

# **Herstellung und Charakterisierung hochaffiner Inhibitoren für die Zytokine IL-6 und LIF basierend auf den Liganden-bindenden Domänen ihrer Rezeptor-Untereinheiten**

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-Biologin

Silke Metz

aus Aachen

Berichter:

Professor Dr. Gerhard Müller-Newen

Universitätsprofessor Dr. Fritz Kreuzaler

Tag der mündlichen Prüfung: 23. März 2007

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Hochschulbibliothek online verfügbar.

## Veröffentlichungen

### Teile der vorliegenden Arbeit wurden veröffentlicht:

Metz, S., Wiesinger, M., Vogt, M., Lauks, H., Schmalzing, G., Heinrich, P. C. and Müller-Newen, G. (2007) *Characterization of the Interleukin (IL)-6 Inhibitor IL-6-RFP, Fused Receptor Domains act as High Affinity Cytokine-Binding Proteins*, **J Biol Chem** 282(2), 1238-48.

### Weitere Veröffentlichungen:

Pranada, A.L., Metz, S., Herrmann, A., Heinrich, P. C. and Müller-Newen, G. (2004) *Real-Time Analysis of STAT3 Nucleocytoplasmic Shuttling*, **J Biol Chem** 279, 15114-23.

Giese, B., Roderburg, C., Sommerauer, M., Wortmann, S.B., Metz, S., Heinrich, P. C. and Müller-Newen, G. (2005) *Dimerization of the Cytokine Receptors gp130 and LIFR analysed in Single Cells*, **J Cell Sci** 118, 5129-40.

## Inhaltsverzeichnis

<b>VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN</b> .....	<b>VI</b>
<b>1 EINLEITUNG</b> .....	<b>1</b>
1.1 DIE IL-6-TYP-ZYTOKINE: EIGENSCHAFTEN, REZEPTORKOMPLEXE, SIGNALTRANSDUKTION .....	1
1.1.1 Zytokine .....	1
1.1.2 IL-6-Typ-Zytokine .....	3
1.1.3 Die Rezeptoren der IL-6-Typ-Zytokine .....	4
1.1.4 Signaltransduktion der IL-6-Typ-Zytokine über den JAK-STAT-Signalweg .....	9
1.2 HEMMUNG VON IL-6-TYP-ZYTOKINEN: INHIBITOREN FÜR ANTI-ZYTOKIN-THERAPIEN ..	10
1.2.1 Dysreguliertes IL-6 kann chronische Entzündungen und Krebserkrankungen verursachen.....	10
1.2.2 Anti-Zytokin-Therapien .....	11
1.2.3 Die löslichen Rezeptoren sIL-6R $\alpha$ und sgp130 wirken antagonistisch auf die IL-6-Rezeptoraktivierung.....	11
1.2.4 Klonierung des IL-6-Inhibitors IL-6-RFP (IL-6-Rezeptor-Fusionsprotein) aus den Liganden-bindenden Domänen von gp130 und IL-6R $\alpha$ .....	13
1.2.5 Hemmung von Zytokinen, die ihren Rezeptorkomplex nur über die Rezeptorbindestellen II und III binden.....	14
1.3 ZIELSETZUNGEN DIESER ARBEIT .....	14
1.3.1 Biochemische Charakterisierung des IL-6-Inhibitors IL-6-RFP.....	14
1.3.2 Klonierung und Charakterisierung neuartiger <i>site</i> II/III-Zytokin-Inhibitoren am Beispiel von LIF .....	15
<b>2 MATERIAL UND METHODEN</b> .....	<b>16</b>
2.1 CHEMIKALIEN, ENZYME UND LÖSUNGEN .....	16
2.2 ZYTOKINE UND LÖSLICHE REZEPTOREN .....	16
2.3 ANTIKÖRPER .....	16
2.4 DNS .....	18
2.4.1 Plasmide und Vektoren .....	18
2.4.2 OLIGONUKLEOTIDE .....	22
2.5 PROKARYOTISCHE ZELLEN UND DEREN KULTIVIERUNG.....	23

---

2.5.1 Bakterienstämme .....	23
2.5.2 Kultivierung und Lagerung von Bakterien.....	24
2.6 PRÄPARATION UND ANALYSE VON PLASMID-DNS .....	24
2.6.1 Isolierung von Plasmid-DNS aus Bakterien.....	24
2.6.1.2 Präparation von Plasmid-DNS im kleinen Maßstab .....	24
2.6.1.2 Präparation von Plasmid-DNS im großen Maßstab .....	24
2.6.2 Bestimmung der Konzentration und Reinheit von Plasmid-DNS.....	24
2.6.3 DNS-Fällung .....	25
2.6.4 DNS-Restriktionsverdau .....	25
2.6.5 Dephosphorylierung linearisierter Plasmid-DNS.....	25
2.6.6 Auftrennung von DNS-Fragmenten mit TAE-Agarose-Gelelektrophorese.....	25
2.6.7 Isolierung von DNS-Fragmenten aus Agarosegelen.....	26
2.6.8 Ligation von DNS-Fragmenten.....	26
2.6.9 Transformation von Bakterien .....	26
2.6.9.1 Herstellung kompetenter Bakterien nach der Calciumchlorid-Methode....	26
2.6.9.2 Transformation kompetenter Bakterien .....	27
2.6.9.2 Transformation der TOP 10-Bakterien .....	27
2.6.10 Automatische DNS-Sequenzierung.....	27
2.6.11 Reverse Transkriptase (RT)-PCR.....	28
2.6.12 PCR .....	28
2.7 EUKARYOTISCHE ZELLINIEN UND DEREN KULTIVIERUNG .....	30
2.7.1 Permanente Zelllinien .....	30
2.7.2 Nährmedien und Lösungen für die Zellkultur.....	32
2.7.3 Kultivierung eukaryotischer Zelllinien .....	33
2.7.3.1. Kultivierung von Säuger-Zelllinien .....	33
2.7.3.2. Kultivierung von Insekten-Zelllinien.....	33
2.8 ZELLBIOLOGISCHE METHODEN .....	33
2.8.1 Proteinexpression in eukaryotischen Zelllinien .....	33
2.8.1.1 Transfektion von COS-7-Zellen mit der DEAE-Dextran-Methode.....	33
2.8.1.2 Transfektion von COS-7-Zellen mit Lipofectamine™ 2000.....	34
2.8.1.3 Transfektion von HepG2-Zellen mit FuGENE .....	34
2.8.1.4 Herstellung von stabilen Flp-In T-REx-293-Expressions-Zelllinien zur Produktion von LIF-RFPs .....	34

---

2.8.1.5 Expression von IL-6-RFP mit Hilfe von Baculovirus-infizierten Insektenzellen.....	35
2.8.2 Stimulation von HepG2- oder MEF-Zellen mit Zytokinen und Untersuchung der STAT3-Phosphorylierung mit oder ohne Zugabe von Zytokin-Inhibitoren ....	36
2.8.3 Reporter-gen-Assay .....	36
2.9 IMMUNOLOGISCHE UND PROTEINCHEMISCHE METHODEN .....	37
2.9.1 Herstellung von Zelllysaten .....	37
2.9.2 Immun-bzw. Koimmunpräzipitation von Proteinen aus Kulturüberständen .....	38
2.9.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese .....	39
2.9.4 Western <i>blotting</i> .....	39
2.9.5 ECL-Immundetektion.....	40
2.9.6 Blaue native Polyacrylamid-Gelelektrophorese (BN-PAGE) und Fluoreszenz-Detektion mit dem Fluoreszenz-scanner <i>Typhoon</i> .....	41
2.9.7 Silberfärbung.....	42
2.9.8 Produktion und Aufreinigung von YFP-IL-6 mit Affinitätschromatographie .....	42
2.9.9 Aufreinigung von IL-6-RFP mit Affinitätschromatographie .....	43
2.9.10 Gelfiltration .....	43
2.9.11 ELISA.....	44
2.9.11.1 ELISA zur Quantifizierung von YFP-IL-6 .....	44
2.9.11.2 ELISA zur Quantifizierung von IL-6-RFP.....	44
2.9.12 Fluoreszenz-Messung von YFP-IL-6 am Spektrometer.....	45
2.10 KONFOKALE MIKROSKOPIE LEBENDER ZELLEN .....	45
<b>3 ERGEBNISSE .....</b>	<b>46</b>
3.1 IL-6-RFP HEMMT DIE STAT3-AKTIVIERUNG UND DIE GEN-INDUKTION DES AKUT-PHASE PROTEINS $\alpha$ 2-MAKROGLOBULIN NACH IL-6-STIMULATION, JEDOCH NICHT NACH STIMULATION MIT DEN VERWANDTEN ZYTOKINEN OSM UND LIF .....	46
3.1.1 Produktion und Reinigung von IL-6-RFP .....	46
3.1.2 IL-6-RFP hemmt die IL-6-vermittelte Gen-Induktion des Akut-Phase-Proteins $\alpha$ 2-Makroglobulin Dosis-abhängig.....	48
3.1.3 OSM- oder LIF-vermittelte Gen-Induktion des Akut-Phase-Proteins $\alpha$ 2-Makroglobulin werden von IL-6-RFP nicht gehemmt.....	49

3.1.4 IL-6-RFP unterdrückt die IL-6-vermittelte Gen-Induktion auch bei gleichzeitiger Gabe von IL-6 und IL-6-RFP oder wenn IL-6-RFP kurz nach IL-6 zugegeben wird .....	51
3.1.5 IL-6-RFP unterdrückt die IL-6-induzierte STAT3-Phosphorylierung.....	52
3.2 UNTERSUCHUNG DER INTERAKTION ZWISCHEN YFP-IL-6 UND IL-6-RFP MIT HILFE VON FLUORESZENZ-GELSHIFT-ASSAYS.....	54
3.2.1 Produktion und Reinigung von YFP-IL-6.....	54
3.2.2 Blaue native PAGE (BN-PAGE): IL-6-RFP bindet YFP-IL-6 mit höherer Affinität als sIL-6R $\alpha$ oder die Kombination aus sIL-6R $\alpha$ und sgp130.....	56
3.2.3 IL-6 bildet mit IL-6-RFP einen stabileren Komplex aus als mit seinen löslichen Rezeptoren.....	58
3.2.3.1 BN-PAGE: Der Komplex aus IL-6-RFP und YFP-IL-6 ist unter denaturierenden Bedingungen stabiler als der Komplex aus YFP-IL-6/sIL-6R $\alpha$ /sgp130 .....	59
3.2.3.2 BN-PAGE: Verdrängung von YFP-IL-6 aus dem Komplex YFP-IL-6/IL-6-RFP oder dem Komplex YFP-IL-6/sIL-6R $\alpha$ /sgp130 durch IL-6.....	60
3.2.3.3 BN-PAGE: Direkter Vergleich der Bindungsaffinitäten zwischen IL-6-RFP und YFP-IL-6 mit den Bindungsaffinitäten zwischen sIL- 6R $\alpha$ /sgp130 und YFP-IL-6 .....	63
3.3 IL-6-RFP LÖST YFP-IL-6 AUS SEINEM REZEPTORKOMPLEX AUF DER ZELLOBERFLÄCHE.....	64
3.4 BESTIMMUNG DER MOLAREN MASSE DES KOMPLEXES AUS YFP-IL-6 UND IL-6-RFP DURCH GELFILTRATION.....	66
3.5 KLONIERUNG UND EXPRESSION VERSCHIEDENER FUSIONSPROTEINE BESTEHEND AUS DOMÄNEN DES mLIFR UND HGP130 ALS POTENTIELLE INHIBITOREN FÜR HUMANES LIF .....	70
3.6 DIE POTENTIELLEN, HUMANEN LIF-INHIBITOREN LIFR(D1-D5)-HGP130(D2-D3) UND LIFR(D1-D5) BINDEN hLIF AM EFFIZIENTESTEN.....	72
3.7 DIE DOMÄNEN D2 UND D3 VON HGP130 WERDEN IN EINEM HUMANEN LIF-INHIBITOR, DER AUF mLIFR BASIERT, NICHT BENÖTIGT .....	74
3.8 D2 UND D3 DES MURINEN GP130 ERHÖHEN DIE BINDUNGS-AFFINITÄT ZWISCHEN DEM MURINEN LIF-BINDENDEN PROTEIN (LBP) UND MURINEM LIF.....	75

---

3.9 LIFR(D1-D5) UND mLIF-RFP HEMMEN SPEZIFISCH DIE BIOAKTIVITÄTEN VON hLIF BZW. mLIF .....	78
3.9.1 Stabile Expression von LIFR(D1-D5) and mLIF-RFP in Hek 293 Flp-In T-REx-Zellen .....	78
3.9.2 LIFR(D1-D5) und mLIF-RFP hemmen die STAT3-Phosphorylierung nach Stimulation mit hLIF bzw. mLIF in MEF-Zellen .....	80
3.9.3 LIFR(D1-D5) hemmt nur humanes LIF und zeigt keine Kreuzreaktivität gegenüber mLIF .....	82
3.9.4 mLIF-RFP unterdrückt die STAT3-Phosphorylierung in MEF-Zellen nach Induktion mit dem zu LIF nahe verwandten Zytokin OSM nicht.....	83
3.9.5 LIFR(D1-D5) und mLIF-RFP unterdrücken die Geninduktion in MEF-Zellen nach Stimulation mit hLIF bzw. mLIF.....	84
<b>4 DISKUSSION .....</b>	<b>86</b>
4.1 BIOCHEMISCHE CHARAKTERISIERUNG DES IL-6-INHIBITORS IL-6-RFP.....	86
4.1.1 Wirkungsweise von IL-6-RFP .....	86
4.1.2 Architektur des Komplexes aus IL-6 und IL-6-RFP .....	89
4.2 KLONIERUNG UND CHARAKTERISIERUNG VON ZYTOKIN-INHIBITOREN FÜR HUMANES UND MURINES LIF .....	93
4.3 AUSBLICK.....	97
<b>5 ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE .....</b>	<b>99</b>
<b>6 LITERATURVERZEICHNIS .....</b>	<b>102</b>

## Verzeichnis der Abkürzungen

Abb.	Abbildung
Amp <sup>R</sup>	Ampicillin-Resistenz
ATP	Adenosintri-phosphat
BN-PAGE	blaue native PAGE
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
CBM	<i>cytokine binding module</i>
cDNS	<i>complementary DNS</i>
CFP	<i>cyan fluorescent protein</i>
CLC	<i>cardiotrophin-like cytokine</i>
CLF	<i>cytokine-like factor</i>
CNTF	<i>ciliary neurotrophic factor</i>
CT-1	Cardiotrophin-1
D	Domäne
dATP	Desoxyadenosintri-phosphat
dCTP	Desoxycytosintri-phosphat
DEAE	Diethylaminoethyl
dGTP	Desoxyguanosintri-phosphat
D-MEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtri-phosphat
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FKS	fötales Kälberserum
FN	Fibronektin
gp	Glykoprotein
Hek	<i>human embryonal kidney cells</i>

---

HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
id	internalisierungs-defizient
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IP	Immunpräzipitation
JAK	Janus Kinase
kD	Kilodalton
LB	Luria Bertani
LIF	<i>leukemia inhibitory factor</i>
LIFR	<i>leukemia inhibitory factor receptor</i>
LSM	<i>laser-scanning</i> Mikroskop
Luc	Luziferase
MEF	<i>murine embryonal fibroblasts</i>
m	murin
mRNS	<i>messenger</i> -Ribonukleinsäure
n	Anzahl
NP	Neuropoetin
OD	optische Dichte
OSM	Oncostatin M
p	phospho-
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PTB	<i>phosphotyrosine binding</i>
R	Rezeptor
RFP	Rezeptor-Fusionsprotein
RNS	Ribonukleinsäure
ROI	<i>region of interest</i>
rpm	<i>rounds per minute</i>
s	<i>soluble</i>

SDS	<i>sodium dodecylsulfate</i>
STAT	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
SH2	Src Homologie Domäne 2
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TNF	<i>tumor necrosis factor</i>
Tris	Trishydroxymethylaminoethan
U	<i>unit</i>
UV	ultraviolett
vgl.	vergleiche
WB	Western <i>blotting</i>
YFP	<i>yellow fluorescent protein</i>

# 1 Einleitung

## 1.1 Die IL-6-Typ-Zytokine: Eigenschaften, Rezeptorkomplexe, Signaltransduktion

### 1.1.1 Zytokine

#### *Eigenschaften von Zytokinen [1]*

Zytokine sind kleine, in der Regel sezernierte Proteine, von denen einige jedoch auch als membranständige Varianten vorkommen können. Sie werden von vielen verschiedenen Zelltypen in nahezu jedem Gewebe hergestellt. Zytokine dienen der Kommunikation zwischen Zellen und regulieren hierbei die Immunantwort, Entzündungsprozesse und die Bildung und Reifung der Blutzellen (Hämatopoese). Als Antwort auf Stimuli werden die entsprechenden Zytokine *de novo* produziert. Sie werden oft durch N- und/oder O-Glykosylierung und intramolekulare Disulfidbrücken stabilisiert. Zytokine wirken im Allgemeinen über kurze Distanzen und kurze Zeitintervalle in sehr niedrigen Konzentrationen (nano- bis picomolar). Sie beeinflussen Zellen durch Bindung an spezifische Membranrezeptoren, welche in den Zellen Signalkaskaden auslösen, die zu einem veränderten Profil der Genexpression führen. Diese veränderte Genexpression löst zum Beispiel eine Steigerung oder Verringerung der Expression von Membranrezeptoren aus, führt zur Zellproliferation, Differenzierung oder zur Sekretion von Effektormolekülen.

Zytokine können auf die Zellen wirken, von denen sie sezerniert werden oder auf Nachbarzellen des gleichen Zelltyps (autokrine Wirkung), auf Nachbarzellen eines anderen Zelltyps (parakrine Wirkung) oder auch auf weiter entfernte Zellen (endokrine Wirkung). In ihrer räumlichen Beziehung zwischen Entstehungs- und Wirkungsort unterscheiden sich die Zytokine weitestgehend von den glandulären Hormonen, wie Schilddrüsen- oder Steroidhormonen. Die Hormone werden in Drüsen von wenigen spezialisierten Zellen hergestellt und wirken fast ausschließlich endokrin, sie beeinflussen also nach Verbreitung über den Blutkreislauf weit entfernte Zielzellen.

Es ist möglich, dass verschiedene Zelltypen das gleiche Zytokin produzieren. Des Weiteren kann ein bestimmtes Zytokin mehrere verschiedene Zelltypen stimulieren und dort unterschiedliche Reaktionen auslösen. Diese Eigenschaft wird als Pleiotropie bezeichnet. Manchmal sind die Aktivitäten der Zytokine redundant, was bedeutet, dass ähnliche

Zellantworten von verschiedenen Zytokinen induziert werden. Zytokine werden oft in einer Kaskade produziert; ein Zytokin kann in seiner Zielzelle die Produktion weiterer Zytokine induzieren. Darüber hinaus können zwei oder mehr Zytokine synergistisch oder antagonistisch auf Zellen wirken.

### *Biologische Wirkungen der Zytokine auf ihre Zielzellen*

Die vielfältigen, biologischen Wirkungen von Zytokinen können in drei Hauptbereiche unterteilt werden:

- Regulation der angeborenen Immunantwort durch Koordination von Entzündungsreaktionen des Organismus. Hierbei aktivieren die Zytokine Phagozyten, induzieren die Synthese von Akut-Phase-Proteinen und führen zur Permeabilisierung des Endothels.
- Regulation der adaptiven Immunantwort auf bakterielle oder virale Infektionen. Hier steuern die Zytokine die Aktivierung, Differenzierung und Proliferation von B- und T-Zellen.
- Kontrolle der Hämatopoese, wobei die Zytokine die Entwicklung und Reifung unterschiedlicher Blutzellen aus hämatopoetischen Stammzellen vermitteln.

Daneben haben Zytokine wichtige Funktionen bei der Steuerung der Embryonalentwicklung und der Fertilität.

### *Klassifizierung der Zytokine*

Zytokine sind anhand verschiedener Merkmale klassifiziert worden. Sie wurden aufgrund ihrer biologischen Wirkungen den pro- oder anti-inflammatorischen Zytokinen zugeordnet. Weiterhin wurden sie hinsichtlich ihrer Rezeptoren oder ihrer drei-dimensionalen Struktur eingeteilt. Bazan [2] hat als erster die Zytokine, die eine Vier-Helix-Bündelstruktur aufweisen, zu einer Familie zusammengefasst. Eine Vier-Helix-Bündelstruktur ist charakterisiert durch vier in einem Bündel angeordnete  $\alpha$ -Helices, bezeichnet mit A, B, C und D, die durch Polypeptid-Schleifen in einer auf-auf-ab-ab Topologie miteinander verbunden sind. Die Mitglieder dieser Familie wurden später in kurz- und langkettige Vier-Helix-Bündel-Zytokine unterteilt [3]. Zu der letztgenannten Gruppe zählen neun Zytokine, die die Rezeptor-Untereinheit Glycoprotein (gp) 130 zur Signaltransduktion verwenden und als „IL-6-Typ-Zytokine“ [4] bezeichnet werden (Abb. 1). Da im Mittelpunkt der vorliegenden Arbeit die Hemmung zweier IL-6-Typ-Zytokine, nämlich Interleukin-6 (IL-6) und *leukemia*

*inhibitory factor* (LIF), steht, wird im Folgenden näher auf die Gruppe der IL-6-Typ-Zytokine eingegangen.

### **1.1.2 IL-6-Typ-Zytokine**

#### *Struktur und Wirkungen*

Die Familie der IL-6-Typ-Zytokine umfasst neun Polypeptide mit einer Größe von etwa 20-45 kD [4]. Hierzu zählen: IL-6, nach dem die Familie benannt wurde, IL-11, IL-27 [5], LIF, Oncostatin M (OSM), *ciliary neurotrophic factor* (CNTF), *cardiotrophin-1* (CT-1), *cardiotrophin-like cytokine* (CLC), [6], und Neuropoetin (NP) [7]. Alle Zytokine dieser Gruppe nutzen die Rezeptor-Untereinheit Glykoprotein 130 (gp130) zur Signaltransduktion [8, 9]. Die meisten IL-6-Typ-Zytokine sind sekretorische Proteine, die mit N-terminalen Signalpeptiden synthetisiert werden. Die Tertiärstrukturen von LIF [10], CNTF [11], OSM [12] und IL-6 [13, 14] sind mittels Röntgenstrukturanalyse oder NMR Spektroskopie aufgeklärt worden. Die Wirkungen der IL-6-Typ-Zytokine können sowohl pro- als auch anti-inflammatorisch sein. Die IL-6-Typ-Zytokine spielen eine wichtige Rolle bei der Akut-Phase-Reaktion, der Immunabwehr, der Hämatopoese, der Regeneration von Leber und Neuronen, der Embryonalentwicklung und der Fertilität [15].

#### *Interleukin-6*

IL-6 ist ein pleiotropes Zytokin, das viele verschiedene biologische Funktionen bei der Immunregulation, Hämatopoese, Entzündung, Wundheilung, dem Knochenmetabolismus und der Onkogenese ausübt. Es wird bei Infektionen und Verletzungen von unterschiedlichen Zelltypen sezerniert, nämlich von Makrophagen, Monozyten, Kupffer-Zellen, Neutrophilen, Mastzellen, B- und T-Zellen, Endothelzellen, Fibroblasten, Keratinozyten, vaskulären, glatten Muskelzellen, Osteoblasten und intestinalen Epithelzellen [16]. IL-6 kann sowohl pro- als auch anti-inflammatorisch wirken. Es ist der wichtigste Mediator bei der Induktion der Genexpression der Akut-Phase-Proteine, führt zur Differenzierung von B-Zellen zu Plasmazellen [17] und hat viele weitere Funktionen.

Es spielt darüber hinaus eine wichtige Rolle bei akuter Sepsis, chronisch-entzündlichen Erkrankungen, wie rheumatoider Arthritis und Morbus Crohn, sowie bei Autoimmunkrankheiten (z. B. multiple Sklerose), Krebserkrankungen (z. B. multiples Myelom) und der Castleman-Erkrankung [18, 19].

### *Leukemia inhibitory factor*

LIF wurde entdeckt, gereinigt und kloniert aufgrund seiner Fähigkeit, die Differenzierung der Monozyten-Zelllinie M1 *in vitro* zu reifen Makrophagen zu induzieren [20, 21]. Später wurde gezeigt, dass LIF eine Vielzahl von Funktionen in unterschiedlichen Zell-Typen ausübt, z.B. in Adipozyten, Hepatozyten, Megakaryozyten, Neuronen und Osteoblasten [22]. Des Weiteren verhindert LIF die Differenzierung von embryonalen Stammzellen [23, 24]. LIF spielt darüber hinaus eine wichtige Rolle bei der Implantation von Embryonen. Mäuse, in denen das LIF-Gen deletiert ist, sind nicht dazu fähig, ihre ansonsten normal entwickelten Blastozysten zu implantieren [25].

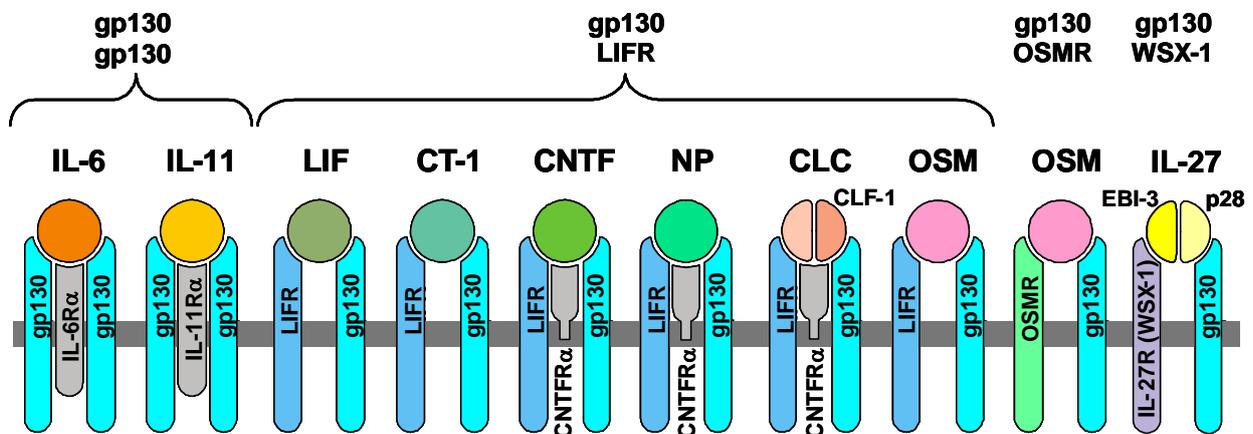
### **1.1.3 Die Rezeptoren der IL-6-Typ-Zytokine**

#### *Die verschiedenen Rezeptorkomplexe der IL-6-Typ-Zytokine*

IL-6-Typ-Zytokine wirken auf ihre Zielzellen durch die Bindung an spezifische Rezeptoren auf der Zelloberfläche. Diese Rezeptoren gehören zu den Typ-I-Membranproteinen, die durch einen extrazellulären N-Terminus, eine einzelne Transmembrandomäne und einen zytoplasmatischen C-Terminus gekennzeichnet sind. Eine Ausnahme bildet der CNTF-Rezeptor, der mit der Plasmamembran durch einen Glycosylphosphatidylinositol-Anker verbunden ist [26]. Alle Rezeptoren der IL-6-Typ-Zytokine gehören zur Familie der hämatopoetischen Zytokinrezeptoren. Die Rezeptoren dieser Familie besitzen mindestens ein Zytokin-bindendes Modul (*cytokine binding module*, CBM, [27]), das aus zwei Fibronektin-Typ-III-ähnlichen Domänen (FNIII-Domänen) besteht. Die N-terminale FNIII-Domäne enthält vier konservierte Cystein-Reste, während die C-terminale FNIII-Domäne ein WSXWS-Motiv besitzt [2]. Fast alle Rezeptoren der IL-6-Typ-Zytokine weisen eine Immunglobulin (Ig)-ähnliche Domäne auf, die entweder an ihren N-Termini oder, im Falle des LIFR und des OSMR, zwischen den beiden CBMs lokalisiert ist. Das N-terminale CBM des OSMR ist allerdings unvollständig. Die signaltransduzierenden Rezeptoren besitzen zusätzlich drei membran-proximale FNIII-Domänen. Zusätzlich gibt es nicht-signaltransduzierende Rezeptoren, die als  $\alpha$ -Rezeptoren bezeichnet werden. Sie binden an bestimmte Zytokine, welche dadurch erst eine Bindungsaffinität zu ihren signalweiterleitenden Rezeptoren erlangen. Verglichen mit den nicht-signalisierenden  $\alpha$ -Rezeptoren haben die signalweiterleitenden Rezeptoren einen bedeutend längeren zytoplasmatischen Teil, der ihre Funktion in der Signaltransduktion widerspiegelt (Abb. 1).

Da gp130 gemeinsamer Bestandteil aller Rezeptorkomplexe der IL-6-Typ-Zytokine ist [8], überschneiden sich die biologischen Wirkungen der verschiedenen Familienmitglieder [4].

Unterschiede werden jedoch durch die zusätzliche Rekrutierung spezifischer Rezeptorketten vermittelt (Abb. 1). IL-6 und IL-11 signalisieren über ein gp130-Homodimer [28, 29], während CNTF, LIF, CT-1, CLC und NP ein Heterodimer aus gp130 und LIFR rekrutieren. IL-27 nutzt ein Heterodimer aus gp130 und WSX-1 zur Signaltransduktion und OSM hat die besondere Eigenschaft, im humanen System sowohl über ein gp130/OSMR-Heterodimer als auch über ein gp130/LIFR-Heterodimer signalisieren zu können. Murines OSM kann hingegen nur das Rezeptorheterodimer aus gp130 und OSMR nutzen. Im Falle von IL-6, IL-11, CNTF, CLC und NP muss das entsprechende Zytokin an einen spezifischen  $\alpha$ -Rezeptor binden, bevor ein Komplex mit den signalisierenden Rezeptorketten gebildet werden kann. Die nicht-signalisierenden  $\alpha$ -Rezeptoren sind IL-6-Rezeptor  $\alpha$  (IL-6R $\alpha$ ) für IL-6 [30], IL-11R $\alpha$  für IL-11 [31], und CNTFR $\alpha$  für CNTF [26], CLC und NP [7]. Obwohl gp130 ubiquitär exprimiert wird, reagieren nur wenige Zellen auf eine Stimulation mit einem bestimmten IL-6-Typ-Zytokin. Das liegt daran, dass nur bestimmte Zelltypen die anderen Rezeptoruntereinheiten exprimieren und die Expression darüber hinaus stark reguliert werden [15]. Die membrangebundenen  $\alpha$ -Rezeptoren können jedoch durch lösliche Formen ersetzt werden, die proteolytisch durch so genanntes *shedding* [32] oder durch Translation alternativ gespleißter mRNS entstehen [33].

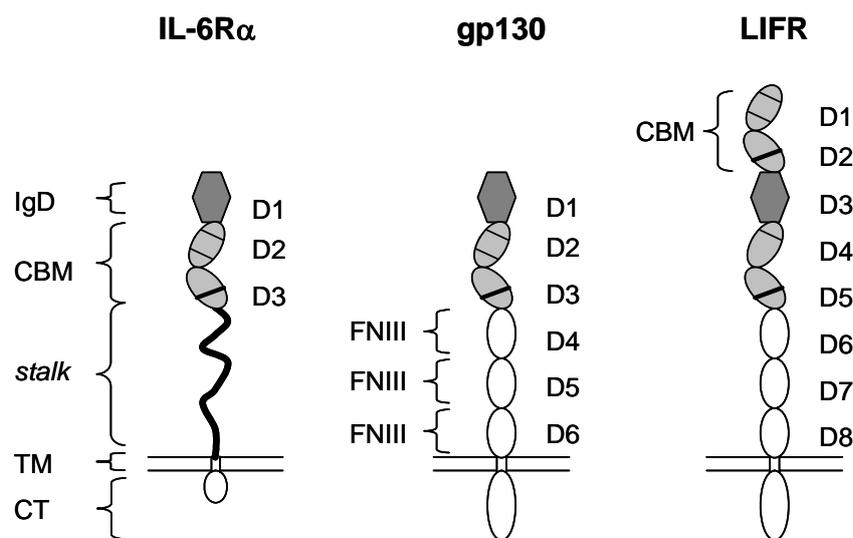


**Abb. 1: Schematische Darstellung der Rezeptorkomplexe der IL-6-Typ-Zytokine**

IL-6-Typ-Zytokine signalisieren über verschiedene Kombinationen aus gp130 und LIFR, OSMR, WSX-1, oder einem weiteren gp130-Molekül. Signalisierende Rezeptoren sind farbige, nicht signalisierende Rezeptoren sind grau dargestellt. Erläuterungen siehe Text (verändert nach [15]).

### Strukturen ausgewählter Rezeptoren der IL-6-Typ-Zytokine

Da sich die vorliegende Arbeit mit den Rezeptorkomplexen der Zytokine IL-6 und LIF befasst, werden nun die Rezeptoren genauer dargestellt, aus denen diese Komplexe bestehen. Wie im vorherigen Abschnitt beschrieben, setzt sich der Rezeptorkomplex für IL-6 aus IL-6R $\alpha$  und gp130 zusammen, während LIF über LIFR und gp130 signalisiert. In Abb. 2 sind die Domänenstrukturen dieser drei Rezeptoren dargestellt.



**Abb. 2: Domänenstrukturen von IL-6R $\alpha$ , gp130 und LIFR**

Dünne Querstriche repräsentieren Cysteinbrücken, dicke Querstriche ein WSXWS-Motiv. IgD = Immunglobulin-ähnliche Domäne, CBM = Zytokin-bindendes Modul, stalk = nicht strukturierte Region des IL-6R $\alpha$ , die das CBM mit der Membran verbindet, TM = Transmembranregion, CT = zytoplasmatischer Teil, FNIII = Fibronectin-Typ-III-ähnliche Domäne.

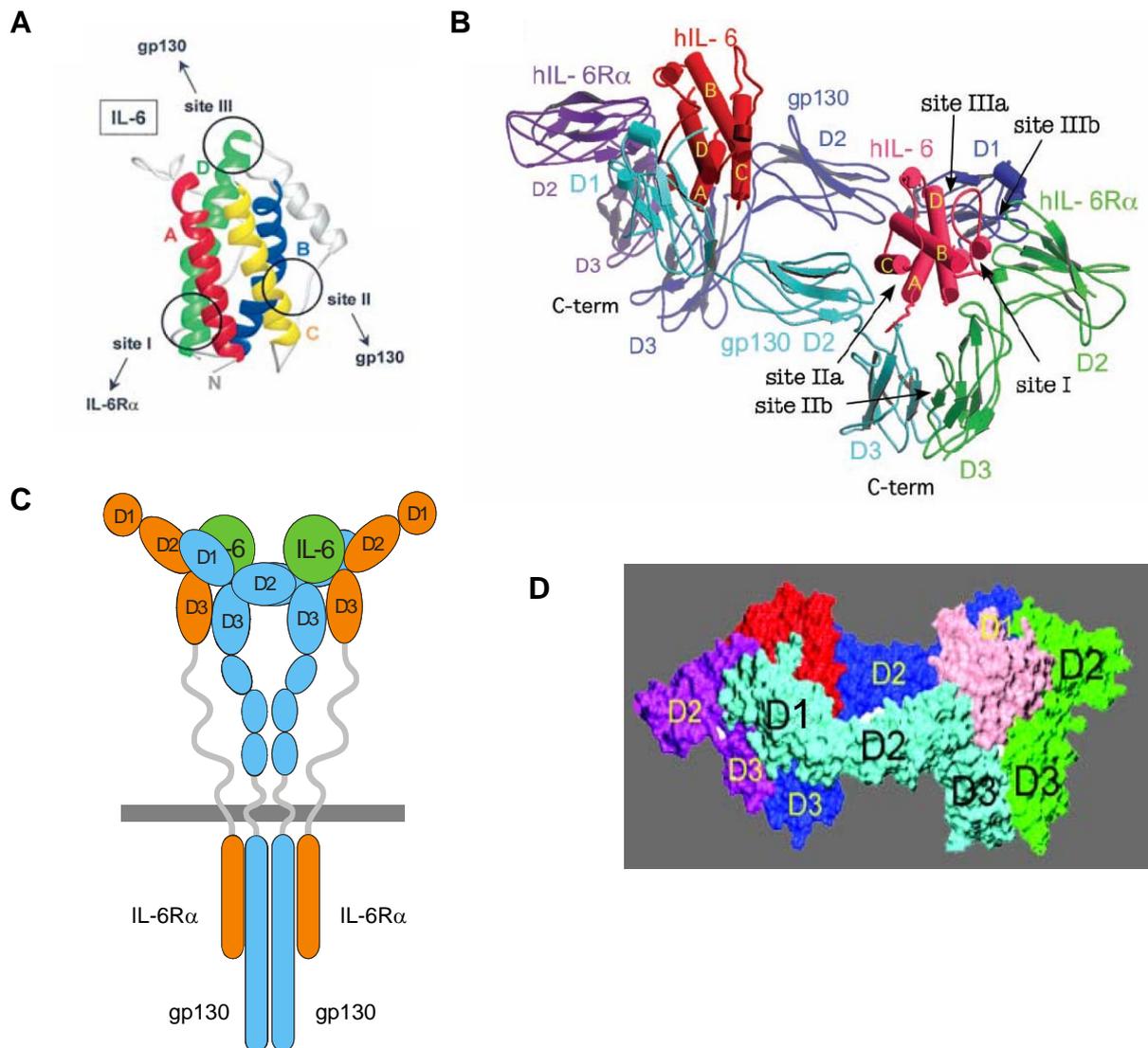
IL-6R $\alpha$  besitzt eine N-terminale Ig-ähnliche Domäne (Abb. 2), der ein CBM folgt. Das CBM ist über die nicht strukturierte so genannte *stalk*-Region mit der Transmembrandomäne verbunden. Der zytoplasmatische Teil des IL-6R $\alpha$  ist verglichen mit gp130 und LIFR sehr kurz. gp130 ähnelt strukturell dem IL-6R $\alpha$ , mit dem Unterschied, dass gp130 statt der *stalk*-Region drei FNIII-Domänen besitzt [34]. Der LIFR unterscheidet sich von gp130 durch ein zusätzliches N-terminales CBM und durch das Fehlen einer Cysteinbrücke in der N-terminalen Domäne des C-terminalen CBM (in D4 des LIFR).

### *Interaktionen zwischen IL-6-Typ-Zytokinen und ihren Rezeptoren*

Mutagenese-Studien an IL-6, CNTF und LIF (reviewed in [35, 36]) haben gezeigt, dass IL-6-Typ-Zytokine verschiedene Rezeptorbindungsstellen besitzen, die *sites* I, II und III genannt werden. Die IL-6-Typ-Zytokine können in solche unterteilt werden, die alle drei (I, II, III) oder nur zwei (II, III) Rezeptorbindungsstellen enthalten. *Site* I vermittelt die Bindung eines spezifischen  $\alpha$ -Rezeptors, während *site* II die universelle gp130-Bindungsstelle aller IL-6-Typ-Zytokine zu sein scheint. Je nach Zytokin wird die *site* III für die Rekrutierung von LIFR, OSMR oder eines zweiten gp130-Moleküls genutzt [4].

### *Der IL-6-Rezeptorkomplex*

IL-6 besitzt alle drei Rezeptorbindungsstellen (Abb. 3A, [36]). Der lösliche IL-6-Rezeptorkomplex besteht aus jeweils zwei Molekülen IL-6, IL-6R $\alpha$  und gp130, wie durch Röntgenstrukturanalyse des Komplexes aus humanem IL-6, dem CBM des humanen IL-6R $\alpha$  und der Ig-ähnlichen Domäne und dem CBM von gp130 belegt wurde (Abb. 3C-D, [37]). IL-6 bindet zuerst über seine *site* I [38] an IL-6R $\alpha$ , wobei die Bindungsaffinität zwischen IL-6 und IL-6R $\alpha$  9 nM beträgt [37]. Diese Bindung ist Voraussetzung für die folgende Bindung des Komplexes aus IL-6 und IL-6R $\alpha$  an gp130. IL-6 alleine bindet nicht an gp130. Dagegen hat der Komplex aus IL-6 und IL-6R $\alpha$  eine hohe Bindungsaffinität zu gp130 ( $K_D = 3$  nM, [37]); dies bedeutet, dass der Aufbau des IL-6-Rezeptorkomplexes kooperativ abläuft. Bei der Ausbildung des IL-6-Rezeptorkomplexes rekrutieren zwei IL-6/IL-6R $\alpha$ -Komplexe zwei gp130-Moleküle. Hierbei interagiert das CBM eines gp130-Moleküls mit der *site* II eines IL-6-Moleküls, die Ig-ähnliche Domäne desselben gp130-Moleküls bindet an das andere IL-6-Molekül über dessen *site* III [37, 39]. Das zweite gp130-Molekül lagert sich spiegelbildlich zum ersten über die freien *sites* II und III der IL-6/IL-6R $\alpha$ -Komplexe an. Während die *site* I nur aus einem Bindungssepitop besteht, sind die *sites* II und III aus je zwei Bindungssepitopen zusammengesetzt. *Site* II besteht aus dem Bindungssepitop IIa, das zwischen IL-6 und dem CBM von gp130 liegt, und dem Bindungssepitop IIb, das sich zwischen D3 von gp130 und D3 von IL-6R $\alpha$  ausbildet. Die *site* III ist aus dem Bindungssepitop IIIa, das zwischen IL-6 und der Ig-ähnlichen Domäne (D1) von gp130 liegt, und dem Bindungssepitop IIIb, das sich zwischen der D1 von gp130 und der D2 von IL-6R $\alpha$  ausbildet, zusammengesetzt. Folglich ergibt sich die in Abb. 3B dargestellte Struktur:



**Abb. 3: Räumliche Struktur von IL-6 und dem IL-6-Rezeptorkomplex**

**(A) Räumliche Struktur von IL-6 mit Rezeptorbindestellen [15]**

**(B) Räumliche Struktur des IL-6-Rezeptorkomplexes mit Darstellung der zusammengesetzten Rezeptorbindestellen, h = human, C-term = C-Terminus [37], nur die Ligandenbindenden Domänen von IL-6Rα und gp130 sind gezeigt**

**(C) Vereinfachte Darstellung der räumlichen Struktur des membranständigen IL-6-Rezeptorkomplexes in Anlehnung**

Einzelne Domänen von IL-6Rα sind in orange dargestellt, einzelne Domänen von gp130 in blau.

**(D) Modell des löslichen IL-6-Rezeptorkomplexes nach Röntgenstrukturanalyse [37]**

#### Der LIF-Rezeptorkomplex

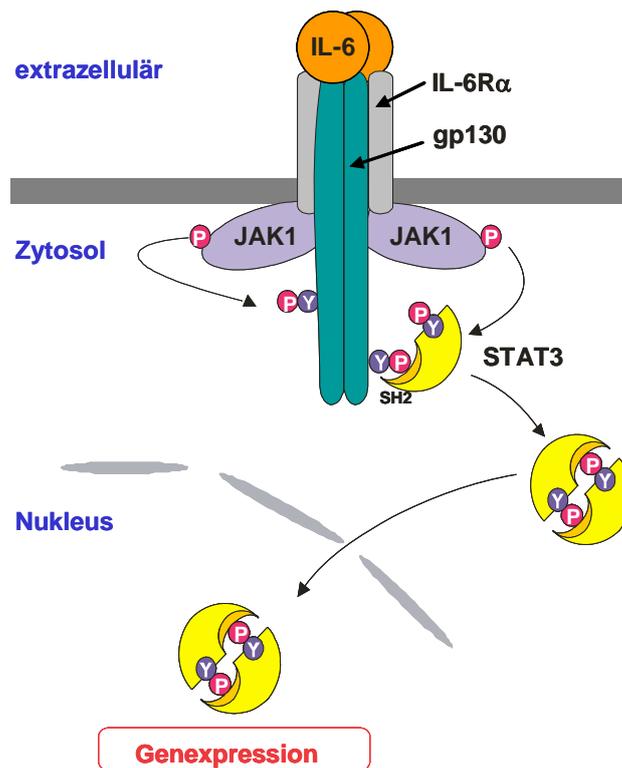
LIF besitzt nur zwei Rezeptorbindestellen, nämlich *sites* II und III. Es rekrutiert gp130 und LIFR und bildet einen heterotrimeren Rezeptorkomplex aus, wie durch Gelfiltration, native Gelelektrophorese, Sedimentations-Gleichgewicht-Analyse, Oberflächen-Plasmonresonanz-Spektroskopie und chemisches *cross-linking* gezeigt wurde [40]. LIF besitzt sowohl eine

Bindeaffinität für gp130 als auch für den LIFR. Aber erst durch Bindung von LIF an beide Rezeptorkomponenten bildet sich ein hoch-affiner Rezeptorkomplex aus. Mittels Röntgenstrukturanalyse wurde gezeigt, dass im Falle von gp130 das CBM zur Bindung von LIF ausreicht [41]. In der Literatur wird jedoch kontrovers diskutiert, welche Domänen des LIFR für die Bindung von LIF notwendig sind. Laut zwei Studien [42, 43] sind die Domänen D1-D5 des LIFR (Abb. 2) zur Bindung von LIF notwendig, während eine andere Studie besagt, dass das N-terminale CBM und die Ig-ähnliche Domäne des LIFR zur Ausbildung eines funktionellen LIFR-Komplexes ausreichen [44]. Im Gegensatz dazu nehmen He und seine Mitarbeiter an, dass LIF nur an die Ig-ähnliche Domäne und das C-terminale CBM des LIFR bindet, und dass das N-terminale CBM für die Bindung und Signalweiterleitung von CNTF benötigt wird [45, 46]. In einer weiteren Studie wird vorgeschlagen, dass LIF nur die Ig-ähnliche Domäne des LIFR bindet [41]. Welche These hiervon am ehesten zutrifft, ist nicht bekannt.

