wurde eine um 19 C-terminale Aminosäuren verlängerte, in *E. coli* exprimierte IL-11-Rezeptordomäne D3 verwendet. Das einzige, nicht an der Ligandenbindung beteiligte Cystein 248 wurde zur Vermeidung von Dimerisationen durch Alanin ersetzt [91]. Es zeigt sich, daß die dritte Domäne des IL-11R $\alpha$  tatsächlich in der Lage ist, das Zytokin zu binden und nachfolgend den



Ternärkomplex zu bilden. Desweiteren konnte in HepG2-Zellen seine Bioaktivität durch STAT-Aktivierung nach Induktion in Gegenwart von Trx-IL-11 nachgewiesen werden.

Überraschenderweise gelang die Immunpräzipitation des gp130 mit IL-11R-D3(C248A) auch in Abwesenheit von IL-11, obwohl der komplette lösliche IL-11R $\alpha$  gp130 nicht alleine binden kann. gp130 wird hier als Monomer und nicht als Dimer gebunden. Deshalb ist die Assoziation der D3 an gp130 nicht hinreichend zur Signaltransduktion. Jedoch ist dies ein wichtiger Befund zum Verständnis des Aktivierungsmechanismus des IL-11-Rezeptorkomplexes. Die spontane Bindung der dritten Domäne des  $\alpha$ -Rezeptors an gp130 weist darauf hin, daß der IL-11R $\alpha$  bereits ein Bindungsepitop für den Signaltransduktor besitzt, das durch die Ligandenbindung zugänglich wird. Diese zusätzliche direkte Assoziation zwischen dem  $\alpha$ -Rezeptor und gp130 trägt vermutlich wesentlich zur Bindung des Ternärkomplexes bei. Es ist denkbar, daß die Abschirmung des Bindungsepitops durch die *stalk*-Region des IL-11R $\alpha$  vermittelt wird, die sich im Gegensatz zur relativ starren Struktur der Domänen flexibel über das Epitop legen könnte. Auf Seiten des gp130 lassen die Betrachtung des Komplexmodelles und ein erster Immunpräzipitationsversuch (nicht gezeigt) vermuten, daß das äquivalente Bindungsepitop zum IL-11R $\alpha$  im Bereich der Domänen 1 bis 3 des gp130 liegt.

Die zuvor diskutierte *stalk*-Region des IL-11R $\alpha$  ist zusätzlich im Hinblick auf eine mögliche limitierte Proteolyse des Proteins von Interesse. Durch *shedding* einer Vielzahl membranständiger Zytokinrezeptoren entstehen im allgemeinen lösliche Rezeptorketten. Die Schnittstellen können je nach Induktor variieren, befinden sich aber ausnahmslos im membranproximalen *stalk*-Bereich der Rezeptoren. Proteine wie gp130, deren Transmembranregionen sofort, ohne verbindenden *stalk*, an eine membranproximale Domäne anschließen, unterliegen keiner limitierten Proteolyse. Bis heute wird vermutet, daß eher das Vorhandensein eines *stalks* als seine Seitenketten ausschlaggebend für die limitierte Proteolyse ist. Das *shedding* des IL-6R $\alpha$ , der ebenso wie der IL-11R $\alpha$  einen *stalk*-Bereich gleicher Länge besitzt, ist auf einer Vielzahl von Zellen beschrieben (Abb. 1.4). Humane Makrophagen *shedden* den IL-6R $\alpha$  nach Stimulation mit porenbildenden Toxinen. In der vorliegenden Arbeit konnte zusätzlich eine Induktion der limitierten Proteolyse des IL-6R $\alpha$  auf humanen Makrophagen durch PMA und LPS gezeigt werden. Während PMA als *shedding*-Stimulus bereits von anderen Zellen her bekannt ist, ist die *shedding*-induzierende Wirkung durch LPS ein gänzlich neuer Befund.

Eine limitierte Proteolyse des IL-11R $\alpha$  fand im Gegensatz zum *shedding* des IL-6R $\alpha$  weder auf transient transfizierten COS7-Zellen durch PMA-Stimulation noch auf humanen Makrophagen nach PMA- oder LPS-Inkubation statt. Es stellt sich die Frage, ob sich dieses unterschiedliche

Verhalten doch aus der geringen Übereinstimmung der Aminosäuresequenzen der *stalks* erklärt. Auch können Proteine durch Glycosylierungen vor einem *shedding* bewahrt werden. Die Funktion der zwei Glycosylierungsstellen im IL-11R $\alpha$  ist in diesem Zusammenhang unbekannt. Desweiteren wäre denkbar, daß der IL-11R $\alpha$  zwar nicht nach PMA- und LPS-Induktion, aber durch Inkubation mit anderen *shedding*-Stimuli wie bakteriellen Metalloproteasen oder porenbildenden Toxinen proteolysiert wird.

Zusammenfassend konnte bis heute weder die lösliche Form des IL-11R $\alpha$  *in vivo*, noch eine limitierte Proteolyse des membranständigen  $\alpha$ -Rezeptors nachgewiesen werden. Der sIL-6R $\alpha$  wirkt wie die in Insektenzellen rekombinant hergestellte, lösliche Form des IL-11R $\alpha$ , agonistisch. Das gegensätzliche Verhalten der sowohl strukturell als auch aufgrund ihrer Signaltransduktion eng verwandten Rezeptorketten IL-6R $\alpha$  und IL-11R $\alpha$  in Bezug auf *shedding*-Stimuli hat deutliche Auswirkungen im Organismus. Zellen, die einen  $\alpha$ -Rezeptor exprimieren, werden durch *shedding*-bedingten Rezeptorkettenverlust weitgehend unresponsiv für das spezifische Zytokin. Zellen, die keinen  $\alpha$ -Rezeptor exprimieren, werden durch die Gegenwart des löslichen Rezeptors für das entsprechende Zytokin sensibilisiert.

## 5. Zusammenfassung

Zytokine vermitteln ihre biologische Wirkung durch Bindung an Oberflächenrezeptoren, die ihrerseits eine Signalkaskade im Inneren der Zelle induzieren. Der IL-11-Rezeptorkomplex besteht aus IL-11, dem ligandenspezifischen  $\alpha$ -Rezeptor IL-11R $\alpha$  und der signaltransduzierenden  $\beta$ -Untereinheit gp130. Auf Basis eines Strukturmodells des humanen IL-11 wurden Bindungsbereiche des Zytokins an seine spezifische  $\alpha$ -Rezeptoruntereinheit (*site 1*) und an den Signaltransduktor gp130 (*sites 2+3*) vorgeschlagen.