Bei der Interaktion zwischen LIF und LIFR gibt es einen ungewöhnlichen Fall der *cross*-Reaktivität zwischen verschiedenen Spezies. Während humanes LIF (hLIF) den humanen LIFR (hLIFR) mit einer Bindungsaffinität von 600-2000 pM bindet, bindet es an den murinen LIFR (mLIFR) mit einer sehr viel höheren Affinität von 10-20 pM. Dieses Phänomen wird hauptsächlich von der Ig-ähnlichen Domäne vermittelt [42].

#### **1.1.4 Signaltransduktion der IL-6-Typ-Zytokine über den JAK-STAT-Signalweg**

Die Bindung eines Zytokins an seinen Rezeptorkomplex induziert die Aktivierung der Rezeptor-assoziierten Janus-Kinasen (JAKs). Diese phosphorylieren daraufhin bestimmte Tyrosinreste in den zytoplasmatischen Domänen der Rezeptoren, wodurch Bindungsstellen für zytoplasmatische Proteine, wie Transkriptionsfaktoren oder Adapterproteine entstehen. Diese Proteine binden daraufhin über ihre PTB- oder SH2-Domänen an die phosphorylierten Tyrosine der Rezeptoren. Eine besondere Bedeutung haben hierbei Transkriptionsfaktoren der STAT (*signal transducer and activator of transcription*)-Familie. STATs werden nach Rezeptorbindung von den JAKs phosphoryliert, lösen sich von den Rezeptoren ab, bilden Homo- oder Heterodimere und wandern in den Zellkern. Dort aktivieren sie zusammen mit weiteren Faktoren bestimmte Zielgene (Abb. 4).



**Abb. 4: Der JAK-STAT-Signaltransduktionsweg am Beispiel von IL-6**

Nach Ausbildung des hexameren IL-6-Rezeptorkomplexes werden JAKs phosphoryliert, die Tyrosinreste im zytoplasmatischen Teil von gp130 phosphorylieren. STAT3 bindet mit seiner SH2 (src-homology 2)-Domäne an spezifische Phospho-Tyrosine des gp130 und wird von JAK1 phosphoryliert. Dies führt zur Ablösung und Dimerisierung von STAT3. STAT3-Dimere wandern in den Zellkern und induzieren die Expression bestimmter Gene (abgewandelt nach [4]).

## 1.2 Hemmung von IL-6-Typ-Zytokinen: Inhibitoren für Anti-Zytokin-Therapien

### 1.2.1 Dysreguliertes IL-6 kann chronische Entzündungen und Krebserkrankungen verursachen

Im vorherigen Teil wurden die vielfältigen Funktionen der Zytokine im gesunden Organismus beschrieben. Wenn Zytokine jedoch unkontrolliert exprimiert werden, kann dies verschiedene Krankheiten verursachen. Eine Fehlregulation der IL-6-Signaltransduktion spielt eine entscheidende Rolle bei chronisch-entzündlichen Erkrankungen (z. B. rheumatoide Arthritis, Morbus Crohn), post-menopausaler Osteoporose, akuter Sepsis, koronarer Herzerkrankung und multipler Sklerose. Darüber hinaus wirkt IL-6 als Wachstumsfaktor für Tumorzellen (z.B. beim multiplen Myelom und beim Prostatakarzinom). Wegen seiner Verwicklung in eine

solche Vielzahl von Erkrankungen ist IL-6 ein Zielprotein von Anti-Zytokin-Therapien geworden.

### 1.2.2 Anti-Zytokin-Therapien

Bei Anti-Zytokin-Therapien werden die Zytokine, die für die Aufrechterhaltung einer Krankheit verantwortlich sind, neutralisiert und so deren Rezeptorbindung und Signalweiterleitung verhindert. Um dies zu erreichen, wurden bereits mehrere Methoden angewendet:

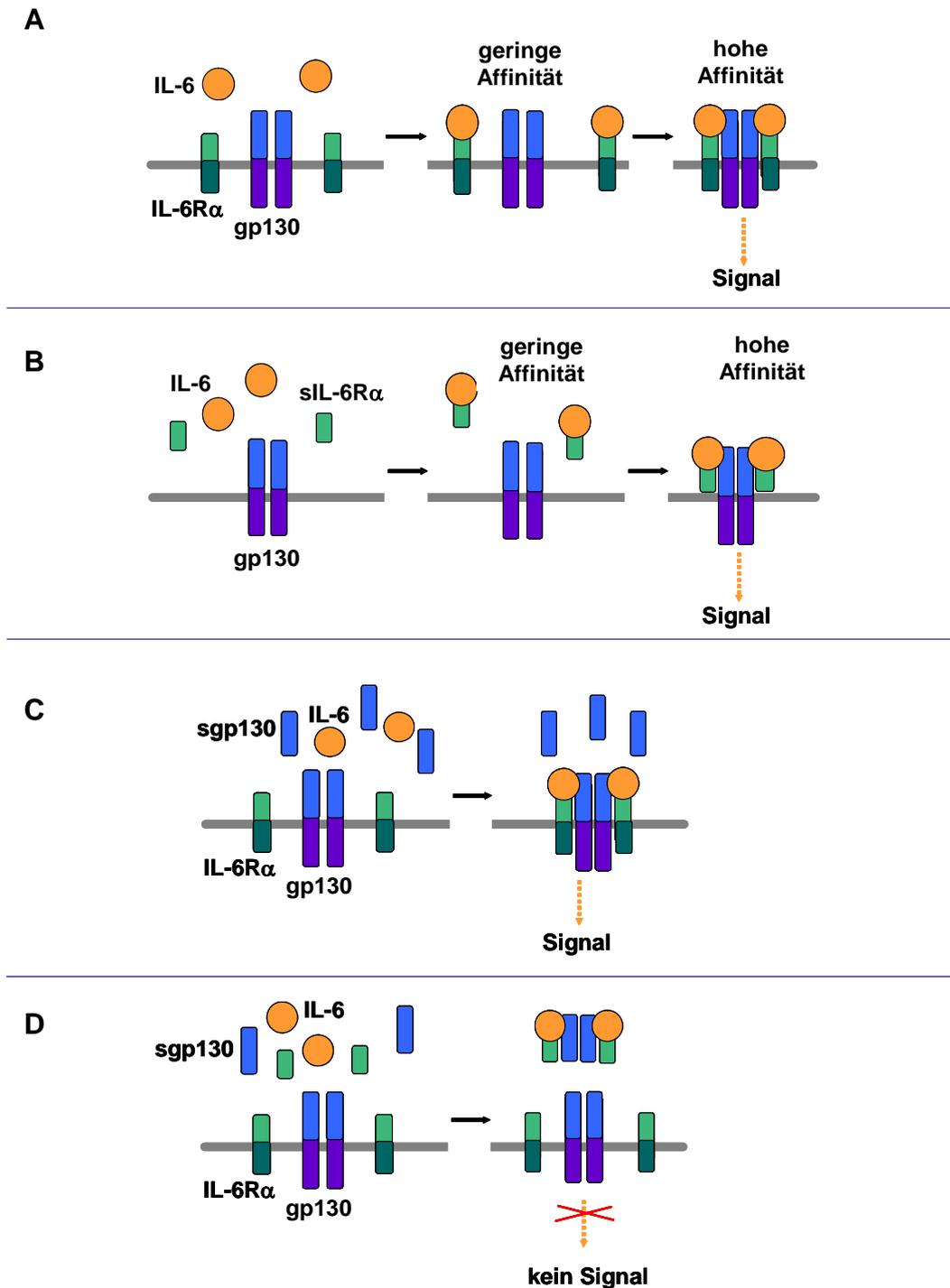
- Mutierte Zytokine, die als Rezeptorantagonisten wirken
- Monoklonale Antikörper, die Interaktionen zwischen Rezeptor und Zytokin blockieren
- Inhibitoren mit geringer Molmasse (sehr vorteilhaft, aber schwierig herzustellen)
- lösliche Zytokinrezeptoren

Sehr erfolgreich ist bisher die Anwendung löslicher Zytokinrezeptoren in Anti-Zytokin-Therapien. Lösliche Zytokinrezeptoren bestehen nur aus der Ektodomäne des Rezeptors und besitzen keine Transmembran- und zytoplasmatische Domäne. Sie binden das entsprechende Zytokin mit der gleichen Affinität und Spezifität wie die membranständigen Rezeptoren. Bei der Behandlung von chronisch-entzündlichen Erkrankungen wie rheumatoider Arthritis war der Einsatz eines dimeren, löslichen TNF-Rezeptors zur Neutralisierung erhöhter TNF-Konzentrationen ein Durchbruch auf diesem Gebiet [47].

Es wurde bereits versucht, IL-6 mit Rezeptorantagonisten oder neutralisierenden Antikörpern zu hemmen, was in einigen Fällen gelang [48, 49]. Eine Behandlung, die auf der Hemmung von IL-6 durch lösliche Rezeptoren basiert, könnte eine weitere Therapie-Möglichkeit für die Patienten werden, die auf die bisher entwickelten Inhibitoren nicht reagiert haben. IL-6 mit löslichen Rezeptoren zu hemmen, stellt eine Herausforderung dar, weil sein Rezeptorkomplex aus zwei unterschiedlichen Rezeptoren mit unterschiedlichen Affinitäten zu IL-6 besteht.

### 1.2.3 Die löslichen Rezeptoren *soluble IL-6R $\alpha$* (sIL-6R $\alpha$ ) und *soluble gp130* (sgp130) wirken antagonistisch auf die IL-6-Rezeptoraktivierung

Die Aktivierung des IL-6-Rezeptorkomplexes erfolgt in zwei Schritten (Abb. 5A). Zuerst bindet IL-6 mit geringer Affinität an den IL-6R $\alpha$ , danach rekrutieren je zwei Komplexe aus IL-6 und IL-6R $\alpha$  zwei gp130-Moleküle, wobei ein hoch-affiner, hexamerer Rezeptorkomplex aufgebaut wird.



**Abb. 5: Schematische Darstellung der Aktivierung des IL-6-Rezeptorkomplexes und deren Beeinflussung durch sIL-6R $\alpha$ , sgp130 und die Kombination aus sIL-6R $\alpha$  und sgp130**

**(A)** Die Aktivierung des IL-6-Rezeptorkomplexes erfolgt in zwei Schritten

**(B)** sIL-6R $\alpha$  wirkt agonistisch auf die Aktivierung des IL-6-Rezeptorkomplexes

**(C)** sgp130 hemmt die Aktivierung des IL-6-Rezeptorkomplexes nur schwach

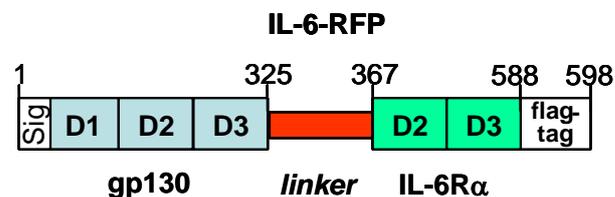
**(D)** sIL-6R $\alpha$  und sgp130 $\alpha$  zusammen wirken antagonistisch auf die Aktivierung des IL-6-Rezeptorkomplexes (verändert nach [50])

Zugabe von sIL-6R $\alpha$  zu IL-6 wirkt agonistisch auf die Rezeptoraktivierung (Abb. 5B, [51]), denn sIL-6R $\alpha$  bindet IL-6 bereits in Lösung. Zusammen mit IL-6 kann sIL-6R $\alpha$  als Koligand angesehen werden, der den membranständigen IL-6R $\alpha$  ersetzen kann. Lösliches gp130 hingegen wirkt sehr schwach antagonistisch auf die IL-6-Rezeptoraktivierung (Abb. 5C, [52]), da es IL-6 nicht abfangen kann. Die geringe antagonistische Wirkung von sgp130 wird in Anwesenheit von sIL-6R $\alpha$  um ein Vielfaches erhöht (Abb. 5D, [53]).

Sowohl sIL-6R $\alpha$  [33, 54] als auch sgp130 [52, 53] kommen in hohen Konzentrationen im menschlichen Blut vor (etwa 50 bzw. 300 ng/ml). Hier können sie als natürliche IL-6-Inhibitoren wirken, die systemische IL-6-Antworten unterdrücken [53].

#### 1.2.4 Klonierung des IL-6-Inhibitors IL-6-RFP (IL-6-Rezeptor-Fusionsprotein) aus den Liganden-bindenden Domänen von gp130 und IL-6R $\alpha$

Um durch sgp130 neutralisiert zu werden, muss IL-6 also erst an sIL-6R $\alpha$  binden. Ein Fusionsprotein aus gp130 und sIL-6R $\alpha$  würde demnach sicherstellen, dass der agonistische Komplex aus sIL-6R $\alpha$  und IL-6 sofort neutralisiert wird. Daher wurde in unserer Gruppe das Fusionsprotein IL-6-RFP kloniert, das aus den Liganden-bindenden Domänen von gp130 (D1-D3) und sIL-6R $\alpha$  (D2-D3) besteht, die über den linker *stalk-49* miteinander verbunden wurden (Abb. 6, [55]). Der linker *stalk-49* ist ein kurzes, flexibles Fragment des extrazellulären, membran-proximalen Teils von IL-6R $\alpha$ , das 49 Aminosäuren umfasst. Eine andere Gruppe zeigte zeitgleich mit unserer, dass durch die Fusion der beiden löslichen Rezeptoren sIL-6R $\alpha$  und sgp130 über den F<sub>c</sub>-Teil von Antikörpern ein potenter IL-6-Antagonist hergestellt werden kann [56].



**Abb. 6:** Schematische Darstellung der Struktur des IL-6-Inhibitors IL-6-RFP (Details siehe Text)

In unserer Gruppe wurde bereits gezeigt, dass IL-6-RFP ein hoch-potenter IL-6-Inhibitor ist, der nicht die Bioaktivität des nahe verwandten Zytokins IL-11 hemmt [55]. IL-11 signalisiert ebenfalls über ein gp130-Homodimer, wobei IL-11 vorher jedoch an sIL-11R $\alpha$  bindet. Darüber hinaus wurde die Wirkungsweise von IL-6-RFP noch nicht ausreichend untersucht.

Eine genauere biochemische Charakterisierung von IL-6-RFP wird in der vorliegenden Studie vorgestellt.

### **1.2.5 Hemmung von Zytokinen, die ihren Rezeptorkomplex nur über die Rezeptorbindestellen II und III binden**

Mit IL-6-RFP wurde ein Inhibitor geschaffen, der ein Zytokin bindet, das seine Rezeptoren über alle drei Rezeptorbindestellen (*sites* I, II und III) rekrutiert. Viele Zytokine, unter anderem aus der IL-6-Typ Zytokinfamilie, signalisieren jedoch über ein Rezeptor-Heterodimer, welches nur über die *sites* II und III der Zytokine gebunden wird. Sie besitzen keinen zu IL-6R $\alpha$  analogen  $\alpha$ -Rezeptor und scheinen deshalb auch keine *site* I aufzuweisen. Zu diesen Zytokinen gehören LIF, IL-27, GCSF, IL-12, IL-23, OSM, Leptin and IL-31 [57]. Wie diese Zytokine mit Hilfe von fusionierten, löslichen Rezeptoren gehemmt werden können, ist noch nicht bekannt. Der zweite Teil dieser Arbeit beschäftigt sich mit der Herstellung dieser Inhibitoren, die wir *site* II/III-Inhibitoren nennen.

## **1.3 Zielsetzungen dieser Arbeit**

### **1.3.1 Biochemische Charakterisierung des IL-6-Inhibitors IL-6-RFP**

Es wurde bereits von Ancy *et al.* [55] gezeigt, dass IL-6-RFP ein hoch-potenter IL-6-Inhibitor ist, der die Bioaktivität von IL-11 nicht hemmt. Während die Bedeutung der fusionierten Zytokinrezeptoren als Medikamente der Zukunft zwar erkannt wurde [58], wurde ihre Wirkungsweise jedoch bisher nicht in ausreichendem Maße untersucht. Deshalb sollte in der vorliegenden Arbeit IL-6-RFP unter verschiedenen Aspekten genauer analysiert werden. Zu diesem Zweck musste IL-6-RFP zuerst in Insektenzellen produziert und gereinigt werden. Danach sollte den folgenden Fragestellungen nachgegangen werden:

- Ist IL-6-RFP auch spezifisch gegenüber LIF und OSM?
- Wie stark ist die Interaktionen zwischen IL-6 und IL-6-RFP im Vergleich zur den Interaktionen zwischen IL-6 und den löslichen Rezeptoren sIL-6R $\alpha$  und sgp130? Zur Klärung dieser Frage sollte eine neue Methode angewendet werden, die native Gelelektrophorese mit fluoreszierenden Proteinen und Fluoreszenz-*scanning* verbindet.

- Ist es möglich, mittels konfokaler Mikroskopie an lebenden Zellen zu zeigen, dass IL-6-RFP das bereits an seinen Rezeptorkomplex auf der Zelle gebundene YFP-IL-6 wieder ablöst?
- Welche Stöchiometrie besitzt der Komplex aus IL-6 und IL-6-RFP? Dies sollte mit Gelfiltration und nativer Gelelektrophorese analysiert werden.

### **1.3.2 Klonierung und Charakterisierung neuartiger *site* II/III-Zytokin-Inhibitoren am Beispiel von LIF**

Als Prototypen für einen *site* II/III-Inhibitor sollte ein Inhibitor für LIF aus den extrazellulären Domänen von gp130 und LIFR hergestellt werden. Hierbei wurde unter anderem das Ziel verfolgt, das erlangte Wissen später auf andere Zytokine übertragen zu können. So könnten dann weitere Zytokin-Inhibitoren für Anti-Zytokin-Therapien hergestellt werden. Auch der LIF-Inhibitor selbst könnte bei der Bekämpfung von Haut-Tumoren eingesetzt werden, denn es wurde gezeigt, dass LIF eine Rolle bei deren Entwicklung spielt [59]. Bei diesem Projekt wurden die folgenden Ziele verfolgt:

- Bei der Herstellung eines LIF-Inhibitors sollte aufgeklärt werden, welche Domänen des LIFR zur LIF-Bindung notwendig sind. Hierzu gibt es in der Literatur verschiedene Hypothesen, die die Grundlage zur Klonierung mehrerer potentieller LIF-Inhibitoren darstellte. Für die Klonierung eines Inhibitors für humanes LIF machte man sich das ungewöhnliche Phänomen zunutze, dass humanes LIF an den murinen LIF-Inhibitor mit viel höherer Affinität bindet als an den humanen LIF-Inhibitor [42]. Die potentiellen Inhibitoren für humanes LIF sollten also auf mLIFR basieren.
- Darüber hinaus sollte ein Inhibitor für murines LIF hergestellt werden.
- Die Fähigkeiten der Inhibitoren für humanes und murines LIF, das LIF der entsprechenden Spezies zu binden, sollte zunächst in Koimmunpräzipitations-Studien analysiert werden.
- Anschließend sollte in Zellkulturexperimenten getestet werden, ob die Inhibitoren auch die Bioaktivität von LIF hemmen.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Chemikalien, Enzyme und Lösungen

Die verwendeten Chemikalien waren in der Regel von *pro analysi* Qualität. Enzyme wurden von den Firmen Roche Diagnostics GmbH (Mannheim), New England Biolabs (Frankfurt/Main), Fermentas GmbH (St. Leon-Rot) und Invitrogen GmbH (Karlsruhe) bezogen, soweit nicht anders im Text vermerkt. Alle wässrigen Lösungen wurden mit doppelt destilliertem Wasser hergestellt.

### 2.2 Zytokine und lösliche Rezeptoren

- IL-6            Rekombinantes, humanes IL-6 wurde nach der Methode von Arcone *et al.* [60] von A. Küster und B. Mütze (Institut für Biochemie, RWTH Aachen) hergestellt. Die spezifische Aktivität wurde in einem B9-Zell-Proliferations-Assay gemessen [61] und betrug  $2 \times 10^6$  BSF-2 (*B-cell stimulatory factor-2*) U/mg Protein.
- sIL-6R $\alpha$         Löslicher, humaner IL-6R $\alpha$  wurde von A. Küster und M. Kauffmann (Institut für Biochemie, RWTH Aachen) mit Hilfe des Baculovirus-Expressionssystems hergestellt [62].
- sgp130         Lösliches, humanes gp130 wurde von R&D Systems (Minneapolis, MN) bezogen.
- OSM            Humanes OSM wurde von Cell Concepts (Umkirch) bezogen.
- humanes LIF    Humanes LIF wurde von Chemicon (Temekula, CA) bezogen.
- murines LIF    Murines LIF wurde von Chemicon bezogen.

### 2.3 Antikörper

Antikörper	Beschreibung	erzeugt in	Firma	Verwendung
anti-Maus, HRP-konjugiert	polyklonal, hauptsächlich gegen den konstanten Bereich des Maus-IgG gerichtet	Ziege	Dako (Hamburg)	WB

anti-Kaninchen, HRP-konjugiert	polyklonal, hauptsächlich gegen den konstanten Bereich des Kaninchen-IgG gerichtet	Ziege	Dako (Hamburg)	WB
anti-Ziege, HRP-konjugiert	polyklonal, hauptsächlich gegen den konstanten Bereich des Ziege-IgG gerichtet	Kaninchen	Dako (Hamburg)	WB
<i>flag</i>	monoklonal	Maus	Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO)	WB, IP, ELISA
GFP (B-2): sc-9996	monoklonal	Maus	Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA)	WB
GFP	monoklonal	Maus	Rockland (Gilbertsville, PA)	WB, IP
IL-6R $\alpha$ (pak Liège)	polyklonal	Kaninchen		WB
gp130 (B-T2-biot)	monoklonal, gegen die erste Domäne des humanen gp130 gerichtet, biotinyliert in unserem Labor	Maus	Freundlicherweise von Dr. J. Wijdenes (Diaclone, Besançon, Frankreich) zur Verfügung gestellt	WB
IL-6 (mab 16)	polyklonal	Kaninchen		ELISA, WB
IL-6-biot	polyklonal, biotinyliert in unserem Labor	Kaninchen		ELISA
murines LIF	polyklonal	Ziege	Sigma-Aldrich	WB
humanes LIF	polyklonal	Kaninchen	Biodesign (Saco, ME)	WB, IP
humanes OSM	polyklonal	Ziege	R&D Systems	WB
STAT3 (C-20): sc-482	polyklonal, gegen C-Terminus von STAT3 gerichtet	Kaninchen	Santa Cruz Biotechnology	WB
STAT3 (H-190): sc-7179	polyklonal, gegen N-Terminus von STAT3 gerichtet	Kaninchen	Santa Cruz Biotechnology	WB
Phospho-Y705-STAT3	polyklonal, gegen p-Tyrosin(705)-Motiv von STAT3 gerichtet	Kaninchen	Cell Signaling (Danvers, MA)	WB

## 2.4 DNS

### 2.4.1 Plasmide und Vektoren

pSVL $\Delta$ EcoRI	eukaryotischer Expressionsvektor, enthält den Promotor des SV40-Virus, Amp <sup>R</sup> und den Replikationsursprung (ori) zur Replikation in Zellen, die das große T-Antigen exprimieren (Pharmacia, Freiburg), Schnittstelle für EcoRI entfernt
pSVL $\Delta$ EcoRI-IL-6-RFP	enthält cDNS für das IL-6-Rezeptor-Fusionsprotein aus humanem gp130 (D1-D3) und humanem IL-6R $\alpha$ (D2-D3), verbunden durch <i>linker stalk-49</i> , C-terminaler <i>flag-tag</i> [55]
pVL1392	auf Polyhedrinlokus basierender Baculovirus Transfervektor (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA)
pVL1392-IL-6-RFP	Baculovirus Transfervektor, der die cDNS für IL-6-RFP enthält [55]
BaculoGold <sup>TM</sup> -DNS	modifizierte AcNPV Baculovirus DNS, die eine letale Deletion enthält und nicht für ein lebensfähiges Virus kodiert; Kointransfektion der BaculoGold-DNS mit einem komplementären Baculovirus Transfervektor hebt die letale Deletion durch homologe Rekombination auf (BD Biosciences Pharmingen)

---

pGL3- $\alpha$ 2M-luc	enthält das Luziferase-Gen, welches durch den $\alpha$ 2-Makroglobulin-Promotor reguliert wird (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ)
pM67 SIE-TK-luc	enthält das Luziferase-Gen, welches durch den SIE-Thymidin-Kinase-Promotor reguliert wird
pCR(TM) <sub>3</sub> -lacZ	enthält cDNS für Galaktosidase, konstitutiv aktiver Promotor (Amersham Biosciences)
pSVL $\Delta$ EcoRI-LIFR(D1-D3)-hgp130(D2-D3)	enthält cDNS für das LIF-Rezeptor-Fusionsprotein aus murinem LIFR (D1-D3) und humanem gp130 (D2-D3), verbunden durch den <i>linker stalk-49</i> ; C-terminaler <i>flag-tag</i>
pSVL $\Delta$ EcoRI-LIFR(D3)-hgp130(D2-D3)	enthält cDNS für das LIF-Rezeptor-Fusionsprotein aus murinem LIFR (D3) und humanem gp130 (D2-D3), verbunden durch den <i>linker stalk-49</i> ; C-terminaler <i>flag-tag</i>
pSVL $\Delta$ EcoRI-LIFR(D1-D5)-hgp130(D2-D3)	enthält cDNS für das LIF-Rezeptor-Fusionsprotein aus murinem LIFR (D1-D5) und humanem gp130 (D2-D3), verbunden durch den <i>linker stalk-49</i> ; C-terminaler <i>flag-tag</i>
pcDNA5/FRT/TO-modifiziert	eukaryotischer Expressionsvektor, Tetracyclin-regulierter, hybrider CMV/TetO <sub>2</sub> -Promotor, Hyg <sup>R</sup> nur bei stabiler Integration in FRT-Sequenz, Amp <sup>R</sup> (Invitrogen), Polylinker

---

	modifiziert von H. Schmitz-Van-de-Leur (Institut für Biochemie, RWTH Aachen)
pcDNA5/FRT/TO-modifiziert-LIFR(D1-D5)- hgp130(D2-D3)	enthält cDNS für das LIF-Rezeptor- Fusionsprotein aus murinem LIFR (D1-D5) und humanem gp130 (D2-D3), verbunden durch den <i>linker stalk-49</i> ; C-terminaler <i>flag- tag</i>
pSVL $\Delta$ EcoRI-LIFR(D2-D4)- hgp130(D2-D3)	enthält cDNS für das LIF-Rezeptor- Fusionsprotein aus murinem LIFR (D2-D4) und humanem gp130 (D2-D3), verbunden durch den <i>linker stalk-49</i> ; C-terminaler <i>flag- tag</i>
pSVL $\Delta$ EcoRI-LIFR(D3-D5)- hgp130(D2-D3)	enthält cDNS für das LIF-Rezeptor- Fusionsprotein aus murinem LIFR (D3-D5) und humanem gp130 (D2-D3), verbunden durch den <i>linker stalk-49</i> ; C-terminaler <i>flag- tag</i>
pSVL $\Delta$ EcoRI-LIFR(D1-D5)	enthält cDNS für murinen LIFR (D1-D5), C- terminaler <i>flag-tag</i>
pcDNA5/FRT/TO-modifiziert-LIFR(D1-D5)	enthält cDNS für murinen LIFR (D1-D5), C- terminaler <i>flag-tag</i>
pSVL $\Delta$ EcoRI-mLIF-RFP	enthält cDNS für das LIF-Rezeptor- Fusionsprotein aus murinem LIFR (D1-D5) und murinem gp130 (D2-D3), verbunden durch den <i>linker AGS-41</i> ; C-terminaler <i>flag-</i>

---

	<i>tag</i>
pcDNA5/FRT/TO-modifiziert-mLIF-RFP	enthält cDNS für mLIF-RFP
pSVL $\Delta$ EcoRI-YFP-hLIF	enthält cDNS für ein Fusionsprotein aus YFP, humanem LIF und der Signalsequenz des humanen IL-6; freundlicherweise zur Verfügung gestellt von T. Recker (Institut für Biochemie)
pcDNA5/FRT/TO-modifiziert-YFP-hLIF	enthält cDNS für YFP-hLIF
pIB-YFP-mLIF	Insektenzell-Expressionsvektor, Amp <sup>R</sup> , enthält cDNS für ein Fusionsprotein aus YFP, humanem LIF und der Signalsequenz des humanen IL-6; freundlicherweise zur Verfügung gestellt von T. Recker (Institut für Biochemie)
pSVL $\Delta$ EcoRI-YFP-mLIF	enthält cDNS für YFP-mLIF
pcDNA5/FRT/TO-modifiziert-YFP-mLIF	enthält cDNS für YFP-mLIF
pOG44	enthält cDNS für die Flp Rekombinase, konstitutiv aktiver CMV-Promotor (Invitrogen)
PCR 2.1-TOPO	Vektor des TOPO TA Cloning-Kits (Invitrogen)
pSVL $\Delta$ EcoRI-gp130id-CFP	enthält cDNS für ein verkürztes

Fusionsprotein aus humanem gp130 und CFP, in dem Val1 von CFP direkt auf Pro668 von gp130 folgt, wodurch die Internalisierung von gp130id-CFP verhindert wird [63]

## 2.4.2 Oligonukleotide

Oligonukleotide wurden von MWG (Ebersberg) oder Eurogentec (Seraing, Belgien) bezogen.

1. mLIFR*Xba*I 5'-TCT AGA ATG GCA GCT TAC TCA TGG TG-3'
2. mLIFR*Xma*I 5'-CCC GGG CAG CTT CTG AGG AAC ATC G-3'
3. hgp130D2-D3*Nhe*I 5'-GCT AGC TCA GGC TTG CCT CCA GAA AAA CC-3'
4. hgp130D2-D3*Apa*I 5'-GGG CCC TGG TCT ATC TTC ATA GGT GAT CCC AC-3'
5. pSVL1240-1259s 5'-ACA ATG GTG AGA CAA GTA GC-3'
6. SIG(mLIFR)*Sac*I 5'-GCT AAG GAG CTC ACC GTT TGC ATG CAT CGT CAG-3'
7. mLIFRD3*Sac*I 5'-GCT AAG GAG CTC GAG ACT AAT GTT TTT CCT CAA GAC-3'
8. hgp130D2as 5'-AGG TTT TTC TGG AGG CAA GCC TGA-3'
9. mLIFRD1-D5*Xba*I 5'-GCT AAG TCT AGA ATG GCA GCT TAC TCA TGG TGG-3'
10. mLIFRD1-D5*Xma*I 5'-CTT AGC CCC GGG GTC TGG TCC CTT TGA AGG AG-3'
11. mLIFRD2-D4*Sac*I 5'-GCT AAG GAG CTC CCA GAG ACT CCC GAG ATC CTG-3'
12. mLIFRD2-D4*Xma*I 5'-AGC CTT CCC GGG CGA AGT CGG ATC ATG AGG AGC-3'
13. mLIFRD1-D5*Apa*I 5'-CTT AGC GGG CCC GTC TGG TCC CTT TGA AGG AG-3'
14. mgp130D2-D3*Nhe*I 5'-GCT AAG GCT AGC TCA GGC TTT CCT CCA GAT AAA CC-3'
15. mgp130D2-D3*Apa*I 5'-CTT AGC GGG CCC TGG TCT GTC TTC GTA TGT GG-3'
16. mLIFRFPse 5'-GCT AAG CTC GAG TCT AGA ATG GCA GCT TAC TCA TGG-3'

17. mLIFRFPase 5'-CTT AGC GAT ATC GGA TCC TCA CTT GTC ATC GTC GTC-3'
18. *sense* Primer (SP) 1.18 5'-CCT GTA CGG AAG TGT TAC-3'
19. *reverse* Primer (RP) 1.13 5'-CAC TGC ATT CTA GTT GTG G-3'
20. SP 1.65 5'-GTG AAC CGT CAG ATC GC-3'
21. RP 1.15 5'-AAC TAG AAG GCA CAG TCG-3'

**Die Primer wurden zur Klonierung folgender Konstrukte mittels PCR genutzt:**

Primer	Konstrukt
1, 2, 3, 4	pSVL $\Delta$ <i>Eco</i> RI-LIFR(D1-D3)- hgp130(D2-D3)
5, 6, 7, 8	pSVL $\Delta$ <i>Eco</i> RI-LIFR(D3)-hgp130(D2- D3)
9, 10	pSVL $\Delta$ <i>Eco</i> RI-LIFR(D1-D5)- hgp130(D2-D3)
5,6,11,12	pSVL $\Delta$ <i>Eco</i> RI-LIFR(D2-D4)- hgp130(D2-D3)
5, 6, 7, 12	pSVL $\Delta$ <i>Eco</i> RI-LIFR(D3-D5)- hgp130(D2-D3)
9, 15	pSVL $\Delta$ <i>Eco</i> RI-LIFR(D1-D5)
14, 15	pSVL $\Delta$ <i>Eco</i> RI-mLIF-RFP
16, 17	pcDNA5/FRT/TO-modifiziert-mLIF- RFP

## 2.5 Prokaryotische Zellen und deren Kultivierung

### 2.5.1 Bakterienstämme

- JM83 *E.-coli*-Bakterienstamm, der zur Klonierung und Amplifikation von Plasmid-DNS verwendet wurde
- XL1Blue *E.-coli*-Bakterienstamm, der zur Klonierung und Amplifikation von Plasmid-DNS verwendet wurde

Top 10 *E.-coli*-Bakterienstamm des *TOPO TA Cloning Kits*, genutzt zur Klonierung und Amplifikation der pCR2.1-TOPO-Plamid-DNS (Invitrogen)

### 2.5.2 Kultivierung und Lagerung von Bakterien

Die Bakterien wurden in LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin als Schüttelkultur oder auf Nährböden bei 37°C kultiviert. Stammkulturen wurden in LB-Medium mit 20% Glycerin bei -80°C gelagert.

LB-Medium	10 g/l NaCl
	10 g/l Trypton (Difco, Detroit, MI)
	5 g/l Hefeextrakt (Fluka, Buchs, Schweiz)
LB-Nährböden	LB-Medium + 15 g/l Agar (MP Biomedicals, Eschwege)

## 2.6 Präparation und Analyse von Plasmid-DNS

### 2.6.1 Isolierung von Plasmid-DNS aus Bakterien

#### 2.6.1.2 Präparation von Plasmid-DNS im kleinen Maßstab

Die Präparation von Plasmid-DNS in kleinen Mengen (5-15 µg) diente der Analyse rekombinanter Plasmide. Der Zellaufschluss der Bakterien und die Aufreinigung der Plasmid-DNS aus 3 ml Übernachtskultur erfolgten mit Hilfe des Plasmid-Minipräparationskits (Qiagen, Hilden) nach Protokoll des Herstellers. Die isolierte DNS wurde in Wasser aufgenommen.

#### 2.6.1.2 Präparation von Plasmid-DNS im großen Maßstab

Um Plasmid-DNS im präparativen Maßstab (50-750 µg) zur Transfektion eukaryotischer Zellen zu isolieren, wurden Übernachtskulturen von 150-500 ml mit Hilfe des Maxi- bzw. des HiSpeed-Maxi-Plasmidpräparationskits (Qiagen) nach Protokoll des Herstellers aufgearbeitet. Die isolierte DNS wurde in Wasser aufgenommen.

### 2.6.2 Bestimmung der Konzentration und Reinheit von Plasmid-DNS

Die Konzentration von Plasmid-DNS ließ sich anhand der Absorption bei  $\lambda = 260$  nm in einem UV-Photometer bestimmen. Eine Absorption  $A_{260\text{nm}} = 1$  entspricht 50 µg doppelsträngiger DNS. Zur Bestimmung der Reinheit der Plasmid-DNS wurde zusätzlich die Absorption bei  $\lambda = 280$  nm ermittelt. Bei reiner DNS liegt der Quotient  $A_{260\text{nm}} : A_{280\text{nm}}$

zwischen 1,7 und 2. Bei geringer DNS-Konzentration ( $<0,5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ ) diente zur Konzentrationsabschätzung eine Agarose-Gelelektrophorese. Hierbei wurde die Leuchtintensität der DNS-Bande mit der Leuchtintensität der Bande von DNS bekannter Konzentration verglichen.

### 2.6.3 DNS-Fällung

Plasmid-DNS wurde aus wässrigen Lösungen durch Zugabe von 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat (pH 4,6), 2,5 Volumen absolutem Ethanol und 30-minütiger Zentrifugation bei 13.000 rpm und  $4^{\circ}\text{C}$  gefällt. Nach Waschen der DNS mit 70% Ethanol und fünfminütiger Zentrifugation bei 13.000 rpm wurde sie getrocknet und in Wasser oder Puffer gelöst.

### 2.6.4 DNS-Restriktionsverdau

Plasmid-DNS wurde nach Standardvorschriften [64] mit Restriktionsendonukleasen verdaut. Hierbei wurden die Empfehlungen der Enzymhersteller berücksichtigt. In einen analytischen Restriktionsverdau wurden  $0,5\text{-}1 \mu\text{g}$  DNS eingesetzt, in einen präparativen  $2\text{-}5 \mu\text{g}$  DNS. Die Enzyme wurden möglichst im doppelten Überschuss zugegeben. Die Inkubationszeit lag bei 1-3 Stunden. Ein Restriktionsverdau mit zwei Enzymen erfolgte im selben Puffer, sofern die Pufferbedingungen beider Enzyme ähnlich waren. War dies nicht der Fall, wurde zuerst mit einem Enzym geschnitten, dann eine Ethanol-Fällung (2.6.3) durchgeführt und danach mit dem anderen Enzym verdaut.

### 2.6.5 Dephosphorylierung linearisierter Plasmid-DNS

Um eine Religation des Vektors zu vermeiden und das Einfügen von Fremd-DNS zu fördern, wurde, falls erforderlich, die endständige 5'-Phosphatgruppe des linearisierten Vektors entfernt. Hierzu wurde  $1 \mu\text{g}$  oder weniger linearisierter Vektor mit 1/10 Volumen 10x *antarctic phosphatase reaction buffer* und 5 U *antarctic phosphatase* (New England Biolabs) versetzt. Im Falle von 5'-Überhängen wurde dann für 15 min, im Falle von 3'-Überhängen für 60 min bei  $37^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Anschließend wurde die Phosphatase 5 min bei  $65^{\circ}\text{C}$  inaktiviert und der dephosphorylierte Vektor in die Ligation eingesetzt.

### 2.6.6 Auftrennung von DNS-Fragmenten mit TAE-Agarose-Gelelektrophorese

DNS-Fragmentgemische wurden nach Zusatz von 1/10 Volumen 10x-DNS-Probenpuffer im elektrischen Feld bei 100 V in einem 1% TAE-Agarose-Gel nach ihrer Größe aufgetrennt. Dem Agarose-Gel wurde  $0,2 \mu\text{g}/\text{ml}$  des in die DNS interkalierenden Fluoreszenzfarbstoffes

Ethidiumbromid zugegeben. Dadurch wurden die DNS-Banden im UV-Licht sichtbar. Als Größenmarker diente die *1 Kb DNA ladder* (Invitrogen).

10x-DNS-Probenpuffer	0,4% Xylencyanolblau 0,4% Bromphenolblau 25% Ficoll
TAE-Laufpuffer	0,04 M Tris-Base 0,02 M Essigsäure 1 mM EDTA
Agarose-Gel	TAE-Puffer mit 1% Agarose (SeaKem LE Agarose, Cambrex Bio Science, Verviers, Belgien)

### 2.6.7 Isolierung von DNS-Fragmenten aus Agarosegelen

DNS-Fragmente aus Restriktionen oder PCR-Amplifikationen wurden mit TAE-Agarose-Gelelektrophorese (2.6.6) aufgetrennt, aus der Gelmatrix ausgeschnitten und mittels *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen) aus der Gelmatrix isoliert.

### 2.6.8 Ligation von DNS-Fragmenten

Doppelsträngige DNS wurde mit T4-DNS-Ligase (Fermentas) ligiert. Hierbei wurden 50 ng des linearisierten Vektors mit einem dreifach molaren Überschuss des Inserts in Ligase-Puffer (enthält ATP, Fermentas) bei Raumtemperatur für eine Stunde mit 2,5 U Ligase inkubiert. Anschließend wurde die Ligase für 10 min bei 65°C inaktiviert. Die Ligationsansätze wurden nun mit 80 µl Wasser verdünnt und mit kompetenten Bakterien zur nachfolgenden Transformation (2.6.9) vermischt.

### 2.6.9 Transformation von Bakterien

#### 2.6.9.1 Herstellung kompetenter Bakterien nach der Calciumchlorid-Methode

500 ml LB-Medium wurden mit einer Übernacht-Vorkultur zu einer OD<sub>600</sub> von 0,02 angeimpft. Die Hauptkultur wurde bei 37°C in einem Schüttelinkubator bebrütet, bis eine OD<sub>600</sub> von 0,3 erreicht war. Ab dann erfolgten alle Schritte bei 4°C. Die Hauptkultur wurde 10 min bei 3.000g zentrifugiert, das Bakteriensediment in 125 ml 50 mM CaCl<sub>2</sub>-Lösung resuspendiert und 20 min in Eiswasser inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien 5 min

bei 3.000g zentrifugiert und das Sediment in 25 ml CaCl<sub>2</sub>-Lösung mit 10% Glycerin aufgenommen. Die kompetente Bakteriensuspension wurde in 400-µl-Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

### **2.6.9.2 Transformation kompetenter Bakterien**

100 µl kompetente Bakteriensuspension (2.6.9.1) wurde auf Eis aufgetaut, mit dem Ligationsansatz (2.6.8) oder 0,5 µg Plasmid-DNS vermischt und 30 min auf Eis inkubiert. Dann wurden das Gemisch zum Hitzeschock für 90 s bei 42°C inkubiert und 2 min auf Eis abgekühlt. Anschließend wurden 900 µl LB-Medium zupipettiert und die Bakterien 45 min bei 37°C bebrütet. Zur Selektion erfolgreich transformierter Bakterien wurden diese nun auf LB-Agar mit Ampicillin (2.5.2) ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Herangewachsene Bakterienkolonien wurden mittels Kolonie-PCR (2.6.13) oder DNS-Präparation (2.6.1.2) und Restriktionsverdau (2.6.4) analysiert.

### **2.6.9.2 Transformation der TOP 10-Bakterien**

TOP 10-Bakterien wurden entsprechend den Vorschriften des *TOPO TA Cloning Kits* (Invitrogen) transformiert. Zur Selektion erfolgreich transformierter Bakterien wurden diese auf LB-Agar mit Ampicillin (2.5.2) ausgestrichen. Dabei erfolgte eine Blau/Weiß-Selektion nach Herstellervorschrift. Die Bakterien wurden über Nacht bei 37°C inkubiert und herangewachsene, weiße Bakterienkolonien mittels DNS-Präparation (2.6.1.2) und Restriktionsverdau (2.6.4) analysiert.

### **2.6.10 Automatische DNS-Sequenzierung**

Das Prinzip der automatischen DNS-Sequenzierung nach Sanger [65] beruht auf dem Einbau fluoreszenzmarkierter Didesoxynukleotide in DNS-Moleküle während einer PCR. Der Einbau führt zum Kettenabbruch und gleichzeitig zur Markierung der DNS-Moleküle. Diese werden anschließend mit Kapillarelektrophorese getrennt und analysiert.

Für die PCR wurde der *Big Dye 1.1-Terminator-Mix* (PE Biosystems, Weiterstadt) verwendet. Sie wurde wie folgt angesetzt:

4 µl *Big Dye 1.1-Terminator-Mix*

0,5-1 µg doppelsträngige DNS

10 pmol Oligonukleotid

	ad 20 µl mit Wasser			
PCR-Reaktionszyklus:	20 s	96°C	erste Denaturierung	
	20 s	48-50°C	Hybridisierung	← 25 Zyklen
	240 s	60°C	Elongation	
	20 s	96°C	Denaturierung	
	240 s	60°C	letzte Elongation	

Nach Amplifikation wurde die DNS gefällt (2.6.3), gewaschen und das Sediment in *Template Suppression Reagent* (PE Biosystems) aufgenommen. Dann wurde die DNS 2 min bei 90°C denaturiert und mit Hilfe des ABIprism Modell 310 Sequenzierers (Applied Biosystems) nach Herstellerangaben analysiert.

### 2.6.11 Reverse Transkriptase (RT)-PCR

Aus Mäuseleber-Zellen isolierte Gesamt-mRNS wurde mittels *First strand cDNA synthesis kit for RT-PCR* (Roche) unter Verwendung der mitgelieferten *random* Primer in cDNS umgeschrieben. Der Reaktions-Zyklus verlief wie folgt: 10 min Denaturierung bei 25°C, 60 min Hybridisierung bei 42°C, 5 min Denaturierung bei 95°C und 5 min Abkühlung bei 4°C.

### 2.6.12 PCR

PCR-Reaktionen wurden wie folgt angesetzt:

- 500 ng DNS-Matrize
- 45 pmol *forward* Primer
- 45 pmol *reverse* Primer
- 100 mM dNTPs (je 25 mM dATP, dGTP, dCTP, dTTP)
- 5 µl 10x Taq-Polymerase-Puffer (New England Biolabs)
- 2,5 U Taq-Polymerase (New England Biolabs)
- ad 50 µl mit Wasser

PCR-Reaktionszyklus:	120 s	94°C	erste Denaturierung	
	90 s	#°C	Hybridisierung	← 30 Zyklen
	90 s	72°C	Elongation	
	60 s	94°C	Denaturierung	
	240 s	72°C	letzte Elongation	

# Die Temperatur hängt vom A/T- und G/C-Gehalt der hybridisierenden Sequenzen ab. Die Schmelzpunkte ( $T_m$ ) der Oligonukleotide wurden mit folgender Formel berechnet:

$$= (C + G) \times 4 + (A + T) \times 2$$

Als Hybridisierungstemperatur wurde eine gegenüber der berechneten Schmelztemperatur um einige Grade niedrigere Temperatur gewählt. Je näher diese an  $T_m$  lag, desto spezifischer hybridisierten die Oligonukleotide.

### 2.6.13 Kolonie-PCR

Um die von Bakterien aufgenommene Plasmid-DNS zu analysieren, wurde als Alternative zu DNS-Isolation und Restriktionsverdau eine Kolonie-PCR durchgeführt. Hierbei wurde die angewachsene Bakterienkolonie in 10 µl Wasser resuspendiert, durch Erhitzen auf 95°C für 5 min lysiert und das Lysat direkt in eine PCR mit spezifischen Primern eingesetzt. Als Kontroll-DNS wurden 1-2 ng des zu analysierenden Vektors mit einem anderen Insert eingesetzt. Folgende Primerpaare, die das Insert flankieren, wurden zu dessen Amplifikation benutzt: für pSVL SP 1.18 und RP 1.13, für pcDNA5 SP 1.65 und RP 1.15 (2.4.2).

Kolonie-PCR-Reaktionen wurden wie folgt angesetzt:

- 10 µl Bakterienlysate
- 15 pmol *forward* Primer
- 15 pmol *reverse* Primer
- 10 mM dNTPs (je 2,5 mM dATP, dGTP, dCTP, dTTP)
- 2,5 µl 10x Taq-Polymerase-Puffer
- 1,25 U Taq-Polymerase
- ad 25 µl mit Wasser

PCR-Reaktionszyklus:	60 s	94°C	erste Denaturierung	
	60 s	50°C	Hybridisierung	← 30 Zyklen
	* s	72°C	Elongation	
	60 s	94°C	Denaturierung	
	300 s	72°C	letzte Elongation	

\* 60 s pro 1.000 Basen

## 2.7 Eukaryotische Zelllinien und deren Kultivierung

### 2.7.1 Permanente Zelllinien

HepG2	adhärent wachsende, humane Leberkarzinom-Zelllinie (ATCC, Rockville, MD)
COS-7	adhärent wachsende Affennierenzellen, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. I. Kerr (London)
MEF	adhärent wachsende, murine, embryonale Fibroblasten-Zelllinie, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. B. Neel (Boston, USA)
Sf21	Zelllinie, die aus Ovargewebe von Larven des Schmetterlings <i>Spodoptera frugiperda</i> gewonnen wurde. Die Zellen wachsen adhärent als Monolayer (Invitrogen).
Sf158	weitere Zelllinie, die aus Ovargewebe von Larven des Schmetterlings <i>Spodoptera frugiperda</i> gewonnen wurde, kann im Gegensatz zu Sf21 ohne FKS kultiviert

	werden
<i>High-five-YFP-IL-6</i>	Die Ursprungszelllinie <i>High-five</i> (Invitrogen) wurde aus Eizell-Homogenaten von <i>Trichoplusia ni</i> gewonnen. <i>High-five-YFP-IL-6</i> -Zellen sezernieren durch stabile Transfektion konstitutiv YFP-IL-6.
Flp-In T-REx-293 <i>host cell line</i>	Die Ursprungszelllinie Hek ist eine adhären wachsende, humane, embryonale Nieren-Zelllinie, die mit humanem Adenovirus Typ 5 transformiert ist. Die daraus generierte Wirtszelllinie Flp-In T-REx-293 <i>host cell line</i> besitzt eine in das Genom integrierte FRT-Sequenz und exprimiert stabil den Tet-Repressor. Sie dient der Herstellung stabiler, induzierbarer Expressions-Zelllinien (Invitrogen).
Flp-In T-REx-293-LIFR(D1-D5)-hgp130(D2-D3)	aus Flp-In T-REx-293 <i>host cell line</i> generierte stabile Expressions-Zelllinie, die das Fusionsprotein LIFR(D1-D5)-hgp130(D2-D3) nach Doxycyclin-Induktion sezerniert
Flp-In T-REx-293-LIFR(D1-D5)	aus Flp-In T-REx-293 <i>host cell line</i> generierte stabile Expressions-Zelllinie, die LIFR(D1-D5) nach Doxycyclin-Induktion sezerniert
Flp-In T-REx-293-mLIF-RFP	aus Flp-In T-REx-293 <i>host cell line</i> generierte stabile Expressions-Zelllinie, die mLIF-RFP nach Doxycyclin-Induktion sezerniert

Flp-In T-REx-293-pcDNA5/FRT/TO-Leervektor	aus Flp-In T-REx-293 <i>host cell line</i> generierte stabile Expressions-Zelllinie, die zur Produktion von Kontrollüberständen mit dem Leervektor transfiziert wurde
Flp-In T-REx-293-YFP-hLIF	aus Flp-In T-REx-293 <i>host cell line</i> generierte stabile Expressions-Zelllinie, die YFP-hLIF nach Doxycyclin-Induktion sezerniert
Flp-In T-REx-293-YFP-mLIF	aus Flp-In T-REx-293 <i>host cell line</i> generierte stabile Expressions-Zelllinie, die YFP-mLIF nach Doxycyclin-Induktion sezerniert

### 2.7.2 Nährmedien und Lösungen für die Zellkultur

D-MEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) Flüssigmedium mit 4,5g/l Glukose, GlutaMAX I und Pyruvat	Gibco/Invitrogen
D-MEM:F12 (1:1) Flüssigmedium mit GlutaMAX I	Gibco/Invitrogen
Opti-MEM Flüssigmedium mit GlutaMAX I	Gibco/Invitrogen
Sf 900 II Flüssigmedium mit L-Glutamin	Gibco/Invitrogen
FKS, mykoplasmenfreies, fötales Kälberserum	CytoGen GmbH, Sinn-Fleisbach
Trypsin (500 mg/ml), EDTA (200 mg/ml)	Cambrex Bio Science
Penicillin (10.000 U/ml)/ Streptomycin (10 mg/ml)	Cambrex Bio Science
Blasticidin	Invitrogen
Doxycyclin	Sigma
Hygromycin B (50 mg/ml)	Perbio/HyClone, Logan, Utah
Zeocin (100 mg/ml)	Invitrogen

### 2.7.3 Kultivierung eukaryotischer Zelllinien

#### 2.7.3.1. Kultivierung von Säuger-Zelllinien

Die Zelllinien COS-7, MEF, Flp-In T-REx-293 *host cell line* und die verschiedenen Flp-In T-REx-293-Expressions-Zelllinien wurden in D-MEM (2.7.2) kultiviert, HepG2-Zellen in D-MEM:F12. Allen Medien wurde 10% Hitze-inaktiviertes FKS, 100 µg/ml Streptomycin and 100 U/ml Penicillin zugesetzt. Die Flp-In T-REx-293 *host cell line* wurde zusätzlich mit 100 µg/ml Zeocin und 10 µg/ml Blastocidin kultiviert, die Flp-In T-REx-293-Expressions-Zelllinien mit 50 µg/ml Hygromycin B und 10 µg/ml Blastocidin.

Alle Zellen wurden bei 37°C in einer Wasser-gesättigten Atmosphäre in 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Zur Weiterkultivierung wurden konfluente Zellen zur Entfernung von Medium-Resten mit PBS gewaschen, mit Trypsinlösung bei 37°C von den Kulturschalen abgelöst und mit frischem Medium abgespült. HepG2-Zellen wurden zur Vereinzelung mehrmals durch eine Kanüle gezogen. Anschließend wurden die Zellen mit frischem Medium 1:3 bis 1:20 verdünnt und auf neue Kulturschalen ausgesät. Für die Langzeitlagerung wurden die Zellen in D-MEM mit 20% FKS und 10% DMSO bei –80°C eingefroren und in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

#### 2.7.3.2. Kultivierung von Insekten-Zelllinien

*High-five*-YFP-IL-6-, sowie Sf21- und Sf158-Insektenzellen wurden bei 27°C in Sf-900II-Medium kultiviert. Dabei wurde dem Medium zur Kultivierung von Sf21 10% Hitze-inaktiviertes FKS zugesetzt, zur Kultivierung von *High-five*-YFP-IL-6 2 µg/ml Blastocidin. Zur Weiterkultivierung wurden konfluente Zellen mit Hilfe eines Zellschabers von den Kulturflaschen in 3 ml konditioniertem Medium abgelöst, mit frischem Medium 1:3 verdünnt und in neue Kulturflaschen ausgesät.

## 2.8 Zellbiologische Methoden

### 2.8.1 Proteinexpression in eukaryotischen Zelllinien

#### 2.8.1.1 Transfektion von COS-7-Zellen mit der DEAE-Dextran-Methode

Es wurde eine modifizierte Methode der Transfektion mit DEAE-Dextran angewendet. COS-7-Zellen wurden zu einem Bedeckungsgrad von 80-90% auf 78,5 cm<sup>2</sup> große Kulturschalen ausgesät. Am nächsten Tag wurden 10-20 µg DNS in 5 ml D-MEM ohne Zusätze verdünnt

und mit 2,5 ml D-MEM, das 6 µl Chloroquin (100 mM, Sigma) und 60 µl DEAE-Dextran (50 mg/ml, Amersham Biosciences) enthielt, vermischt. Nach Entfernen des Kulturmediums wurde das Gemisch tropfenweise auf die COS-7-Zellen gegeben, die dann unter Luftabschluss 75-90 min bei 37°C inkubiert wurden. Dann wurde zweimal mit PBS gewaschen und ein DMSO-Schock durchgeführt, bei dem die Zellen für eine Minute mit 10% DMSO in PBS inkubiert wurden. Nach erneutem zweimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen in D-MEM mit Zusätzen (2.7.3) kultiviert und nach Bedarf am nächsten Tag passagiert. Innerhalb von 48 Stunden wurden Proteine in ausreichenden Mengen exprimiert.

#### **2.8.1.2 Transfektion von COS-7-Zellen mit Lipofectamine™ 2000**

COS-7-Zellen wurden zu einem Bedeckungsgrad von 50-90% auf 78,5 cm<sup>2</sup> (oder 28 cm<sup>2</sup>) große Kulturschalen ausgesät. Am nächsten Tag wurden 0,5 ml Opti-MEM mit 20 µl Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen) gemischt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 10 µg (4 µg) DNS in 0,5 ml Opti-MEM verdünnt, zur Lipofectamine/Opti-MEM-Lösung pipettiert und für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die COS-7-Zellen wurden gewaschen und mit 9 ml (4 ml) D-MEM mit FKS aber ohne Antibiotika bedeckt. Das Transfektionsgemisch wurde tropfenweise zu den Zellen gegeben und diese über Nacht bei 37°C kultiviert. Am nächsten Tag wurden die Zellen passagiert (bzw. auf 42 mm Coverslips ausgesät) und in D-MEM mit Zusätzen (2.7.3) kultiviert. Innerhalb von 48 Stunden nach Transfektion wurden Proteine in ausreichenden Mengen exprimiert.

#### **2.8.1.3 Transfektion von HepG2-Zellen mit FuGENE**

Ein Transfektionsmix bestehend aus 4 µg DNS, 12 µl FuGENE 6 (Roche) und Opti-MEM *ad* 60 µl wurde vorbereitet und 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurden HepG2-Zellen mit PBS gewaschen und mit Trypsin von der Kulturschale gelöst. Sie wurden so in 10 ml Kulturmedium verdünnt, dass ihre Zieldichte 30% betrug. Zu dieser Zellsuspension wurde der vorbereitete Transfektionsmix pipettiert, Zellen und Transfektionsmix wurden gemischt und auf einer Kulturschale ausgesät. Am nächsten Tag wurden die Zellen passagiert.

#### **2.8.1.4 Herstellung von stabilen Flp-In T-REx-293-Expressions-Zelllinien zur Produktion von LIF-RFPs**

Zur Produktion von LIF-RFPs wurde das *Flp-In T-REx protein expression system* (Invitrogen) benutzt. Bei der Herstellung von stabilen Flp-In T-REx-293-Expressions-Zelllinien wurde

nach Anweisungen des Herstellers gearbeitet. Flp-In T-REx-293-Wirtszellen wurden mit 3,6 µg des Plasmids pOG44 (2.4.1) und 0,4 µg des Plasmids pcDNA5/FRT/TO-modifiziert (2.4.1), das die kodierende Sequenz für das gewünschte LIF-RFP enthielt, kotransfiziert. Die Kotransfektion wurde mit Hilfe von FuGENE 6 durchgeführt (2.8.1.3). 48 Stunden nach Transfektion wurden stabil transfizierte Zellen mit 50-200 µg/ml Hygromycin B selektiert. Einzelne Klone wurden expandiert und die Produktion des entsprechenden LIF-RFPs durch Inkubation der Zellen mit 10 ng/ml Doxycyclin für 24 Stunden induziert. Die Produktion des entsprechenden LIF-RFPs wurde durch Analyse der Zelllysate (2.9.1) und der Kulturüberstände der jeweiligen Expressions-Zelllinie mittels SDS-PAGE (2.9.3), Western blotting (2.9.4) und Immundetektion (2.9.5) überprüft. Zusätzlich wurden die LIF-RFPs aus den Überständen mittels *flag*-Antikörper präzipitiert (2.9.2) und ebenfalls mit SDS-PAGE, Western blotting und Immundetektion analysiert.

#### **2.8.1.5 Expression von IL-6-RFP mit Hilfe von Baculovirus-infizierten Insektenzellen**

Um IL-6-RFP mit Hilfe des Baculovirus-Expressionssystems zu produzieren, wurde nach Anweisungen des *baculovirus expression vector system manual* (BD Biosciences Pharmingen) gearbeitet. Hierbei wurde der Baculovirus Transfer Vektor pVL1392-IL-6-RFP (2.4.1) verwendet, der die kodierende Sequenz des IL-6-RFP enthielt. Sf21-Zellen wurden mit 4 µg dieses Vektors und 0,5 µg BaculoGold<sup>TM</sup>-DNS (2.4.1) kotransfiziert. Hierzu wurden  $2 \times 10^6$  Sf21-Zellen in 3 ml Kulturmedium in einer Kulturflasche mit 25 cm<sup>2</sup> Wachstumsfläche ausgesät. Nach Absetzen der Zellen wurde das Medium entfernt und 1 ml frisches Kulturmedium zugegeben. Die zu transfizierenden Plasmide wurden vermischt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurde 1 ml Transfektionspuffer zu den Plasmiden gegeben und das Gemisch tropfenweise zu den Zellen pipettiert, wobei die Kulturflasche geschwenkt wurde. Nach vierstündiger Inkubation mit dem Transfektionsgemisch bei 27°C wurden die Zellen mit Kulturmedium gewaschen und mit frischem Medium kultiviert. Waren nach einigen Tagen infizierte Zellen sichtbar, wurden einzelne Virus-Klone durch End-Punkt-Verdünnung des Zellüberstandes gewonnen und bezüglich ihrer Expression von IL-6-RFP in Sf21-Zellen mit ELISA (2.9.11.2) untersucht. Der ausgewählte Virusklon wurde dann durch Infektion von Sf158-Zellen vermehrt. Zur Proteinproduktion wurden exponentiell wachsende Sf158-Zellen mit Baculovirus-haltigen Zellkultur-Überständen infiziert. Nach drei Tagen wurde der IL-6-RFP-haltige Überstand geerntet und durch Zentrifugation und Sterilfiltration von Zellen und Zelltrümmern gereinigt.

Transfektionspuffer	25 mM Hepes (NaCl, NaOH) pH 7,1
	125 mM CaCl <sub>2</sub>
	140 mM NaCl

### **2.8.2 Stimulation von HepG2- oder MEF-Zellen mit Zytokinen und Untersuchung der STAT3-Phosphorylierung mit oder ohne Zugabe von Zytokin-Inhibitoren**

HepG2- oder MEF-Zellen wurden auf 6-*well*-Schalen (9,6 cm<sup>2</sup>/*well*) kultiviert. Im Falle von HepG2-Zellen wurden diese über Nacht in Hungermedium (D-MEM ohne Zusätze) gehalten. Dann wurden HepG2- oder MEF-Zellen mit dem entsprechenden Zytokin oder der Kombination aus Zytokin und Zytokin-Inhibitor für 20 min in Kulturmedium ohne FKS stimuliert. Anschließend wurden die Zellen lysiert (2.9.1) und die Lysate nach SDS-PAGE (2.9.3) und Western *blotting* (2.9.4) mit einem p-STAT3- oder STAT3-spezifischen Antikörper (2.3) analysiert.

### **2.8.3 Reporter-gen-Assay**

Zum Nachweis der STAT3-vermittelten Geninduktion wurde die Induktion eines Luziferase-Reportergens mit vorgeschaltetem, STAT3-abhängigen Promotor nach Zytokin-Stimulation in HepG2-Zellen untersucht. Hierzu wurden HepG2-Zellen auf 6-*well*-Schalen (9,6 cm<sup>2</sup>/*well*) kultiviert und transient mittels FuGENE (2.8.1.3) mit pGL3- $\alpha$ 2M-luc (2.4.1) und pCR(TM)<sub>3</sub>-lacZ (2.4.1) kotransfiziert. Um die STAT1- und STAT3-vermittelte Geninduktion in MEF-Zellen zu analysieren, wurde die Induktion eines Luziferase-Reportergens mit vorgeschaltetem, STAT1- und STAT3-abhängigen Promotor nach Zytokin-Stimulation untersucht. Hierzu wurden MEF-Zellen ebenfalls auf 6-*well*-Schalen kultiviert und transient mittels FuGENE mit pM67 SIE-TK-luc (2.4.1) und pCR(TM)<sub>3</sub>-lacZ kotransfiziert. Bei Verwendung von HepG2-Zellen wurden diese dann in FKS-freiem D-MEM für sechs Stunden gehungert und anschließend sowohl HepG2- als auch MEF-Zellen mit dem angegebenen Zytokin oder der Kombination aus Zytokin und Zytokin-Inhibitor für ca. 16 Stunden stimuliert. Danach wurden die Zellen mit Reporterlysispuffer aufgeschlossen und die Luziferase-Aktivität mit Hilfe des Luziferase-Assay-Kits (Promega, Madison, USA) nach Herstellerangaben bestimmt. Die Werte der Luziferase-Aktivität wurden durch Verrechnung mit der  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität, die ein Maß für die Transfektionseffizienz ist, normalisiert. Die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität wurde ermittelt, indem 100  $\mu$ l Zelllysate (oder Lysispuffer als Kontrolle) mit 500  $\mu$ l  $\beta$ -Gal-Mix und 100  $\mu$ l Ortho-Nitrophenyl-Galaktopyranosid (ONPG, 1

mg/ml in Wasser) vermischt und bei 37°C inkubiert wurden. Sobald sich das Gemisch gelb färbte, was einen Umsatz von ONPG zu Ortho-Nitrophenol anzeigt, wurde die Reaktion mit 250 µl 1 M Natriumcarbonat (pH 8) gestoppt. Durch photometrische Messung bei  $\lambda = 420$  nm wurde der Substratumsatz bestimmt, der ein Maß für die  $\beta$ -Galaktosidase-Aktivität ist.

5x Reporterlysispuffer	25 mM Tris-H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> , pH 7,8
	2 mM EDTA
	10% Glycerin
	1% Triton X-100
	vor Verwendung 1:5 mit Wasser verdünnt + 10 mM DTT
$\beta$ -Gal-Mix	60 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	40 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	1 mM KCl
	1 mM MgCl <sub>2</sub>
	3,9 ml/l $\beta$ -Mercaptoethanol

## 2.9 Immunologische und proteinchemische Methoden

### 2.9.1 Herstellung von Zelllysaten

Zur Herstellung von Lysaten wurden die Zellen in 0,1 bis 0,9 ml RIPA (*radioimmune precipitation assay*)-Lysispuffer nach Zusatz von Proteaseinhibitoren mit Hilfe eines Gummischabers von den Kulturschalen gelöst. Die Zellsuspension wurde dann für 30 min bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden Membranbestandteile durch Zentrifugation für 10 min bei 13.000 rpm abgetrennt und die Lysate bei -80°C gelagert.

RIPA-Lysispuffer	50 mM Tris-HCl, pH 7,4
	150 mM NaCl
	1 mM EDTA
	0,5% Nonidet P-40
	1 mM NaF

	15% Glycerol
	20 mM $\beta$ -Glycerophosphat
vor Verwendung zugesetzte	1 mM $\text{Na}_3\text{VO}_4$
Proteaseinhibitoren	0,5 mM EDTA
	0,25 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)
	5 $\mu\text{g/ml}$ Aprotinin
	1 $\mu\text{g/ml}$ Leupeptin

### 2.9.2 Immun-bzw. Koimmunpräzipitation von Proteinen aus Kulturüberständen

Die Immunpräzipitation dient der Anreicherung bestimmter Proteine aus Zellkulturüberständen oder Zellysaten. Bei der Koimmunpräzipitation werden auch mit diesen Proteinen assoziierte, andere Proteine aufgereinigt. Alternativ werden die immunpräzipitierten Proteine mit anderen Proteinen inkubiert und es wird untersucht, ob diese an die ersten binden.

Für Immun- bzw. Koimmunpräzipitations-Studien wurden COS-7-Zellen transient mit pSVL $\Delta$ EcoRI, der für das gewünschte LIF-RFP kodierte, transfiziert (2.8.1.1 oder 2.8.1.2) und 48 Stunden zur Proteinproduktion kultiviert. Danach wurden die Zell-Überstände geerntet und durch Zentrifugation und Sterilfiltration gereinigt. Für eine Immunpräzipitation wurden die Überstände über Nacht bei 4°C mit 5  $\mu\text{g/Ansatz}$  *flag*-Antikörper (2.3) inkubiert, welcher vorher mit 5  $\mu\text{g/Ansatz}$  eines Kaninchen Anti-Maus Brückenantikörpers (2.3) an ProteinA-Sepharose (5 mg/Ansatz, Amersham Biosciences) immobilisiert wurde. Am nächsten Tag wurde die Sepharose mit den präzipitierten LIF-RFPs zentrifugiert und im Falle einer Koimmunpräzipitations-Studie über Nacht bei 4°C in PBS mit 50  $\mu\text{M}$  humanem oder murinem LIF inkubiert. Die Proteine wurden dann mit 2x Lämmli-Puffer und Inkubation für 10 min bei 95°C von der Sepharose eluiert, denaturiert und nach SDS-PAGE und Western *blotting* mit einem Antikörper gegen humanes oder murines LIF (2.3) detektiert. Nach Strippen (2.9.5) der Membran wurde eine weitere Immundetektion mit einem *flag*-Antikörper durchgeführt.

2x Lämmli-Puffer	20% Glycerin
	10% $\beta$ -Mercaptoethanol
	4% SDS
	125 mM Tris-HCl, pH 6,8

0,01% Bromphenolblau

### 2.9.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese dient der Auftrennung von Proteinen nach ihrer Größe. Das negativ geladene Natriumdodecylsulfat (SDS) lagert sich entlang der Aminosäurekette der Proteine an und bildet mit diesen einen SDS-Proteinkomplex, in dem die Eigenladung des Proteins im Vergleich zur negativen Gesamtladung vernachlässigbar ist. Die Menge angelagertes SDS ist zur Proteingröße proportional. Die zu analysierenden Lysate oder (Ko-)Immunpräzipitate werden in 1x bzw. 2x Lämmli-Puffer aufgenommen und bei 95°C für 10 min erhitzt, um die Proteine zu denaturieren. Disulfidbrücken werden durch  $\beta$ -Mercaptoethanol reduziert. Das SDS-Polyacrylamidgel besteht aus einem Sammel- und einem Trenngel, wobei das Sammelgel der Vorsortierung und Fokussierung der Proteine dient, und im Trenngel die Proteine nach Größe aufgetrennt werden. Je nach Größe der zu analysierenden Proteine wurden 10%- oder 12,5%ige Trenngele mit 6%igen Sammelgelen verwendet. Die Elektrophorese wurde in einer Biometra-Kammer bei 35 mA durchgeführt. Als Größenstandards wurden die *Precision Plus Protein Dual Color Standards* (BioRad, Hercules, USA) benutzt.

Acrylamid-Lösung	290 g/l Acrylamid
	10 g/l Bisacrylamid
4x Trenngelpuffer	1,5 M Tris-HCl, pH 8,8
	0,4% SDS
4x Sammelgelpuffer	0,5 M Tris-HCl, pH 6,8
	0,4% SDS
10x Laufpuffer	0,25 M Tris-Base
	1,92 M Glyzin
	1% SDS

### 2.9.4 Western blotting

Die elektrophoretisch getrennten Proteine wurden mittels *semidry-blotting* auf eine Polyvinylidenfluorid (PVDF)-Membran übertragen. Die PVDF-Membran wurde zur Vorbereitung 5 s in Methanol und 15 min in Anodenpuffer II, das SDS-Gel 5 min in Kathodenpuffer inkubiert. Dann wurden in einer *blotting*-Kammer vier *Whatman*-Filterpapiere in Gelgröße, die mit Anodenpuffer I getränkt waren, und zwei mit Anodenpuffer

II getränkte Filterpapiere luftblasenfrei übereinander gelegt. Darauf wurden die Membran und das SDS-Gel platziert. Den oberen Abschluss bildeten vier mit Kathodenpuffer getränkte Filterpapiere. Die *blotting*-Kammer wurde mit einem Gewicht beschwert und die Proteine vom SDS-Gel auf die Membran bei  $0,8 \text{ mA/cm}^2$  für 1 Stunde übertragen. Der Boden der Kammer war hierbei die Anode, der Deckel die Kathode. Anschließend wurde die Membran in TBS-N-Puffer bei  $4^\circ\text{C}$  gelagert, falls sich nicht unmittelbar eine Immundetektion anschloss.

Anodenpuffer I	0,3 M Tris-Base 20% Methanol
Anodenpuffer II	0,025 M Tris-Base 20% Methanol
Kathodenpuffer	0,04 M $\epsilon$ -Aminocaprinsäure 20% Methanol 0,01% SDS
5x TBS-N-Puffer	100 mM Tris-HCl, pH 7,5 670 mM NaCl 0,5% Nonidet P-40

### 2.9.5 ECL-Immundetektion

Nach dem Western *blotting* wurden freie Bindungsstellen auf der Membran, an die Antikörper möglicherweise unspezifisch binden, durch 45-minütige Inkubation auf dem Schüttler mit 10% BSA-Lösung in TBS-N-Puffer abgesättigt. Nach dreimaligem kurzen Spülen mit TBS-N-Puffer wurde die entsprechend verdünnte Erstantikörperlösung auf die Membran gegeben und für 1 Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei  $4^\circ\text{C}$  geschüttelt. Dann wurde zweimal mit TBS-N-Puffer gespült und zweimal für 5 min mit TBS-N-Puffer auf dem Schüttler inkubiert, um überschüssigen Erstantikörper zu entfernen. Nun wurde die 1:2.000 verdünnte Zweitantikörperlösung auf die Membran gegeben und 30 min bei Raumtemperatur geschüttelt. Der Zweitantikörper war gegen den konstanten Bereich des Erstantikörpers gerichtet und mit Meerrettich-Peroxidase gekoppelt. Die Membran wurde wie nach Erstantikörper-Inkubation gewaschen. Die Bindung des Zweitantikörpers wurde mittels *Enhanced Chemiluminescence* (ECL, Amersham Biosciences) nach Herstellerangabe nachgewiesen. Hierbei wird ein Substrat auf die Membran gegeben, welches die Meerrettich-Peroxidase unter Lichtemission umsetzt. Dieses Licht erzeugt auf einem Röntgenfilm

(Amersham Biosciences) schwarze Banden. Die Expositionszeiten hierbei lagen zwischen 10 s und 2 min. Um eine weitere Immundetektion durchzuführen, wurden die Antikörperkomplexe durch eine 25-minütige Inkubation der Membran in *stripping*-Puffer bei 70°C entfernt.

*stripping*-Puffer    62 mM Tris-HCl, pH 6,7  
                          2% SDS  
                          76 µl β-Mercaptoethanol/ 10 ml, vor  
                          Verwendung zusetzen

### **2.9.6 Blaue native Polyacrylamid-Gelelektrophorese (BN-PAGE) und Fluoreszenz-Detektion mit dem Fluoreszenz-scanner Typhoon**

Die native Polyacrylamid-Gelelektrophorese wird zur Analyse von Proteinen oder Proteinkomplexen in ihrer nativen Form verwendet im Gegensatz zur SDS-PAGE, bei der die Proteine denaturiert werden. Um die Eigenladungen der Proteine zu überdecken, wird bei der BN-PAGE [66, 67] der Farbstoff Coomassie im Kathodenpuffer gelöst, der an die Proteine bindet und sie negativ lädt. Die Proteine bewegen sich im elektrischen Feld dann alle zur Anode und werden nach ihrer Größe (und Form) aufgetrennt. Dies ermöglicht eine Größenabschätzung der zu analysierenden Proteinkomplexe im Vergleich zu Proteinen bekannter Größe. Fluoreszierende Proteine im aufzutrennenden Proteingemisch können nach Ablauf der BN-PAGE mit Hilfe des Fluoreszenz-scanners *Typhoon gel imager* (Amersham Biosciences) sichtbar gemacht werden. Bei den durchgeführten BN-PAGE wurde das fluoreszierende Protein YFP-IL-6 verwendet. YFP wurde mit einer Wellenlänge von 488 nm angeregt, seine Emission wurde nach Passage durch einen Bandpass-Filter, der nur die Wellenlängen 500-540 nm durchlässt, registriert. Zum Größenvergleich wurde BSA benutzt, dessen unterschiedliche Multimere mit einer Silberfärbung sichtbar gemacht wurden. Zusätzlich diente BSA als interner Größenmarker, da YFP-IL-6- und IL-6-RFP-Lösungen BSA zur Erhöhung der Proteinstabilität enthielten. Um eine Komplexbildung zu ermöglichen, wurden YFP-IL-6 und IL-6-RFP (oder YFP-IL-6, sIL-6R $\alpha$  und sgp130) vor Auftragung auf das Gel für 30 min bei Raumtemperatur in den angegebenen molaren Mengen inkubiert. Dann wurde das Proteingemisch mit 1/5 Volumen 5x Probenpuffer versetzt, der ebenfalls Coomassie enthielt. Die Proteine wurden in Gradienten-Polyacrylamid-Gelen aufgetrennt (4%-12% oder 4%-20%) und die Elektrophorese in einer Biometra-Kammer bei 120 V durchgeführt.

Kathodenpuffer	50 mM Tricin 15 mM Bis-Tris 0,002% Coomassie Brilliant Blue G 250
Anodenpuffer	50 mM Bis-Tris-HCl, pH 7
3x Gelpuffer	1,5 M 6-Aminocapronat 150 mM Bis-Tris-HCl pH 7
5x Probenpuffer	100 mM 6-Aminocapronat 50% Glycerin 1% Coomassie Brilliant Blue G 250

### 2.9.7 Silberfärbung

Nach Ablauf einer SDS- oder BN-PAGE wurde eine Silberfärbung der aufgetrennten Proteine durchgeführt. Zunächst wurden die Proteine für 3x 30 min oder über Nacht mit Fixierlösung fixiert. Dann wurde das entsprechende Gel 4x 10 min mit Wasser auf dem Schüttler gewaschen, für 1 min in 0,8 mM Natrium-Thiosulfat ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ ) inkubiert und anschließend zweimal für 1 min mit Wasser gewaschen. Danach wurde das Gel 30-60 min in 12 mM Silbernitrat imprägniert, mit Wasser gespült und 10-20 min bis zum Sichtbarwerden der Proteinbanden in Entwickler-Lösung auf dem Schüttler inkubiert. Die Färbung wurde gestoppt, indem das Gel für 30-60 min in Stopp-Lösung geschüttelt wurde. Nach zweimaligem Waschen wurde das Gel auf einem Vakuum-Heiztrockner getrocknet.

Fixierlösung	5% Essigsäure 30% Ethanol
Entwickler	3% $\text{K}_2\text{CO}_3$ 0,00925% Formaldehyd 0,00125% ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ )
Stopp-Lösung	4% Tris-Base 2% Essigsäure

### 2.9.8 Produktion und Aufreinigung von YFP-IL-6 mit Affinitätschromatographie

Die Produktion von YFP-IL-6 erfolgte in stabilen *High-five*-YFP-IL-6-Insektenzellen (2.7.1). 72 Stunden nach Aussäen der Zellen wurden die YFP-IL-6-haltigen Überstände geerntet und

durch Zentrifugation und Sterilfiltration von Zellbestandteilen gereinigt. YFP-IL-6 wurde durch Affinitätschromatographie aufgereinigt, wobei an Cyan-Brom-Sepharose (Amersham Biosciences) immobilisierter sIL-6R $\alpha$  als Affinitätsmatrix verwendet wurde. Ungefähr 150 ml Zell-Überstände wurden auf die zuvor mit PBS-Tween äquilibrierte Säule aufgetragen und mit 3 Säulenvolumen PBS gewaschen, bzw. bis die OD<sub>280</sub> der Waschfraktionen nahe 0 lag. Dann wurde YFP-IL-6 mit 2 M MgCl<sub>2</sub> in ca. zehn 1-ml-Fraktionen eluiert, deren Proteingehalt sofort photometrisch (OD<sub>280</sub>) bestimmt wurde. Proteinhaltige Fraktionen wurden mit 0,002% BSA zur Erhöhung der Stabilität des YFP-IL-6 versetzt, vereinigt und über Nacht gegen PBS dialysiert. Die Durchfluss-, Wasch- und Elutionsfraktionen wurden nach SDS-PAGE und Western *blotting* mittels Immundetektion analysiert und die YFP-IL-6-Konzentration der Elutionsfraktion durch ELISA (2.9.11.1) und Fluoreszenz-Spektroskopie (2.9.12) ermittelt.

### **2.9.9 Aufreinigung von IL-6-RFP mit Affinitätschromatographie**

Zur Produktion von IL-6-RFP wurde das Baculovirus-Proteinexpressionssystem (2.8.1.5) verwendet. IL-6-RFP wurde durch Affinitätschromatographie aufgereinigt, wobei an Cyan-Brom-Sepharose immobilisiertes IL-6 als Affinitätsmatrix benutzt wurde. Ungefähr 100 ml IL-6-RFP-haltige Kulturüberstände wurden auf die mit PBS-Tween zuvor äquilibrierte Säule aufgetragen und mit 3 Säulenvolumen PBS-Tween gewaschen, bzw. bis die OD<sub>280</sub> der Waschfraktionen nahe 0 lag. Dann wurde IL-6-RFP mit zehnmal 1 ml 1 M Essigsäure eluiert und die Eluate entsprechend in 1 ml-Fraktionen gesammelt, welche sofort durch Auffangen in 400  $\mu$ l 2 M Tris-HCl, pH 9 neutralisiert wurden. Der Proteingehalt der Elutionsfraktionen wurde photometrisch (OD<sub>280</sub>) bestimmt und proteinhaltige Fraktionen mit 0,002% BSA zur Erhöhung der Stabilität des IL-6-RFP versetzt, vereinigt und über Nacht gegen PBS dialysiert. Die Durchfluss-, Wasch- und Elutionsfraktionen wurden nach SDS-PAGE und Western *blotting* mittels Immundetektion analysiert und die IL-6-RFP-Konzentration der Elutionsfraktion durch ELISA (2.9.11.2) ermittelt.

### **2.9.10 Gelfiltration**

Die Gelfiltration diente dazu, die molare Masse von YFP-IL-6, IL-6-RFP und dem Komplex YFP-IL-6/IL-6-RFP zu ermitteln. Gelfiltrationen wurden mit einer Superdex 200 16/60-Säule (Amersham Biosciences) bei 4°C und einer Flussrate von 1 ml/min durchgeführt. Vor jedem Lauf wurde die Säule mit 180 ml entgastem PBS gespült, um das zur Lagerung verwendete 20% Ethanol zu entfernen. Dann wurden maximal 4 ml des zu analysierenden

Proteingemischs aufgetragen. Während jedes Laufs wurde die Absorption der Eluate bei 280 nm (Detektion Gesamtprotein) und 514 nm (Detektion YFP) photometrisch gemessen und 3-ml-Fractionen der Eluate gesammelt. Die Säule wurde mit 9 mg einer Standard-Protein-Mischung (BioRad) kalibriert.

## 2.9.11 ELISA

### 2.9.11.1 ELISA zur Quantifizierung von YFP-IL-6 (nach [68])

Um YFP-IL-6 zu quantifizieren, wurden die Vertiefungen einer 96-*well*-ELISA-Platte über Nacht bei Raumtemperatur mit 1 µg/ml IL-6-Antikörper mab 16 (2.3) inkubiert. Anschließend wurde der Überstand entfernt und freie Bindungsstellen mit 1% BSA in PBS bei 37°C eine Stunde abgesättigt. Nach dreimaligem Waschen mit PBS-Tween wurden die zu analysierenden Proben mit PTG-Puffer verdünnt, in die Vertiefungen der 96-*well*-Platte überführt und mit einem 1:300-verdünnten, biotinylierten, polyklonalen IL-6-Antikörper (2.3) für 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Danach wurde dreimal mit PBS-Tween gewaschen. Anschließend wurde 45 min mit 1 µg/ml Streptavidin-HRP (Sanquin, Amsterdam, Niederlande) in PTG-Puffer inkubiert, wieder dreimal mit PBS-Tween gewaschen und die Entwickler-Lösung zugegeben. Sobald eine deutliche Blaufärbung zu sehen war, wurde die Reaktion mit 2 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> gestoppt (Farbumschlag nach gelb) und die Absorption der Proben bei der Wellenlänge 450 nm im ELISA *reader* gemessen.

PBS-Tween	PBS + 0,05% Tween
PTG-Puffer	PBS + 0,05% Tween + 0,02% Gelatine
Entwickler	0,1 M Natriumacetat, pH 5,5 0,1 mg/ml 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB) 0,003% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>

### 2.9.11.2 ELISA zur Quantifizierung von IL-6-RFP

Der ELISA zur Quantifizierung von IL-6-RFP wurde analog zu 2.9.11.1 durchgeführt, unterschied sich jedoch in den verwendeten Antikörpern. Hier wurde 3 µg/ml *flag*-Antikörper (2.3) zum Binden an die ELISA-Platte verwendet, und als biotinylierter Antikörper wurde BT2-biot (2.3) in einer 1:200-Verdünnung eingesetzt.

### 2.9.12 Fluoreszenz-Messung von YFP-IL-6 am Spektrometer

Alternativ zum ELISA wurde die YFP-IL-6-Konzentration auch mit Fluoreszenz-Spektroskopie bestimmt. Dazu wurden YFP-IL-6-haltige Proben bei einer Wellenlänge von 514 nm angeregt, während die Emission innerhalb der Wellenlängen 520-600 nm detektiert wurde. Der Fluoreszenzwert am Emissionsmaximum von YFP-IL-6 bei 525 nm wurde für die Auswertungen benutzt.

### 2.10 Konfokale Mikroskopie lebender Zellen

Zur Analyse fluoreszierender Moleküle in lebenden Zellen wurde ein konfokales *laser-scanning* Mikroskop des Typs Zeiss LSM 510 Meta (Zeiss, Jena) verwendet. Dieses ist unter anderem mit einem Argon-Laser ausgestattet, der Licht der Wellenlängen 458, 488 und 514 nm emittieren kann. Alle Bilder wurden mit einem 63x Wasser-korrigierten Objektiv (*Zeiss C-Apochromat 63/1.2w Korr*) aufgenommen. Für die Mikroskopie lebender Zellen wurden diese in einer offenen Zellkultivierungs-Kammer (Pecon, Erbach) kultiviert, die in eine CO<sub>2</sub>- und Heiz-Einheit eingespannt wurde. Die CO<sub>2</sub>- und Heiz-Einheit sorgte für einen konstanten CO<sub>2</sub>-Gehalt von 5% und eine konstante Temperatur von 37°C. Um verschiedene Fluoreszenz-Signale von einer Zelle aufzunehmen, wurde die *Multi-Track*-Funktion des LSM 510 Meta verwendet. Die Fluoreszenz des *cyan fluorescent protein* (CFP) wurde mit einer Wellenlänge von 458 nm und 5% Transmission angeregt und das emittierte Licht nach Passage durch einen Bandpass-Filter 480/20, der Licht der Wellenlänge 470-490 nm durchlässt, detektiert. Durch das enge Detektionsband wurde die Emission des *yellow fluorescent protein* (YFP), das auch mit 458 nm angeregt werden kann, ausgeschlossen. YFP wurde mit einer Wellenlänge von 514 nm und 5% Transmission angeregt und seine Emission wurde nach Passage durch einen Bandpass-Filter, der nur die Wellenlängen 530-600 nm durchlässt, registriert. Der Durchmesser der konfokalen Blende betrug bei allen Aufnahmen in Abhängigkeit von der Anregungswellenlänge eine *Airy Unit*. Für die verwendeten Anregungswellenlängen ergibt diese Einstellung eine Schichtdicke der konfokalen Aufnahmen von ca. 1 µm.

Zur Analyse von lebenden COS-7-Zellen wurden diese mit pSVL-gp130id-CFP (2.4.1) transfiziert (2.8.1.2) und auf 42 mm großen Coverslips ausgesät. 48 Stunden nach der Transfektion wurde ein Coverslip in die offene Zellkultivierungs-Kammer eingebaut und mit dem konfokalen Mikroskop analysiert.