Es wurden folgende Ergebnisse erzielt:

**Die *sites 1* und *3* des IL-11 wurden durch Mutagenesestudien eindeutig definiert.**

- Zuzüglich zu acht bereits generierten Punktmutanten (Diplomarbeit) - wurden sechs weitere, in einer der drei vermutlichen Bindungsregionen punktmutierte IL-11-Fusionsproteine hergestellt. *Abb. 1.7.* zeigt alle vierzehn Punktmutationen in einem Modell des IL-11. Die Bioaktivität der nach Expression aus *E. coli*-Bakterien vorliegenden, mutierten Proteine konnte durch Regulation der Akutphase-Proteinsynthese in den Hepatomzellen HepG2 und durch Proliferationstests mit Ba/F3-gp130-IL-11R $\alpha$ -Zellen bestimmt werden, wobei die Untersuchungen an den verschiedenen Zelllinien zu gleichen Ergebnissen führten.
- Die Bindung an den IL-11R $\alpha$  und die Ternärkomplexbildung von unterschiedlichen *sites* zugeordneten Punktmutanten wurde untersucht.
- In der vorliegenden Arbeit konnte die *site 1* des IL-11 eindeutig als das IL-11R $\alpha$  Bindungsepitop identifiziert werden. Sie wird hauptsächlich von exponierten Aminosäuren des C-terminalen Bereiches der D-Helix, von Arginin 47 der A-Helix und benachbarten Resten des AB-loops gebildet. Die Aminosäuren R47E, R190E und D186V umschließen eine schmale, tiefe, hydrophobe Tasche, die aus den Seitenketten T46, L50, L185, V189 und L193 besteht, und vermitteln so die Spezifität der Rezeptorbindung.
- Die Reste des N-terminalen Bereiches der D-Helix (I171) und des C-terminalen Bereiches des AB-loops (F64) gehören der *site 3*, der Bindungsregion zu einem gp130, an. Störungen in dieser hydrophoben Region durch Einfügen geladener Aminosäuren (I171D oder F64D) führten zu punktmutierten Proteinen stark reduzierter Bioaktivitäten, die immer noch in der Lage sind, IL-11R $\alpha$  zu binden, aber die wirkungsvolle Rekrutierung von gp130 verhindern.
- Die an der *site 2* eingeführten Punktmutationen führten nicht zur Definition der zur Bindung des gp130 notwendigen Seitenketten. Vermutlich ist eine Kombination von mehreren Mutationen an der *site 2* nötig, um eine inaktive IL-11-Mutante zu erhalten.

**Mittels antagonistischer monoklonaler IL-11-Antikörper konnte die *site 2* des IL-11 definiert werden.**

- Die Bindungsepitope der antagonistischen monoklonalen IL-11-Antikörper mAb618, E33, H2 und H56 im IL-11 wurden mit Hilfe von Plasmonresonanzstudien an den punktmultierten Trx-Fusionsproteinen bestimmt.
- Die Aminosäuren D134 und R135 gehören zum Epitop des E33. H2, H56 und mAb618 teilen sich ein Epitop, dem die Reste R135 und R139 angehören. Aufgrund der antagonistischen Wirkung der Antikörper kann argumentiert werden, daß diese Seitenketten der *site 2* des IL-11 zugeordnet werden müssen.
- Zusätzlich wurde gezeigt, daß die Humanspezifität des E33 aus der Bindung an die Asparaginsäure 134, die im murinen IL-11 durch eine Glutaminsäure ersetzt ist, resultiert.

**Die Bindung der *site 1* des IL-11 an den IL-11R $\alpha$  wurde verstärkt.**

- Die Definition der *site 1* als  $\alpha$ -Rezeptorbindungsepitop führte im folgenden zur gezielten Auswahl weiterer Punktmutanten, die eine erhöhte Affinität zum IL-11R $\alpha$  erwarten ließen.
- Mittels Ersatz des Histidins 182 durch Leucin gelang es, die Bindung des IL-11 an den  $\alpha$ -Rezeptor deutlich zu verstärken. Sie kann mit Punktmutationen der *site 2* und *3* kombiniert werden und stellt so einen wichtigen Schritt zur Agonisten- und Antagonistengenerierung dar.

**Die dritte Domäne des IL-11R $\alpha$  assoziiert mit gp130.**

- In Gegenwart von IL-11 bildet die dritte Domäne des IL-11R $\alpha$  mit gp130 einen Ternärkomplex, der in HepG2-Zellen eine STAT3-Aktivierung induzieren kann.
- In Abwesenheit des Zytokins bindet IL-11R-D3 monomeres gp130. Diese spontane Bindung der dritten Domäne des  $\alpha$ -Rezeptors an gp130 ist ein wichtiger Befund zum Verständnis des Aktivierungsmechanismus des IL-11-Rezeptorkomplexes und weist darauf hin, daß der IL-11R $\alpha$  bereits ein Bindungsepitop für den Signaltransduktor besitzt, das erst durch die Ligandenbindung zugänglich wird.

**Weder PMA noch LPS induzieren ein *shedding* des IL-11R $\alpha$ .**

- Auf humanen Makrophagen konnte zusätzlich zum bekannten Einfluß porenformender Toxine eine Induktion der limitierten Proteolyse des IL-6R $\alpha$  durch PMA und LPS gezeigt werden. Während PMA als *shedding*-Stimulus bereits von anderen Zellen her bekannt ist, ist die induzierende Wirkung des LPS ein neuer Befund.
- Eine limitierte Proteolyse des IL-11R $\alpha$  findet weder auf transient transfizierten COS7-Zellen nach PMA-Stimulation noch auf humanen Makrophagen nach PMA- oder LPS-Inkubation statt.

## 6. Ausblick

In der vorliegenden Arbeit gelang es, mit ausgewählten Punktmutanten die Bindungsregionen zum spezifischen  $\alpha$ -Rezeptor (*site 1*) und zu den zwei signaltransduzierenden Rezeptorketten gp130 (*site 2+3*) eindeutig zu bestimmen und zuzuordnen.

- Überraschenderweise verhinderte keine der generierten *site 2*-Mutanten die Bildung eines signaltransduzierenden Ternärkomplexes. Eine deutlichere Erniedrigung der Bioaktivität könnte durch Kombination von mehreren Mutationen an der *site 2* erreicht werden.
- Mutationen der für die Bindung der signaltransduzierenden Rezeptoruntereinheit gp130 relevanten Aminosäuren - wie F64D und I171D - sollen in einem Protein mit der Punktmutation H182L, deren  $\alpha$ -Rezeptorbindung verstärkt ist, kombiniert werden, so daß ein wirkungsvoller Antagonist für IL-11 entwickelt werden kann.
- Ein wirkungsvoller Agonist für IL-11 soll durch Kombination der Punktmutationen R135E, deren Bindung zur signaltransduzierenden Rezeptoruntereinheit an der *site 2* verstärkt ist, und H182L entwickelt werden.
- Desweiteren sollen - nach Aufreinigung und Kristallisation des IL-11 und seines spezifischen Rezeptors - NMR- und Röntgenspektren des Zytokins, des Rezeptors und des IL-11/IL-11R-Komplexes zur Aufklärung der Strukturen führen.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß die dritte Domäne des IL-11R $\alpha$  im Gegensatz zum kompletten Rezeptor gp130 alleine binden kann.