### 3 Ergebnisse

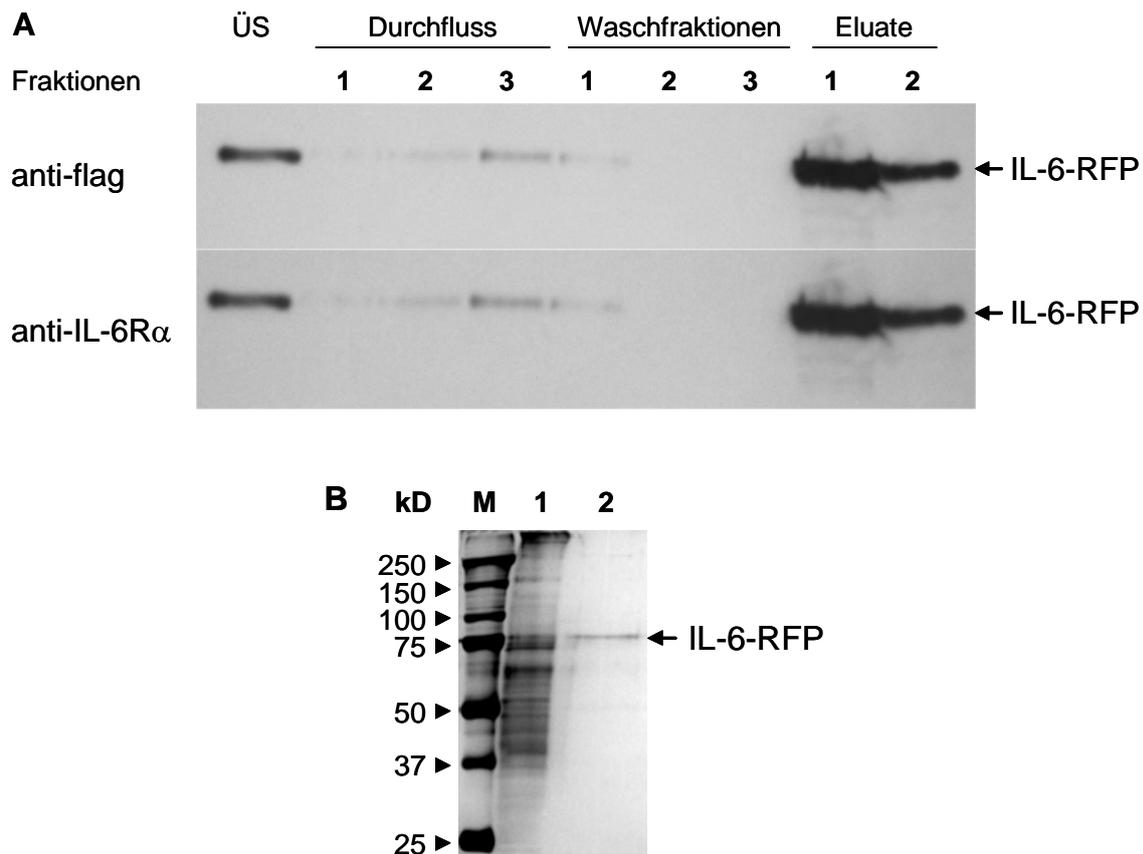
Dieser erste Teil der Ergebnisse beschreibt die biochemische Charakterisierung des IL-6-Inhibitors *interleukin-6 receptor fusion protein*, IL-6-RFP. Dieser IL-6-Inhibitor besteht aus den Domänen D1-D3 des humanen gp130, welche durch den *linker stalk-49* mit den Domänen D2-D3 des humanen sIL-6R $\alpha$  fusioniert sind. Es wurde bereits gezeigt, dass IL-6-RFP ein sehr potenter IL-6-Inhibitor ist, der nicht die Bioaktivität des nahe verwandten Zytokins IL-11 hemmt [55]. IL-11 signalisiert ebenfalls über ein gp130-Homodimer, wobei IL-11 vorher jedoch an IL-11R $\alpha$  bindet. Die Aktivität von IL-6-RFP gegenüber LIF und OSM, die über ein Heterodimer aus gp130 und einem weiteren, spezifischen Rezeptor signalisieren, hat man bisher noch nicht getestet. Auch wurde die Wirkungsweise von fusionierten Zytokinrezeptoren noch nicht ausreichend untersucht. Daher war die Analyse der Spezifität, Stabilität und Stöchiometrie des Komplexes aus IL-6-RFP und IL-6 das Thema des ersten Teils der vorliegenden Arbeit.

#### **3.1 IL-6-RFP hemmt die STAT3-Aktivierung und die Gen-Induktion des Akut-Phase-Proteins $\alpha$ 2-Makroglobulin nach IL-6-Stimulation, jedoch nicht nach Stimulation mit den verwandten Zytokinen OSM und LIF**

Stimulation von HepG2-Zellen mit den IL-6-Typ Zytokinen IL-6, OSM oder LIF löst die Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors STAT3 aus, welcher dann unter anderem an den Promotor des Gens für das Akut-Phase-Protein  $\alpha$ 2-Makroglobulin bindet [69]. Zum Nachweis der Spezifität von IL-6-RFP wurde untersucht, ob es die STAT3-Phosphorylierung und Induktion des  $\alpha$ 2-Makroglobulin-Gens nach Stimulation mit IL-6, OSM oder LIF hemmt.

##### **3.1.1 Produktion und Reinigung von IL-6-RFP**

IL-6-RFP wurde mit Hilfe des Baculovirus-Expressionssystems hergestellt (2.8.1.5) und aus Zellkultur-Überständen Baculovirus-infizierter Sf158-Zellen gereinigt. Die Reinigung stellte sicher, dass beobachtete Effekte durch IL-6-RFP und nicht von anderen Proteinen des Insektenzell-Überstandes verursacht wurden. Sie erfolgte durch Affinitätschromatographie mit immobilisiertem IL-6 (2.9.9).



**Abb. 7: Affinitätschromatographie von IL-6-RFP**

(A) IL-6-RFP wurde mittels Affinitätschromatographie mit immobilisiertem IL-6 aus Zellkultur-Überständen IL-6-RFP-Baculovirus-infizierter Sf158-Zellen gereinigt. Proben verschiedener Schritte einer Affinitätschromatographie wurden nach SDS-PAGE und Western blotting mit Antikörpern gegen flag bzw. IL-6R $\alpha$  analysiert. Bei der dargestellten Analyse wurden 47,5 ml Zellkultur-Überstand (ÜS), der 1,3  $\mu\text{g/ml}$  IL-6-RFP enthielt, auf die Affinitätschromatographie-Säule aufgetragen. Während des Durchflusses wurden nach 10 ml (1), 25 ml (2) und 40 ml (3), während des darauf folgenden Waschens mit PBS-Tween nach 8 ml (1), 30 ml (2) und 45 ml (3) Proben genommen. Die erste Elutionsfraktion umfasste ein Volumen von 4 ml und enthielt 9,3  $\mu\text{g/ml}$  IL-6-RFP, die zweite Elutionsfraktion besaß ein Volumen von 3 ml und enthielt 1,8  $\mu\text{g/ml}$  IL-6-RFP.

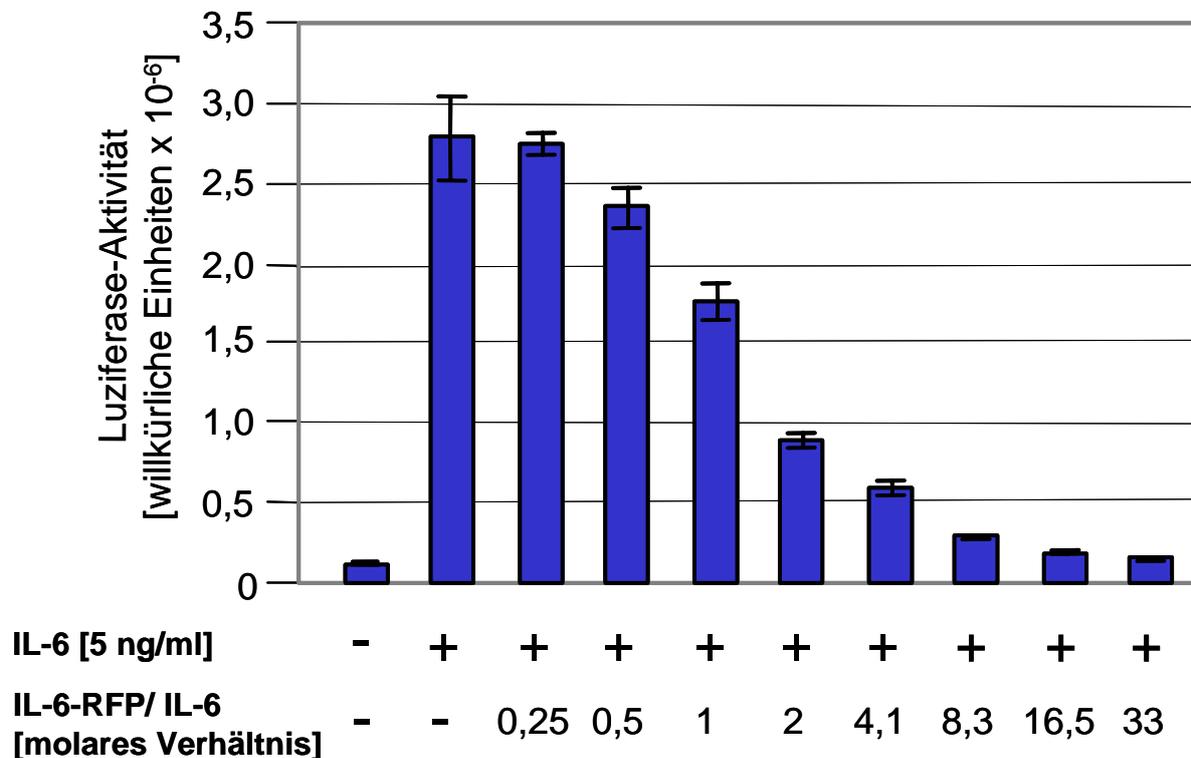
(B) Proteine aus 25  $\mu\text{l}$  Überstand von Baculovirus-infizierten Insektenzellen, der etwa 25 ng IL-6-RFP enthielt (1), oder 25 ng gereinigtes IL-6-RFP in PBS (2) wurden mittels SDS-PAGE unter nicht-reduzierenden Bedingungen getrennt. Anschließend wurde eine Silber-Färbung durchgeführt. M = Marker Proteine.

IL-6-RFP liegt im Zellkultur-Überstand Baculovirus-infizierter Sf158-Zellen in einer Konzentration von 1,3  $\mu\text{g/ml}$  vor (ÜS, Abb. 7A). Diese Konzentration wurde mit Hilfe eines ELISA ermittelt (2.9.11.2). In den Durchfluss- und Waschfraktionen sind lediglich kleine Mengen IL-6-RFP zu finden. In der ersten Elutionsfraktion hat das gereinigte, konzentrierte IL-6-RFP eine Konzentration von 9,3  $\mu\text{g/ml}$ , was einem Konzentrierungsfaktor durch die Affinitätschromatographie von etwa 10 entspricht. Die Ausbeute liegt bei 69%. Zur

Stabilisierung von IL-6-RFP in verdünnten Lösungen wurden 0,02% BSA zugesetzt. Vergleicht man den Zellkultur-Überstand IL-6-RFP-Baculovirus-infizierter Sf158-Zellen mit gereinigtem IL-6-RFP ohne zugesetztem BSA auf einem Silbergel (Abb. 7B), so erkennt man deutlich den Reinigungseffekt, der durch die Affinitätschromatographie erzielt wird. Außer IL-6-RFP ist fast kein anderes Protein aus dem Kulturüberstand nachweisbar.

Konzentrierungsfaktor, Ausbeute und Reinheit des IL-6-RFP zeigen, dass die Affinitätschromatographie mit immobilisiertem IL-6 zur Reinigung von IL-6-RFP im Labormaßstab geeignet ist.

### 3.1.2 IL-6-RFP hemmt die IL-6-vermittelte Gen-Induktion des Akut-Phase-Proteins $\alpha$ 2-Makroglobulin Dosis-abhängig

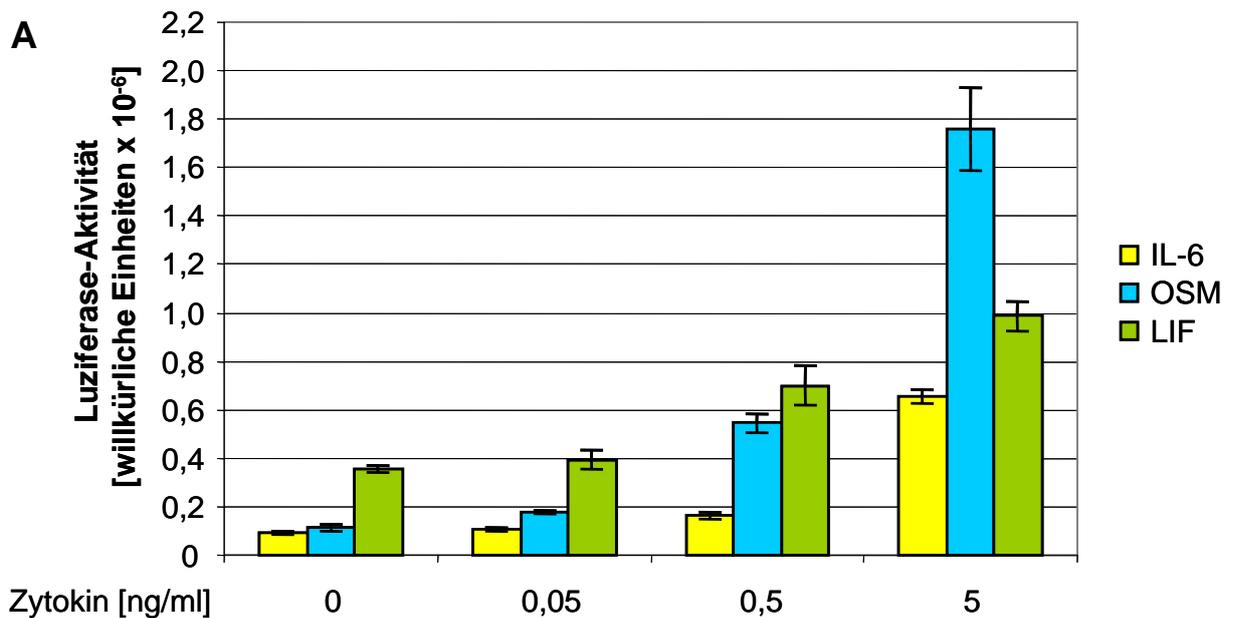


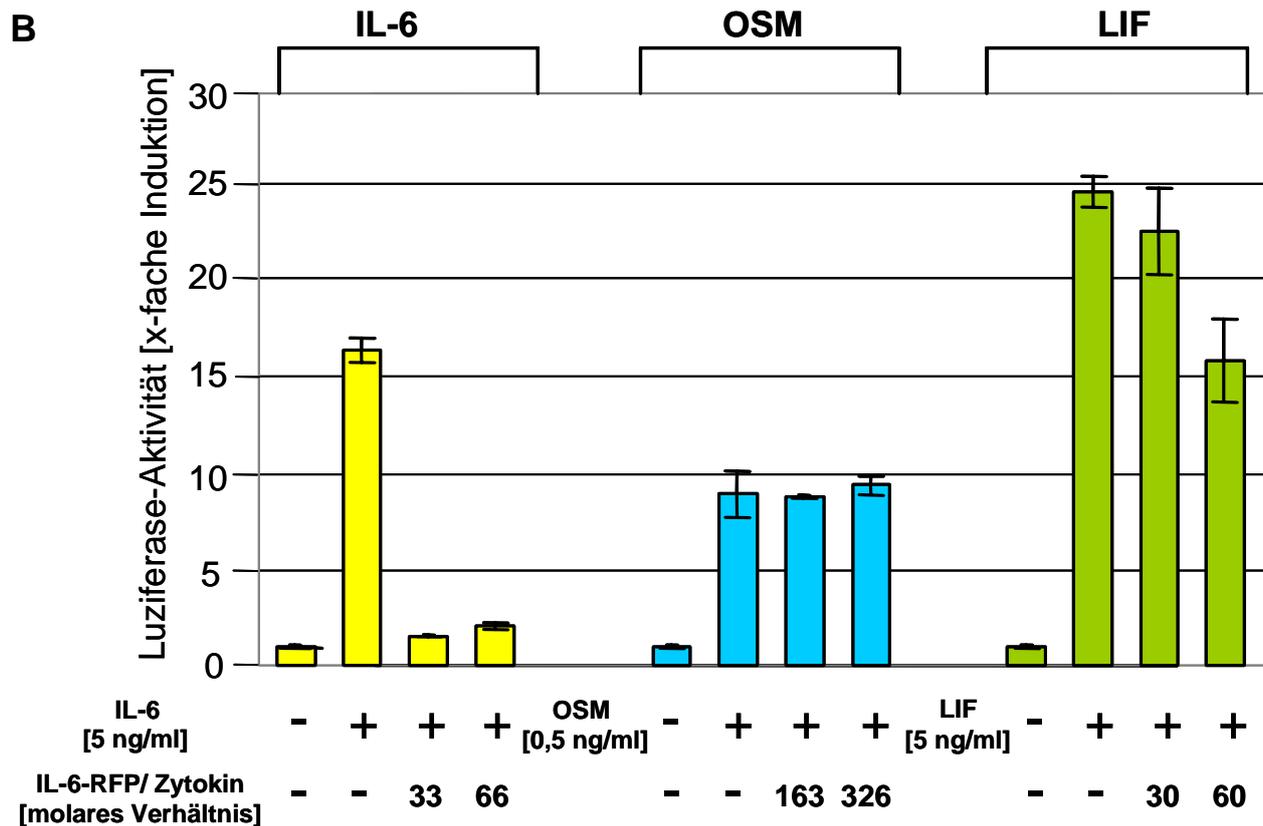
**Abb. 8: Dosis-abhängige Hemmung der IL-6-Antwort durch IL-6-RFP in einem Reporter-gen-Assay**

HepG2-Zellen wurden mit einem Reporter-gen-Plasmid, das für Luziferase kodiert, transfiziert. Die Expression der Luziferase stand unter der Kontrolle des STAT3-abhängigen  $\alpha$ 2M-Promotors der Ratte. IL-6 und IL-6-RFP wurden in den angegebenen molaren Verhältnissen für 30 min bei 37°C zur Komplexbildung inkubiert. Danach wurden die HepG2-Zellen mit dem Gemisch aus Zytokin und Inhibitor 16 Stunden stimuliert. Die Luziferase-Aktivität wurde dreimal parallel bestimmt.

Wie in Abb. 8 gezeigt, hemmt IL-6-RFP die Induktion des  $\alpha 2$ -Makroglobulin-Promotors nach IL-6-Stimulation Dosis-abhängig in einem Reporter-gen-Assay in HepG2-Zellen. Schon ein zweifach molarer Überschuss von IL-6-RFP über IL-6 führt zu einer Verringerung der biologischen Antwort um ungefähr 70%. Ein mehr als 10-fach molarer Überschuss unterdrückt die Gen-Induktion vollständig.

### 3.1.3 OSM- oder LIF-vermittelte Gen-Induktion des Akut-Phase-Proteins $\alpha 2$ -Makroglobulin werden von IL-6-RFP nicht gehemmt





**Abb. 9: Untersuchung der Spezifität von IL-6-RFP in einem Reporter-gen-Assay**

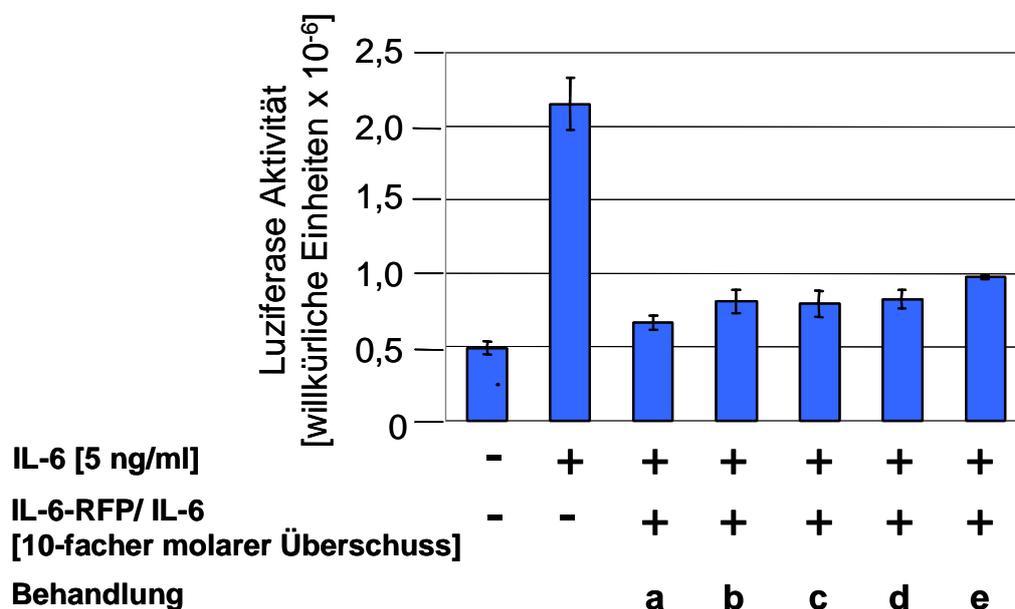
(A) HepG2-Zellen wurden wie in Abb. 8 beschrieben transfiziert und mit IL-6, OSM oder LIF in steigenden Konzentrationen 16 Stunden stimuliert. Anschließend wurde die Luziferase-Aktivität bestimmt.

(B) IL-6, OSM oder LIF wurden für 30 min bei 37°C mit IL-6-RFP in den angegebenen molaren Verhältnissen inkubiert. Dann wurden wie in (A) transfizierte HepG2-Zellen mit dem Gemisch aus Zytokin und Inhibitor 16 Stunden stimuliert und die Luziferase-Aktivität bestimmt.

Die Spezifität von IL-6-RFP gegenüber IL-11, dessen Rezeptorkomplex ebenfalls aus zwei gp130-Rezeptoren besteht, die jedoch mit zwei IL-11R $\alpha$ -Molekülen assoziieren, wurde bereits gezeigt [55]. Nun wurde untersucht, ob IL-6-RFP auch solche Zytokine nicht hemmt, deren Rezeptorkomplex kein gp130-Homodimer enthält, sondern die über ein gp130-LIFR-Heterodimer signalisieren. Hier könnte das in IL-6-RFP enthaltene CBM von gp130 das entsprechende Zytokin binden. In diesem Zusammenhang wurden OSM und LIF untersucht. HepG2-Zellen reagieren auf IL-6-, OSM- und LIF-Stimulation mit der Induktion von Akut-Phase-Proteinen und sind deshalb gut geeignet, die Spezifität von IL-6-RFP zu untersuchen. Zunächst wurde die Zytokinkonzentration ermittelt, die zu einer ausreichenden Luziferase-Aktivität führt (Abb. 9A). Anschließend wurde ein Reporter-gen-Assay zur Untersuchung der Spezifität von IL-6-RFP gegenüber OSM und LIF durchgeführt (Abb. 9B). Durch Zugabe von IL-6-RFP in Konzentrationen, bei denen die IL-6-Antwort vollständig unterdrückt wird, wird

die OSM-abhängige Gen-Induktion nicht gehemmt (Abb. 9B). Durch Zugabe von IL-6-RFP in einem 30-fach molaren Überschuss über LIF wird die LIF-Antwort ebenfalls nicht beeinflusst; sie wird jedoch durch Zugabe eines 60-fach molaren Überschusses leicht gehemmt. Folglich ist IL-6-RFP in Konzentrationen, bei denen die IL-6-vermittelte Gen-Induktion vollständig gehemmt wird, spezifisch für IL-6 und hemmt OSM und LIF nicht. Erst bei Zugabe von IL-6-RFP in einem 60-fach molaren Überschuss unterdrückt es auch die LIF-vermittelte Gen-Induktion um 40%.

### 3.1.4 IL-6-RFP unterdrückt die IL-6-vermittelte Gen-Induktion auch bei gleichzeitiger Gabe von IL-6 und IL-6-RFP oder wenn IL-6-RFP kurz nach IL-6 zugegeben wird



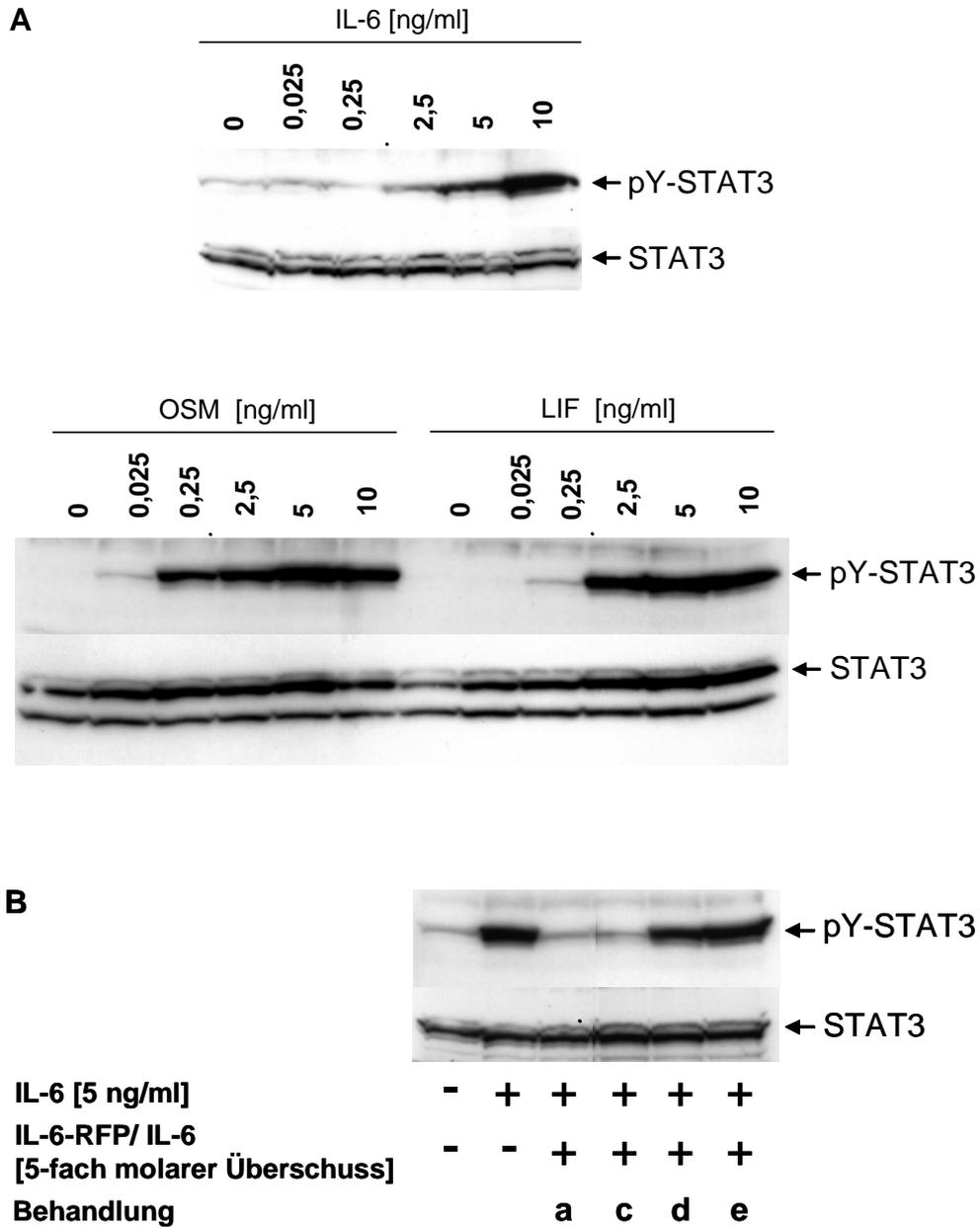
**Abb. 10: Hemmung der IL-6-vermittelten Induktion des  $\alpha 2M$ -Promotors nach Behandlung mit IL-6-RFP zu unterschiedlichen Zeitpunkten**

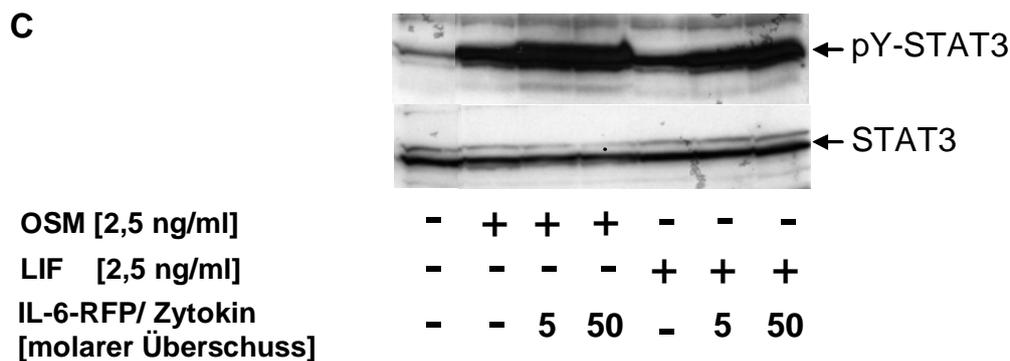
HepG2-Zellen wurden wie in Abb. 8 beschrieben transfiziert. Bei Behandlung „a“ wurde IL-6 mit einem 10-fach molaren Überschuss von IL-6-RFP für 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden HepG2-Zellen für 16 Stunden mit dem Gemisch aus Zytokin und Inhibitor stimuliert. Bei „b“ wurden die Zellen für 30 min mit IL-6-RFP vorinkubiert und dann mit IL-6 stimuliert, während bei „c“ IL-6 und IL-6-RFP ohne Vorinkubation gleichzeitig zu den Zellen gegeben wurden. Bei „d“ und „e“ wurden HepG2-Zellen für 10 bzw. 20 min mit IL-6 stimuliert und anschließend IL-6-RFP für 16 Stunden dazugegeben. Danach wurde die Luziferase-Aktivität gemessen.

IL-6-RFP hemmt die IL-6-vermittelte Reporter-gen-Induktion nicht nur nach Vorinkubation von IL-6 und IL-6-RFP (Behandlung „a“), sondern auch bei gleichzeitiger Zugabe von IL-6 und IL-6-RFP („b“, „c“), wie in Abb. 10 gezeigt wird. Auch wenn IL-6-RFP 10 min („d“)

oder 20 min („e“) nach IL-6-Stimulation zugesetzt wird, hemmt es die Induktion des Reportergens  $\alpha 2$ -Makroglobulin in diesem Lang-Zeit-Experiment.

### 3.1.5 IL-6-RFP unterdrückt die IL-6-induzierte STAT3-Phosphorylierung





**Abb. 11: Auswirkung von IL-6-RFP auf die STAT3-Phosphorylierung nach Stimulation mit IL-6, OSM oder LIF in HepG2-Zellen**

(A) HepG2-Zellen wurden auf 6-well-Platten ausgesät und über Nacht ohne Serum gehungert. Dann wurden sie mit IL-6, OSM oder LIF in unterschiedlichen Konzentrationen für 20 min stimuliert und anschließend lysiert. Die Lysate wurden nach SDS-PAGE und Western blotting mit phospho-STAT3 oder STAT3-spezifischen Antikörpern analysiert.

(B) Die Kultivierung der HepG2-Zellen erfolgte wie in (A). IL-6 wurde mit einem 5-fach molaren Überschuss von IL-6-RFP für 30 min bei 37°C inkubiert, um eine Komplexbildung zu ermöglichen. Dann wurden die Zellen mit IL-6 oder dem Gemisch aus IL-6 und IL-6-RFP stimuliert (Behandlung „a“). Bei „c“ wurden IL-6 und IL-6-RFP ohne Vorinkubation gleichzeitig für 20 min zu den Zellen gegeben. In Ansätzen „d“ und „e“ wurden HepG2-Zellen mit IL-6 für 10 min bzw. 20 min stimuliert und danach mit IL-6-RFP für 20 min behandelt. Danach wurden die HepG2-Zellen lysiert und die Lysate wie in (A) analysiert.

(C) Die Kultivierung der HepG2-Zellen erfolgte wie in (A). OSM und IL-6-RFP oder LIF und IL-6-RFP wurden für 30 min bei 37°C in den angegebenen molaren Verhältnissen inkubiert. Dann wurden HepG2-Zellen mit OSM oder LIF oder dem Gemisch aus OSM und IL-6-RFP oder LIF und IL-6-RFP für 20 min stimuliert. Nach der Stimulation wurden die HepG2-Zellen lysiert und die Lysate wie in (A) analysiert.

Während die Induktion eines Reporter-Gens 16 Stunden nach Zytokin-Stimulation gemessen wird, kann die STAT3-Phosphorylierung schon innerhalb von Minuten detektiert werden. Um die Auswirkung von IL-6-RFP auf die STAT3-Phosphorylierung in HepG2-Zellen zu untersuchen, wurden zuerst die Konzentrationen der Zytokine IL-6, OSM und LIF ermittelt, die eine ausreichende STAT3-Phosphorylierung induzieren (Abb. 11A). Dann wurden HepG2-Zellen mit den Zytokinen in entsprechenden Konzentrationen unter Zugabe von IL-6-RFP stimuliert (Abb. 11B, C). Wie in Abb. 11B gezeigt, wird die STAT3-Phosphorylierung durch IL-6-RFP gehemmt, wenn IL-6 und IL-6-RFP für 30 min bei 37°C vorinkubiert werden („a“) oder ohne Vorinkubation gleichzeitig zu den Zellen gegeben werden („c“). Bei dieser Kurz-Zeit-Antwort reicht eine zeitverzögerte Behandlung mit IL-6-RFP nach IL-6-Stimulation („d“ und „e“) nicht aus, um die STAT3-Phosphorylierung zu hemmen.

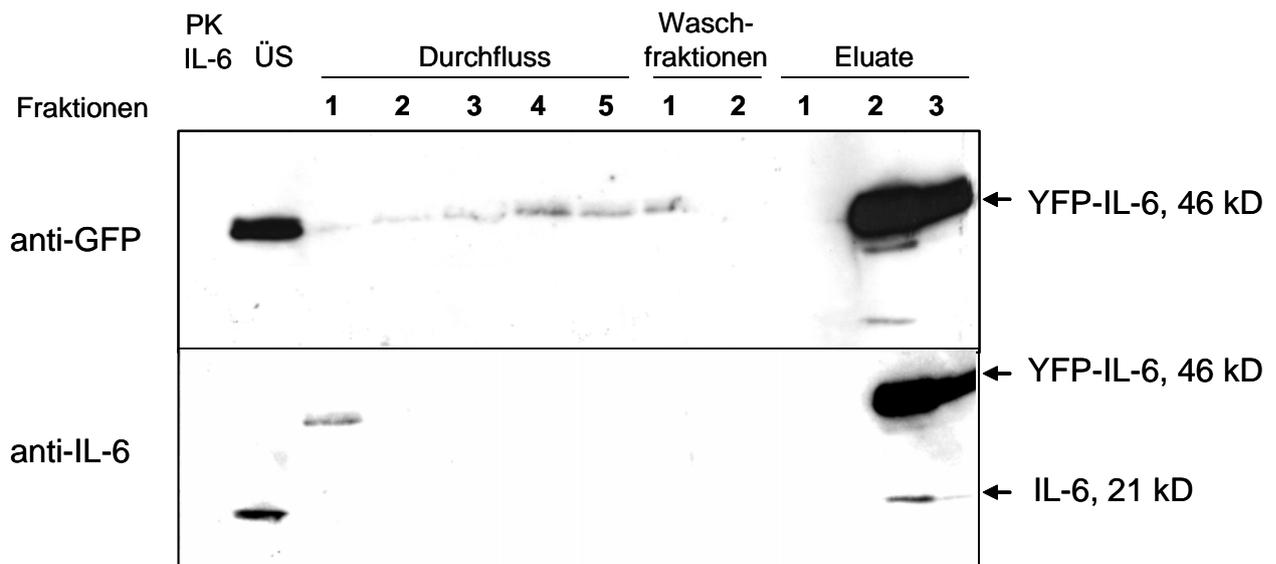
Wie auch beim Reporter-gen-Assay gezeigt, ist IL-6-RFP spezifisch für die Hemmung von IL-6. Die OSM- oder LIF-induzierte STAT3-Phosphorylierung wird nicht durch IL-6-RFP gehemmt (Abb. 11C).

### **3.2 Untersuchung der Interaktion zwischen YFP-IL-6 und IL-6-RFP mit Hilfe von Fluoreszenz-Gelshift-Assays**

Zur Analyse von Protein-Protein-Interaktionen wurde eine neue Methode angewendet, die auf BN-PAGE, fluoreszierenden Fusionsproteinen und Fluoreszenz-*scanning* beruht. Hierbei werden fluoreszierende Proteine, die mit anderen Proteinen eine Wechselwirkung eingegangen sind, mittels BN-PAGE aufgetrennt und ihre Fluoreszenz mittels Fluoreszenz-*scanner* sichtbar gemacht. Durch Vergleich mit Marker-Proteinen bekannter Größe kann man dann die Molmasse der Komplexe, in denen das fluoreszierende Protein gebunden ist, bestimmen. In den folgenden Experimenten dient YFP-IL-6 als fluoreszierendes Protein, IL-6-RFP als Interaktionspartner und die verschiedenen Multimere von BSA als Marker-Proteine.

#### **3.2.1 Produktion und Reinigung von YFP-IL-6**

Das Fusionsprotein YFP-IL-6 wurde kloniert, indem man das *yellow fluorescent protein* (YFP) mit dem N-Terminus von IL-6 fusionierte. Die Fusion mit YFP hat keinen Einfluss auf die Bioaktivität von IL-6 [70]. Zur Produktion von YFP-IL-6 wurden stabile *High-five*-YFP-IL-6-Zellen verwendet, die YFP-IL-6 kontinuierlich sezernieren. YFP-IL-6 aus Überständen dieser Zellen ließ sich mittels Affinitätschromatographie mit immobilisiertem sIL-6R $\alpha$  aufgereinigen (2.9.8).



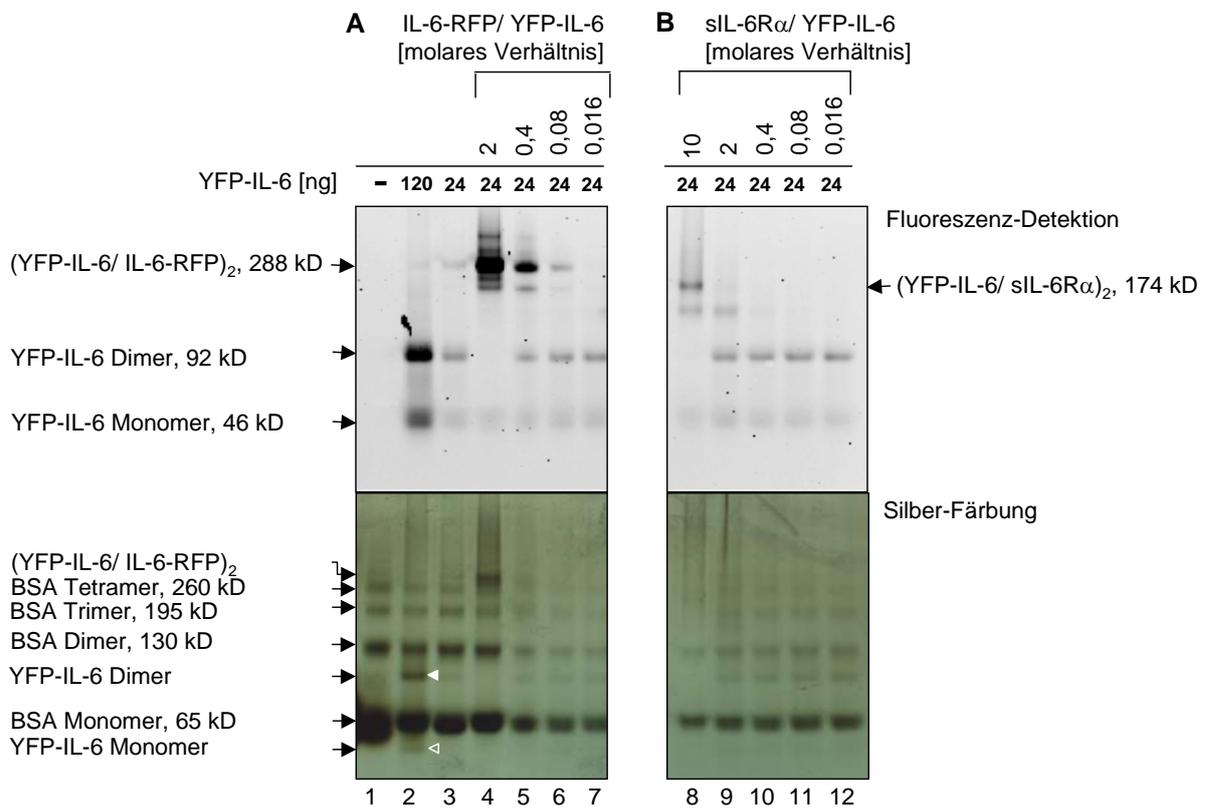
### Abb. 12: Affinitätschromatographie von YFP-IL-6

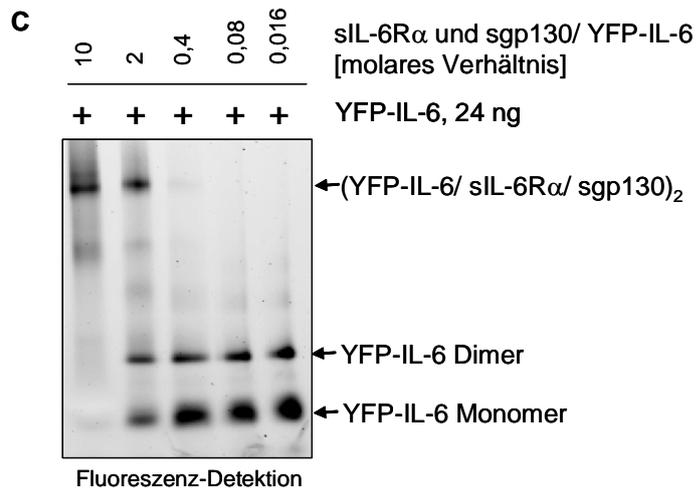
YFP-IL-6 wurde mittels Affinitätschromatographie mit immobilisiertem sIL-6R $\alpha$  aus Zellkultur-Überständen stabiler High-five-YFP-IL-6-Insektenzellen gereinigt. Proben verschiedener Schritte einer Affinitätschromatographie wurden nach SDS-PAGE und Western blotting mit Antikörpern gegen GFP bzw. IL-6 analysiert. Bei der dargestellten Analyse wurden 80 ml Zellkultur-Überstand (ÜS), der etwa 1  $\mu\text{g/ml}$  YFP-IL-6 enthielt, auf die Affinitätschromatographie-Säule aufgetragen. Als Positivkontrolle für den IL-6-Antikörper diente nicht-markiertes IL-6 (PK IL-6). Während des Durchflusses wurden nach 10 ml (1), 20 ml (2), 40 ml (3), 60 ml (4) und 80 ml (5), während des darauf folgenden Waschens mit PBS-Tween nach 10 ml (1) und 30 ml (2) Proben genommen. Die erste Elutionsfraktion (4 ml) enthielt 12  $\mu\text{g/ml}$  YFP-IL-6, die zweite (2 ml) etwa 6  $\mu\text{g/ml}$  YFP-IL-6.

YFP-IL-6 liegt im Zellkultur-Überstand stabiler High-five-YFP-IL-6-Zellen in einer Konzentration von 1  $\mu\text{g/ml}$  vor (ÜS, Abb. 12). Diese Konzentration wurde mit Hilfe eines ELISA bestimmt (2.9.11.1). In den Durchflussfraktionen und der ersten Waschfraktion sind nur kleine Mengen YFP-IL-6 zu finden. Diese sind nur mit dem sensitiveren GFP-Antikörper detektierbar (Abb. 12, oberes Bild) und nicht mit dem IL-6-Antikörper. In den Eluaten weist das gereinigte, konzentrierte YFP-IL-6 generell eine Konzentration von ungefähr 12-19  $\mu\text{g/ml}$  auf, was einem Konzentrierungsfaktor durch die Affinitätschromatographie von etwa 10 bis 20 entspricht. Die Ausbeute liegt bei etwa 75%. Zur Stabilisierung von YFP-IL-6 in verdünnten Lösungen wurden 0,02% BSA zugesetzt. Konzentrierungsfaktor und Ausbeute zeigen, dass die Affinitätschromatographie mit immobilisiertem sIL-6R $\alpha$  zur Reinigung von YFP-IL-6-RFP im Labormaßstab geeignet ist.

### 3.2.2 Blaue native PAGE (BN-PAGE): IL-6-RFP bindet YFP-IL-6 mit höherer Affinität als sIL-6R $\alpha$ oder die Kombination aus sIL-6R $\alpha$ und sgp130

Während die Bioaktivität von IL-6-RFP bereits detailliert analysiert wurde, wird im Folgenden auf die Komplexbildung zwischen YFP-IL-6 und IL-6-RFP näher eingegangen. In einer vor kurzem von unserer Arbeitsgruppe veröffentlichten Studie [70] wurde gezeigt, dass die Fusion von YFP an den N-Terminus von IL-6 die Bioaktivität des Zytokins nicht beeinflusst. Verschiedene Mengen YFP-IL-6/BSA wurden auf ein nicht-denaturierendes Polyacrylamid-Gradientengel aufgetragen und eine BN-PAGE durchgeführt. Das nasse Gel wurde direkt nach dem Lauf mit dem Fluoreszenz-scanner *Typhoon* (Amersham Biosciences) analysiert, wobei abgestrahlte Fluoreszenz von der *software* des *scanners* als schwarze Banden dargestellt wird.





**Abb. 13: BN-PAGE: Vergleich der Konzentrationen von IL-6-RFP, sIL-6R $\alpha$  oder sIL-6R $\alpha$  und sgp130, die zur YFP-IL-6-Bindung notwendig sind**

(A) YFP-IL-6 (24 ng) wurde mit einer 2-; 0,4-; 0,08- oder 0,016-fach molaren Konzentration IL-6-RFP für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das gefüllte, weiße Dreieck zeigt das YFP-IL-6-Dimer an, das nicht-gefüllte, weiße Dreieck das YFP-IL-6-Monomer.

(B) Parallel wurde YFP-IL-6 (24 ng) mit einer 10-; 2-; 0,4-; 0,08- oder 0,016-fach molaren Konzentration sIL-6R $\alpha$  gemischt und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert.

(C) YFP-IL-6 (24 ng) wurde mit einer 10-; 2-; 0,4-; 0,08- oder 0,016-fach molaren Konzentration der Kombination sIL-6R $\alpha$  und sgp130 gemischt und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Proteinkomplexe in (A) - (C) wurden mit Hilfe einer BN-PAGE getrennt und YFP-IL-6 durch Detektion auf einem Fluoreszenz-scanner (Typhoon) sichtbar gemacht. Danach wurden die Polyacrylamidgele fixiert und eine Silberfärbung durchgeführt.

YFP-IL-6 wird in Form von zwei fluoreszierenden Banden detektiert (Abb. 13A, oberes Bild, Spur 2 und 3), die später noch näher charakterisiert werden. Anschließend wurden die Proteinbanden desselben Gels mittels Silberfärbung sichtbar gemacht (Abb. 13A, unteres Bild). Bei der größeren Menge YFP-IL-6 (120 ng) ist die obere YFP-IL-6-Bande klar zu erkennen (gefülltes, weißes Dreieck, Spur 2), wohingegen die untere nur schwach gefärbt ist (nicht-gefülltes, weißes Dreieck, Spur 2). Bei der kleineren YFP-IL-6-Menge (24 ng, Spur 3) ist YFP-IL-6 kaum sichtbar. Demzufolge ist die Sensitivität des Fluoreszenz-scanners mindestens genauso hoch wie die einer Silberfärbung oder sogar noch höher. In Spur 1 wurde BSA (2  $\mu$ g) alleine auf das Gel aufgetragen. Albumin-Monomere (65 kD) bilden die stärkste Bande aus, aber auch Dimere (130 kD), Trimere (195 kD) und Tetramere (260 kD) sind gut sichtbar. Die Albumin-Banden dienen als Marker für die molaren Massen der untersuchten Proteine. Die berechnete Molmasse von YFP-IL-6-Monomeren beträgt 46 kD. Deshalb stellt die Bande zwischen den Albumin-Dimeren (130 kD) und den Albumin-Monomeren

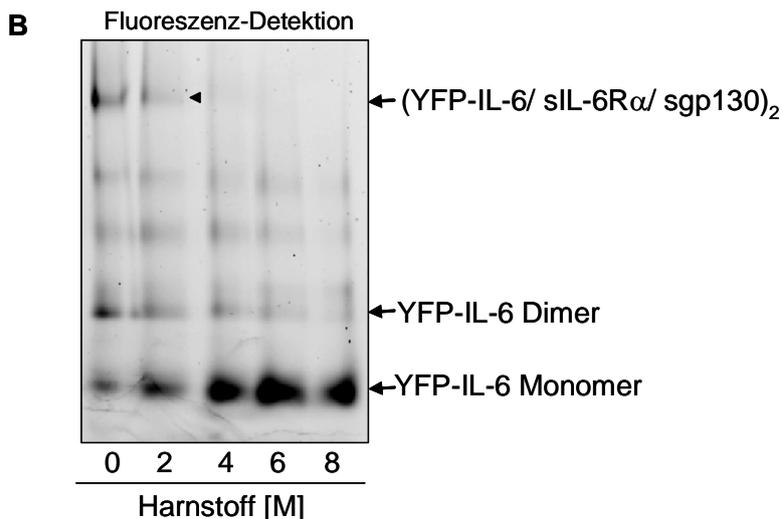
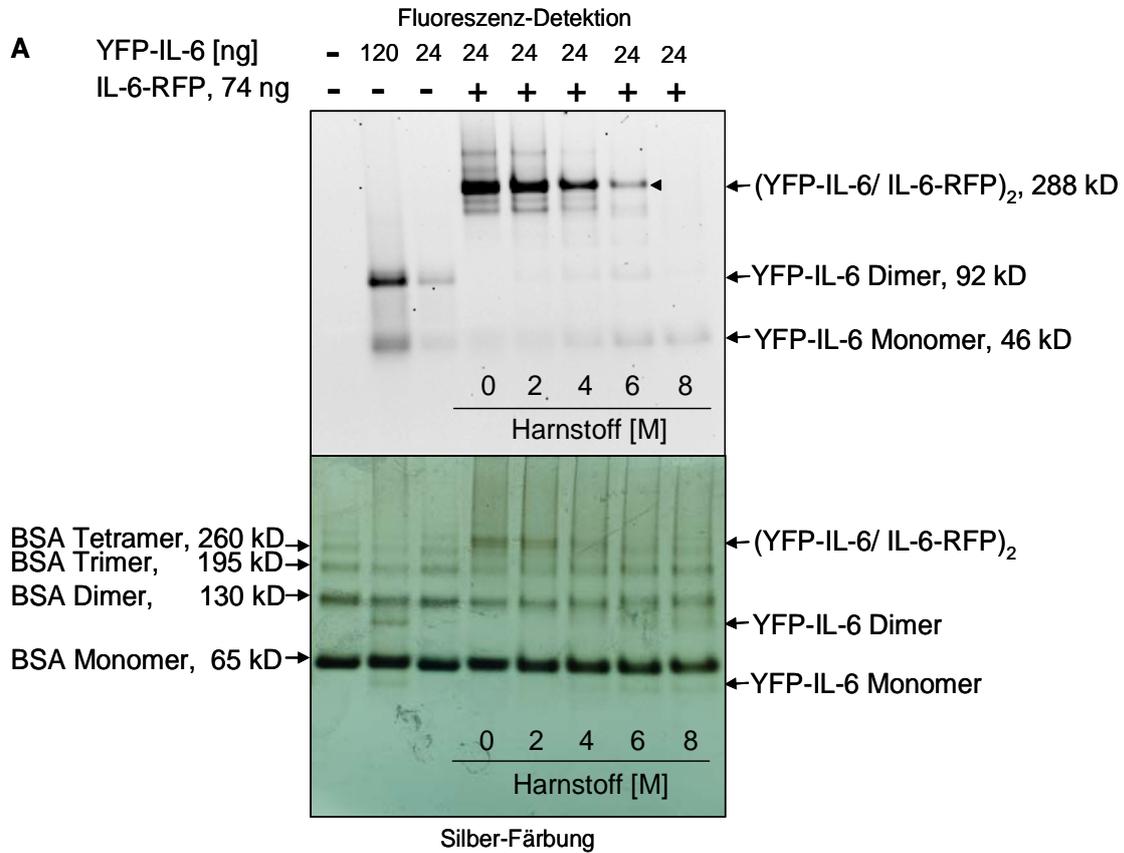
YFP-IL-6-Dimere (92 kD, gefülltes, weißes Dreieck) dar, während die untere Bande YFP-IL-6-Monomere (46 kD, nicht-gefülltes, weißes Dreieck) repräsentiert.

Die Zugabe von IL-6-RFP zu YFP-IL-6 führt zu einer starken Verschiebung der Bande zu höherer molarer Masse, was die Komplexbildung zwischen YFP-IL-6 und IL-6-RFP anzeigt (Abb. 13A, Spuren 4-6). Diese Verschiebung der Bande wird von einer beträchtlichen Erhöhung der Fluoreszenzintensität begleitet, wie oft bei der Durchführung blauer, nativer Gelelektrophoresen beobachtet wurde. Dieses Phänomen rührt wahrscheinlich von Quenchen oder Dequenchen des Fluoreszenzsignals her, das von unterschiedlichen, lokalen Konzentrationen von Coomassie, Salz und Polyacrylamid verursacht wird. Ein zweifach molarer Überschuss an IL-6-RFP reicht aus, um YFP-IL-6 komplett zu binden (Spur 4). Auch noch bei einem 0,4- bzw. 0,08-fach molaren Verhältnis von IL-6-RFP zu YFP-IL-6 wird ein Komplex ausgebildet. Um eine vollständige Komplexbildung zwischen YFP-IL-6 und sIL-6R $\alpha$  zu erreichen, ist jedoch ein 10-fach molarer Überschuss von sIL-6R $\alpha$  nötig (Abb. 13B, Spur 8). Der Komplex ist schon bei einem zweifach molaren Überschuss nicht mehr sichtbar (vgl. Spur 9 mit Spur 4). sIL-6R $\alpha$  und sgp130 zusammen (Abb. 13C) müssen ebenfalls in einem 10-fach molaren Überschuss eingesetzt werden, um YFP-IL-6 komplett zu binden. Bei einem zweifach molaren Überschuss wird YFP-IL-6 nur teilweise gebunden (vgl. mit Spur 4, Abb. 13A). Diese Ergebnisse zeigen, dass das Fusionsprotein IL-6-RFP YFP-IL-6 mit höherer Affinität bindet als die getrennten, löslichen Rezeptoren sIL-6R $\alpha$  und sgp130.

### **3.2.3 IL-6 bildet mit IL-6-RFP einen stabileren Komplex aus als mit seinen löslichen Rezeptoren**

Um die Stabilität der Komplexe YFP-IL-6/IL-6-RFP und YFP-IL-6/sIL-6R $\alpha$ /sgp130 zu vergleichen, wurden drei verschiedene Experimente durchgeführt (3.2.3.1, 3.2.3.2 und 3.2.3.3).

### 3.2.3.1 BN-PAGE: Der Komplex aus IL-6-RFP und YFP-IL-6 ist unter denaturierenden Bedingungen stabiler als der Komplex aus YFP-IL-6/sIL-6R $\alpha$ /sgp130



**Abb. 14: BN-PAGE: Analyse der Stabilität des Komplexes YFP-IL-6/IL-6-RFP und des Komplexes YFP-IL-6/sIL-6R $\alpha$ /sgp130 in Gegenwart von Harnstoff**

(A) Um eine Komplexbildung zu ermöglichen, wurden 24 ng YFP-IL-6 mit einem zweifach molaren Überschuss von IL-6-RFP (74 ng) für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das

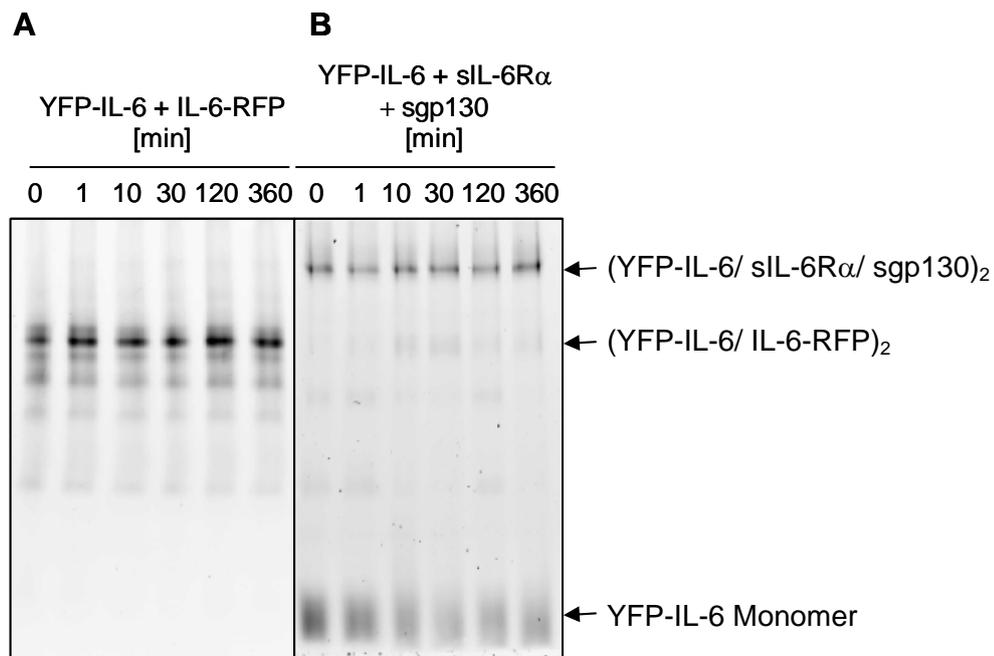
*schwarze Dreieck zeigt den Komplex (YFP-IL-6/ IL-6-RFP)<sub>2</sub> an. Harnstoff wurde in den angegebenen Konzentrationen zugesetzt und die Komplexe für weitere 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden die Proteinkomplexe mit Hilfe der BN-PAGE getrennt und fluoreszierendes YFP-IL-6 wurde mit dem Fluoreszenz-scanner sichtbar gemacht. Anschließend wurden die Polyacrylamidgele fixiert und eine Silberfärbung durchgeführt.*

*(B) In einem parallelen Ansatz wurden YFP-IL-6 (24 ng), sIL-6R $\alpha$  (44 ng) und sgp130 (74 ng) in einem molaren Verhältnis von 1:2:2 gemischt und ebenfalls für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurde wie in (A) weiter verfahren. Das schwarze Dreieck zeigt den Komplex (YFP-IL-6/ sIL-6R $\alpha$ / sgp130)<sub>2</sub> an.*

In diesem ersten Experiment zur Untersuchung der Stabilität der Komplexe YFP-IL-6/IL-6-RFP und YFP-IL-6/sIL-6R $\alpha$ /sgp130 wurden diese mit Harnstoff in steigenden Konzentrationen inkubiert (Abb. 14). Während der Komplex aus YFP-IL-6 und IL-6-RFP noch in Gegenwart von 6 M Harnstoff detektierbar ist (Abb. 14A, gefülltes, schwarzes Dreieck), ist vom Komplex YFP-IL-6/sIL-6R $\alpha$ /sgp130 in Gegenwart von 2 M Harnstoff nur noch eine schwache Bande sichtbar (Abb. 14B, gefülltes, schwarzes Dreieck), die bei 4 M Harnstoff ganz verschwindet. Mit steigenden Harnstoffkonzentrationen verstärkt sich die Fluoreszenz der Bande der YFP-IL-6-Monomere (Abb. 14B), was auf eine Dissoziation der YFP-IL-6-Dimere in Monomere durch Harnstoff hinweist.

### **3.2.3.2 BN-PAGE: Verdrängung von YFP-IL-6 aus dem Komplex YFP-IL-6/IL-6-RFP oder dem Komplex YFP-IL-6/sIL-6R $\alpha$ /sgp130 durch IL-6**

Um zu untersuchen, ob nicht-markiertes IL-6 YFP-IL-6 aus dem Komplex YFP-IL-6/IL-6-RFP oder dem Komplex YFP-IL-6/sIL-6R $\alpha$ /sgp130 verdrängt, wurden die Komplexe mit einem 10-fach molaren Überschuss an IL-6 für 1, 10, 30, 120 oder 360 min inkubiert. Zur Kontrolle wurden die Komplexe für dieselben Zeiträume bei Raumtemperatur ohne Zugabe von IL-6 inkubiert, um sicherzustellen, dass der Zerfall der Komplexe nicht von ihrer Instabilität über die Zeit herrührte.

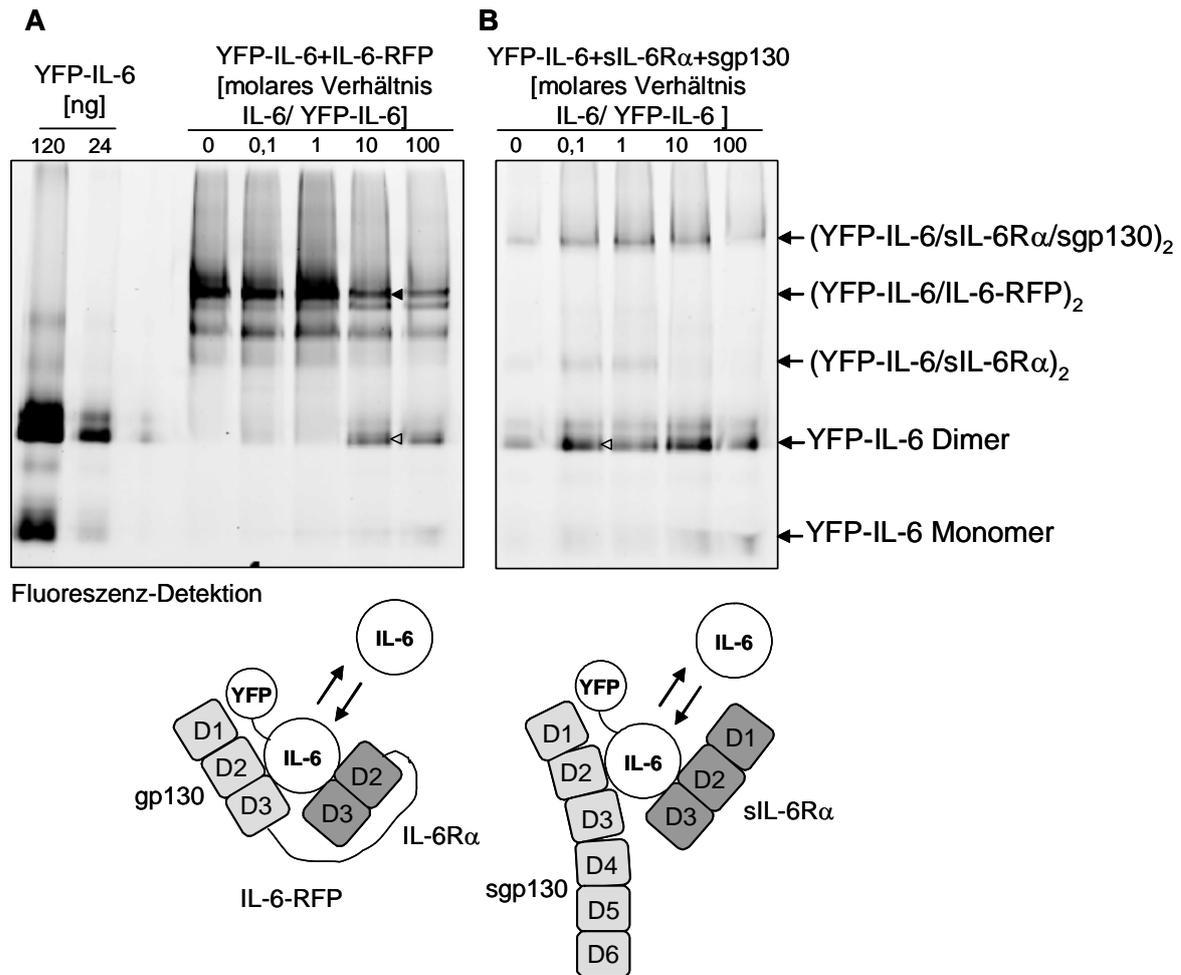


**Abb. 15: Analyse der Stabilität der Komplexe YFP-IL-6/IL-6-RFP und YFP-IL-6/sIL-6R $\alpha$ /sgp130 im Verlauf der Zeit**

**(A)** Zur Komplexbildung wurden 24 ng YFP-IL-6 mit IL-6-RFP in einem molaren Verhältnis von 1:2 für 30 min bei RT präinkubiert. Dann wurden die Komplexe für weitere 1, 10, 30, 120 oder 360 min bei RT ohne Zugabe von nicht-markiertem IL-6 inkubiert und anschließend mit BN-PAGE und Fluoreszenz-scanning untersucht.

**(B)** Parallel wurden 24 ng YFP-IL-6 mit sIL-6R $\alpha$  und sgp130 in einem molaren Verhältnis von 1:2:2 für 30 min bei RT präinkubiert. Danach wurde wie in (A) verfahren.

Wie in Abb. 15A und B gezeigt, sind die Komplexe YFP-IL-6/IL-6-RFP bzw. YFP-IL-6/sIL-6R $\alpha$ /sgp130 über 360 min stabil. Durch Zugabe eines 10-fach molaren Überschusses IL-6 über YFP-IL-6 für verschiedene Zeiträume (Daten nicht gezeigt) findet kein Austausch von YFP-IL-6 gegen IL-6 statt.



**Abb. 16: Analyse des Austauschs von IL-6 gegen YFP-IL-6 in den Komplexen YFP-IL-6/IL-6-RFP und YFP-IL-6/sIL-6Rα/sgp130 nach Zugabe von IL-6 in verschiedenen Konzentrationen**

**(A)** Zur Komplexbildung wurden 24 ng YFP-IL-6 mit IL-6-RFP in einem molaren Verhältnis von 1:2 für 30 min bei RT präinkubiert. Dann wurden die Komplexe für 120 min bei RT mit IL-6 in den angegebenen molaren Verhältnissen zu YFP-IL-6 inkubiert und anschließend mit BN-PAGE und Fluoreszenz-scanning untersucht.

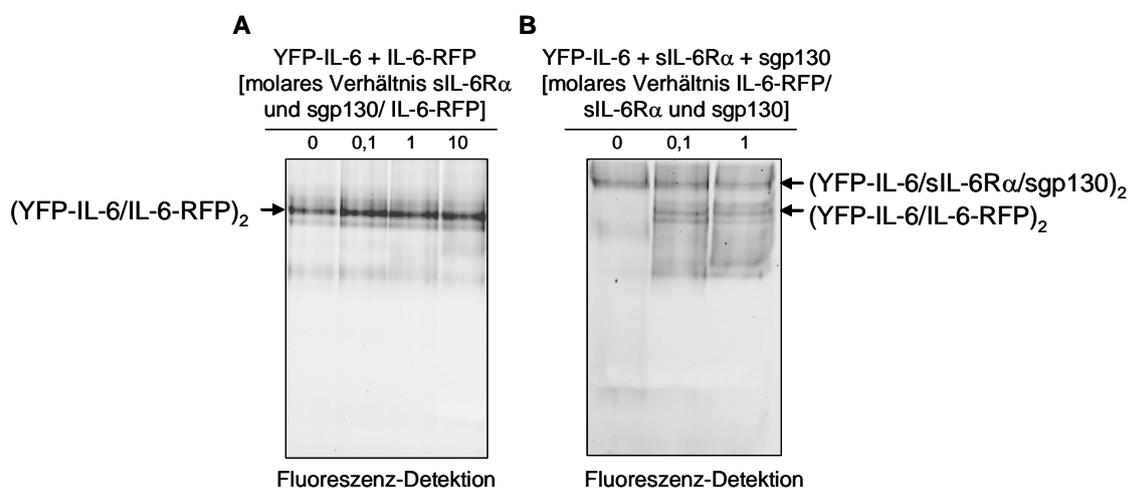
**(B)** Parallel wurden 24 ng YFP-IL-6 mit sIL-6Rα und sgp130 im molaren Verhältnis von 1:2:2 für 30 min bei RT präinkubiert. Anschließend wurde analog zu (A) fortgefahren.

Nun wurde analysiert, ob IL-6 in steigenden Konzentrationen YFP-IL-6 aus den Komplexen YFP-IL-6/IL-6-RFP bzw. YFP-IL-6/sIL-6Rα/sgp130 innerhalb von 120 min verdrängt. Wie in Abb. 16A gezeigt, wird ein 10-fach molares Überschuss IL-6 über YFP-IL-6 benötigt, um YFP-IL-6 teilweise gegen IL-6 auszutauschen. Die Fluoreszenzintensität des Komplexes aus YFP-IL-6 und IL-6-RFP nimmt bei Inkubation mit einem 10-fach molaren Überschuss IL-6 ab (gefülltes Dreieck), während sich die Fluoreszenzintensität der YFP-IL-6 Dimere verstärkt (nicht-gefülltes Dreieck). Im Falle des Komplexes aus YFP-IL-6 und seinen löslichen

Rezeptoren (Abb. 16B) reichen kleinere Mengen nicht-markiertes IL-6 aus, um YFP-IL-6 aus dem Komplex zu verdrängen. Die Fluoreszenz der YFP-IL-6 Dimere steigt schon an, wenn IL-6 in einem nur 0,1-fach molaren Überschuss zugegeben wird (nicht-gefülltes Dreieck). Demzufolge wird YFP-IL-6 von IL-6-RFP mit höherer Affinität gebunden als von seinen löslichen Rezeptoren.

### 3.2.3.3 BN-PAGE: Direkter Vergleich der Bindungsaffinitäten zwischen IL-6-RFP und YFP-IL-6 mit den Bindungsaffinitäten zwischen sIL-6R $\alpha$ /sgp130 und YFP-IL-6

In diesem Versuch wurden steigende Mengen sIL-6R $\alpha$  und sgp130 für zwei Stunden zum Komplex aus YFP-IL-6 und IL-6-RFP gegeben (Abb. 17A), um herauszufinden, ob die löslichen Rezeptoren YFP-IL-6 aus dem Komplex YFP-IL-6/IL-6-RFP lösen und dadurch den Komplex YFP-IL-6/sIL-6R $\alpha$ /sgp130 bilden können. Wie in Abb. 17A gezeigt, ist nach zwei Stunden fast kein ternärer Komplex aus YFP-IL-6/sIL-6R $\alpha$ /sgp130 gebildet worden. Die löslichen Rezeptoren können YFP-IL-6 nicht aus dem Komplex YFP-IL-6/IL-6-RFP lösen. In Abb. 17B wird die entgegengesetzte Situation untersucht, d.h., steigenden Mengen IL-6-RFP werden dem Komplex YFP-IL-6/sIL-6R $\alpha$ /sgp130 zugesetzt, und beobachtet, ob sich der Komplex YFP-IL-6/IL-6-RFP ausbildet. Wird IL-6-RFP zum präformierten Komplex YFP-IL-6/sIL-6R $\alpha$ /sgp130 gegeben, dann wird der Komplex YFP-IL-6/IL-6-RFP schon nach Zugabe von IL-6-RFP in einer 0,1-fach molaren Konzentration innerhalb von zwei Stunden ausgebildet. Folglich wird YFP-IL-6 im Komplex mit IL-6-RFP mit höherer Affinität gebunden als im Komplex mit sIL-6R $\alpha$  und sgp130. Wenn IL-6-RFP, sIL-6R $\alpha$  und sgp130 in einer IL-6-haltigen Lösung vorliegen, verschiebt sich das Bindungsgleichgewicht zugunsten des Komplexes IL-6/IL-6-RFP.



**Abb. 17: Konkurrenz von IL-6-RFP und sIL-6R $\alpha$ /sgp130 um YFP-IL-6**

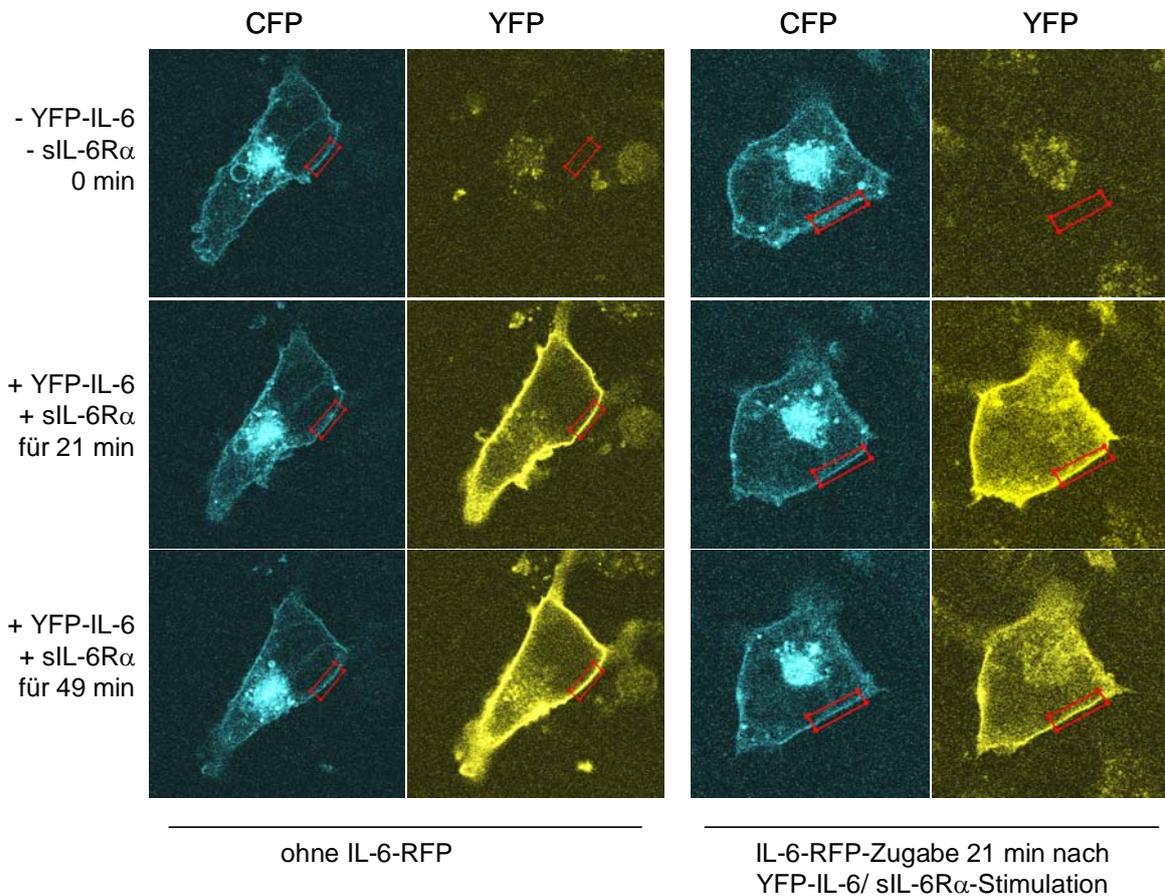
(A) 24 ng YFP-IL-6 wurden mit einem zweifach molaren Überschuss IL-6-RFP zur Komplexbildung für 30 min bei RT inkubiert. Dann wurde der Komplex YFP-IL-6/IL-6-RFP mit sIL-6R $\alpha$  und sgp130 in einer 0-, 0,1-, 1- oder 10-fach molaren Konzentration bezogen auf IL-6-RFP für zwei Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Proteinkomplexe mit Hilfe der BN-PAGE aufgetrennt und die Fluoreszenz von YFP-IL-6 mit einem Fluoreszenz-scanner detektiert.

(B) 24 ng YFP-IL-6 wurden mit einem 10-fach molaren Überschuss sIL-6R $\alpha$  und sgp130 zur Komplexbildung für 30 min bei RT inkubiert. Der Komplex aus YFP-IL-6, sIL-6R $\alpha$  und sgp130 wurde mit IL-6-RFP in einer 0-, 0,1- oder 1-fach molaren Konzentration bezogen auf sIL-6R $\alpha$  und sgp130 inkubiert. Anschließend wurde wie in (A) verfahren.

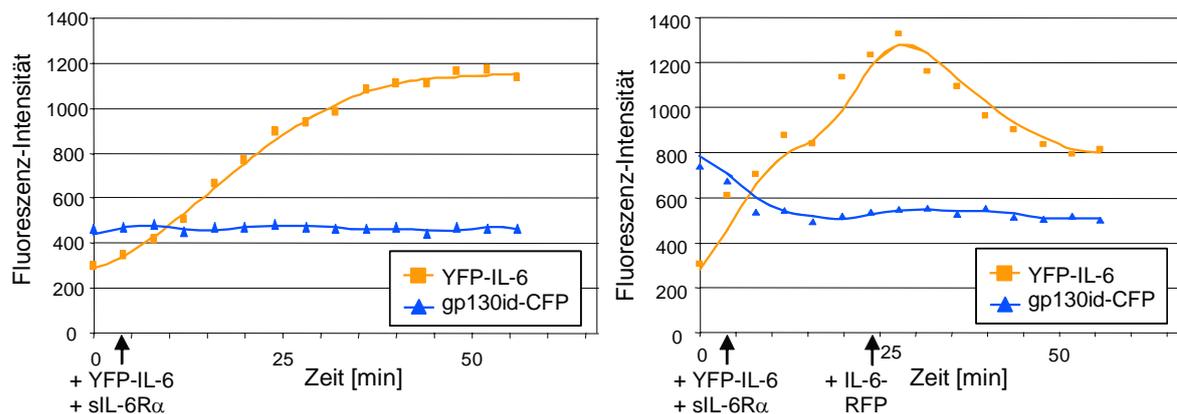
**3.3 IL-6-RFP löst YFP-IL-6 aus seinem Rezeptorkomplex auf der Zelloberfläche**

Als nächstes wurde untersucht, ob IL-6-RFP aufgrund seiner hohen Affinität zu IL-6 dieses aus seinem Rezeptorkomplex auf der Plasmamembran herauslösen kann. Hierbei würde IL-6-RFP das Bindungsgleichgewicht auf die Seite des Komplexes IL-6/IL-6-RFP verschieben. Zu diesem Zweck wurden COS-7-Zellen mit einer Internalisierungs-defekten Mutante von gp130, die mit CFP fusioniert war (gp130id-CFP), transfiziert. Anschließend wurden die transfizierten Zellen mittels *live cell imaging* am konfokalen *laser-scanning* Mikroskop untersucht. Neben endoplasmatischem Retikulum und Golgi-Apparat ist die Plasmamembran der transfizierten Zellen im CFP-Kanal deutlich sichtbar (Abb. 18A). Die Fluoreszenz, die die Organellen und die Plasmamembran sichtbar macht, rührt von der Oberflächenexpression von gp130id-CFP her. Nach Zugabe von YFP-IL-6 und sIL-6R $\alpha$  (COS-7-Zellen besitzen keinen endogenen IL-6R $\alpha$ ) akkumuliert das fluoreszierende Zytokin aufgrund der Rezeptorbindung an der Zelloberfläche. Diese Akkumulation führt zu einer im YFP-Kanal sichtbaren Membranfärbung. Die Intensitäten der CFP- und YFP-Fluoreszenz in der mit einem roten Rechteck markierten Region (*membrane region of interest, membrane-ROI*) der Zelloberfläche sind in Abb. 18B dargestellt.

A



B



**Abb. 18: Lebend-Zell-Aufnahmen der YFP-IL-6-Ablösung von der Oberfläche gp130id-CFP-transfizierter Zellen**

(A) COS-7-Zellen wurden mit 4  $\mu\text{g}$  pSVL-gp130id-CFP transfiziert, auf Coverslips ausgesät und in einer offenen Zellkultivierungs-Kammer mit konfokaler laser-scanning Mikroskopie untersucht. Die Zellen wurden mit 240 ng/ml YFP-IL-6 und 3  $\mu\text{g}/\text{ml}$  sIL-6R $\alpha$  kostimuliert und Bilder wurden eine Stunde alle vier Minuten aufgenommen (linke Seite). Eine Auswahl der Bilder ist gezeigt. In einem zweiten Versuch (rechte Seite) wurde zusätzlich ein 10-fach molarer Überschuss IL-6-RFP über YFP-IL-6 21 min nach Kostimulation zu den Zellen

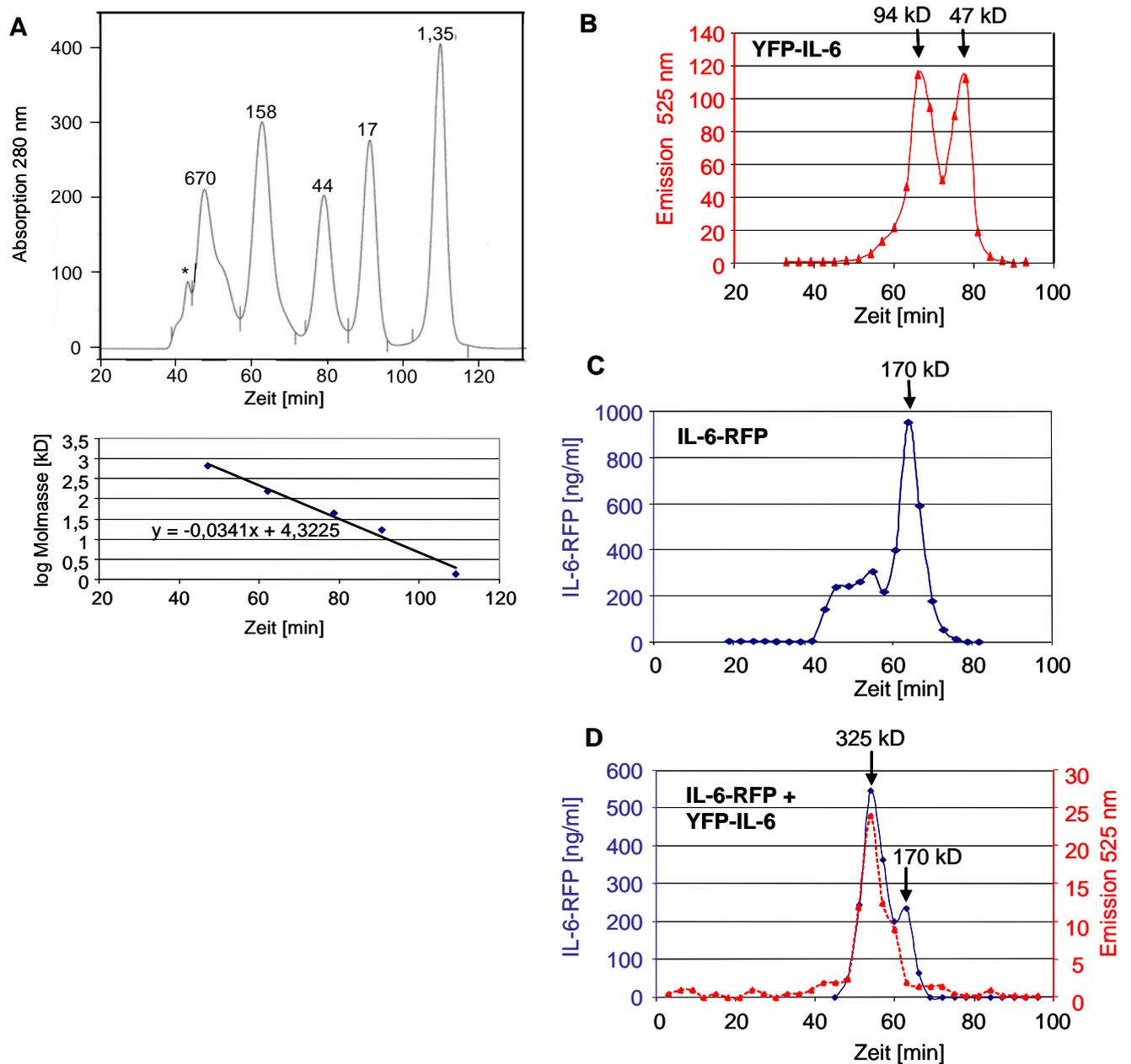
gegeben. Die Regionen der Plasmamembranen, die zur quantitativen Auswertung in B verwendet wurden, sind in den Aufnahmen rot markiert (membrane-regions of interest, membrane-ROIs). Die hier gezeigten Zellen sind für sieben Zellen jedes Ansatzes repräsentativ.

**(B)** *Quantitative Auswertung der Membran-ROIs in A, die in jedem Bild eingezeichnet sind. Die Kurve, die die CFP-Fluoreszenz zeigt, ist mit blauen Dreiecken markiert, während die Kurve, die die YFP-Fluoreszenz darstellt, mit orange-farbenen Quadraten markiert ist.*

Die Bindung von YFP-IL-6 an gp130id-CFP erreicht nach 50 min eine Sättigung (Abb. 18B, linkes Diagramm). In einem zweiten Versuch (Abb. 18A, rechte Seite) wird ein 10-fach molarer Überschuss IL-6-RFP über YFP-IL-6 21 min nach YFP-IL-6/sIL-6R $\alpha$ -Stimulation zugegeben. Die Zugabe von IL-6-RFP führt zu einer Abnahme der Zelloberflächenfärbung von YFP-IL-6, wie in der Aufnahme des YFP-Kanals zum Zeitpunkt 49 min gezeigt wird. Die entsprechenden Fluoreszenzintensitäten von YFP und CFP in den rot-markierten ROIs sind im rechten Diagramm in Abb. 18B dargestellt. Nach Zugabe von IL-6-RFP nimmt die YFP-IL-6-Fluoreszenz ab, während die gp130id-CFP-Fluoreszenz konstant bleibt. Die Abnahme des YFP/CFP-Verhältnisses an der Plasmamembran zeigt, dass YFP-IL-6 von der Membran entfernt wird. Innerhalb von 25 min sinkt die Zahl der mit YFP-IL-6-besetzten Rezeptoren um ungefähr 50%. Daraus folgt, dass IL-6-RFP dazu fähig ist, YFP-IL-6 aus aktivierten Rezeptorkomplexen an der Zelloberfläche zu lösen, indem es das Bindungsgleichgewicht auf die Seite des Komplexes YFP-IL-6/IL-6-RFP verschiebt.

### **3.4 Bestimmung der molaren Masse des Komplexes aus YFP-IL-6 und IL-6-RFP durch Gelfiltration**

Um die molekularen Massen von YFP-IL-6, IL-6-RFP und dem Komplex YFP-IL-6/IL-6-RFP in Lösung zu bestimmen, wurde eine Gelfiltration mit einer kalibrierten Superdex-Gelfiltrationssäule (Abb. 19A) durchgeführt. YFP-IL-6 und der Komplex YFP-IL-6/IL-6-RFP wurden mit Hilfe der Fluoreszenzspektroskopie in den gesammelten Elutionsfraktionen detektiert. IL-6-RFP wurde mit Hilfe eines ELISA quantifiziert.



**Abb. 19: Superdex-Gelfiltration von YFP-IL-6 und dem Komplex YFP-IL-6/IL-6-RFP**

(A) Oberes Diagramm: Gelfiltrations-Chromatogramm eines Marker-Proteingemischs (Thyreoglobulin, 670 kD;  $\gamma$ -Globulin, 158 kD; Ovalbumin, 44 kD; Myoglobin, 17 kD und Vitamin B<sub>12</sub>, 1,35 kD; der mit Stern (\*) markierte Peak stammt von einem undefinierten Protein-Aggregat; aufgetragene Gesamtproteinmenge: 9 mg). Die Absorption der Proteine wurde bei 280 nm gemessen. Die Zahlen über den Peaks geben die molaren Massen in kD an. Unteres Diagramm: Regressionskurve, die anhand der Retentionszeiten der Marker-Proteine erstellt wurde. Sie wurde benutzt, um die molaren Massen der Peaks in B zu ermitteln. Da der Trennbereich der Gelfiltrationssäule von 10 – 600 kD reicht, wurden Thyreoglobulin und Vitamin B<sub>12</sub> nicht für die Berechnungen verwendet.

(B) 57  $\mu$ g YFP-IL-6 wurden auf einer kalibrierten Superdex 200 16/60-Säule bei einer Flussrate von 1 ml/min analysiert. 3 ml-Fractionen wurden gesammelt und diese mittels Fluoreszenz-Spektroskopie analysiert, wobei die Emission von YFP bei 525 nm gemessen wurde.