- Wenn die Abschirmung des gp130-Bindungs epitops auf der IL-11R-D3-Oberfläche durch die *stalk*-Region des IL-11R $\alpha$  vermittelt würde, sollte ein lösliches Rezeptorkonstrukt mit verkürztem *stalk* ebenfalls konstitutiv gp130 binden.
- Auf Seiten des gp130 liegt das äquivalente Bindungs epitop zum IL-11R $\alpha$  vermutlich im Bereich der zytokinbindenden Domäne. Immunpräzipitationen verkürzter gp130-Konstrukte könnten diese These bestätigen.

Die im Rahmen der Arbeit durchgeführten Experimente führten zur Annahme, daß im Gegensatz zum IL-6R $\alpha$ , keine limitierte Proteolyse des IL-11R $\alpha$  induziert werden konnte.

- Weiterführend sollten entweder Voraussetzungen zum IL-11R $\alpha$ -*shedding* benannt werden oder geklärt werden, wieso trotz *stalk*-Region keine Proteolyse des IL-11R $\alpha$  stattfinden kann.
- Die *stalk*-Regionen des IL-6R $\alpha$  und des IL-11R $\alpha$  sollen ausgetauscht und die chimären Proteine auf ihr *shedding*-Verhalten hin untersucht werden.

## 7. Literatur

1. Thomson, A. W. (1991) *The Cytokine Handbook*, Academic Press, London.
2. Nicola, N. A. (1994) *Guidebook to Cytokines and their Receptors*, Oxford University Press, Oxford.
3. Anderson, D. M., Johnson, L., Glaccum, M. B., Copeland, N. G., Gilbert, D. J., Jenkins, N. A., Valentine, V., Kirstein, M. N., Shapiro, D. N., Morris, S. W. & et al. (1995) Chromosomal assignment and genomic structure of Il15, *Genomics*. 25, 701-6.
4. Foster, D. C., Sprecher, C. A., Grant, F. J., Kramer, J. M., Kuijper, J. L., Holly, R. D., Whitmore, T. E., Heipel, M. D., Bell, L. A., Ching, A. F. & et al. (1994) Human thrombopoietin: gene structure, cDNA sequence, expression, and chromosomal localization, *Proc Natl Acad Sci U S A*. 91, 13023-7.
5. Madej, T., Boguski, M. S. & Bryant, S. H. (1995) Threading analysis suggests that the obese gene product may be a helical cytokine, *FEBS Lett*. 373, 13-8.
6. McDonald, N. Q., Panayotatos, N. & Hendrickson, W. A. (1995) Crystal structure of dimeric human ciliary neurotrophic factor determined by MAD phasing, *Embo J*. 14, 2689-99.
7. Robinson, R. C., Grey, L. M., Staunton, D., Vankelecom, H., Vernallis, A. B., Moreau, J. F., Stuart, D. I., Heath, J. K. & Jones, E. Y. (1994) The crystal structure and biological function of leukemia inhibitory factor: implications for receptor binding, *Cell*. 77, 1101-16.
8. Sprang, S. R. & Bazan, J. F. (1993) *Curr. Opin. Struct. Biol*. 3, 815-827.
9. Wells, J. A. & de Vos, A. M. (1996) Hematopoietic receptor complexes, *Annu Rev Biochem*. 65, 609-34.
10. Xu, G. Y., Yu, H. A., Hong, J., Stahl, M., McDonagh, T., Kay, L. E. & Cumming, D. A. (1997) Solution structure of recombinant human interleukin-6, *J Mol Biol*. 268, 468-81.
11. Somers, W., Stahl, M. & Seehra, J. S. (1997) 1.9 Å crystal structure of interleukin 6: implications for a novel mode of receptor dimerization and signaling, *Embo J*. 16, 989-97.
12. Cheetham, J. C., Smith, D. M., Aoki, K. H., Stevenson, J. L., Hoeffel, T. J., Syed, R. S., Egrie, J. & Harvey, T. S. (1998) NMR structure of human erythropoietin and a comparison with its receptor bound conformation, *Nat Struct Biol*. 5, 861-6.
13. Deller, M. C., Hudson, K. R., Ikemizu, S., Bravo, J., Jones, E. Y. & Heath, J. K. (2000) Crystal structure and functional dissection of the cytostatic cytokine oncostatin M, *Structure Fold Des*. 8, 863-74.
14. Heldin, C. H. (1995) Dimerization of cell surface receptors in signal transduction, *Cell*. 80, 213-23.
15. Davis, S., Aldrich, T. H., Valenzuela, D. M., Wong, V. V., Furth, M. E., Squinto, S. P. & Yancopoulos, G. D. (1991) The receptor for ciliary neurotrophic factor, *Science*. 253, 59-63.
16. Taga, T. & Kishimoto, T. (1997) Gp130 and the interleukin-6 family of cytokines, *Annu Rev Immunol*. 15, 797-819.
17. Heinrich, P. C., Behrmann, I., Müller-Newen, G., Schaper, F. & Graeve, L. (1998) Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway, *Biochem J*. 334, 297-314.

18. Darnell, J. E., Jr., Kerr, I. M. & Stark, G. R. (1994) Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins, *Science*. 264, 1415-21.
19. Ihle, J. N., Witthuhn, B. A., Quelle, F. W., Yamamoto, K., Thierfelder, W. E., Kreider, B. & Silvennoinen, O. (1994) Signaling by the cytokine receptor superfamily: JAKs and STATs, *Trends Biochem Sci*. 19, 222-7.
20. Ihle, J. N. & Kerr, I. M. (1995) Jaks and Stats in signaling by the cytokine receptor superfamily, *Trends Genet*. 11, 69-74.
21. Stahl, N., Farruggella, T. J., Boulton, T. G., Zhong, Z., Darnell, J. E., Jr. & Yancopoulos, G. D. (1995) Choice of STATs and other substrates specified by modular tyrosine- based motifs in cytokine receptors, *Science*. 267, 1349-53.
22. Kolch, W. (2000) Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions, *Biochem J*. 351 Pt 2, 289-305.
23. Lee, I. S., Liu, Y., Narazaki, M., Hibi, M., Kishimoto, T. & Taga, T. (1997) Vav is associated with signal transducing molecules gp130, Grb2 and Erk2, and is tyrosine phosphorylated in response to interleukin-6, *FEBS Lett*. 401, 133-7.
24. Hong, F., Nguyen, V. A., Shen, X., Kunos, G. & Gao, B. (2000) Rapid activation of protein kinase B/Akt has a key role in antiapoptotic signaling during liver regeneration, *Biochem Biophys Res Commun*. 279, 974-9.
25. Tu, Y., Gardner, A. & Lichtenstein, A. (2000) The phosphatidylinositol 3-kinase/AKT kinase pathway in multiple myeloma plasma cells: roles in cytokine-dependent survival and proliferative responses, *Cancer Res*. 60, 6763-70.
26. Jain, N., Zhang, T., Kee, W. H., Li, W. & Cao, X. (1999) Protein kinase C delta associates with and phosphorylates Stat3 in an interleukin-6-dependent manner, *J Biol Chem*. 274, 24392-400.
27. Elson, G. C., Lelievre, E., Guillet, C., Chevalier, S., Plun-Favreau, H., Froger, J., Suard, I., de Coignac, A. B., Delneste, Y., Bonnefoy, J. Y., Gauchat, J. F. & Gascan, H. (2000) CLF associates with CLC to form a functional heteromeric ligand for the CNTF receptor complex, *Nat Neurosci*. 3, 867-72.
28. Senaldi, G., Varnum, B. C., Sarmiento, U., Starnes, C., Lile, J., Scully, S., Guo, J., Elliott, G., McNinch, J., Shaklee, C. L., Freeman, D., Manu, F., Simonet, W. S., Boone, T. & Chang, M. S. (1999) Novel neurotrophin-1/B cell-stimulating factor-3: a cytokine of the IL- 6 family, *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96, 11458-63.
29. Kishimoto, T., Akira, S., Narazaki, M. & Taga, T. (1995) Interleukin-6 family of cytokines and gp130, *Blood*. 86, 1243-54.
30. Mosley, B., De Imus, C., Friend, D., Boiani, N., Thoma, B., Park, L. S. & Cosman, D. (1996) Dual Oncostatin M (OSM) Receptors. Cloning and characterization of an alternative signaling subunit conferring osm-specific receptor activation, *J Biol Chem*. 271, 32635-43.
31. Hoischen, S. H., Vollmer, P., Marz, P., Ozbek, S., Gotze, K. S., Peschel, C., Jostock, T., Geib, T., Mullberg, J., Mechttersheimer, S., Fischer, M., Grotzinger, J., Galle, P. R. & Rose-John, S. (2000) Human herpes virus 8 interleukin-6 homologue triggers gp130 on neuronal and hematopoietic cells, *Eur J Biochem*. 267, 3604-12.
32. Hibi, M., Murakami, M., Saito, M., Hirano, T., Taga, T. & Kishimoto, T. (1990) Molecular cloning and expression of an IL-6 signal transducer, gp130, *Cell*. 63, 1149-57.

33. Moritz, R. L., Hall, N. E., Connolly, L. M. & Simpson, R. J. (2001) Determination of the disulfide structure and N-glycosylation sites of the extracellular domain of the human signal transducer gp130, *J Biol Chem.* 276, 8244-53.
34. Kurth, I., Horsten, U., Pflanz, S., Timmermann, A., Kuster, A., Dahmen, H., Tacke, I., Heinrich, P. C. & Muller-Newen, G. (2000) Importance of the membrane-proximal extracellular domains for activation of the signal transducer glycoprotein 130 [In Process Citation], *J Immunol.* 164, 273-82.
35. Murakami, M., Narazaki, M., Hibi, M., Yawata, H., Yasukawa, K., Hamaguchi, M., Taga, T. & Kishimoto, T. (1991) Critical cytoplasmic region of the interleukin 6 signal transducer gp130 is conserved in the cytokine receptor family, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88, 11349-53.
36. Haan, C., Hermanns, H. M., Heinrich, P. C. & Behrmann, I. (2000) A single amino acid substitution (Trp666Ala) in the interbox1/2 region of the interleukin-6 signal transducer gp130 abrogates binding of JAK1, and dominantly impairs signal transduction, *Biochem J.* 349, 261-266.
37. Lütticken, C., Wegenka, U. M., Yuan, J., Buschmann, J., Schindler, C., Ziemiecki, A., Harpur, A. G., Wilks, A. F., Yasukawa, K., Taga, T., Kishimoto, T., Barbieri, G., Pellegrini, S., Sendtner, M., Heinrich, P. C. & Horn, F. (1994) Association of transcription factor APRF and protein kinase Jak1 with the interleukin-6 signal transducer gp130, *Science.* 263, 89-92.
38. Stahl, N., Boulton, T. G., Farruggella, T., Ip, N. Y., Davis, S., Witthuhn, B. A., Quelle, F. W., Silvennoinen, O., Barbieri, G., Pellegrini, S., Ihle, J. N. & Yancopoulos, G. D. (1994) Association and activation of Jak-Tyk kinases by CNTF-LIF-OSM-IL-6 beta receptor components, *Science.* 263, 92-5.
39. Fuhrer, D. K., Feng, G. S. & Yang, Y. C. (1995) Syp associates with gp130 and Janus kinase 2 in response to interleukin- 11 in 3T3-L1 mouse preadipocytes, *J Biol Chem.* 270, 24826-30.
40. Schmitz, J., Weissenbach, M., Haan, S., Heinrich, P. C. & Schaper, F. (2000) SOCS3 Exerts Its Inhibitory Function on Interleukin-6 Signal Transduction through the SHP2 Recruitment Site of gp130, *J Biol Chem.* 275, 12848-12856.
41. Gerhartz, C., Heesel, B., Sasse, J., Hemmann, U., Landgraf, C., Schneider-Mergener, J., Horn, F., Heinrich, P. C. & Graeve, L. (1996) Differential activation of acute phase response factor/STAT3 and STAT1 via the cytoplasmic domain of the interleukin 6 signal transducer gp130. I. Definition of a novel phosphotyrosine motif mediating STAT1 activation, *J Biol Chem.* 271, 12991-8.
42. Matsuda, T., Fukada, T., Takahashi-Tezuka, M., Okuyama, Y., Fujitani, Y., Hanazono, Y., Hirai, H. & Hirano, T. (1995) Activation of Fes tyrosine kinase by gp130, an interleukin-6 family cytokine signal transducer, and their association, *J Biol Chem.* 270, 11037-9.
43. Matsuda, T., Takahashi-Tezuka, M., Fukada, T., Okuyama, Y., Fujitani, Y., Tsukada, S., Mano, H., Hirai, H., Witte, O. N. & Hirano, T. (1995) Association and activation of Btk and Tec tyrosine kinases by gp130, a signal transducer of the interleukin-6 family of cytokines, *Blood.* 85, 627-33.
44. Ernst, M., Gearing, D. P. & Dunn, A. R. (1994) Functional and biochemical association of Hck with the LIF/IL-6 receptor signal transducing subunit gp130 in embryonic stem cells, *Embo J.* 13, 1574-84.