*(C) IL-6-RFP (17,7 µg) wurde auf derselben Gelfiltrationssäule analysiert. 3 ml-Fractionen wurden gesammelt und diese mit ELISA analysiert.*

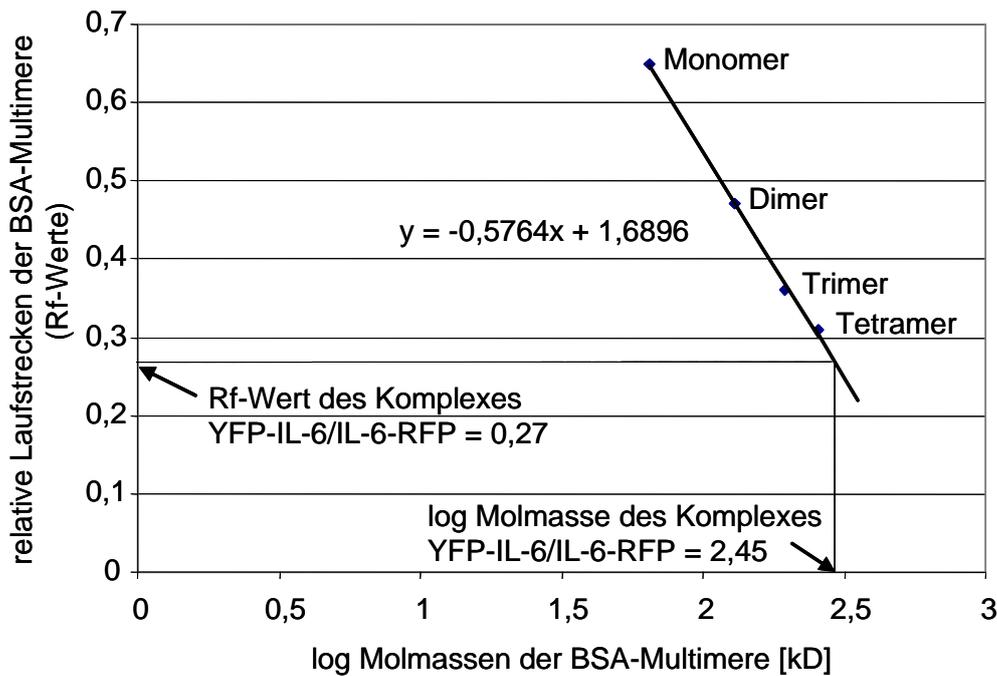
*(D) Zur Komplexbildung wurden 5,7 µg YFP-IL-6 mit einem zweifach molaren Überschuss IL-6-RFP (17,7 µg) für 30 min bei RT inkubiert. Der Komplex wurde anschließend mittels Gelfiltration untersucht. Die gesammelten 3 ml-Elutionsfraktionen wurden durch Fluoreszenzspektroskopie zur Detektion von YFP-IL-6 analysiert, und mittels ELISA untersucht, um die Konzentration von IL-6-RFP zu bestimmen. Die molekularen Massen wurden anhand der Regressionsgeraden (A) berechnet.*

YFP-IL-6 allein eluiert in zwei Peaks von der Gelfiltrationssäule (Abb. 19B). Gemäß den Retentionszeiten werden diese von YFP-IL-6-Monomeren (47 kD) bzw. YFP-IL-6-Dimeren (94 kD) hervorgerufen. Dieser Befund stimmt mit den Ergebnissen der BN-PAGE überein, bei der ebenfalls zwei YFP-IL-6-Spezies detektiert wurden.

Das Elutionsprofil von IL-6-RFP ist in Abb. 19C gezeigt. Interessanterweise konnte kein monomeres IL-6-RFP nachgewiesen werden. Der größte Anteil des IL-6-RFP kann in einem Peak, der einer Molmasse von 170 kD entspricht, detektiert werden. Dieser Peak repräsentiert wahrscheinlich dimeres IL-6-RFP. Auch einige Proteinkomplexe mit höheren Molmassen sind nachweisbar.

Eine Vorinkubation von YFP-IL-6 mit einem zweifach molaren Überschuss IL-6-RFP führt zu einem völlig anderen Elutionsprofil (Abb. 19D, rote Kurve mit gefüllten Dreiecken verglichen mit Abb. 19B). Die gesamte YFP-IL-6-Population eluiert früher von der Säule, was auf eine höhere Molmasse hinweist. Dieser Befund zeigt, dass YFP-IL-6 komplett in einem Komplex mit IL-6-RFP gebunden ist. Dies bestätigt ebenfalls die Ergebnisse der blauen, nativen Gelelektrophorese. Relevante Fraktionen wurden mit einem ELISA analysiert, um IL-6-RFP zu detektieren (Abb. 19D, blaue Kurve mit gefüllten Rauten). Alle Fraktionen, die YFP-IL-6 enthalten, enthalten auch IL-6-RFP. Zusätzlich erscheint ein zweiter Peak von IL-6-RFP, welcher kein YFP-IL-6 enthält. Dieser Peak entspricht einer molaren Masse von 170 kD und repräsentiert dimeres IL-6-RFP ohne Ligand. Mit Hilfe der Gelfiltration wurde eine molare Masse des Komplexes YFP-IL-6/IL-6-RFP von 325 kD ermittelt.

Die Molmasse des Komplexes aus YFP-IL-6 und IL-6-RFP wurde darüber hinaus mittels BN-PAGE bestimmt. Hierbei dienten die Mutlimere des BSA als Marker-Proteine. Die relativen Laufstrecken ( $R_f$ -Werte) der BSA-Multimere wurden gegen die Logarithmen ihrer Molmassen aufgetragen und eine Regressionsgerade erstellt (Abb. 20).



**Abb. 20: Bestimmung der Molmasse des YFP-IL-6/IL-6-RFP Komplexes mittels BN-PAGE**  
 Mit BSA versetztes IL-6-RFP wurde mittels BN-PAGE getrennt. Die BSA-Multimere dienen als Markerproteine zur Erstellung einer Regressionsgeraden. Bei dieser Regressionsgeraden wurden die relativen Laufstrecken der BSA-Multimere (Rf-Werte) gegen die Logarithmen ihrer Molmassen aufgetragen. Anhand des Rf-Wertes des Komplexes YFP-IL-6/IL-6-RFP wurde mit Hilfe dieser Geraden eine Molmasse des Komplexes von 290 kD ermittelt.

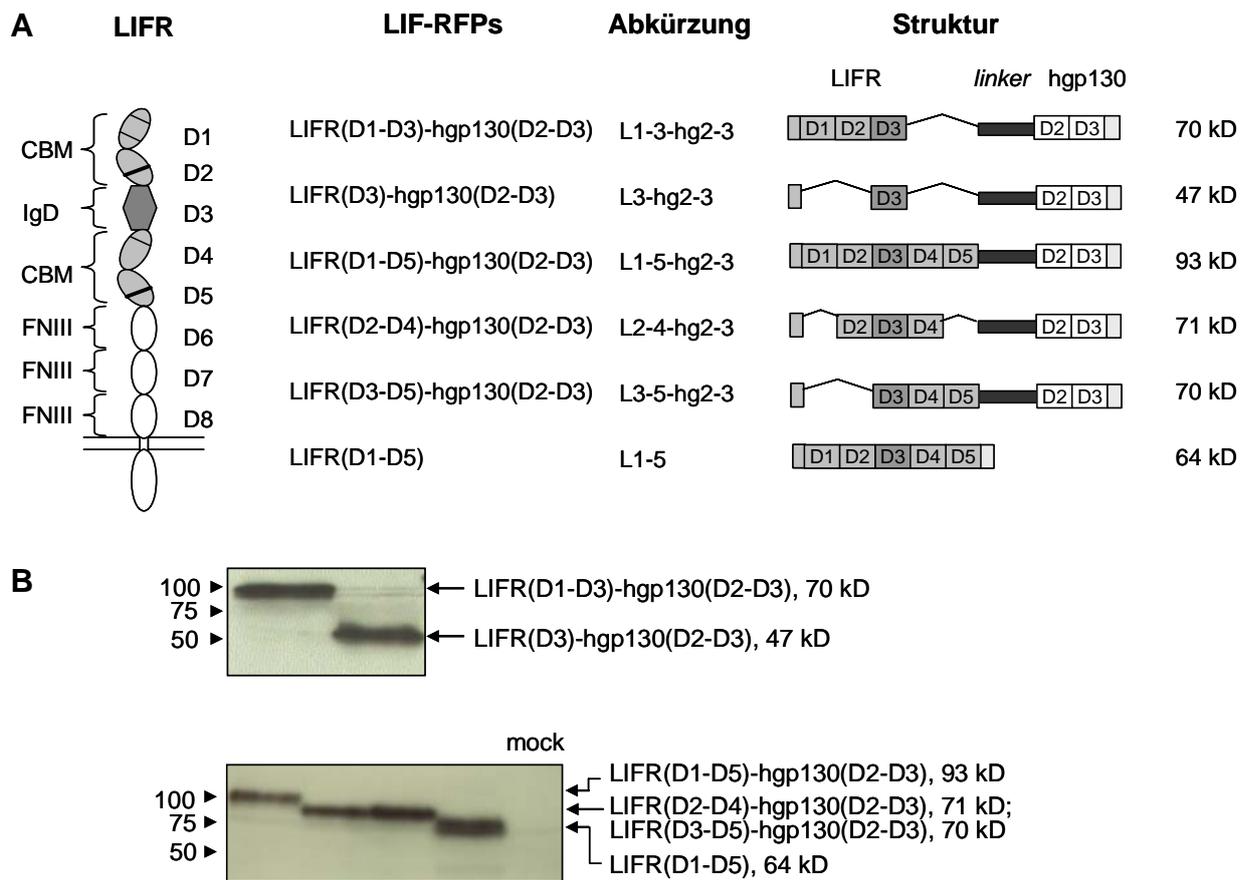
Anhand des Rf-Wertes wurde für den YFP-IL-6/IL-6-RFP Komplex eine molare Masse von 290 kD ermittelt.

Wenn der Komplex aus YFP-IL-6 und IL-6-RFP analog zum nativen, hexameren Rezeptorkomplex aufgebaut ist, der aus je zwei Molekülen IL-6, IL-6R $\alpha$  und gp130 besteht [37], wird ein tetramerer Komplex aus je zwei Molekülen YFP-IL-6 und IL-6-RFP erwartet. Die berechnete molare Masse für einen solchen Komplex ist 264 kD. Die Diskrepanz zwischen den gemessenen Molmassen von 290 kD (ermittelt durch BN-PAGE) und 325 kD (ermittelt durch Gelfiltration) und der berechneten molaren Masse lässt sich mit dem sperrigen Aufbau des IL-6-Rezeptorkomplexes erklären (siehe Diskussion).

### 3.5 Klonierung und Expression verschiedener Fusionsproteine bestehend aus Domänen des mLIFR und hgp130 als potentielle Inhibitoren für humanes LIF

IL-6-Typ-Zytokine besitzen definierte Rezeptorbindestellen, so genannte *sites*, die in Mutagenese-Studien an IL-6, CNTF und LIF [35, 36] charakterisiert wurden. Die IL-6-Typ-Zytokine können in solche unterteilt werden, die drei (I, II, III) oder zwei (II, III) Rezeptorbindestellen aufweisen. Die *site* I ist die Bindestelle für einen spezifischen  $\alpha$ -Rezeptor, während die *site* II die universelle Bindestelle für gp130 zu sein scheint. Je nach Zytokin wird die *site* III sehr wahrscheinlich zur Bindung an LIFR, OSMR oder ein zweites gp130-Molekül genutzt [4]. Der im ersten Teil (3.1) charakterisierte IL-6-Inhibitor IL-6-RFP diente dazu, ein Zytokin zu hemmen, das alle drei Rezeptorbindestellen besitzt. Es gibt aber auch Zytokine, die keinen zum IL-6R $\alpha$  analogen  $\alpha$ -Rezeptor binden und demzufolge keine *site* I aufweisen. Sie gehören zur zweiten Zytokingruppe, deren Mitglieder nur die *sites* II und III besitzen. Ein Beispiel für ein Zytokin dieser Gruppe ist der *leukemia inhibitory factor* (LIF). Im Folgenden wird die Klonierung von inhibitorischen Rezeptor-Fusionsproteinen für humanes und murines LIF als Prototypen für Inhibitoren für Zytokine, die nur *sites* II und III besitzen, beschrieben. Wir haben diese Inhibitoren „*site* II/III-Inhibitoren“ genannt.

Um die Molmasse der LIF-Inhibitoren so niedrig wie möglich zu halten, sollten nur solche Domänen von gp130 und LIFR integriert werden, die absolut notwendig für die Bindung von LIF sind. Für gp130 ist klar gezeigt, dass die Domänen 2 und 3, die das CBM ausbilden, für die Bindung von LIF ausreichen [41]. Im Gegensatz hierzu gibt es widersprüchliche Aussagen im Hinblick auf die Domänen des LIFR, die zur LIF-Bindung benötigt werden (siehe Einleitung). Um die Aussagen zu überprüfen, wurden die in Abb. 21 dargestellten, potentiellen hLIF-Inhibitoren kloniert. Da humanes LIF an den murinen LIFR mit einer viel höheren Affinität als an hLIFR bindet [71], wurden in alle potentiellen LIF-Inhibitoren Teile des mLIFR eingefügt. Da in dieser Arbeit nur Konstrukte verwendet wurden, die den murinen LIFR enthalten, jedoch nicht den humanen, wird im Folgenden auf das „m“ vor LIFR zur Bezeichnung der Spezies verzichtet.



**Abb. 21: Schematische Darstellung der Struktur der möglichen Inhibitoren für humanes LIF und deren Expression in COS-7-Zellen**

(A) Schematische Darstellung der Domänenstruktur des LIFR und der Aufbau der möglichen Inhibitoren für humanes LIF. Dünne Querstriche in der schematischen Darstellung des LIFR repräsentieren Cysteinbrücken, dicke Querstriche ein WSXWS-Motiv. IgD = Immunglobulin-ähnliche Domäne, CBM = Zytokin-bindendes Modul, FNIII = Fibronectin-Typ-III-ähnliche Domäne. Die Domänen des LIFR in den möglichen Inhibitoren stammen aus der Maus, während die Domänen von gp130 humanen (h) Ursprungs sind. Als linker wurde stalk-49 (siehe Text) verwendet. Die kleinen Rechtecke an den N-Termini der LIF-Inhibitoren stellen jeweils die Signalsequenz des mLIFR dar, die kleinen, C-terminalen Rechtecke zeigen jeweils ein flag-tag an. Die molekularen Massen wurden ohne Berücksichtigung der Glykosylierung berechnet.

(B) COS-7-Zellen wurden mit  $10 \mu\text{g}$  pSVL $\Delta\text{EcoRI}$ , der die kodierende Sequenz des angegebenen humanen LIF-Inhibitors enthielt, oder Leervektor (mock) transfiziert. 48 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen lysiert und die Lysate nach SDS-PAGE und Western blotting mit einem flag-Antikörper analysiert.

Der LIFR ist ein 190 kD Glykoprotein, welches acht extrazelluläre Domänen besitzt (Abb. 21A, links): ein N-terminales CBM (D1-D2), eine Immunglobulin-ähnliche Domäne (D3), ein C-terminales CBM (D4-D5) und drei Fibronectin-Typ-III-ähnliche Domänen (D6-D8). Die Membran-proximalen Fibronectin-Typ-III-ähnlichen-Domänen in den Rezeptoren der IL-6-

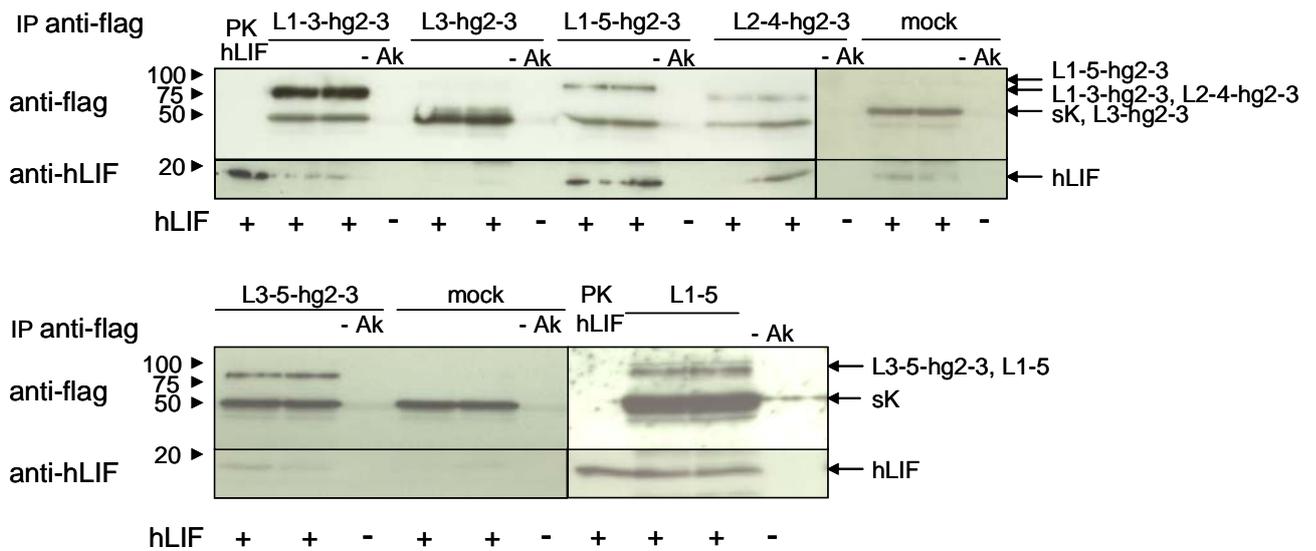
Typ-Zytokine sind nicht in die Ligandenbindung involviert. Sie sind jedoch für die Kopplung von Ligandenbindung und Signaltransduktion notwendig. Ihre Deletion führt zu Rezeptoren, die nicht zur Signalweiterleitung fähig sind [72, 73].

Die oberen fünf potentiellen, humanen LIF-Inhibitoren [(LIFR(D1-D3)-hgp130(D2-D3), LIFR(D3)-hgp130(D2-D3), LIFR(D1-D5)-hgp130(D2-D3), LIFR(D2-D4)-hgp130(D2-D3), LIFR(D3-D5)-hgp130(D2-D3), Abb. 21A, rechter Teil] enthalten die dargestellten Domänen des mLIFR, welche mit Hilfe des *linkers stalk-49* mit den Domänen D2-D3 des humanen gp130 fusioniert wurden. Der *linker stalk-49* wurde bereits bei der Klonierung des IL-6-Inhibitors IL-6-RFP verwendet [55]. *stalk-49* ist ein flexibles Fragment der extrazellulären, Membran-proximalen Region des humanen IL-6R $\alpha$  und besteht aus 49 Aminosäuren [74]. Zur Erleichterung der Detektion der potentiellen LIF-Inhibitoren wurde ein *flag-tag* an die C-Termini aller Konstrukte angefügt. Um die Rolle des hgp130 in einem humanen LIF-Inhibitor, welcher mLIFR enthält, zu untersuchen, wurde LIFR(D1-D5) kloniert, welcher nur die Domänen D1-D5 des mLIFR enthält, jedoch nicht das CBM (D2-D3) des hgp130.

Die potentiellen, humanen LIF-Inhibitoren wurden in COS-7-Zellen exprimiert und deren Lysate nach SDS-PAGE und Western *blotting* mit einem *flag*-Antikörper untersucht (Abb. 21B). Alle Inhibitoren konnten gut detektiert werden und besaßen die erwarteten Molmassen. Im Allgemeinen wurden Inhibitoren mit geringerer Molmasse besser exprimiert als solche mit größeren Molmassen.

### **3.6 Die potentiellen, humanen LIF-Inhibitoren LIFR(D1-D5)-hgp130(D2-D3) und LIFR(D1-D5) binden hLIF am effizientesten**

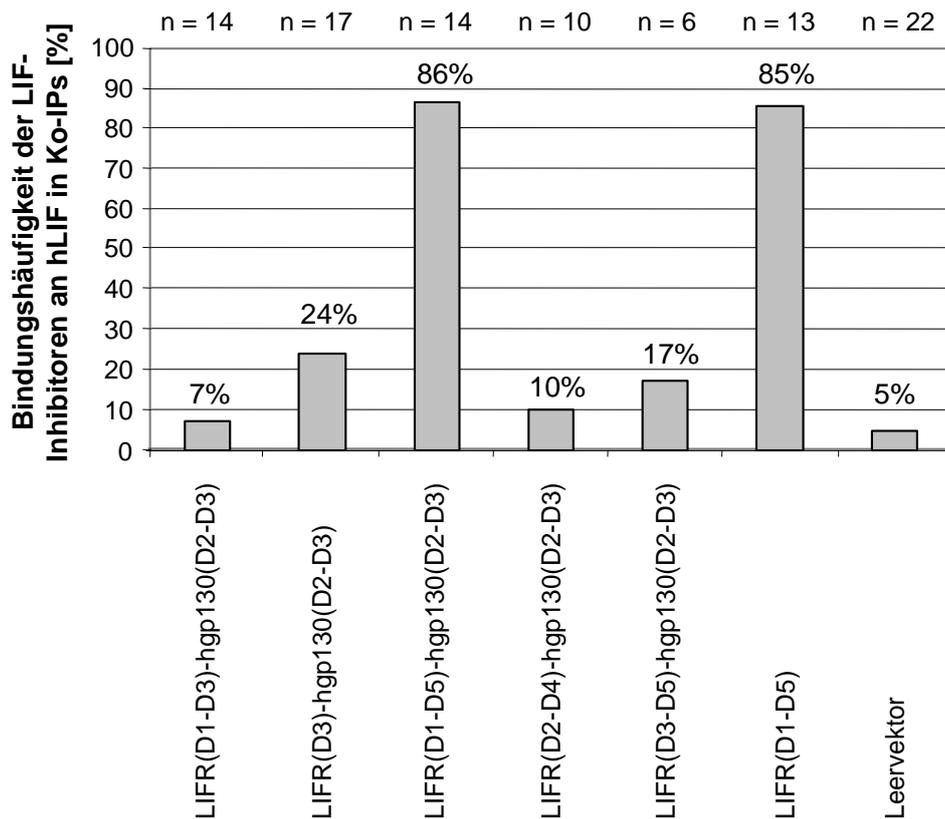
Alle potentiellen LIF-Inhibitoren wurden bezüglich ihrer Fähigkeit, hLIF zu binden, in Koimmunpräzipitations-Studien untersucht. Hierzu wurden COS-7-Zellen mit pSVL $\Delta$ EcoRI, der die kodierende Sequenz des angegebenen, humanen LIF-Inhibitors enthielt, oder mit Leervektor transfiziert. 48 Stunden nach der Transfektion wurden die mit einem *flag-tag* markierten LIF-Inhibitoren aus den Zellkultur-Überständen mit einem an ProteinA-Sepharose gekoppelten *flag*-Antikörper präzipitiert. Anschließend wurden die präzipitierten Proteine mit 50 nM humanem LIF in PBS inkubiert, um eine Koimmunpräzipitation zu ermöglichen. Die Protein-Komplexe wurden dann von der ProteinA-Sepharose eluiert und nach SDS-PAGE und Western *blotting* mit einem *flag*- oder hLIF-Antikörper detektiert. Das Ergebnis einer repräsentativen Koimmunpräzipitation jedes humanen LIF-Inhibitors ist in Abb. 22 gezeigt.



**Abb. 22: Koimmunpräzipitations-Studien der potentiellen, humanen LIF-Inhibitoren mit humanem LIF**

COS-7-Zellen wurden mit 10  $\mu$ g pSVL $\Delta$ EcoRI, der die kodierende Sequenz des angegebenen, humanen LIF-Inhibitors enthielt, oder Leervektor (mock) transfiziert. 48 Stunden nach der Transfektion wurden die mit einem flag-tag markierten LIF-Inhibitoren aus den Zellkultur-Überständen mit einem an ProteinA-Sepharose gekoppelten flag-Antikörper präzipitiert. Anschließend wurden die präzipitierten Proteine mit 50 nM humanem LIF (hLIF) in PBS inkubiert, um eine Koimmunpräzipitation zu ermöglichen. Die Protein-Komplexe wurden dann von der ProteinA-Sepharose eluiert und nach SDS-PAGE und Western blotting mit einem flag- oder hLIF-Antikörper detektiert. Die Koimmunpräzipitationen wurden mehrmals wiederholt. Eine repräsentative Koimmunpräzipitation ist für jeden Inhibitor gezeigt. Als Positivkontrolle (PK) für den hLIF-Antikörper wurden 20 ng hLIF verwendet. IP = Immunpräzipitation; -Ak = ohne Antikörper; sK = schwere Kette des flag-Antikörpers.

LIFR(D1-D3)-hgp130(D2-D3), LIFR(D3)-hgp130(D2-D3), LIFR(D2-D4)-hgp130(D2-D3) und LIFR(D3-D5)-hgp130(D2-D3) binden humanes LIF nur schwach, wohingegen LIFR(D1-D5)-hgp130(D2-D3) und LIFR(D1-D5) humanes LIF am effizientesten kopräzipitieren. Da die Resultate der Koimmunpräzipitations-Studien stark von der Transfektionseffizienz der COS-7-Zellen abhängen, wurden sie mehrmals wiederholt und die prozentuale Häufigkeit der Bindung von hLIF an die Inhibitoren bestimmt.



**Abb. 23: Häufigkeit der Koimmunpräzipitation der verschiedenen, potentiellen LIF-Inhibitoren mit hLIF**

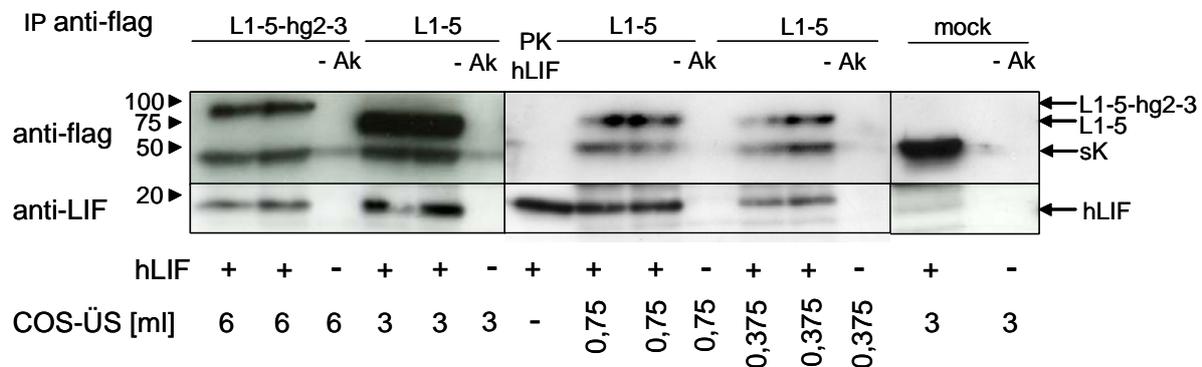
Die Koimmunpräzipitationen (Ko-IPs) wurden wie in Abb. 22 beschrieben n-mal ausgeführt und die prozentuale Häufigkeit der Bindung zwischen den Inhibitoren und hLIF ermittelt.

Wie in Abb. 23 gezeigt, binden LIFR(D1-D3)-hgp130(D2-D3), LIFR(D3)-hgp130(D2-D3), LIFR(D2-D4)-hgp130(D2-D3) und LIFR(D3-D5)-hgp130(D2-D3) hLIF nur schwach. Die Bindehäufigkeiten liegen in der Reihenfolge der Aufzählung bei 7%, 24%, 10% oder 17%. Die Bindehäufigkeit der Negativkontrolle (Kulturüberstand von Zellen, die mit Leervektor transfiziert wurden) beträgt 5%. Im Gegensatz hierzu binden LIFR(D1-D5)-hgp130(D2-D3) und LIFR(D1-D5) sehr häufig an hLIF. Ihre Bindehäufigkeit von ungefähr 85% ist die höchste aller potentiellen LIF-Inhibitoren. Folglich wurden LIFR(D1-D5)-hgp130(D2-D3) und LIFR(D1-D5) als geeignete Proteine zur Bindung von hLIF ausgewählt.

### 3.7 Die Domänen D2 und D3 von hgp130 werden in einem humanen LIF-Inhibitor, der auf mLIFR basiert, nicht benötigt

Um die Rolle des CBMs von hgp130 (D2-D3) im Konstrukt LIFR(D1-D5)-hgp130(D2-D3) zu untersuchen, wurden LIFR(D1-D5) und LIFR(D1-D5)-hgp130(D2-D3) bezüglich ihrer Fähigkeit, hLIF zu binden, direkt miteinander verglichen. Da LIFR(D1-D5) von COS-7-

Zellen besser exprimiert wird als LIFR(D1-D5)-hgp130(D2-D3), wurde LIFR(D1-D5) aus geringeren Volumina des Kulturüberstandes transfizierter COS-7-Zellen präzipitiert als LIFR(D1-D5)-hgp130(D2-D3), (Abb. 24).



**Abb. 24: Vergleich von LIFR(D1-D5)-hgp130(D2-D3) und LIFR(D1-D5) bezüglich ihrer Fähigkeit, hLIF zu binden.**

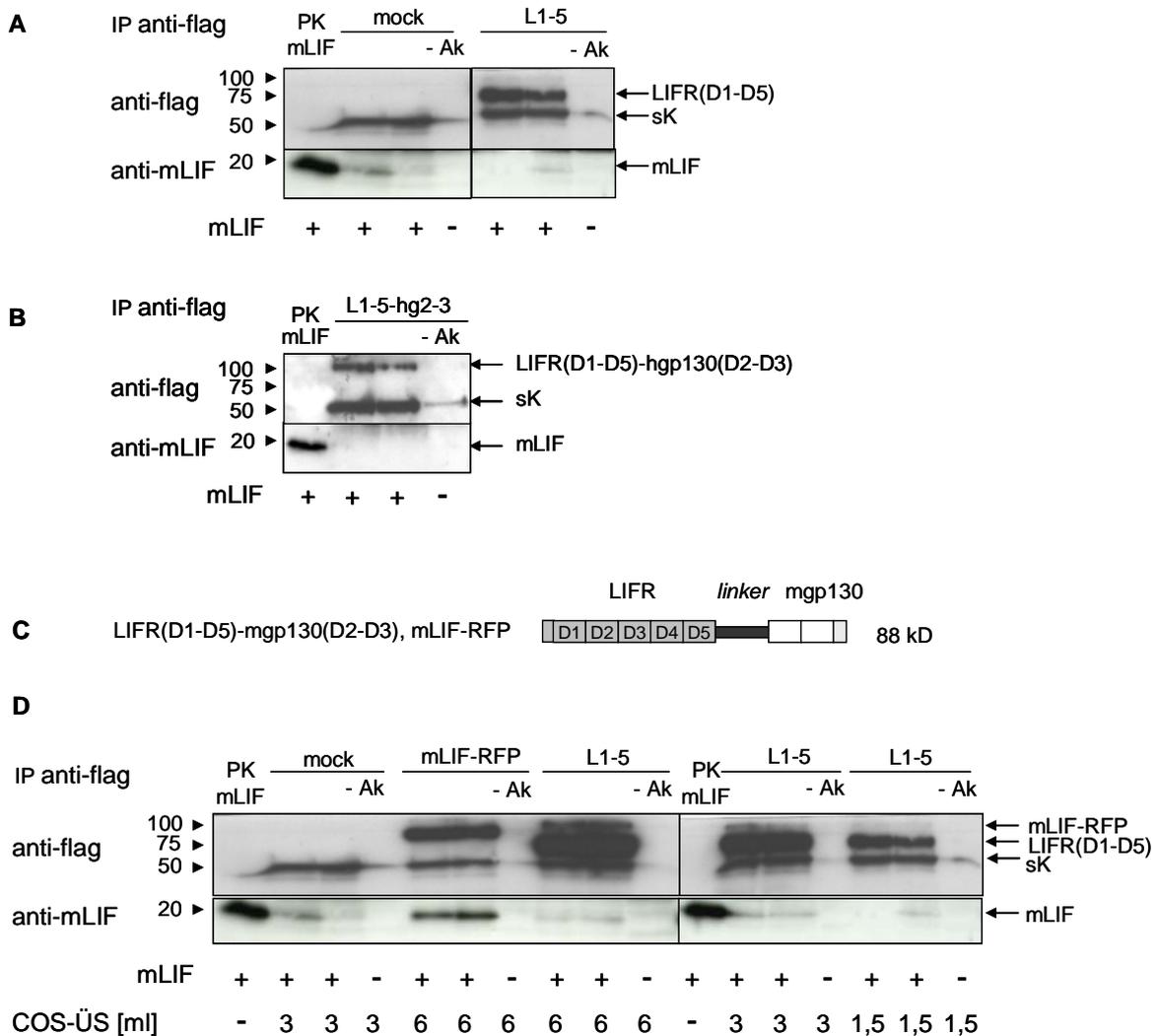
Koimmunpräzipitations-Studien wurden wie in Abb. 22 durchgeführt. Um (D1-D5)-hgp130(D2-D3) und LIFR(D1-D5) in gleichen Mengen zu präzipitieren, wurden unterschiedliche Volumina des Kulturüberstandes von COS-7-Zellen (COS-ÜS), die LIFR(D1-D5) sezernierten, eingesetzt. Als Positivkontrolle (PK) für den hLIF-Antikörper wurden 20 ng hLIF verwendet. IP = Immunpräzipitation; -Ak = ohne Antikörper; sK = schwere Kette des flag-Antikörpers.

Bei Verwendung von 0,75 ml Kulturüberstand zur Präzipitation von LIFR(D1-D5) und 6 ml Kulturüberstand zur Präzipitation von LIFR(D1-D5)-hgp130(D2-D3) sind die Mengen der präzipitierten Inhibitoren vergleichbar. In diesem Falle binden LIFR(D1-D5) und LIFR(D1-D5)-hgp130(D2-D3) hLIF im gleichen Maße. Dies bedeutet, dass D2 und D3 von hgp130 für die Bindung von hLIF im Konstrukt LIFR(D1-D5)-hgp130(D2-D3) überflüssig sind.

### 3.8 D2 und D3 des murinen gp130 erhöhen die Bindungsaffinität zwischen dem murinen LIF-bindenden Protein (LBP) und murinem LIF

Der natürliche Inhibitor des murinen LIF ist das LIF-bindende Protein (LBP). Es ist eine verkürzte Form des zellulären LIFR und bindet mLIF mit einer geringen Affinität von etwa 600-2000 pM [42, 71]. Wie in den vorherigen Abschnitten (3.5-3.7) berichtet, wurde der auf dem murinen LIFR basierende Inhibitor LIFR(D1-D5) verwendet, um humanes LIF zu hemmen. Hierbei wurden Domänen des murinen LIFR zur Bindung von humanem LIF eingesetzt, weil der mLIFR humanes LIF mit viel höherer Affinität bindet als der humane LIFR [42, 71]. Da der LIF-Inhibitor LIFR(D1-D5) strukturell LBP ähnelt, wurde nun untersucht, ob LIFR(D1-D5) sich auch für die Bindung von mLIF eignet. Erwartet wurde nun

eine geringere Bindungsaffinität zwischen LIFR(D1-D5) und mLIF als zwischen LIFR(D1-D5) und hLIF. Grund hierfür ist, dass der mLIFR eine viel geringere Bindungsaffinität zu mLIF als zu hLIF hat.



**Abb. 25: Vergleich von LIFR(D1-D5)-hgp130(D2-D3), LIFR(D1-D5) und LIFR(D1-D5)-mgp130(D2-D3) bezüglich ihrer Fähigkeit, mLIF zu binden**

(A, B, D) Die LIF-Inhibitoren wurden wie in Abb. 22 beschrieben aus Zellkulturüberständen von COS-7-Zellen präzipitiert, die mit (A) *pSVLΔEcoRI-LIFR(D1-D5)-hgp130(D2-D3)*, (B) *pSVLΔEcoRI-LIFR(D1-D5)* oder (D) *pSVLΔEcoRI-LIFR(D1-D5)-mgp130(D2-D3)* = *pSVLΔEcoRI-mLIF-RFP* transfiziert worden waren. Anschließend wurden die präzipitierten Proteinkomplexe mit 50 nM mLIF in PBS inkubiert, um eine Kopräzipitation zu ermöglichen. Die Proteinkomplexe wurden von der ProteinA-Sepharose eluiert und nach SDS-PAGE und Western blotting mit einem flag- oder mLIF-Antikörper detektiert. In Abb. 24D wurden unterschiedliche Volumina des Kulturüberstandes von COS-7-Zellen (COS-ÜS), die LIFR(D1-D5) exprimierten, verwendet, um gleiche Mengen von LIFR(D1-D5) und LIFR(D1-D5)-mgp130(D2-D3) = mLIF-RFP zu präzipitieren. Als Positivkontrolle (PK) für den mLIF-

*Antikörper wurden 20 ng mLIF verwendet. IP = Immunpräzipitation; -Ak = ohne Antikörper; sK = schwere Kette des flag-Antikörpers.*

*(C) Schematische Darstellung von LIFR(D1-D5)-mgp130(D2-D3) = mLIF-RFP, das für die Präzipitation von mLIF verwendet wurde. Die Domänen des LIFR und des gp130 stammen aus der Maus (m). Als linker wurde AGS-41 (siehe Text) verwendet. Das kleine Rechteck am N-Terminus des mLIF-RFP stellt die Signalsequenz des mLIFR dar, das kleine, C-terminale Rechteck zeigt ein flag-tag an. Die Molmasse wurde ohne Berücksichtigung der Glykosylierung berechnet.*

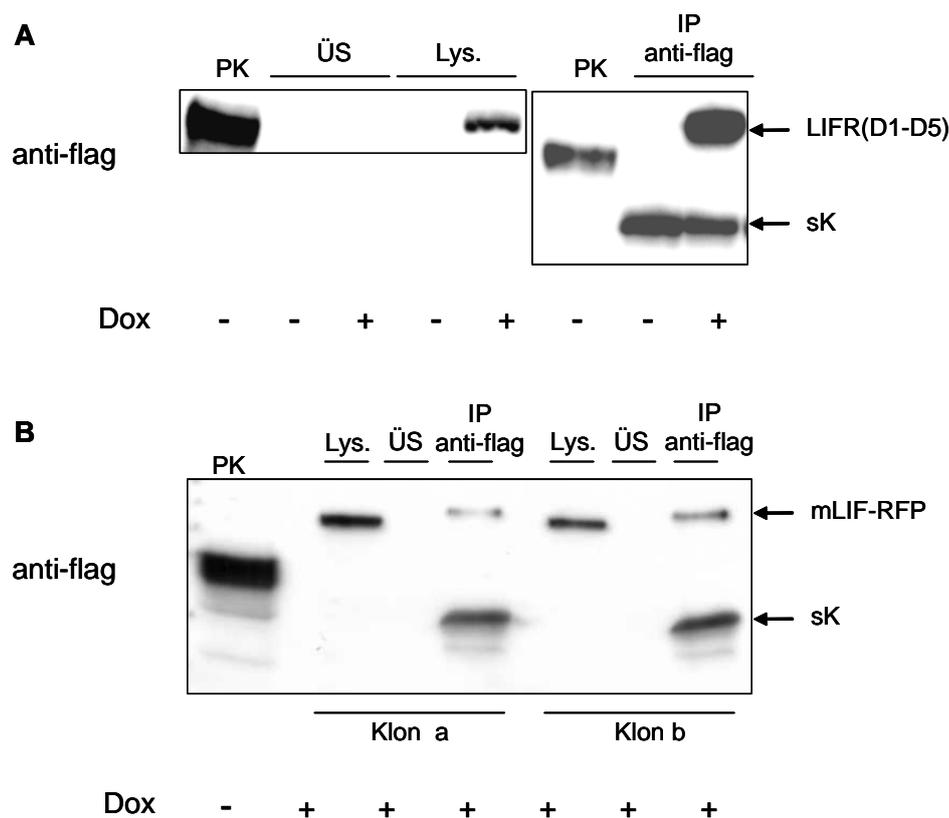
Wie in Abb. 25A gezeigt, wird mLIF nicht mit LIFR(D1-D5) kopräzipitiert, zumindest nicht in den im Versuch eingesetzten Konzentrationen. Aber auch wenn größere Mengen von LIFR(D1-D5) präzipitiert werden, ist kaum eine Kopräzipitation zwischen LIFR(D1-D5) und mLIF zu beobachten (Abb. 25D). Anschließend wurde getestet, ob das Fusionsprotein LIFR(D1-D5)-hgp130(D2-D3), welches hgp130(D2-D3) zusätzlich zu LIFR(D1-D5) enthält, eine höhere Bindungsaffinität zu mLIF aufweist als LIFR(D1-D5) alleine. LIFR(D1-D5)-hgp130(D2-D3) bindet mLIF auch nur schwach, was zeigt, dass hgp130 nur eine geringe Affinität zu mLIF hat. Deswegen wurde ein neues Rezeptor-Fusionsprotein kloniert, indem hgp130 (D2-D3) im Konstrukt LIFR(D1-D5)-hgp130(D2-D3) durch mgp130(D2-D3) ersetzt wurde (Abb. 25C). Ziel war es, durch diese Fusion die Bindungsaffinität des Fusionsproteins zu mLIF deutlich zu steigern.

Zusätzlich wurde der humane *linker stalk-49* gegen den synthetischen *linker* AGS-41 [55] ausgetauscht, welcher aus flexiblen Ala-, Gly- und Ser-reichen Peptiden mit einer Gesamtlänge von 41 Aminosäuren besteht. AGS-41 sollte in Mäusen weniger immunogen sein als der *linker stalk-49*, der humanen Ursprungs ist. LIFR(D1-D5)-mgp130(D2-D3), abgekürzt mLIF-RFP, kopräzipitiert mLIF mit hoher Effizienz (Abb. 25D). Dies bedeutet, dass für eine hochaffine Bindung von mLIF ein Fusionsprotein aus LIFR(D1-D5) und mgp130(D2-D3) erforderlich ist. Die Fusion der Liganden-bindenden Domänen von mLIFR und mgp130 führt zu einem Inhibitor, dessen Affinität zu mLIF deutlich höher ist als die des natürlichen LIF-Inhibitors LBP [71].

### 3.9 LIFR(D1-D5) und mLIF-RFP hemmen spezifisch die Bioaktivitäten von hLIF bzw. mLIF

#### 3.9.1 Stabile Expression von LIFR(D1-D5) and mLIF-RFP in Hek 293 Flp-In T-REx Zellen

Die vorangegangenen Experimente haben gezeigt, dass hLIF von LIFR(D1-D5) effektiv gebunden wird. Zur Bindung von mLIF ist ein Fusionsprotein aus den Liganden-bindenden Domänen von mLIFR und mgp130 notwendig. Als nächstes wurde nun die Wirkung der beiden Inhibitoren auf die Signaltransduktion in Zellen untersucht. Für Zellkultur-Experimente wurden größere Mengen der Inhibitoren für hLIF [LIFR(D1-D5)] und für mLIF (mLIF-RFP) benötigt. Aus diesem Grund wurden Hek 293 Flp-In T-REx Expressions-Zelllinien hergestellt, die LIFR(D1-D5) oder mLIF-RFP nach Induktion mit Doxycyclin stabil exprimieren und sezernieren. Eine zusätzliche Hek 293 Flp-In T-REx Expressions-Zelllinie wurde stabil mit dem Leervektor transfiziert, um Kontroll-Überstände zu produzieren.



**Abb. 26: Stabile Expression von LIFR(D1-D5) oder mLIF-RFP in Hek 293 Flp-In T-REx Zellen**

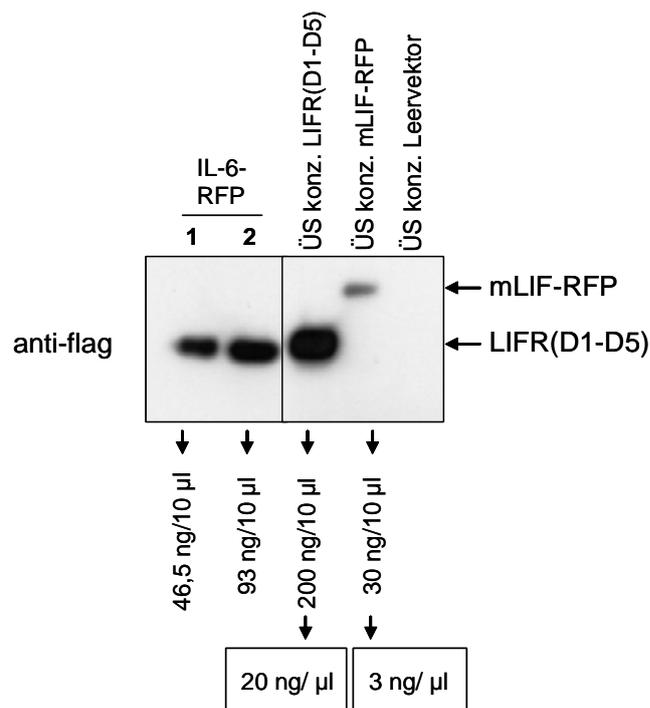
(A) Hek 293 Flp-In T-REx Zellen wurden stabil mit einem Expressionsplasmid für LIFR(D1-D5) transfiziert. Um die Produktion von LIFR(D1-D5) zu induzieren, wurden die Zellen mit 10 ng/ml Doxycyclin (Dox) für 24 Stunden (ohne Serum und Hygromycin B) behandelt.