45. Hallek, M., Neumann, C., Schaffer, M., Danhauser-Riedl, S., von Bubnoff, N., de Vos, G., Druker, B. J., Yasukawa, K., Griffin, J. D. & Emmerich, B. (1997) Signal transduction of interleukin-6 involves tyrosine phosphorylation of multiple cytosolic proteins and activation of Src-family kinases Fyn, Hck, and Lyn in multiple myeloma cell lines, *Exp Hematol.* 25, 1367-77.
46. Dittrich, E., Renfrew Haft, C., Muys, L., Heinrich, P. C. & Graeve, L. (1996) A di-leucine motif and an upstream serine in the interleukin-6 (IL-6) signal transducer gp130 mediate ligand-induced endocytosis and down-regulation of the IL-6 receptor, *J Biol Chem.* 271, 5487-94.
47. Yoshida, K., Taga, T., Saito, M., Suematsu, S., Kumanogoh, A., Tanaka, T., Fujiwara, H., Hirata, M., Yamagami, T., Nakahata, T., Hirabayashi, T., Yoneda, Y., Tanaka, K., Wang, W. Z., Mori, C., Shiota, K., Yoshida, N. & Kishimoto, T. (1996) Targeted disruption of gp130, a common signal transducer for the interleukin 6 family of cytokines, leads to myocardial and hematological disorders, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 93, 407-11.
48. Cherel, M., Sorel, M., Lebeau, B., Dubois, S., Moreau, J. F., Bataille, R., Minvielle, S. & Jacques, Y. (1995) Molecular cloning of two isoforms of a receptor for the human hematopoietic cytokine interleukin-11, *Blood.* 86, 2534-40.
49. Lebeau, B., Montero Julian, F. A., Wijdenes, J., Muller-Newen, G., Dahmen, H., Cherel, M., Heinrich, P. C., Brailly, H., Hallet, M. M., Godard, A., Minvielle, S. & Jacques, Y. (1997) Reconstitution of two isoforms of the human interleukin-11 receptor and comparison of their functional properties, *FEBS Lett.* 407, 141-7.
50. Bilinski, P., Roopenian, D. & Gossler, A. (1998) Maternal IL-11Ralpha function is required for normal decidua and fetoplacental development in mice, *Genes Dev.* 12, 2234-43.
51. Robb, L., Li, R., Hartley, L., Nandurkar, H. H., Koentgen, F. & Begley, C. G. (1998) Infertility in female mice lacking the receptor for interleukin 11 is due to a defective uterine response to implantation, *Nat Med.* 4, 303-8.
52. Blanc, C., Vusio, P., Schleinkofer, K., Boisteau, O., Pflanz, S., Minvielle, S., Grotzinger, J., Muller-Newen, G., Heinrich, P. C., Jacques, Y. & Montero-Julian, F. A. (2000) Monoclonal antibodies against the human interleukin-11 receptor alpha-chain (IL-11Ralpha) and their use in studies of human mononuclear cells, *J Immunol Methods.* 241, 43-59.
53. Müllberg, J., Schooltink, H., Stoyan, T., Günther, M., Graeve, L., Buse, G., Mackiewicz, A., Heinrich, P. C. & Rose-John, S. (1993) The soluble interleukin-6 receptor is generated by shedding, *Eur J Immunol.* 23, 473-80.
54. Müllberg, J., Oberthur, W., Lottspeich, F., Mehl, E., Dittrich, E., Graeve, L., Heinrich, P. C. & Rose-John, S. (1994) The soluble human IL-6 receptor. Mutational characterization of the proteolytic cleavage site, *J Immunol.* 152, 4958-68.
55. Banning, U., Bonig, H., Pafferath, B., Klein-Vehne, A., Burdach, S. & Korholz, D. (1998) Release of the soluble interleukin-6 receptor from human T-cells, *Immunol Invest.* 27, 47-55.
56. Jones, S. A., Horiuchi, S., Novick, D., Yamamoto, N. & Fuller, G. M. (1998) Shedding of the soluble IL-6 receptor is triggered by Ca<sup>2+</sup> mobilization, while basal release is predominantly the product of differential mRNA splicing in THP-1 cells, *Eur J Immunol.* 28, 3514-22.
57. Jones, S. A., Novick, D., Horiuchi, S., Yamamoto, N., Szalai, A. J. & Fuller, G. M. (1999) C-reactive protein: a physiological activator of interleukin 6 receptor shedding, *J Exp Med.* 189, 599-604.

58. Mullberg, J., Durie, F. H., Otten-Evans, C., Alderson, M. R., Rose-John, S., Cosman, D., Black, R. A. & Mohler, K. M. (1995) A metalloprotease inhibitor blocks shedding of the IL-6 receptor and the p60 TNF receptor, *J Immunol.* *155*, 5198-205.
59. Vollmer, P., Walev, I., Rose-John, S. & Bhakdi, S. (1996) Novel pathogenic mechanism of microbial metalloproteinases: liberation of membrane-anchored molecules in biologically active form exemplified by studies with the human interleukin-6 receptor, *Infect Immun.* *64*, 3646-51.
60. Vollmer, P., Oppmann, B., Voltz, N., Fischer, M. & Rose-John, S. (1999) A role for the immunoglobulin-like domain of the human IL-6 receptor. Intracellular protein transport and shedding, *Eur J Biochem.* *263*, 438-46.
61. Walev, I., Vollmer, P., Palmer, M., Bhakdi, S. & Rose-John, S. (1996) Pore-forming toxins trigger shedding of receptors for interleukin 6 and lipopolysaccharide, *Proc Natl Acad Sci U S A.* *93*, 7882-7.
62. Paul, S. R., Bennett, F., Calvetti, J. A., Kelleher, K., Wood, C. R., O'Hara, R. M., Jr., Leary, A. C., Sibley, B., Clark, S. C., Williams, D. A. & et al. (1990) Molecular cloning of a cDNA encoding interleukin 11, a stromal cell- derived lymphopoietic and hematopoietic cytokine, *Proc Natl Acad Sci U S A.* *87*, 7512-6.
63. Du, X. & Williams, D. A. (1997) Interleukin-11: review of molecular, cell biology, and clinical use, *Blood.* *89*, 3897-908.
64. Du, X. X. & Williams, D. A. (1994) Interleukin-11: a multifunctional growth factor derived from the hematopoietic microenvironment, *Blood.* *83*, 2023-30.
65. Elias, J. A., Zheng, T., Einarsson, O., Landry, M., Trow, T., Rebert, N. & Panuska, J. (1994) Epithelial interleukin-11. Regulation by cytokines, respiratory syncytial virus, and retinoic acid, *J Biol Chem.* *269*, 22261-8.
66. Elias, J. A., Tang, W. & Horowitz, M. C. (1995) Cytokine and hormonal stimulation of human osteosarcoma interleukin-11 production, *Endocrinology.* *136*, 489-98.
67. Karow, J., Hudson, K. R., Hall, M. A., Vernallis, A. B., Taylor, J. A., Gossler, A. & Heath, J. K. (1996) Mediation of interleukin-11-dependent biological responses by a soluble form of the interleukin-11 receptor, *Biochem J.* *318*, 489-95.
68. Neben, S. & Turner, K. (1993) The biology of interleukin 11, *Stem Cells.* *11 Suppl 2*, 156-62.
69. Quesniaux, V. F., Mayer, P., Liehl, E., Turner, K., Goldman, S. J. & Fagg, B. (1993) Review of a novel hematopoietic cytokine, interleukin-11, *Int Rev Exp Pathol.* *34*, 205-14.
70. Yang, Y. C. & Yin, T. (1992) Interleukin-11 and its receptor, *Biofactors.* *4*, 15-21.
71. Yang, Y. C. (1993) Interleukin 11: an overview, *Stem Cells.* *11*, 474-86.
72. Baumann, H. & Schendel, P. (1991) Interleukin-11 regulates the hepatic expression of the same plasma protein genes as interleukin-6, *J Biol Chem.* *266*, 20424-7.
73. Teramura, M., Kobayashi, S., Hoshino, S., Oshimi, K. & Mizoguchi, H. (1992) Interleukin-11 enhances human megakaryocytopoiesis in vitro, *Blood.* *79*, 327-31.
74. Keller, D. C., Du, X. X., Srour, E. F., Hoffman, R. & Williams, D. A. (1993) Interleukin-11 inhibits adipogenesis and stimulates myelopoiesis in human long-term marrow cultures, *Blood.* *82*, 1428-35.

75. Musashi, M., Yang, Y. C., Paul, S. R., Clark, S. C., Sudo, T. & Ogawa, M. (1991) Direct and synergistic effects of interleukin 11 on murine hemopoiesis in culture, *Proc Natl Acad Sci U S A*. 88, 765-9.
76. Quesniaux, V. F., Clark, S. C., Turner, K. & Fagg, B. (1992) Interleukin-11 stimulates multiple phases of erythropoiesis in vitro, *Blood*. 80, 1218-23.
77. Anderson, K. C., Morimoto, C., Paul, S. R., Chauhan, D., Williams, D., Cochran, M. & Barut, B. A. (1992) Interleukin-11 promotes accessory cell-dependent B-cell differentiation in humans, *Blood*. 80, 2797-804.
78. Romas, E., Udagawa, N., Zhou, H., Tamura, T., Saito, M., Taga, T., Hilton, D. J., Suda, T., Ng, K. W. & Martin, T. J. (1996) The role of gp130-mediated signals in osteoclast development: regulation of interleukin 11 production by osteoblasts and distribution of its receptor in bone marrow cultures, *J Exp Med*. 183, 2581-91.
79. Booth, C. & Potten, C. S. (1995) Effects of IL-11 on the growth of intestinal epithelial cells in vitro, *Cell Prolif*. 28, 581-94.
80. Potten, C. S. (1996) Protection of the small intestinal clonogenic stem cells from radiation-induced damage by pretreatment with interleukin 11 also increases murine survival time, *Stem Cells*. 14, 452-9.
81. Mehler, M. F., Rozental, R., Dougherty, M., Spray, D. C. & Kessler, J. A. (1993) Cytokine regulation of neuronal differentiation of hippocampal progenitor cells, *Nature*. 362, 62-5.
82. Tepler, I., Elias, L., Smith, J. W., 2nd, Hussein, M., Rosen, G., Chang, A. Y., Moore, J. O., Gordon, M. S., Kuca, B., Beach, K. J., Loewy, J. W., Garnick, M. B. & Kaye, J. A. (1996) A randomized placebo-controlled trial of recombinant human interleukin- 11 in cancer patients with severe thrombocytopenia due to chemotherapy, *Blood*. 87, 3607-14.
83. Ohsumi, J., Miyadai, K., Kawashima, I., Ishikawa-Ohsumi, H., Sakakibara, S., Mita-Honjo, K. & Takiguchi, Y. (1991) Adipogenesis inhibitory factor. A novel inhibitory regulator of adipose conversion in bone marrow, *FEBS Lett*. 288, 13-6.
84. Czupryn, M., Bennett, F., Dube, J., Grant, K., Scoble, H., Sookdeo, H. & McCoy, J. M. (1995) Alanine-scanning mutagenesis of human interleukin-11: identification of regions important for biological activity, *Ann N Y Acad Sci*. 762, 152-64.
85. Czupryn, M. J., McCoy, J. M. & Scoble, H. A. (1995) Structure-function relationships in human interleukin-11. Identification of regions involved in activity by chemical modification and site-directed mutagenesis, *J Biol Chem*. 270, 978-85.
86. Grotzinger, J., Kurapkat, G., Wollmer, A., Kalai, M. & Rose-John, S. (1997) The family of the IL-6-type cytokines: specificity and promiscuity of the receptor complexes, *Proteins*. 27, 96-109.
87. Hudson, K. R., Vernallis, A. B. & Heath, J. K. (1996) Characterization of the receptor binding sites of human leukemia inhibitory factor and creation of antagonists, *J Biol Chem*. 271, 11971-8.
88. Panayotatos, N., Radziejewska, E., Acheson, A., Somogyi, R., Thadani, A., Hendrickson, W. A. & McDonald, N. Q. (1995) Localization of functional receptor epitopes on the structure of ciliary neurotrophic factor indicates a conserved, function-related epitope topography among helical cytokines, *J Biol Chem*. 270, 14007-14.