Anschließend wurden die Überstände geerntet und die Zellen lysiert. Zusätzlich wurde LIFR(D1-D5) aus den Kulturüberständen mit einem flag-Antikörper präzipitiert. Lysate (Lys), Kulturüberstände (ÜS) und aus Kulturüberständen präzipitierte Proteine (IP) wurden nach SDS-PAGE und Western blotting mit einem flag-Antikörper detektiert. Als Positivkontrolle (PK) für den flag-Antikörper wurden Lysate von COS-7-Zellen verwendet, die LIFR(D1-D5) exprimierten. Mit Doxycyclin induzierte und nicht-induzierte Zellen sind dargestellt. sK = schwere Kette des flag-Antikörpers.

**(B)** Hek 293 Flp-In T-REx Zellen wurden stabil mit einem Expressionsplasmid für mLIF-RFP transfiziert. Die Analyse des mLIF-RFP aus Lysaten und Kulturüberständen wurde wie in (A) durchgeführt. Als Positivkontrolle (PK) für den flag-Antikörper wurden Lysate von COS-7-Zellen verwendet, die LIFR(D1-D5) exprimierten. Das Profil der Proteinexpression von zwei verschiedenen Klonen ist dargestellt.

Hek 293 Flp-In T-Rex-LIFR(D1-D5)-Zellen und Hek 293 Flp-In T-Rex-mLIF-RFP-Zellen exprimieren die entsprechenden Inhibitoren nach Induktion mit Doxycyclin, die in den Lysaten der Zellen detektierbar sind (Abb. 26). In den Kulturüberständen ist die Konzentration der Inhibitoren zu gering für eine Detektion mit dem *flag*-Antikörper. Präzipitiert man die Inhibitoren jedoch mit einem *flag*-Antikörper aus den Kulturüberständen, so können sie in der Immundetektion nachgewiesen werden. Da erst die sezernierten Inhibitoren korrekt glykosyliert sind, haben sie eine größere Molmasse als die Inhibitoren in den Zelllysaten. Daher laufen die Inhibitoren aus den Lysaten im SDS-Gel etwas schneller als die aus den Kulturüberständen präzipitierten (Abb. 26).

Zur Verwendung der Inhibitoren in Zellkulturexperimenten wurden die Kulturüberstände der stabilen Zelllinien 20-fach mittels Ultrafiltration konzentriert. Die Konzentrationen der Inhibitoren wurden danach durch Vergleich ihrer Signalintensitäten in einer Immundetektion mit den Signalintensitäten von *flag*-markierten Proteinen in bekannten Konzentrationen abgeschätzt (Abb. 27).

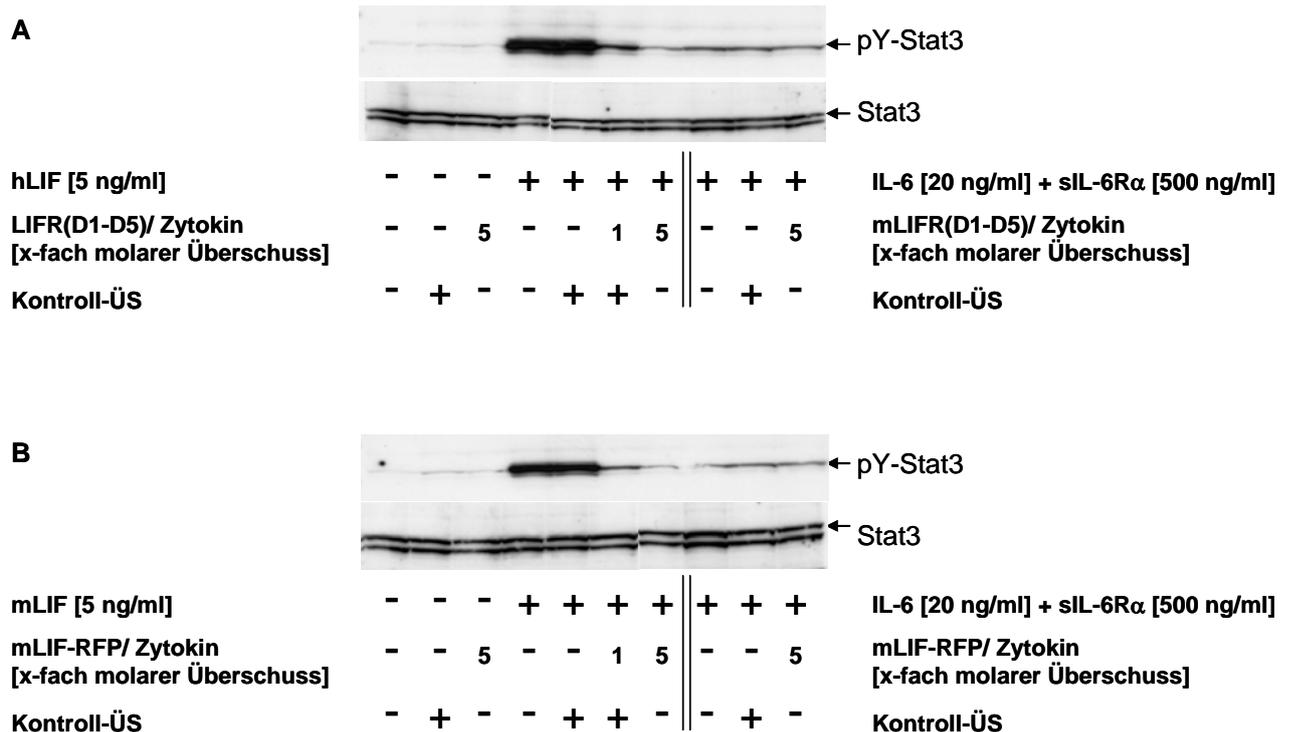


**Abb. 27: Konzentrationsabschätzung von LIFR(D1-D5) und mLIF-RFP in konzentrierten Kulturüberständen durch Vergleich mit der Signalintensität des flag-markierten IL-6-RFP in bekannten Konzentrationen**

Je 10 µl flag-markiertes IL-6-RFP in den angegebenen Konzentrationen wurde als Referenzwert zur Konzentrationsabschätzung von LIFR(D1-D5) und mLIF-RFP in konzentrierten Kulturüberständen (ÜS konz.) eingesetzt. Von den konzentrierten Kulturüberständen wurden ebenfalls 10 µl verwendet. Die geschätzten Konzentrationen sind angegeben.

### 3.9.2 LIFR(D1-D5) und mLIF-RFP hemmen die STAT3-Phosphorylierung nach Stimulation mit hLIF bzw. mLIF in MEF-Zellen

Murine embryonale Fibroblasten (MEF) sind gut geeignet, um sowohl den Inhibitor für hLIF, LIFR(D1-D5), als auch den Inhibitor für mLIF, mLIF-RFP zu testen. Grund hierfür ist, dass sie mLIFR auf ihrer Zelloberfläche exprimieren, der auf humanes und murines LIF reagiert. Stimulation von MEF-Zellen mit humanem oder murinem LIF führt zur Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors STAT3. In Abb. 28 wurden MEF-Zellen mit hLIF oder mLIF in An- oder Abwesenheit des entsprechenden LIF-Inhibitors stimuliert und die Phosphorylierung von STAT3 analysiert.



**Abb. 28: Untersuchung der STAT3-Phosphorylierung in MEF-Zellen, die mit hLIF bzw. mLIF mit oder ohne Zugabe von LIFR(D1-D5) oder mLIF-RFP stimuliert wurden**

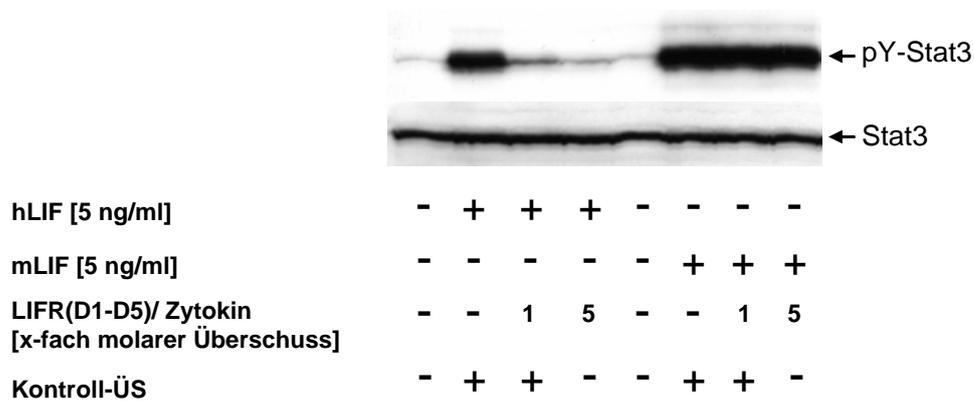
(A) MEF-Zellen wurden für 20 min bei 37°C mit 5 ng/ml hLIF in An- oder Abwesenheit von LIFR(D1-D5) in den angegebenen molaren Verhältnissen stimuliert. Um die Spezifität von LIFR(D1-D5) zu überprüfen, wurden die MEF-Zellen parallel mit 20 ng/ml IL-6 und 500 ng/ml sIL-6Rα in An- oder Abwesenheit von LIFR(D1-D5) stimuliert. Anschließend wurden die Zelllysate nach SDS-PAGE und Western blotting mit einem STAT3- oder phospho-STAT3-Antikörper analysiert.

(B) MEF-Zellen wurden für 20 min bei 37°C mit 5 ng/ml mLIF in An- oder Abwesenheit von mLIF-RFP in den angegebenen, molaren Verhältnissen stimuliert. Um die Spezifität von mLIF-RFP zu überprüfen, wurden die MEF-Zellen parallel mit 20 ng/ml IL-6 und 500 ng/ml sIL-6Rα in An- oder Abwesenheit von mLIF-RFP stimuliert. Anschließend wurde wie in (A) weiter verfahren.

Humanes LIF und murines LIF induzieren die STAT3-Phosphorylierung in MEF-Zellen gleich stark (Abb. 28A, B). Die gleichzeitige Zugabe von LIFR(D1-D5) bzw. mLIF-RFP in einem molaren Verhältnis von 1:1 zu humanem bzw. murinem LIF führt bereits zu einer starken Abnahme der STAT3-Phosphorylierung. Zugabe des jeweiligen Inhibitors in einem molaren Verhältnis von 5:1 zu humanem bzw. murinem LIF hemmt die STAT3-Phosphorylierung nahezu bis zum unstimulierten Level. Des Weiteren hemmt weder LIFR(D1-D5), noch mLIF-RFP die STAT3-Phosphorylierung nach Stimulation mit IL-6 und sIL-6Rα, die auch über gp130 signalisieren. Diese Ergebnisse zeigen, dass die beiden Inhibitoren LIFR(D1-D5) und mLIF-RFP sehr potent und spezifisch sind.

### 3.9.3 LIFR(D1-D5) hemmt nur humanes LIF und zeigt keine Kreuzreaktivität gegenüber mLIF

Der LIF-Inhibitor LIFR(D1-D5), der auf dem mLIFR basiert, hemmt hLIF effektiv. Jedoch hat der natürliche LIF-Inhibitor LBP [71], der dem Inhibitor LIFR(D1-D5) stark ähnelt, auch eine Affinität zu mLIF. Diese ist jedoch erheblich geringer verglichen mit der Affinität zu hLIF. Die Bindungsaffinität zwischen LIFR(D1-D5) und mLIF reichte nicht aus, um eine Koimmunpräzipitation in den verwendeten Konzentrationen nachzuweisen (Abb. 25A). Nun sollte geklärt werden, ob LIFR(D1-D5) die durch mLIF induzierte Phosphorylierung von STAT3 in MEF-Zellen auch nicht unterdrücken kann. Hierzu wurden MEF-Zellen mit murinem LIF in An- oder Abwesenheit von LIFR(D1-D5) in den angegebenen molaren Verhältnissen stimuliert und die STAT3-Phosphorylierung analysiert (Abb. 29).



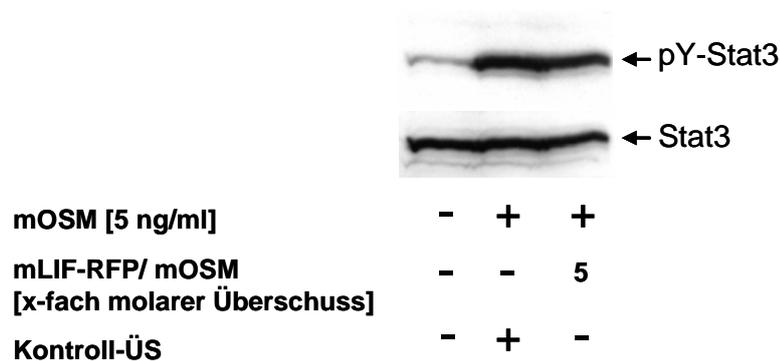
**Abb. 29: Untersuchung der Kreuzreaktivität von LIFR(D1-D5) gegenüber mLIF**

MEF-Zellen wurden für 20 min bei 37°C mit 5 ng/ml hLIF oder mLIF in An- oder Abwesenheit von LIFR(D1-D5) in den angegebenen molaren Verhältnissen stimuliert. Anschließend wurden die Zelllysate nach SDS-PAGE und Western blotting mit einem STAT3- oder phospho-STAT3-Antikörper analysiert.

Ein fünffach molarer Überschus von LIFR(D1-D5) über hLIF hemmt die STAT3-Phosphorylierung komplett in MEF-Zellen (Abb. 28, 29). Im Gegensatz hierzu beeinflusst die Zugabe von LIFR(D1-D5) in ein- oder fünffacher Konzentration zu mLIF die STAT3-Phosphorylierung nicht. Dies bestätigt die Ergebnisse der Koimmunpräzipitations-Studien, bei denen bei den verwendeten Konzentrationen keine Bindung zwischen mLIF und LIFR(D1-D5) nachgewiesen werden konnte (Abb. 25A).

### 3.9.4 mLIF-RFP unterdrückt die STAT3-Phosphorylierung in MEF-Zellen nach Induktion mit dem zu LIF nahe verwandten Zytokin OSM nicht

Murines OSM nutzt ein Rezeptorheterodimer aus dem OSMR und gp130 zur Signaltransduktion [75]. Es gibt widersprüchliche Aussagen im Hinblick darauf, ob OSM in Abwesenheit von OSMR an gp130 binden kann. Stimuliert man Zellen einer erythroleukämischen Zelllinie mit OSM und verabreicht gleichzeitig eine lösliche Form von gp130, wird die biologische Aktivität von OSM auf die Zellen unterdrückt. Dies bedeutet, dass gp130 an OSM bindet und dessen Bioaktivität hemmt [76]. Im Gegensatz dazu zeigen Diveu *et al.*, 2006, dass die gleichzeitige Gabe von OSM und sgp130 die OSM-induzierte, biologische Antwort von Ba/F3-gp130-OSMR-Zellen nicht beeinflusst. Folglich bindet OSM nicht direkt an gp130 [77]. Wenn OSM in Abwesenheit von OSMR an gp130 binden würde, könnte es vom Inhibitor mLIF-RFP, der das CBM des murinen gp130 enthält, möglicherweise gebunden und die durch mOSM induzierten Zellantworten gehemmt werden. Um dies zu analysieren, wurden MEF-Zellen mit murinem OSM in An- oder Abwesenheit von mLIF-RFP stimuliert und die STAT3-Phosphorylierung untersucht.



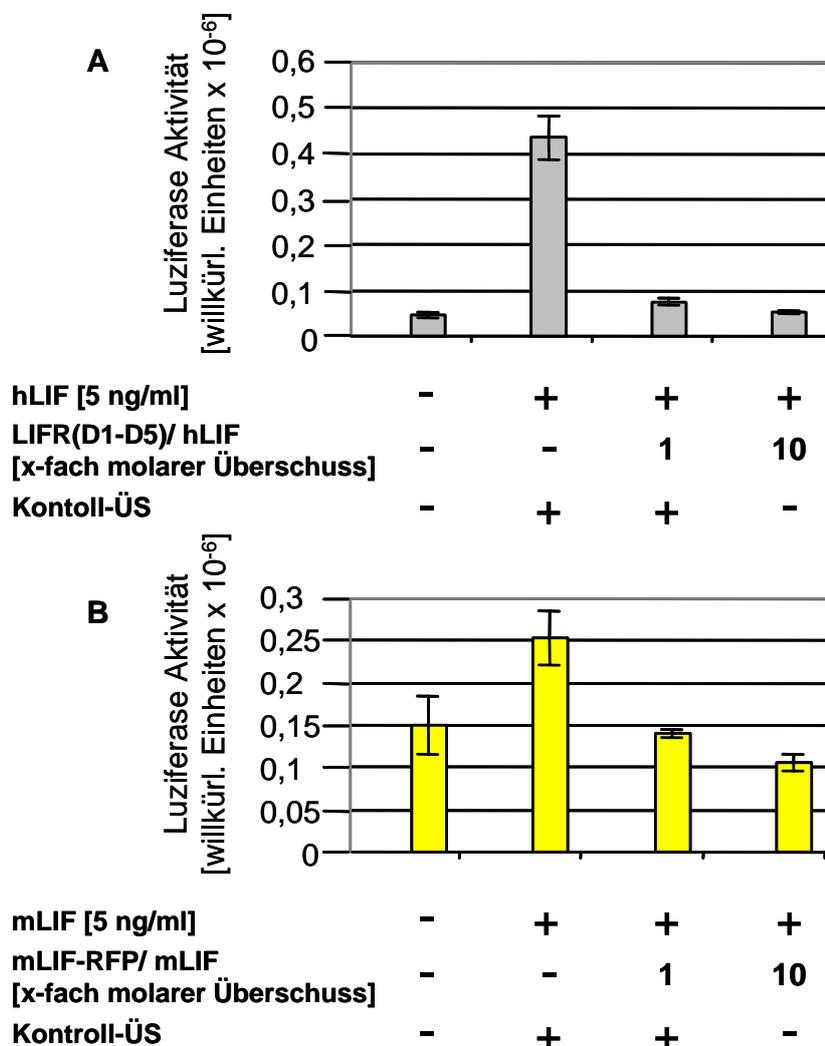
**Abb. 30: Untersuchung der Spezifität von mLIF-RFP gegenüber mOSM**

MEF-Zellen wurden für 20 min bei 37°C mit 5 ng/ml mOSM in An- oder Abwesenheit von mLIF-RFP im angegebenen molaren Verhältnissen stimuliert. Anschließend wurden die Zellen lysiert und die Lysate nach SDS-PAGE und Western blotting mit einem STAT3- oder phospho-STAT3-Antikörper analysiert.

Wie in Abb. 30 gezeigt, hemmt ein fünffach molarer Überschuss von mLIF-RFP die STAT3-Phosphorylierung in MEF-Zellen nach Stimulation von mOSM nicht. In den von uns verwendeten Konzentrationen bindet mOSM folglich nicht an die Domänen D2 und D3 des mgp130 im mLIF-RFP. mLIF-RFP ist demnach ein spezifischer Inhibitor, der die verwandten Zytokine mOSM (Abb. 30) und humanes IL-6 (Abb. 28) nicht bindet.

### 3.9.5 LIFR(D1-D5) und mLIF-RFP unterdrücken die Geninduktion in MEF-Zellen nach Stimulation mit hLIF bzw. mLIF

Um weitere Effekte von LIFR(D1-D5) und mLIF-RFP auf die Bioaktivität von humanem bzw. murinem LIF zu analysieren, wurden Reporter-gen-Assays in HepG2- bzw. MEF-Zellen durchgeführt. In Abb. 31A wurden HepG2-Zellen mit einem Reporter-gen-Plasmid transfiziert, das für Luziferase kodierte, deren Expression unter der Kontrolle des STAT3-abhängigen  $\alpha 2M$ -Promotors stand. Anschließend wurden die HepG2-Zellen 16 Stunden mit hLIF und einem entsprechenden Volumen Kontroll-Überstand oder mit einer Kombination aus hLIF und LIFR(D1-D5) in den angegebenen molaren Verhältnissen stimuliert. Danach wurde die Luziferase-Aktivität ermittelt.



**Abb. 31: Untersuchung der Geninduktion nach Stimulation mit hLIF oder mLIF in An- oder Abwesenheit von LIFR(D1-D5) bzw. mLIF-RFP**

(A) HepG2-Zellen wurden mit einem Reporter-gen-Plasmid transfiziert, das für Luziferase kodierte, deren Expression vom STAT3-abhängigen  $\alpha 2 M$ -Promotor kontrolliert wurde. Anschließend wurden die transfizierten HepG2-Zellen 16 Stunden entweder mit hLIF und einem entsprechenden Volumen Kontroll-Überstand (ÜS) oder mit einer Kombination aus hLIF und LIFR(D1-D5) in den angegebenen molaren Verhältnissen stimuliert. Dann wurde die Luziferase-Aktivität bestimmt.

(B) MEF-Zellen wurden mit einem Reporter-gen-Plasmid transfiziert, das für Luziferase kodierte, die unter der Kontrolle des STAT1- und STAT3-abhängigen SIE-TK-Promotors stand. Anschließend wurden die transfizierten MEF-Zellen 16 Stunden entweder mit mLIF und einem entsprechenden Volumen Kontroll-Überstand (ÜS) oder mit einer Kombination aus mLIF und mLIF-RFP in den angegebenen molaren Verhältnissen stimuliert. Dann wurde die Luziferase-Aktivität bestimmt.

Die Stimulation der transfizierten HepG2-Zellen mit 5 ng/ml hLIF (Abb. 31A) induziert eine starke Aktivität der Luziferase. Diese Aktivität wird jedoch komplett blockiert, wenn LIFR(D1-D5) gleichzeitig mit hLIF in einem molaren Verhältnis von nur 1:1 zu den Zellen gegeben wird.

In Abb. 31B wurden MEF-Zellen mit einem Reporter-gen-Plasmid transfiziert, das für Luziferase kodierte, deren Expression von einem STAT1- und STAT3-abhängigen SIE-TK-Promotor kontrolliert wurde. Dann wurden die MEF-Zellen 16 Stunden mit mLIF und einem entsprechenden Volumen Kontroll-Überstand oder mit einer Kombination aus mLIF und mLIF-RFP in den angegebenen molaren Verhältnissen stimuliert. Anschließend wurde die Luziferase-Aktivität bestimmt. Die Stimulation der transfizierten MEF-Zellen mit 5 ng/ml mLIF (Abb. 31B) führt zu einem Anstieg der Luziferaseaktivität. Auch mLIF-RFP blockiert die Luziferase-Aktivität komplett, wenn es gleichzeitig mit mLIF in einem molaren Verhältnis von 1:1 zu den Zellen gegeben wird. Zusammengefasst lässt sich aus den dargestellten Experimenten schließen, dass LIFR(D1-D5) und mLIF-RFP potente und spezifische Inhibitoren für humanes bzw. murines LIF sind.

## 4 Diskussion

### 4.1 Biochemische Charakterisierung des IL-6-Inhibitors IL-6-RFP

#### 4.1.1 Wirkungsweise von IL-6-RFP

Ziel des ersten Teils der vorliegenden Arbeit war es, die Wirkungsweise von Zytokin-Inhibitoren, die aus den Liganden-bindenden Domänen der löslichen Rezeptoren des Zytokins bestehen, am Beispiel des IL-6-Inhibitors IL-6-RFP genauer zu analysieren. Denn obwohl die Bedeutung der fusionierten Zytokinrezeptoren für die zukünftige Behandlung von chronisch-entzündlichen Erkrankungen oder bestimmten Formen von Krebs erkannt wurde [58], ist ihre Wirkungsweise noch nicht in ausreichendem Maße untersucht worden. Die löslichen Rezeptoren des IL-6, sIL-6R $\alpha$  und sgp130 treten im menschlichen Blut in beträchtlichen Mengen auf; sIL-6R $\alpha$  besitzt hier eine Konzentration von 50 ng/ml [33, 54], sgp130 hat eine Konzentration von 300 ng/ml [52, 53]. Beide Rezeptoren zusammen hemmen systemische IL-6-Antworten [53]. Auf dieser Beobachtung basierend wurde IL-6-RFP aus den Liganden-bindenden Domänen seiner löslichen Rezeptoren sIL-6R $\alpha$  (D2-D3) und sgp130 (D1-D3) kloniert [55].

#### *Spezifität von IL-6-RFP*

Da die Rezeptoruntereinheit gp130 gemeinsamer Bestandteil aller IL-6-Typ-Zytokinrezeptorkomplexe ist [8], stellt sich die Frage, ob nicht auch andere IL-6-Typ-Zytokine neben IL-6 durch den gp130-Anteil in IL-6-RFP gehemmt werden. Für IL-11 wurde das bereits ausgeschlossen [55]. Auf menschlichen Zellen signalisiert OSM über ein Heterodimer aus gp130 und OSMR oder gp130 und LIFR [78]. Doch auch ein großer Überschuss von IL-6-RFP über OSM hemmt dessen Bioaktivität nicht (Abb. 9B, 11C). Dies legt nahe, dass die Affinität zwischen dem gp130-Anteil des IL-6-RFP und humanem OSM sehr gering ist. LIF signalisiert über ein Heterodimer aus gp130 und LIFR [78]. Bei einem 60-fach molaren Überschuss von IL-6-RFP über LIF wird die Bioaktivität von LIF nur schwach gehemmt (Abb. 9B). Dies kann dadurch erklärt werden, dass LIF mit geringer Affinität an die Domänen D2-D3 von gp130 bindet [41]. Bei Konzentrationen von IL-6-RFP, die für eine komplette Bindung von IL-6 ausreichen, ist IL-6-RFP jedoch ein spezifischer Inhibitor und hemmt die Bioaktivität von LIF nicht. Diese geringe Affinität von IL-6-RFP zu OSM und LIF

stimmt mit Studien überein, in denen die Neutralisierung von OSM und LIF mit dem kompletten sgp130-Molekül (D1-D6) untersucht wurde. Ein 300-fach molarer Überschuss von sgp130 über OSM hemmte die Bioaktivität von OSM nur in geringem Maße [52].

#### *IL-6-RFP hemmt die Geninduktion auch bei zeitlich verzögerter Zugabe nach IL-6-Stimulation*

In einem Reporter-gen-Assay wird die Geninduktion nach Stimulation mit Zytokinen simuliert. Ein Reporter-gen-Assay ist ein Langzeit-Experiment, da die Luziferase-Aktivität erst nach 16-stündiger Stimulation mit Zytokinen gemessen wird. Interessanterweise hemmt IL-6-RFP in einem Reporter-gen-Assay auch nach einer zeitverzögerten Verabreichung (10 bzw. 20 min) nach IL-6-Stimulation die Geninduktion vollständig (Abb. 10). Um jedoch die Aktivierung von STAT3, die in Abb. 11B schon 20 Minuten nach IL-6-Stimulation detektiert wurde, zu unterdrücken, muss IL-6-RFP zumindest gleichzeitig zugegeben werden (Abb. 11B). In diesem Falle hemmt eine zeitversetzte Gabe von IL-6-RFP die IL-6-Antwort nicht. Diese Ergebnisse machen deutlich, dass in der kurzen Zeitspanne (10 bzw. 20 min, Abb. 11B) zwischen IL-6-Stimulation und Zusatz des IL-6-RFP STAT3 zwar phosphoryliert wird, die Genexpression jedoch nicht induziert werden kann. Das Zytokin muss also über eine längere Zeitspanne auf eine Zelle wirken, um die Genexpression zu induzieren. Das bedeutet für die Behandlung einer Krankheit mit IL-6-RFP, dass der Inhibitor die Bioaktivität von IL-6 auch dann hemmen kann, wenn er nach Zytokin-Freisetzung verabreicht wird. Dies wird weiterhin durch die Ergebnisse der Lebend-Zell-Experimente unterstützt. Nachdem IL-6 an Rezeptoren auf der Zelloberfläche gebunden hat, kann es durch Zugabe von IL-6-RFP abgelöst werden (Abb. 18).

#### *IL-6-RFP bindet IL-6 mit höherer Affinität als die löslichen Rezeptoren sIL-6R $\alpha$ und sgp130*

Wenn ein mit GFP fusioniertes Protein an ein anderes Protein bindet, ändert sich die Mobilität des GFP-Fusionsproteins in einer nativen Gelelektrophorese. Diese Änderung der Mobilität von GFP-Fusionsproteinen kann zur Detektion von Protein-Protein-Interaktionen genutzt werden [79]. Um die Interaktionen zwischen IL-6-RFP und IL-6 zu untersuchen, wurde in dieser Arbeit eine Methode genutzt, die blaue native PAGE (BN-PAGE), Fluoreszenzmarkiertes IL-6 und Fluoreszenz-Detektion mittels *gel-scanning* kombiniert. Beim *gel-scanning* wird die Fluoreszenz von fluoreszierenden Proteinen im Gel auf einem Fluoreszenz-scanner detektiert. Um diese Methode anwenden zu können, wurde YFP-IL-6 durch Fusion

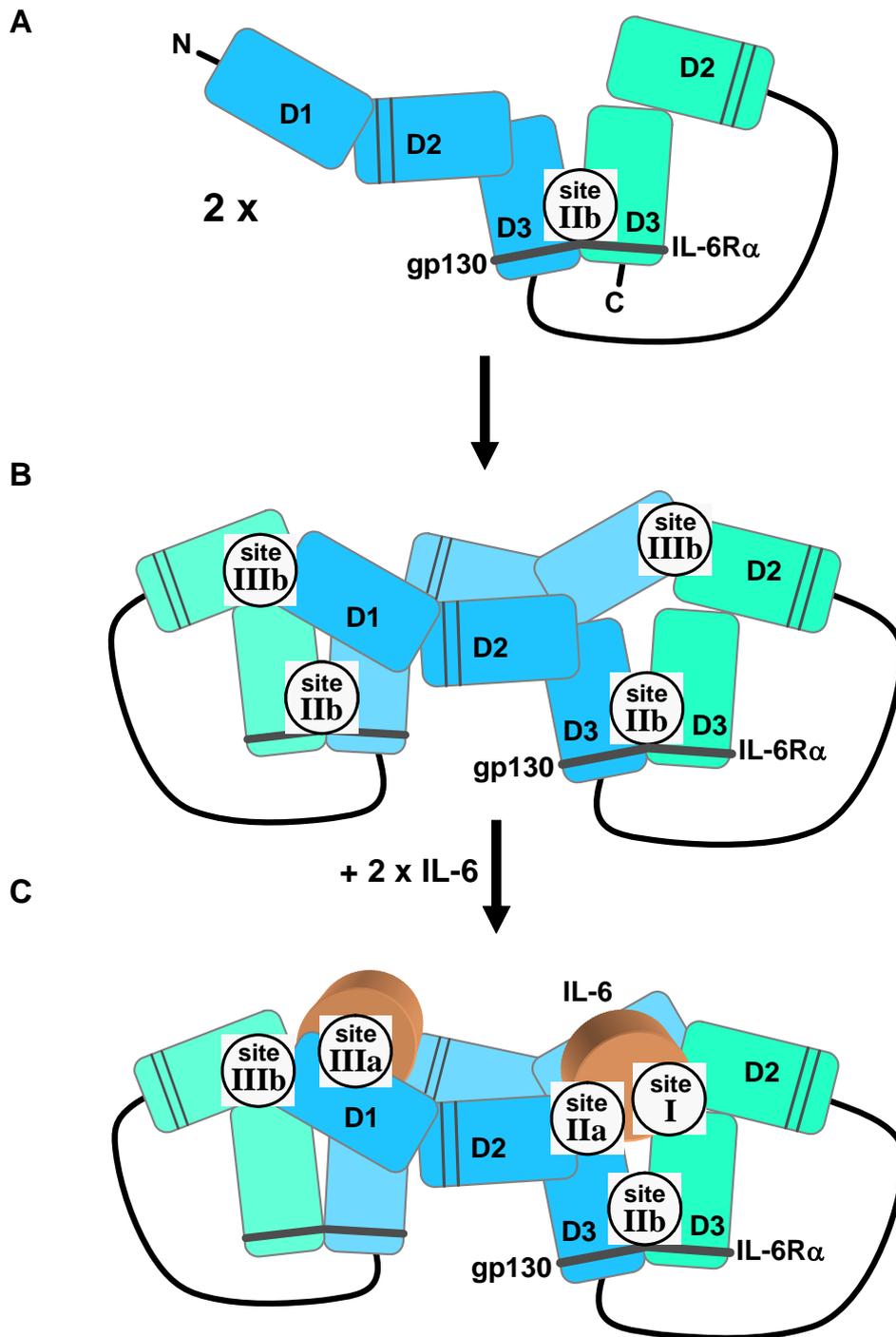
des *yellow fluorescent protein* mit dem N-Terminus von IL-6 hergestellt. YFP wurde mit dem N-Terminus von IL-6 fusioniert, da dieser keine große Rolle für die Bioaktivität von IL-6 spielt, wie durch Deletion der 28 N-terminalen Aminosäuren des IL-6 gezeigt wurde [80]. Folglich beeinflusste auch die Fusion des YFP an den N-Terminus von IL-6 dessen Bioaktivität nicht [70]. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die Interaktion zwischen YFP-IL-6 und IL-6-RFP zu einer Verringerung der Mobilität des YFP-IL-6 führte. Dies wurde durch eine starke Verschiebung der YFP-IL-6-Bande nach Bindung an IL-6-RFP sichtbar gemacht (Abb.13A). Wie weiterhin demonstriert wurde, reicht ein zweifach molarer Überschuss IL-6-RFP über YFP-IL-6 aus, um YFP-IL-6 komplett in einem binären YFP-IL-6/IL-6-RFP-Komplex zu binden. Beim Vergleich der Komplexe YFP-IL-6/IL-6-RFP und YFP-IL-6/sIL-6R $\alpha$ /sgp130 stellte sich heraus, dass YFP-IL-6 von IL-6-RFP mit höherer Affinität gebunden wird als von den separaten, löslichen Rezeptoren sIL-6R $\alpha$  und sgp130. Dies stimmt mit dem geringeren inhibitorischen Potential von sIL-6R $\alpha$  und sgp130 gegenüber IL-6 überein [55]. Die Rangfolge der Affinitäten zu IL-6 wäre demnach IL-6-RFP > sIL-6R $\alpha$ /sgp130 > sIL-6R $\alpha$  > sgp130. sgp130 allein besitzt keine messbare Affinität zu IL-6 (nicht gezeigt). Die außerordentliche Aktivität von IL-6-RFP wird darüber hinaus durch die erhöhte Stabilität des Komplexes YFP-IL-6/IL-6-RFP gegenüber Denaturierung mit Harnstoff widerspiegelt (Abb. 14A). Die hohe Stabilität des Komplexes YFP-IL-6/IL-6-RFP zeigt sich außerdem durch die geringe Austauschrate von YFP-IL-6 durch nicht-markiertes IL-6 und die Resistenz des YFP-IL-6/IL-6-RFP-Komplexes gegen einen Überschuss der löslichen Rezeptoren (Abb. 16A, 17A).

Des Weiteren wurde mittels *live cell imaging* dargestellt, dass YFP-IL-6, welches bereits an die Rezeptoren auf der Zellmembran gebunden hatte, durch Zugabe von IL-6-RFP von der Zellmembran entfernt wurde (Abb. 18). Das ist darin begründet, dass die Affinität von IL-6-RFP zu IL-6 höher ist als die Affinität zwischen IL-6 und den einzelnen Rezeptoren IL-6R $\alpha$  und gp130. Wenn sowohl IL-6-RFP als auch die löslichen Rezeptoren sIL-6R $\alpha$  und sgp130 in einer IL-6-haltigen Lösung vorliegen, verschiebt sich das Bindungsgleichgewicht auf die Seite des Komplexes IL-6/IL-6-RFP (Abb.17A).

IL-6-RFP wirkt also inhibitorisch, indem es IL-6 in Lösung mit einer Affinität, die höher ist als die der einzelnen, löslichen Rezeptoren sIL-6R $\alpha$  und sgp130, bindet und dadurch neutralisiert. Außerdem entfernt IL-6-RFP aufgrund seiner hohen Affinität IL-6, das bereits an die Rezeptoren auf der Zelloberfläche gebunden hat, aus seinen Rezeptorkomplexen und schaltet dadurch die IL-6-vermittelte Signaltransduktion ab.

#### 4.1.2 Architektur des Komplexes aus IL-6 und IL-6-RFP

Die Stöchiometrie des Komplexes aus IL-6 und IL-6-RFP wurde über die Bestimmung der Molmasse mittels Gelfiltration und nativer Gelelektrophorese analysiert. Zu diesem Zweck wurde ebenfalls das fluoreszenzmarkierte YFP-IL-6 eingesetzt, da es sowohl als ungebundenes Molekül als auch in Proteinkomplexen gut mittels *gel imaging* und Fluoreszenzspektroskopie detektiert werden kann. Die Analysen des Komplexes YFP-IL-6/IL-6-RFP legen nahe, dass die Architektur des IL-6/IL-6-RFP-Komplexes der des hexameren IL-6-Rezeptorkomplexes gleicht. Letztere wurde durch Röntgenstrukturanalyse identifiziert [37]. Laut der Struktur des löslichen IL-6-Rezeptorkomplexes signalisiert IL-6 über einen hexameren Komplex aus je zwei Molekülen IL-6, sIL-6R $\alpha$  und sgp130 (Abb. 3B, [37]).



**Abb. 32: Hypothetische Ausbildung des IL-6/IL-6-RFP-Komplexes in Anlehnung an den hexameren IL-6-Rezeptor-Komplex**

Einzelne Domänen von gp130 und IL-6R $\alpha$  sind in blau bzw. grün dargestellt. Schwarze Balken zeigen das konservierte WSXWS-Motiv in den Domänen D3 an, schwarze Linien die konservierten Disulfidbrücken in den Domänen D2. Der linker ist als schwarze Linie dargestellt. Interaktionsstellen sind bezeichnet wie von Boulanger et al. [37] vorgeschlagen. Monomeres IL-6-RFP (A) bildet ein Dimer (B) durch site IIb- und site IIIb-Wechselwirkungen. Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind im Komplex aus IL-6-RFP und IL-6 (C) nur fünf der zehn Interaktionsstellen gezeigt. Im Komplex kommen alle Interaktionsstellen zweimal vor.

Mit Hilfe von BN-PAGE wurde in der vorliegenden Arbeit gezeigt, dass freies YFP-IL-6 in einer monomeren und einer dimeren Form vorkommt (Abb. 13A). Weiterhin zeigte sich, dass die Mobilität des Komplexes aus IL-6-RFP und YFP-IL-6 niedriger ist als die des Albumin-Tetramers (260 kD, Abb. 13A), das hier neben den anderen BSA-Multimeren als Marker-Protein diente. Die Logarithmen der Molmassen der BSA-Multimere wurden gegen die relativen Laufstrecken ( $R_f$ ) aufgetragen und eine Regressionsgerade erstellt (Abb. 20). Anhand dieser Regressionsgerade ließ sich eine scheinbare molare Masse von 290 kD für den Komplex IL-6-RFP/YFP-IL-6 ermitteln. Entspräche der Komplex aus YFP-IL-6 und IL-6-RFP dem hexameren IL-6-Rezeptorkomplex, dann bestünde er aus zwei YFP-IL-6- und zwei IL-6-RFP-Molekülen. Die berechnete molare Masse für solch einen  $(\text{YFP-IL-6})_2/(\text{IL-6-RFP})_2$ -Komplex beträgt 264 kD.

Die Dimerisierung von freiem YFP-IL-6 wird nicht durch den YFP-Teil vermittelt, denn YFP alleine ist mittels BN-PAGE nur in der monomeren Form nachweisbar (nicht gezeigt). Die Dimerisierung des YFP-IL-6 wird durch die bekannte Eigenschaft von rekombinantem IL-6, Dimere zu bilden, verursacht. In diesem Zusammenhang wurde gezeigt, dass das IL-6-Dimer metastabil ist und in Anwesenheit von 3 M Harnstoff dissoziiert [81]. Das Verhalten der YFP-IL-6 Dimere in der BN-PAGE stimmt mit der letztgenannten Eigenschaft von IL-6 überein. Zwischen 2 M und 4 M Harnstoff dissoziieren YFP-IL-6-Dimere zu Monomeren, erkennbar an der Zunahme der Monomer-Bande in Abb. 14A und B. Die Mobilität des Komplexes YFP-IL-6/IL-6-RFP ändert sich nicht bei Harnstoffkonzentrationen, bei denen YFP-IL-6-Dimere dissoziieren (Abb. 14). Folglich kann IL-6-RFP nur mit zwei monomeren YFP-IL-6-Molekülen einen Komplex eingegangen sein. Ebenfalls für einen Komplex aus IL-6-RFP und monomerem YFP-IL-6 spricht, dass IL-6 über Interaktionen der gp130-Bindungsstellen zweier IL-6-Moleküle dimerisiert [81]. Diese Bindungsstellen sind aber bei einer Bindung von IL-6 an IL-6-RFP besetzt (Abb. 32C). Folglich kann YFP-IL-6 nicht in der dimeren Form, sondern nur in Form von zwei einzelnen Monomeren an IL-6-RFP binden.

Um die mittels BN-PAGE bestimmten Molmassen zu bestätigen, wurden Gelfiltrationen von YFP-IL-6, IL-6-RFP und dem Komplex IL-6-RFP/YFP-IL-6 auf einer kalibrierten Säule durchgeführt (Abb. 19). Die mittels Gelfiltration ermittelten molaren Massen unterstützten die Beobachtungen, die mit Hilfe der BN-PAGE gemacht wurden. Es konnte zunächst bestätigt werden, dass freies YFP-IL-6 in einer monomeren und einer dimeren Form vorliegt (Abb. 19B).

Entgegen der Erwartung eluiert IL-6-RFP in Abwesenheit von YFP-IL-6 mit einer Retentionszeit von der Säule, die seiner dimeren Form entspricht (Abb. 19C). Lösliches

gp130 und löslicher IL-6R $\alpha$  sind monomere Proteine, die erst in Anwesenheit von IL-6 dimerisieren [82]. Durch Röntgenstrukturanalyse wurden im hexameren IL-6-Rezeptorkomplex vier Kontaktstellen zwischen IL-6R $\alpha$  und gp130 entdeckt [41]. Möglicherweise wird die *site* Iib im IL-6-RFP-Monomer (Abb. 32A) durch die kovalente Verbindung der Domänen von sIL-6R $\alpha$  und sgp130 durch den *linker* stabilisiert. Die dadurch eingenommene räumliche Struktur von IL-6-RFP könnte dessen Dimerisierung in Abwesenheit von IL-6 fördern (Abb. 32B). In der Annahme, dass IL-6-RFP tatsächlich solch ein präformiertes Dimer bildet, würde IL-6 optimal über seine Rezeptorbindestellen daran binden können. Dies würde zu einem Komplex aus IL-6 und IL-6-RFP führen, dessen räumliche Anordnung dem hexameren IL-6-Rezeptorkomplex entspricht (Abb. 32C).

Der Komplex aus YFP-IL-6 und IL-6-RFP eluiert mit einer Retentionszeit von der Säule, die einer molaren Masse von 325 kD entspricht (Abb. 19D). Auch ungebundenes, dimeres IL-6-RFP wurde nachgewiesen, denn es wurde im zweifach molaren Überschuss über YFP-IL-6 eingesetzt. Freies YFP-IL-6 kann nicht detektiert werden, was zeigt, dass es komplett in einem Komplex mit IL-6-RFP gebunden ist (Abb. 19D).

Die mittels Gelfiltration ermittelte, molare Masse des (YFP-IL-6)<sub>2</sub>/(IL-6-RFP)<sub>2</sub>-Komplexes von 325 kD und die durch BN-PAGE ermittelte, molare Masse von 290kD sind höher als die berechnete Molmasse, die 264 kD beträgt. Grund hierfür ist wahrscheinlich, dass der in Abb. 32C dargestellte (YFP-IL-6)<sub>2</sub>/(IL-6-RFP)<sub>2</sub>-Komplex keine hochkompakte Struktur hat, sondern ausgedehnt ist und eine Aussparung zwischen den beiden IL-6-Molekülen aufweist. Diese Architektur könnte die scheinbare Erhöhung der molaren Masse erklären. Eine ähnliche Abweichung zwischen berechneter und gemessener Molmasse ist auch bei der Analyse des löslichen IL-6R-Komplexes durch Gelfiltration und analytische Ultrazentrifugation beobachtet worden [82].