89. de Vos, A. M., Ultsch, M. & Kossiakoff, A. A. (1992) Human growth hormone and extracellular domain of its receptor: crystal structure of the complex, *Science*. 255, 306-12.
90. Somers, W., Ultsch, M., De Vos, A. M. & Kossiakoff, A. A. (1994) The X-ray structure of a growth hormone-prolactin receptor complex, *Nature*. 372, 478-81.
91. Schleinkofer, K., Dingley, A., Tacke, I., Federwisch, M., Müller-Newen, G., Heinrich, P. C., Vusio, P., Jacques, Y. & Grotzinger, J. (2001) Identification of the domain in the human interleukin-11 receptor that mediates ligand binding, *J Mol Biol*. 306, 263-74.
92. Arcone, R., Pucci, P., Zappacosta, F., Fontaine, V., Malorni, A., Marino, G. & Ciliberto, G. (1991) Single-step purification and structural characterization of human interleukin-6 produced in *Escherichia coli* from a T7 RNA polymerase expression vector, *Eur J Biochem*. 198, 541-7.
93. Dahmen, H. (1997) Definition der Kontaktstellen der gp130-Extrazellulärregion im Interleukin-11-Rezeptorkomplex, *Diplomarbeit, Institut für Biochemie, RWTH-Aachen*.
94. Weiergraber, O., Hemmann, U., Kuster, A., Müller-Newen, G., Schneider, J., Rose-John, S., Kurschat, P., Brakenhoff, J. P., Hart, M. H., Stabel, S. & et al. (1995) Soluble human interleukin-6 receptor. Expression in insect cells, purification and characterization, *Eur J Biochem*. 234, 661-9.
95. Sambrook, Fritsch & Maniatis. (2000) *Molecular cloning: A laboratory manual (Third Edition)*; Cold spring harbour, USA.
96. LaVallie, E. R., DiBlasio, E. A., Kovacic, S., Grant, K. L., Schendel, P. F. & McCoy, J. M. (1993) A thioredoxin gene fusion expression system that circumvents inclusion body formation in the *E. coli* cytoplasm, *Biotechnology (N Y)*. 11, 187-93.
97. Dahmen, H., Horsten, U., Kuster, A., Jacques, Y., Minvielle, S., Kerr, I. M., Ciliberto, G., Paonessa, G., Heinrich, P. C. & Müller-Newen, G. (1998) Activation of the signal transducer gp130 by interleukin-11 and interleukin-6 is mediated by similar molecular interactions, *Biochem J*. 331, 695-702.
98. Wagner, B. J., Hayes, T. E., Hoban, C. J. & Cochran, B. H. (1990) The SIF binding element confers sis/PDGF inducibility onto the c-fos promoter, *Embo J*. 9, 4477-84.
99. Wijdenes, J., Heinrich, P. C., Müller-Newen, G., Roche, C., Gu, Z. J., Clement, C. & Klein, B. (1995) Interleukin-6 signal transducer gp130 has specific binding sites for different cytokines as determined by antagonistic and agonistic anti-gp130 monoclonal antibodies, *Eur J Immunol*. 25, 3474-81.
100. Müller-Newen, G., Küster, A., Wijdenes, J., Schaper, F. & Heinrich, P. C. (2000) Studies on the interleukin-6-type cytokine signal transducer gp130 reveal a novel mechanism of receptor activation by monoclonal antibodies, *J Biol Chem*. 275, 4579-86.
101. Baumann, H., Wang, Y., Morella, K. K., Lai, C. F., Dams, H., Hilton, D. J., Hawley, R. G. & Mackiewicz, A. (1996) Complex of the soluble IL-11 receptor and IL-11 acts as IL-6-type cytokine in hepatic and nonhepatic cells, *J Immunol*. 157, 284-90.
102. Pflanz, S., Tacke, I., Grotzinger, J., Jacques, Y., Minvielle, S., Dahmen, H., Heinrich, P. C. & Müller-Newen, G. (1999) A fusion protein of interleukin-11 and soluble interleukin-11 receptor acts as a superagonist on cells expressing gp130, *FEBS Lett*. 450, 117-22.
103. Clackson, T. & Wells, J. A. (1995) A hot spot of binding energy in a hormone-receptor interface, *Science*. 267, 383-6.

104. Kalai, M., Montero-Julian, F. A., Grotzinger, J., Fontaine, V., Vandebussche, P., Deschuyteneer, R., Wollmer, A., Brailly, H. & Content, J. (1997) Analysis of the human interleukin-6/human interleukin-6 receptor binding interface at the amino acid level: proposed mechanism of interaction, *Blood*. 89, 1319-33.
105. Fuh, G., Cunningham, B. C., Fukunaga, R., Nagata, S., Goeddel, D. V. & Wells, J. A. (1992) Rational design of potent antagonists to the human growth hormone receptor, *Science*. 256, 1677-80.
106. Paonessa, G., Graziani, R., De Serio, A., Savino, R., Ciapponi, L., Lahm, A., Salvati, A. L., Toniatti, C. & Ciliberto, G. (1995) Two distinct and independent sites on IL-6 trigger gp 130 dimer formation and signalling, *Embo J*. 14, 1942-51.
107. Barton, V. A., Hudson, K. R. & Heath, J. K. (1999) Identification of three distinct receptor binding sites of murine interleukin-11, *J Biol Chem*. 274, 5755-61.
108. Neddermann, P., Graziani, R., Ciliberto, G. & Paonessa, G. (1996) Functional expression of soluble human interleukin-11 (IL-11) receptor alpha and stoichiometry of in vitro IL-11 receptor complexes with gp130, *J Biol Chem*. 271, 30986-91.
109. Gearing, D. P., Comeau, M. R., Friend, D. J., Gimpel, S. D., Thut, C. J., McGourty, J., Brasher, K. K., King, J. A., Gillis, S., Mosley, B., Ziegler, S. F. & Cosman, D. (1992) The IL-6 signal transducer, gp130: an oncostatin M receptor and affinity converter for the LIF receptor, *Science*. 255, 1434-7.
110. Savino, R., Ciapponi, L., Lahm, A., Demartis, A., Cabibbo, A., Toniatti, C., Delmastro, P., Altamura, S. & Ciliberto, G. (1994) Rational design of a receptor super-antagonist of human interleukin-6, *Embo J*. 13, 5863-70.
111. Ozbek, S., Grotzinger, J., Krebs, B., Fischer, M., Wollmer, A., Jostock, T., Mullberg, J. & Rose-John, S. (1998) The membrane proximal cytokine receptor domain of the human interleukin-6 receptor is sufficient for ligand binding but not for gp130 association, *J Biol Chem*. 273, 21374-9.

## 8. Anhang

### Verzeichnis der Abkürzungen

A	Ampere
AcNPV	nukleärer Polyhedrosisvirus des Insekts <i>Autographa californica</i>
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATCC	<i>American Tissue Type Culture Collection</i>
ATP	Adenosintriphosphat
bakt.	bakterielle
BSA	bovines Serumalbumin
BSF	<i>B-cell stimulation factor</i>
c	centi
°C	Grad Celsius
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CLC	<i>Cardiotrophin-like Cytokine</i>
CLF	<i>Cytokine-like Factor-1</i>
CNTF	<i>ciliary neurotrophic factor</i>
cpm	<i>counts per minute</i>
CRP	C-reaktives Protein
CSF	<i>Colony Stimulating Factor</i>
CT-1	Cardiotrophin-1
D	Domäne
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i>
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTT	1,4-Dithio-DL-treitöl
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
E	Extinktion
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
EMSA	<i>electrophoretic mobility shift assay</i>
Epo	Erythropoetin
Fab	<i>fragment antigen binding</i>
FACS	<i>fluorescence activated cell sorter</i>
FKS	fötales Kälberserum

g	Gramm
g	Gravitationskonstante (980 cm/s)
G-CSF	Granulozyten-CSF
GH	<i>growth hormone</i>
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-CSF
gp	Glykoprotein
Grb2	<i>growth factor binding protein 2</i>
h	Stunde
h	human
HBS	<i>HEPES buffered Saline</i>
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N`-2-ethansulfonsäure
HGF	<i>hepatocyte growth factor</i>
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
Jak	Janus Kinase
k	kilo
kDa	Kilodalton
l	Liter
LB	Luria-Bertani-Medium
LIF	<i>Leukemia Inhibitory Factor</i>
m	Meter
m	murin
m	milli
M	Molar
mAb	monoklonaler Antikörper
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MAPKK	<i>MAPK kinase</i>
M-CSF	Makrophagen-CSF
min	Minute
moi	<i>multiplicity of infection</i>
mRNA	<i>messenger ribonuclein acid</i>
n	nano
NF-IL-6	Nekrose-Faktor IL-6
NNT-1	<i>Novel Neurotrophin-1</i>
OD	Optische Dichte
OSM	Onkostatine M
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PDGF	<i>Platelet Derived Growth Factor</i>
PEG	Polyethylenglykol

PIAS	<i>protein inhibitor of activated STAT</i>
PI3K	Phosphatidylinositol 3 Kinase
PKB	Proteinkinase B
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PMA	Phorbol 13-Myristat 12-Acetat
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PRL	Prolaktin
PVDF	Polyvinyliden-Difluorid
PY	Phospho-Tyrosin
R	Rezeptor
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
rpm	<i>rounds per minute</i>
RT	Raumtemperatur
s	<i>soluble</i>
SCF	<i>stem cell factor</i>
SDS	Sodiumdodecylsulfat
sec	Sekunde
Sf	<i>Spodoptera frugiperda</i>
SH	<i>src homology</i>
SHP	<i>SH2-domain-containing tyrosine phosphatase</i>
SIE	<i>SIS inducible element</i>
SOE	<i>splicing by overlapping extension</i>
SOCS	<i>suppressor of cytokine signalling</i>
STAT	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription</i>
TAE	Tris/Essigsäure/EDTA
TBE	Tris/Borsäure/EDTA
TEMED	N; N; N'; N';-Tetramethyldiamin
TF	<i>tissue factor</i>
TGFβ	<i>Transforming Growth Factor β</i>
TIMP	<i>tissue inhibitor of metalloproteinases</i>
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
TPO	Thrombopoetin
Tris	Tris(hydroxy)aminomethan
Trx	Thioredoxin
U	<i>unit</i>
UV	Ultraviolett
v	viral
V	Volt
Vol	Volumen
X	beliebige Aminosäure
XTT	sodium 3'-[1-(phenylamino-carbonyl)-3,4-tetrazolium]-bis-(4-methoxy-6-nitro) benzen sulfonic acid hydrate
βc	<i>common β chain</i>
μ	mikro



## **Danksagung**

Herrn Prof. Dr. Peter C. Heinrich danke ich sehr herzlich für die Überlassung des Themas, sein Interesse am Fortgang meiner Arbeit und die mir in jeder Hinsicht gewährte Unterstützung.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Y. Jacques für die freundliche Aufnahme in seiner Arbeitsgruppe während der Zeit meines Auslandstipendiats und die Möglichkeit seine Laboreinrichtungen zu nutzen.

Herrn Prof. Dr. D. Enders danke ich für die Übernahme des Korreferats.

Herrn Priv.-Doz. Dr. Gerhard Müller-Newen danke ich für die Betreuung, viele hilfreiche Diskussionen und Unterstützung bei der Erstellung der vorliegenden Arbeit.

Dr. Joachim Grötzinger und K. Schleinkofer haben mit den Modellen des IL-11 und des ternären IL-11/IL-11R/gp130-Komplexes einen wesentlichen Teil zu dieser Arbeit beigetragen, wofür ich mich herzlich danken möchte.

Besonders möchte ich Andrea Küster für ihre stete Hilfsbereitschaft und tatkräftige Unterstützung danken.

Patricia Vusio danke ich für die Unterstützung bei der Durchführung der Oberflächen-Plasmonresonanzexperimente.

Ein Dankeschön auch Christa Gerlach für ihre Mühe mit den HepG2-Zellen, Hubert Szameit für die Lösung technischer Probleme, Marcel Robbertz für die Photoarbeiten und Simone Radtke für die Korrekturen.

Allen ehemaligen und derzeitigen KollegInnen einen Dank für die stete Hilfsbereitschaft und nette Atmosphäre.

## Lebenslauf

Ingrid Tacke  
Robensstr. 7  
52070 Aachen

Geboren: 11.06.1972 in Neuwied am Rhein

## Schulbildung

1978-1982 Grundschule St. Martin in Andernach/ Rheinland-Pfalz

1982-1991 Bertha von Suttner-Gymnasium in Andernach

06/1991 Abitur

## Universitäre Ausbildung

10/1991-09/1997 Studium der Chemie (Diplom) an der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule in Aachen (RWTH Aachen).

01/1997-03/1997 Forschungspraktikum am Institut für Biochemie der RWTH-Aachen

04/1997-09/1997 Diplomarbeit am Institut für Biochemie der RWTH-Aachen  
Titel der Diplomarbeit: *Struktur-/Funktionsuntersuchungen an humanem Interleukin-11*

09/2000-03/2001 Forschung am Institut national de la santé et de la recherche médicale in Nantes (Frankreich) im Rahmen der Promotion

10/1997-02/2002 Promotion am Institut für Biochemie der RWTH Aachen  
Titel der Promotion: *Struktur- und Funktionsuntersuchungen am humanen Interleukin-11-Rezeptorkomplex*

13/02/2002 Tag der mündlichen Doktorprüfung