Zusammengefasst deuten die Analysen mit BN-PAGE und Gelfiltration darauf hin, dass der IL-6/IL-6-RFP-Komplex eine dem löslichen IL-6-Rezeptorkomplex analoge räumliche Struktur einnimmt. Der lösliche IL-6-Rezeptorkomplex wird durch zehn Protein-Protein-Interaktionen zusammengehalten (je zweimal *sites* I, IIa, IIb, IIIa und IIIb, Abb. 32C). Die außerordentlich hohe Stabilität des IL-6/IL-6-RFP-Komplexes im Vergleich mit dem löslichen IL-6-Rezeptorkomplex aus IL-6, sIL-6R $\alpha$  und sgp130 wird durch die Stabilisierung dieser Interaktionen durch die kovalente Verbindung der Domänen des sIL-6R $\alpha$  und sgp130 durch den *linker* verursacht. Diese Ergebnisse liefern eine Erklärung für die hohe Spezifität und Affinität von IL-6-RFP auf molekularer Ebene.

Aus dem ersten Teil dieser Arbeit folgt, dass IL-6-RFP ein viel versprechender IL-6-Inhibitor für die Behandlung von Krankheiten ist, die durch fehlregulierte IL-6-Expression verursacht werden.

## **4.2 Klonierung und Charakterisierung von Zytokin-Inhibitoren für humanes und murines LIF**

*Der Inhibitor LIFR(D1-D5) unterdrückt effektiv die Bioaktivität des humanen LIF, der Inhibitor mLIF-RFP die des murinen LIF*

In der vorliegenden Arbeit wird gezeigt, wie man die Bioaktivität von humanem und murinem LIF durch Inhibitoren hemmt, die aus den Liganden-bindenden Domänen ihrer löslichen Rezeptoren bestehen. Die ersten fünf N-terminalen Domänen des murinen LIFR [LIFR(D1-D5)] reichen aus, um humanes LIF komplett zu binden. Zur Bindung von humanem LIF wurden Domänen des murinen LIFR eingesetzt, da dieser hLIF mit viel höherer Affinität als hLIFR bindet [42]. Murines LIF wird effektiv von dem Fusionsprotein mLIF-RFP (murines LIF-Rezeptor-Fusionsprotein) gebunden, das aus den ersten fünf N-terminalen Domänen des murinen LIFR und dem CBM des murinen gp130 besteht. Zunächst wurde die Fähigkeit der beiden Inhibitoren, LIF der entsprechenden Spezies zu binden, in Koimmunpräzipitations-Studien untersucht. Die Eigenschaften der Inhibitoren wurden dann in Zellkultur-Versuchen mit MEF-Zellen weiter analysiert. Stimulation von MEF-Zellen mit humanem oder murinem LIF führt zur Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors STAT3. Nach Stimulation von MEF-Zellen mit 5 ng/ml hLIF und gleichzeitiger Verabreichung eines fünffach molaren Überschusses des humanen LIF-Inhibitors LIFR(D1-D5) wurde die STAT3-Phosphorylierung effektiv gehemmt (Abb. 28A). Das gleiche galt für die Stimulation von MEF-Zellen mit 5 ng/ml mLIF und gleichzeitiger Behandlung mit einem fünffach molaren Überschusses des murinen LIF-Inhibitors mLIF-RFP (Abb. 28B). Darüber hinaus reicht für die komplette Unterdrückung der Geninduktion nach Stimulation der MEF-Zellen mit humanem oder murinem LIF eine Zugabe des entsprechenden Inhibitors in einem molaren Verhältnis von nur 1:1 (LIF:Inhibitor) aus (Abb. 31).

Der mLIFR bindet mLIF mit einer geringeren Affinität als hLIF. Als nächstes wurde deshalb untersucht, ob diese geringe Affinität des mLIFR zu mLIF ausreicht, um die Bioaktivität des mLIF zu hemmen. Die Zugabe von LIFR(D1-D5), der auf mLIFR basiert, in ein- oder fünffacher Konzentration zu mLIF beeinflusst die STAT3-Phosphorylierung in MEF-Zellen

nicht (Abb. 29). LIFR(D1-D5) zeigt folglich in den Konzentrationen, die zur Bindung von hLIF ausreichen, keine Kreuzreaktivität zu mLIF. Dies bestätigt die Ergebnisse der Koimmunpräzipitations-Studien, bei denen bei den verwendeten Konzentrationen keine Bindung zwischen mLIF und LIFR(D1-D5) nachgewiesen werden konnte (Abb. 25D).

#### *Analyse der Spezifität von LIFR(D1-D5) und mLIF-RFP*

Da die Rezeptoruntereinheit gp130 gemeinsamer Bestandteil aller IL-6-Typ-Zytokin-Rezeptorkomplexe ist, ist es fraglich, ob nicht auch andere Zytokine aus dieser Gruppe durch den gp130-Anteil in mLIF-RFP gehemmt werden. Wie herausgefunden wurde, beeinflussen weder LIFR(D1-D5) noch mLIF-RFP die Bioaktivität von IL-6 (Abb. 28). Die Spezifität von mLIF-RFP wurde darüber hinaus in Bezug auf mOSM analysiert. Murines OSM signalisiert über ein Rezeptorheterodimer aus mOSMR und mgp130. Es ist bekannt, dass mOSM keine Bindungsaffinität zu mLIFR hat [75]. Es gibt jedoch widersprüchliche Aussagen im Hinblick darauf, ob OSM in Abwesenheit von OSMR an gp130 binden kann (3.9.4). Wenn OSM in Abwesenheit von OSMR an gp130 binden würde, könnte es vom Inhibitor mLIF-RFP, der das CBM des murinen gp130 enthält, möglicherweise gebunden werden und die durch mOSM induzierten Zellantworten gehemmt werden. Wie gezeigt wurde, hemmt mLIF-RFP die STAT3-Phosphorylierung nach mOSM-Induktion in MEF-Zellen nur schwach, wenn mLIF-RFP in einem fünffachen molaren Überschuss über mOSM zugesetzt wird (Abb. 30). Folglich sind mLIF-RFP und LIFR(D1-D5) spezifische Inhibitoren, die die Bioaktivität anderer IL-6-Typ-Zytokine nicht unterdrücken.

#### *Für die Bindung von humanem LIF sind alle fünf N-terminalen Domänen des mLIFR, jedoch nicht das CBM von humanem gp130 notwendig*

Die ersten fünf N-terminalen Domänen des mLIFR [LIFR(D1-D5)] binden hLIF mit einer unerwartet hohen Affinität von 10-20 pM [42]. Im Gegensatz dazu bindet hLIF an den hLIFR oder mLIF an den mLIFR mit einer Affinität von nur 600-2000 pM [42, 71]. Die hohe Bindungsaffinität zwischen hLIF und mLIFR kann durch eine Fusion von mLIFR mit dem CBM von hgp130 nicht weiter verstärkt werden (Abb. 24); deswegen ist das CBM von hgp130 für die Hemmung des hLIF nicht notwendig.

Die Verkürzung des LIFR(D1-D5) führt zu einer starken Erniedrigung der Bindungsaffinität zu hLIF. Dies wurde dadurch gezeigt, dass hLIF in Koimmunpräzipitations-Studien nicht an die Konstrukte LIFR(D1-D3)-hgp130(D2-D3), LIFR(D3)-hgp130(D2-D3), LIFR(D2-D4)-

hgp130(D2-D3), LIFR(D3-D5)-hgp130(D2-D3) band. Mit diesen Resultaten wird die Hypothese von Owczarek *et al.* [42] und Voisin *et al.* [43] unterstützt, nach welcher mindestens die ersten fünf N-terminalen Domänen des mLIFR zur Bindung von LIF benötigt werden. Die Hypothese, nach der nur D1-D3 des LIFR für die Bindung von LIF erforderlich sind [44], kann nicht bestätigt werden, da das Konstrukt LIFR(D1-D3)-hgp130(D2-D3) humanes LIF nur schwach bindet. Auch die Konstrukte LIFR(D3)-hgp130(D2-D3) und LIFR(D3-D5)-hgp130(D2-D3) binden LIF nur sehr schwach. Deswegen werden die Vorschläge, dass nur die D3 des LIFR [41] oder die Domänen D3-D5 des LIFR zur Bindung von LIF ausreichen [45, 46], durch die Ergebnisse dieser Arbeit ebenfalls nicht unterstützt.

Die Aminosäure-Sequenzen von hLIFR und mLIFR sind zu 76% homolog [83]. Die höhere Affinität des mLIFR zu hLIF wird nur durch wenige unterschiedliche Aminosäuren in der Ig-ähnlichen Domäne hervorgerufen [84]. Da sich hLIFR und mLIFR stark ähneln, haben die beiden CBMs des hLIFR und mLIFR wahrscheinlich ähnliche Funktionen. Nach Voisin *et al.* [43] führt die Deletion des N-terminalen Moduls des C-terminalen CBMs (D4) des humanen LIFR zu einem D1-D3-Fragment des hLIFR mit einer veränderten Konformation. Von diesem D1-D3-Fragment des hLIFR wird hLIF nicht gebunden. Unter der Voraussetzung, dass die Resultate, die für den hLIFR erzielt wurden, auf den mLIFR übertragbar sind, könnte eine Fehlfaltung der Konstrukte LIFR(D1-D3)-hgp130(D2-D3) und LIFR(D3)-hgp130(D2-D3) die Erklärung für ihre nicht erfolgte Bindung an hLIF sein. Wie darüber hinaus dargestellt wurde, wird das komplette N-terminale CBM zusammen mit der Ig-ähnlichen Domäne des LIFR für eine LIF-Bindung benötigt [43]. Die Abwesenheit des N-terminalen Moduls (D1) des N-terminalen CBM des mLIFR im Konstrukt LIFR(D2-D4)-hgp130(D2-D3) oder das Fehlen des gesamten N-terminalen CBM des mLIFR im Konstrukt LIFR(D3-D5)-hgp130(D2-D3) könnte demzufolge der Grund für ihre Unfähigkeit zur LIF-Bindung sein. Zusammengefasst ist nur ein Konstrukt, welches alle fünf N-terminalen Domänen des mLIFR umfasst, zur Bindung von humanem LIF geeignet.

#### *Die Fusion von mLIFR(D1-D5) mit dem CBM des mgp130 erhöht die Bindungsaffinität zwischen mLIFR(D1-D5) und mLIF*

Der natürliche LIF-Inhibitor der Maus, das *LIF binding protein* (LBP), ist eine lösliche Form des zellulären mLIFR, dem die Transmembranregion und der zytoplasmatische Teil fehlen. LBP bindet mLIF mit der gleichen Affinität wie der zelluläre mLIFR [71]. Der LIF-Inhibitor LIFR(D1-D5) unterscheidet sich nur durch das Fehlen der drei C-terminalen FNIII-Domänen von LBP, ansonsten sind sie homolog. Für eine Hemmung der STAT3-Phosphorylierung in

MEF-Zellen nach Stimulation mit mLIF ist LIFR(D1-D5) in den von uns verwendeten Konzentrationen wegen seiner geringen Affinität zu mLIF nicht geeignet (Abb. 29). Erst ein viel höherer molarer Überschuss von LIFR(D1-D5) über mLIF als der eingesetzte würde wahrscheinlich zu einer Bindung von mLIF führen. Wie in dieser Arbeit gezeigt wird, erhöht die Fusion von LIFR(D1-D5) mit dem CBM von mgp130 die Bindungsaffinität zu mLIF erheblich. Das murine LIF-Rezeptor-Fusionsprotein (mLIF-RFP) hemmt effektiv die STAT3-Phosphorylierung und die Induktion des STAT1- und STAT3-abhängigen SIE-TK-Promotors in MEF-Zellen nach Stimulation mit mLIF (Abb. 28B, 31). mLIF-RFP ist folglich ein potenterer mLIF-Inhibitor als das natürlich in der Maus vorkommende LBP.

#### *Möglicher therapeutischer Nutzen der vorgestellten LIF-Inhibitoren LIFR(D1-D5) und mLIF-RFP*

Ein LIF-Inhibitor könnte bei der Behandlung von Haut-Tumoren eingesetzt werden, denn LIF wird in Haut-Tumoren stark exprimiert und es gibt Hinweise, dass LIF eine Rolle bei ihrer Entwicklung spielt [59]. Darüber hinaus könnte die Verabreichung eines LIF-Inhibitors eine neue Methode zur Empfängnisverhütung ohne Einsatz von Steroiden werden. Es ist nämlich in Mäusen gezeigt worden, dass die Implantation der Blastozyste von der maternalen LIF-Expression abhängt [25]. Außerdem können zu niedrige Konzentrationen von LIF im Endometrium zu menschlicher Unfruchtbarkeit beitragen [85, 86]. Ob jedoch der humane LIF-Inhibitor LIFR(D1-D5), der auf dem murinen LIFR basiert, überhaupt zu Therapie-Zwecken im Menschen eingesetzt werden kann, ist fraglich, denn er ist wahrscheinlich stark immunogen. Auf jeden Fall ist LIFR(D1-D5) nützlich, um hLIF in *in-vitro*-Experimenten zu unterdrücken. Im Gegensatz hierzu ist der murine LIF-Inhibitor mLIF-RFP gut für *in-vivo*-Anwendungen geeignet. Beide Rezeptoranteile des mLIF-RFP stammen aus der Maus; nur die Immunogenität des synthetischen *linkers* AGS-41, der aus den Aminosäuren Alanin, Glycin und Serin besteht, müsste noch untersucht werden. Für mögliche *in-vivo*-Anwendungen beim Menschen könnte man ein Fusionsprotein aus den Liganden-bindenden Domänen des hLIFR und des hgp130 herstellen (hLIF-RFP). Der Vorteil des hLIF-RFP gegenüber dem aus mLIFR basierenden mLIFR(D1-D5) wäre eine geringere Immunogenität. Die Bindungsaffinität des hLIF-RFP zu hLIF müsste dann noch analysiert werden.

*Kann die Konstruktion des LIF-Inhibitors mLIF-RFP auf Inhibitoren für andere Zytokine übertragen werden?*

IL-6-Typ-Zytokine binden an ihre Rezeptoren über verschiedene Rezeptorbindestellen, die *sites* I, II und III genannt werden. Die IL-6-Typ-Zytokine können in solche unterteilt werden, die alle drei *sites* (I, II, III) oder nur zwei *sites* (II, III) besitzen. Während der IL-6-Inhibitor IL-6-RFP ein Zytokin bindet, das alle drei Rezeptorbindestellen nutzt, wurde mit der Konstruktion von LIF-Inhibitoren das Ziel verfolgt, Zytokine zu hemmen, die nur die *sites* II und III besitzen. Diese Inhibitoren haben wir *site* II/III-Inhibitoren genannt. Es gibt viele Zytokine, die über ein Rezeptorheterodimer signalisieren, welches nur über die *sites* II und III rekrutiert wird. Hierzu zählen neben LIF die Zytokine IL-27, GCSF, IL-12, IL-23, OSM, Leptin und IL-31 [57]. Von diesen wurde LIF ausgewählt für die Konstruktion eines prototypischen *site* II/III-Inhibitors, mit dem Ziel, das erlangte Wissen später auf andere Zytokine zu übertragen. An dieser Stelle muss die Frage gestellt werden: sind die LIF-Inhibitoren LIFR(D1-D5) und mLIF-RFP nun als Prototypen zur Herstellung weiterer *site* II/III-Inhibitoren geeignet? LIFR(D1-D5) eher nicht, weil die hohe Bindungsaffinität des mLIFR an hLIF ein Ausnahmefall ist, der sicherlich nicht oft in der Natur vorkommt. mLIF-RFP hingegen kann als wirklicher Prototyp angesehen werden, der als Modell für die Entwicklung weiterer *site* II/III-Inhibitoren, die auf der Fusion von Liganden-bindenden Rezeptor-Domänen basieren, dienen kann. Diese *site* II/III-Inhibitoren können für die genauere Untersuchung der Funktionen von Zytokinen oder bei der Behandlung von Krankheiten, bei denen Zytokine dysreguliert sind, nützlich sein (siehe 4.3).

### 4.3 Ausblick

*Analyse der Wirkung von IL-6-RFP in-vivo*

Die biochemische Charakterisierung des IL-6-Inhibitors IL-6-RFP zeigt, dass dieser hochaffin und spezifisch die Bioaktivitäten von humanem IL-6 hemmt. Alle Experimente sind jedoch bisher *in-vitro* durchgeführt worden. Interessant wäre es nun, die Wirkung des IL-6-RFP *in-vivo* zu testen. Hierzu bieten sich verschiedene Mausmodelle chronisch-entzündlicher Erkrankungen an, zum Beispiel das der rheumatoiden Arthritis. Der vorgestellte IL-6-Inhibitor ist jedoch spezifisch für humanes IL-6 und hemmt murines IL-6 nicht (Wiesinger, 2004, persönliche Mitteilung). Um einen IL-6-Inhibitor für murines IL-6 zu schaffen, müssten die Liganden-bindenden Domänen des humanen gp130 und des humanen IL-6R $\alpha$  in IL-6-RFP durch die entsprechenden murinen Domänen ersetzt werden. Voraussetzung hierfür

wäre, dass die Liganden-bindenden Domänen des IL-6R $\alpha$  und gp130 im humanen und murinen System die gleichen sind. Da der murine IL-6R $\alpha$  sowohl murines als auch humanes IL-6 bindet, würde man mit einem murinen IL-6-Inhibitor möglicherweise einen bispezifischen Inhibitor für murines und humanes IL-6 herstellen. Nach erfolgreicher Produktion dieses Inhibitors könnte getestet werden, ob er zur Behandlung der rheumatoiden Arthritis im Mausmodell geeignet ist.

#### *Übertragbarkeit der Konstruktion des siteII/III-Inhibitors mLIF-RFP auf Inhibitoren für andere Zytokine*

Die in der vorliegenden Arbeit vorgestellte Konstruktion von *site* II/III-Inhibitoren am Beispiel von mLIF-RFP als Prototyp ist unter anderem eine Strategie zur Entwicklung weiterer Zytokin-Inhibitoren. Auf welche Zytokine könnte das erworbene Wissen nun übertragen werden? Sinnvoll wäre zum Beispiel die Herstellung eines Inhibitors für IL-31. IL-31 ist ein erst kürzlich entdecktes Zytokin [87], welches nahe verwandt zu LIF, OSM und Cardiotrophin-1 ist [88]. IL-31 leitet sein Signal über einen Rezeptorkomplex weiter, der aus IL-31-Rezeptor (IL-31R) und OSMR $\beta$  besteht [87, 89]. In Patienten mit atopischer Dermatitis wurde gezeigt, dass IL-31 an der Auslösung des Juckreizes [90] und der Entwicklung von Hautentzündungen beteiligt ist [91]. Folglich könnte IL-31 ein Zielprotein bei der Behandlung von atopischer Dermatitis werden. Vor kurzem wurde eine verkürzte Form des OSMR entdeckt, die nur die D1-D3 des membrangebundenen OSMR umfasst, und als sOSMR bezeichnet wurde [77]. Von Diveu *et al.* [77] wurde weiterhin herausgefunden, dass die Zugabe von sOSMR in Kombination mit IL-31R zu T98G-Glioblastom-Zellen zu einer Reduktion der STAT3-Phosphorylierung nach IL-31-Stimulation führt. Es wäre interessant zu untersuchen, ob die Fusion eines möglicherweise verkürzten IL-31R mit sOSMR diese Hemmung noch verstärken könnte.

Auch IL-27 ist ein Zytokin, das sehr wahrscheinlich nur die *sites* II und III besitzt. Es nutzt die Rezeptoren WSX-I und gp130 zur Signalweiterleitung [92]. Der Rezeptor WSX-I reicht aus, um IL-27 zu binden und ist hierdurch ein natürlicher IL-27-Inhibitor, der angeborene und adaptive Elemente der Type-II-Immunität hemmt [93]. Ob es möglich ist, WSX-I zu verkürzen oder dessen Bindungsaffinität durch eine Fusion mit dem CBM von gp130 zu erhöhen, muss noch aufgeklärt werden.

## 5 Zusammenfassung der Ergebnisse

### *Biochemische Charakterisierung des IL-6-Inhibitors IL-6-RFP*

Zytokine sind kleine, sezernierte Proteine, die von vielen verschiedenen Zelltypen in nahezu jedem Gewebe hergestellt werden. Sie dienen der interzellulären Kommunikation und regulieren unter anderem die Immunantwort, Entzündungsprozesse und die Hämatopoese. Dysregulierte Zytokinproduktion spielt eine wichtige Rolle bei der Entstehung und dem Fortgang bestimmter Krankheiten. So kann zum Beispiel eine fehlregulierte IL-6-Produktion chronisch-entzündliche Erkrankungen wie rheumatoide Arthritis und Morbus Crohn, akute Sepsis und bestimmte Formen von Krebs verursachen. Während die Bedeutung von fusionierten Zytokinrezeptoren als Medikamente zur Behandlung fehlregulierter Zytokinproduktion erkannt wurde, wurde ihre Wirkungsweise jedoch bisher nicht in ausreichendem Maße untersucht. Dies sollte am Beispiel des in unserer Arbeitsgruppe hergestellten IL-6-Inhibitors IL-6-Rezeptorfusionsprotein (IL-6-RFP) geschehen.

Im ersten Teil dieser Arbeit wird eine ausführliche biochemische Charakterisierung des IL-6-Inhibitors IL-6-RFP präsentiert. Dieser Inhibitor besteht aus den Liganden-bindenden Domänen des Glykoproteins 130 (gp130) und des Interleukin-6 Rezeptor  $\alpha$  (IL-6R $\alpha$ ), welche über einen *linker* miteinander fusioniert wurden. IL-6-RFP ist ein hoch-spezifischer IL-6-Inhibitor, der die Bioaktivitäten der verwandten IL-6-Typ-Zytokine OSM und LIF nicht beeinflusst. Des Weiteren wurde eine neue Methode für die Analyse von Protein-Protein-Wechselwirkungen präsentiert. Diese Methode basiert auf blauer nativer PAGE mit fluoreszierenden Fusionsproteinen und Fluoreszenz-*scanning*. Hiermit wurde herausgefunden, dass ein zweifach molarer Überschuss von IL-6-RFP über IL-6 ausreicht, um IL-6 komplett in einem binären IL-6/IL-6-RFP-Komplex zu binden. Der Komplex aus IL-6 und IL-6-RFP ist stabiler als der Komplex aus IL-6 und seinen löslichen Rezeptoren gp130 und IL-6-R $\alpha$ . IL-6-RFP wirkt folglich inhibitorisch, indem es IL-6 in Lösung mit einer Affinität, die höher ist als die der einzelnen, löslichen Rezeptoren bindet und dadurch neutralisiert. Wie mit *live cell imaging* gezeigt wurde, entfernt IL-6-RFP aufgrund seiner hohen Affinität IL-6 aus seinem Rezeptorkomplex auf der Zelloberfläche. Weiterhin legt die Analyse der Stöchiometrie mittels Gelfiltration und blauer nativer PAGE nahe, dass der Komplex aus IL-6 und IL-6-RFP analog zum hexameren IL-6-Rezeptorkomplex aufgebaut ist. Die hexamere Struktur des IL-6-Rezeptorkomplexes wurde durch Röntgenstrukturanalyse aufgeklärt und

zeigt, dass der IL-6-Rezeptorkomplex aus je zwei Molekülen IL-6, IL-6R $\alpha$  und gp130 besteht [37].

Aus dem ersten Teil dieser Arbeit folgt, dass IL-6-RFP ein viel versprechender IL-6-Inhibitor für die Behandlung von Krankheiten ist, die von fehlregulierter IL-6-Expression verursacht werden.

#### *Klonierung und Charakterisierung neuartiger site II/III-Zytokin-Inhibitoren am Beispiel von LIF*

Mit dem IL-6-Rezeptor-Fusionsprotein wurde ein Inhibitor geschaffen, der ein Zytokin bindet, das seine Rezeptoren über alle drei Rezeptorbindestellen (*sites* I, II und III) rekrutiert. Viele Zytokine signalisieren jedoch über ein Rezeptor-Heterodimer, welches nur über die *sites* II und III der Zytokine gebunden wird. Zu diesen Zytokinen gehören neben LIF die Zytokine IL-27, GCSF, IL-12, IL-23, OSM, Leptin and IL-31 [57]. Ziel des zweiten Teils dieser Arbeit war es herauszufinden, wie diese Zytokine mit Hilfe von fusionierten, löslichen Rezeptoren gehemmt werden können. Als Prototypen für solch einen neuartigen *site* II/III-Inhibitor sollte ein Inhibitor für LIF aus den extrazellulären Domänen von gp130 und LIFR hergestellt werden. Hierbei wurde auch das Ziel verfolgt, das erlangte Wissen später auf andere Zytokine zu übertragen.

Es stellte sich heraus, dass die ersten fünf N-terminalen Domänen des murinen LIFR [LIFR(D1-D5)] für eine potente Bindung von humanem LIF ausreichen. Zur Rekrutierung des humanen LIF wurde der murine LIFR verwendet, da dieser das humane LIF mit einer außergewöhnlich hohen Affinität bindet [42, 71]. Für die Präzipitation von murinem LIF eignete sich das Fusionsprotein mLIF-RFP. Es besteht aus den ersten fünf N-terminalen Domänen des murinen LIFR, die mit dem Zytokin-bindenden Modul des murinen gp130 über einen *linker* fusioniert wurden. In Zellkultur-Versuchen mit MEF-Zellen wurde gezeigt, dass ein fünffach molarer Überschuss von LIFR(D1-D5) bzw. mLIF-RFP über hLIF bzw. mLIF die STAT3-Phosphorylierung effizient reprimierte. LIFR(D1-D5) und mLIF-RFP sind spezifische Inhibitoren und hemmen die Bioaktivität von IL-6 nicht. Darüber hinaus hemmt mLIF-RFP auch nicht die Bioaktivität des nahe verwandten Zytokins Oncostatin M. Des Weiteren ist für die komplette Hemmung der Geninduktion nach Stimulation mit hLIF oder mLIF eine Zugabe von LIFR(D1-D5) oder mLIF-RFP in einem molaren Verhältnis von 1:1 zu hLIF oder mLIF bereits ausreichend.

Die vorgestellte Konstruktion des *site* II/III-Inhibitors mLIF-RFP ist eine Strategie zur Entwicklung weiterer Zytokin-Inhibitoren, die auf der Fusion von Liganden-bindenden

Rezeptor-Domänen basieren. Diese *site* II/III-Inhibitoren können für die genauere Untersuchung von Funktionen von Zytokinen oder bei der Behandlung von Krankheiten, bei denen Zytokine dysreguliert sind, nützlich werden.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Decker, J. M. 2006.  
<http://microvet.arizona.edu/Courses/MIC419/Tutorials/Cytokines.html>.
2. Bazan, J. F. 1990. Structural design and molecular evolution of a cytokine receptor superfamily. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:6934.
3. Nicola, N. A. e. 1994. Guideline to cytokines and their receptors. Oxford University Press, Oxford, p. 1.
4. Heinrich, P. C., I. Behrmann, G. Muller-Newen, F. Schaper, and L. Graeve. 1998. Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. *Biochem J* 334 ( Pt 2):297.
5. Pflanz, S., J. C. Timans, J. Cheung, R. Rosales, H. Kanzler, J. Gilbert, L. Hibbert, T. Churakova, M. Travis, E. Vaisberg, W. M. Blumenschein, J. D. Mattson, J. L. Wagner, W. To, S. Zurawski, T. K. McClanahan, D. M. Gorman, J. F. Bazan, R. de Waal Malefyt, D. Rennick, and R. A. Kastelein. 2002. IL-27, a heterodimeric cytokine composed of EBI3 and p28 protein, induces proliferation of naive CD4(+) T cells. *Immunity* 16:779.
6. Senaldi, G., B. C. Varnum, U. Sarmiento, C. Starnes, J. Lile, S. Scully, J. Guo, G. Elliott, J. McNinch, C. L. Shaklee, D. Freeman, F. Manu, W. S. Simonet, T. Boone, and M. S. Chang. 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.
7. Derouet, D., F. Rousseau, F. Alfonsi, J. Froger, J. Hermann, F. Barbier, D. Perret, C. Diveu, C. Guillet, L. Preisser, A. Dumont, M. Barbado, A. Morel, O. deLapeyriere, H. Gascan, and S. Chevalier. 2004. Neuropoietin, a new IL-6-related cytokine signaling through the ciliary neurotrophic factor receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:4827.
8. Bravo, J., and J. K. Heath. 2000. Receptor recognition by gp130 cytokines. *Embo J* 19:2399.
9. Muller-Newen, G. 2003. The cytokine receptor gp130: faithfully promiscuous. *Sci STKE* 2003:PE40.
10. Robinson, R. C., L. M. Grey, D. Staunton, H. Vankelecom, A. B. Vernallis, J. F. Moreau, D. I. Stuart, J. K. Heath, and E. Y. Jones. 1994. The crystal structure and

- biological function of leukemia inhibitory factor: implications for receptor binding. *Cell* 77:1101.
11. McDonald, N. Q., N. Panayotatos, and W. A. Hendrickson. 1995. Crystal structure of dimeric human ciliary neurotrophic factor determined by MAD phasing. *Embo J* 14:2689.
  12. Deller, M. C., K. R. Hudson, S. Ikemizu, J. Bravo, E. Y. Jones, and J. K. Heath. 2000. Crystal structure and functional dissection of the cytostatic cytokine oncostatin M. *Structure* 8:863.
  13. Somers, W., M. Stahl, and J. S. Seehra. 1997. 1.9 Å crystal structure of interleukin 6: implications for a novel mode of receptor dimerization and signaling. *Embo J* 16:989.
  14. Xu, G. Y., H. A. Yu, J. Hong, M. Stahl, T. McDonagh, L. E. Kay, and D. A. Cumming. 1997. Solution structure of recombinant human interleukin-6. *J Mol Biol* 268:468.
  15. Heinrich, P. C., I. Behrmann, S. Haan, H. M. Hermanns, G. Muller-Newen, and F. Schaper. 2003. Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem J* 374:1.
  16. Kishimoto, T., S. Akira, M. Narazaki, and T. Taga. 1995. Interleukin-6 family of cytokines and gp130. *Blood* 86:1243.
  17. Akira, S., T. Taga, and T. Kishimoto. 1993. Interleukin-6 in biology and medicine. *Adv Immunol* 54:1.
  18. Choy, E. 2003. Interleukin 6 receptor as a target for the treatment of rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis* 62 Suppl 2:ii68.
  19. Nishimoto, N., Y. Kanakura, K. Aozasa, T. Johkoh, M. Nakamura, S. Nakano, N. Nakano, Y. Ikeda, T. Sasaki, K. Nishioka, M. Hara, H. Taguchi, Y. Kimura, Y. Kato, H. Asaoku, S. Kumagai, F. Kodama, H. Nakahara, K. Hagihara, K. Yoshizaki, and T. Kishimoto. 2005. Humanized anti-interleukin-6 receptor antibody treatment of multicentric Castleman disease. *Blood* 106:2627.
  20. Gearing, D. P., N. M. Gough, J. A. King, D. J. Hilton, N. A. Nicola, R. J. Simpson, E. C. Nice, A. Kelso, and D. Metcalf. 1987. Molecular cloning and expression of cDNA encoding a murine myeloid leukaemia inhibitory factor (LIF). *Embo J* 6:3995.
  21. Gough, N. M., D. P. Gearing, J. A. King, T. A. Willson, D. J. Hilton, N. A. Nicola, and D. Metcalf. 1988. Molecular cloning and expression of the human homologue of the murine gene encoding myeloid leukemia-inhibitory factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85:2623.

22. Hilton, D. J. 1992. LIF: lots of interesting functions. *Trends Biochem Sci* 17:72.
23. Smith, A. G., J. K. Heath, D. D. Donaldson, G. G. Wong, J. Moreau, M. Stahl, and D. Rogers. 1988. Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides. *Nature* 336:688.
24. Williams, R. L., D. J. Hilton, S. Pease, T. A. Willson, C. L. Stewart, D. P. Gearing, E. F. Wagner, D. Metcalf, N. A. Nicola, and N. M. Gough. 1988. Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells. *Nature* 336:684.
25. Stewart, C. L., P. Kaspar, L. J. Brunet, H. Bhatt, I. Gadi, F. Kontgen, and S. J. Abbondanzo. 1992. Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukaemia inhibitory factor. *Nature* 359:76.
26. Davis, S., T. H. Aldrich, D. M. Valenzuela, V. V. Wong, M. E. Furth, S. P. Squinto, and G. D. Yancopoulos. 1991. The receptor for ciliary neurotrophic factor. *Science* 253:59.
27. Wells, J. A., and A. M. de Vos. 1996. Hematopoietic receptor complexes. *Annu Rev Biochem* 65:609.
28. Murakami, M., M. Hibi, N. Nakagawa, T. Nakagawa, K. Yasukawa, K. Yamanishi, T. Taga, and T. Kishimoto. 1993. IL-6-induced homodimerization of gp130 and associated activation of a tyrosine kinase. *Science* 260:1808.
29. Yin, T., T. Taga, M. L. Tsang, K. Yasukawa, T. Kishimoto, and Y. C. Yang. 1993. Involvement of IL-6 signal transducer gp130 in IL-11-mediated signal transduction. *J Immunol* 151:2555.
30. Yamasaki, K., T. Taga, Y. Hirata, H. Yawata, Y. Kawanishi, B. Seed, T. Taniguchi, T. Hirano, and T. Kishimoto. 1988. Cloning and expression of the human interleukin-6 (BSF-2/IFN beta 2) receptor. *Science* 241:825.
31. Hilton, D. J., A. A. Hilton, A. Raicevic, S. Rakar, M. Harrison-Smith, N. M. Gough, C. G. Begley, D. Metcalf, N. A. Nicola, and T. A. Willson. 1994. Cloning of a murine IL-11 receptor alpha-chain; requirement for gp130 for high affinity binding and signal transduction. *Embo J* 13:4765.
32. Mullberg, J., H. Schooltink, T. Stoyan, M. Gunther, L. Graeve, G. Buse, A. Mackiewicz, P. C. Heinrich, and S. Rose-John. 1993. The soluble interleukin-6 receptor is generated by shedding. *Eur J Immunol* 23:473.
33. Muller-Newen, G., C. Kohne, R. Keul, U. Hemmann, W. Muller-Esterl, J. Wijdenes, J. P. Brakenhoff, M. H. Hart, and P. C. Heinrich. 1996. Purification and

- characterization of the soluble interleukin-6 receptor from human plasma and identification of an isoform generated through alternative splicing. *Eur J Biochem* 236:837.
34. Hibi, M., M. Murakami, M. Saito, T. Hirano, T. Taga, and T. Kishimoto. 1990. Molecular cloning and expression of an IL-6 signal transducer, gp130. *Cell* 63:1149.
  35. Grotzinger, J., G. Kurapkat, A. Wollmer, M. Kalai, and S. Rose-John. 1997. The family of the IL-6-type cytokines: specificity and promiscuity of the receptor complexes. *Proteins* 27:96.
  36. Simpson, R. J., A. Hammacher, D. K. Smith, J. M. Matthews, and L. D. Ward. 1997. Interleukin-6: structure-function relationships. *Protein Sci* 6:929.
  37. Boulanger, M. J., D. C. Chow, E. E. Brevnova, and K. C. Garcia. 2003. Hexameric structure and assembly of the interleukin-6/IL-6 alpha-receptor/gp130 complex. *Science* 300:2101.
  38. Yawata, H., K. Yasukawa, S. Natsuka, M. Murakami, K. Yamasaki, M. Hibi, T. Taga, and T. Kishimoto. 1993. Structure-function analysis of human IL-6 receptor: dissociation of amino acid residues required for IL-6-binding and for IL-6 signal transduction through gp130. *Embo J* 12:1705.
  39. Kurth, I., U. Horsten, S. Pflanz, H. Dahmen, A. Kuster, J. Grotzinger, P. C. Heinrich, and G. Muller-Newen. 1999. Activation of the signal transducer glycoprotein 130 by both IL-6 and IL-11 requires two distinct binding epitopes. *J Immunol* 162:1480.
  40. Zhang, J. G., C. M. Owczarek, L. D. Ward, G. J. Howlett, L. J. Fabri, B. A. Roberts, and N. A. Nicola. 1997. Evidence for the formation of a heterotrimeric complex of leukaemia inhibitory factor with its receptor subunits in solution. *Biochem J* 325 ( Pt 3):693.
  41. Boulanger, M. J., A. J. Bankovich, T. Kortemme, D. Baker, and K. C. Garcia. 2003. Convergent mechanisms for recognition of divergent cytokines by the shared signaling receptor gp130. *Mol Cell* 12:577.
  42. Owczarek, C. M., Y. Zhang, M. J. Layton, D. Metcalf, B. Roberts, and N. A. Nicola. 1997. The unusual species cross-reactivity of the leukemia inhibitory factor receptor alpha-chain is determined primarily by the immunoglobulin-like domain. *J Biol Chem* 272:23976.
  43. Voisin, M. B., J. Bitard, S. Daburon, J. F. Moreau, and J. L. Taupin. 2002. Separate functions for the two modules of the membrane-proximal cytokine binding domain of

- glycoprotein 190, the leukemia inhibitory factor low affinity receptor, in ligand binding and receptor activation. *J Biol Chem* 277:13682.
44. Aasland, D., B. Oppmann, J. Grotzinger, S. Rose-John, and K. J. Kallen. 2002. The upper cytokine-binding module and the Ig-like domain of the leukaemia inhibitory factor (LIF) receptor are sufficient for a functional LIF receptor complex. *J Mol Biol* 315:637.
  45. He, W., K. Gong, G. Zhu, D. K. Smith, and N. Y. Ip. 2002. Membrane distal cytokine binding domain of LIFR interacts with soluble CNTFR in vitro. *FEBS Lett* 514:214.
  46. He, W., K. Gong, D. K. Smith, and N. Y. Ip. 2005. The N-terminal cytokine binding domain of LIFR is required for CNTF binding and signaling. *FEBS Lett* 579:4317.
  47. Goldenberg, M. M. 1999. Etanercept, a novel drug for the treatment of patients with severe, active rheumatoid arthritis. *Clin Ther* 21:75.
  48. Wendling, D., E. Racadot, and J. Wijdenes. 1993. Treatment of severe rheumatoid arthritis by anti-interleukin 6 monoclonal antibody. *J Rheumatol* 20:259.
  49. Bataille, R., B. Barlogie, Z. Y. Lu, J. F. Rossi, T. Lavabre-Bertrand, T. Beck, J. Wijdenes, J. Brochier, and B. Klein. 1995. Biologic effects of anti-interleukin-6 murine monoclonal antibody in advanced multiple myeloma. *Blood* 86:685.
  50. Muller-Newen, G., S. Haan, and P. C. Heinrich. 2003. Fusionierte lösliche Rezeptoren als hochaktive Zytokin-Inhibitoren. *Biospektrum, Sonderausgabe 9. Jahrgang*.
  51. Taga, T., M. Hibi, Y. Hirata, K. Yamasaki, K. Yasukawa, T. Matsuda, T. Hirano, and T. Kishimoto. 1989. Interleukin-6 triggers the association of its receptor with a possible signal transducer, gp130. *Cell* 58:573.
  52. Narazaki, M., K. Yasukawa, T. Saito, Y. Ohsugi, H. Fukui, Y. Koishihara, G. D. Yancopoulos, T. Taga, and T. Kishimoto. 1993. Soluble forms of the interleukin-6 signal-transducing receptor component gp130 in human serum possessing a potential to inhibit signals through membrane-anchored gp130. *Blood* 82:1120.
  53. Muller-Newen, G., A. Kuster, U. Hemmann, R. Keul, U. Horsten, A. Martens, L. Graeve, J. Wijdenes, and P. C. Heinrich. 1998. Soluble IL-6 receptor potentiates the antagonistic activity of soluble gp130 on IL-6 responses. *J Immunol* 161:6347.
  54. Honda, M., S. Yamamoto, M. Cheng, K. Yasukawa, H. Suzuki, T. Saito, Y. Osugi, T. Tokunaga, and T. Kishimoto. 1992. Human soluble IL-6 receptor: its detection and enhanced release by HIV infection. *J Immunol* 148:2175.

55. Ancey, C., A. Kuster, S. Haan, A. Herrmann, P. C. Heinrich, and G. Muller-Newen. 2003. A fusion protein of the gp130 and interleukin-6Ralpha ligand-binding domains acts as a potent interleukin-6 inhibitor. *J Biol Chem* 278:16968.
56. Economides, A. N., L. R. Carpenter, J. S. Rudge, V. Wong, E. M. Koehler-Stec, C. Hartnett, E. A. Pyles, X. Xu, T. J. Daly, M. R. Young, J. P. Fandl, F. Lee, S. Carver, J. McNay, K. Bailey, S. Ramakanth, R. Hutabarat, T. T. Huang, C. Radziejewski, G. D. Yancopoulos, and N. Stahl. 2003. Cytokine traps: multi-component, high-affinity blockers of cytokine action. *Nat Med* 9:47.
57. Boulay, J. L., J. J. O'Shea, and W. E. Paul. 2003. Molecular phylogeny within type I cytokines and their cognate receptors. *Immunity* 19:159.
58. Dinarello, C. A. 2003. Setting the cytokine trap for autoimmunity. *Nat Med* 9:20.
59. McKenzie, R. C., and J. Szepietowski. 2004. Cutaneous leukemia inhibitory factor and its potential role in the development of skin tumors. *Dermatol Surg* 30:279.
60. Arcone, R., P. Pucci, F. Zappacosta, V. Fontaine, A. Malorni, G. Marino, and G. Ciliberto. 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.
61. Aarden, L. A., E. R. De Groot, O. L. Schaap, and P. M. Lansdorp. 1987. Production of hybridoma growth factor by human monocytes. *Eur J Immunol* 17:1411.
62. Weiergraber, O., U. Hemmann, A. Kuster, G. Muller-Newen, J. Schneider, S. Rose-John, P. Kurschat, J. P. Brakenhoff, M. H. Hart, S. Stabel, and et al. 1995. Soluble human interleukin-6 receptor. Expression in insect cells, purification and characterization. *Eur J Biochem* 234:661.
63. Giese, B., C. K. Au-Yeung, A. Herrmann, S. Diefenbach, C. Haan, A. Kuster, S. B. Wortmann, C. Roderburg, P. C. Heinrich, I. Behrmann, and G. Muller-Newen. 2003. Long term association of the cytokine receptor gp130 and the Janus kinase Jak1 revealed by FRAP analysis. *J Biol Chem* 278:39205.
64. Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. 1989. *Molecular cloning*. Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, NY.
65. Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R. 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74:5463.
66. Schagger, H., and G. von Jagow. 1991. Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal Biochem* 199:223.

67. Nicke, A., J. Rettinger, and G. Schmalzing. 2003. Monomeric and dimeric byproducts are the principal functional elements of higher order P2X1 concatamers. *Mol Pharmacol* 63:243.
68. Helle, M., L. Boeije, E. de Groot, A. de Vos, and L. Aarden. 1991. Sensitive ELISA for interleukin-6. Detection of IL-6 in biological fluids: synovial fluids and sera. *J Immunol Methods* 138:47.
69. Heinrich, P. C., J. V. Castell, and T. Andus. 1990. Interleukin-6 and the acute phase response. *Biochem J* 265:621.
70. Giese, B., C. Roderburg, M. Sommerauer, S. B. Wortmann, S. Metz, P. C. Heinrich, and G. Muller-Newen. 2005. Dimerization of the cytokine receptors gp130 and LIFR analysed in single cells. *J Cell Sci* 118:5129.
71. Layton, M. J., B. A. Cross, D. Metcalf, L. D. Ward, R. J. Simpson, and N. A. Nicola. 1992. A major binding protein for leukemia inhibitory factor in normal mouse serum: identification as a soluble form of the cellular receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:8616.
72. Kurth, I., U. Horsten, S. Pflanz, A. Timmermann, A. Kuster, H. Dahmen, I. Tacke, P. C. Heinrich, and G. Muller-Newen. 2000. Importance of the membrane-proximal extracellular domains for activation of the signal transducer glycoprotein 130. *J Immunol* 164:273.
73. Hammacher, A., J. Wijdenes, D. J. Hilton, N. A. Nicola, R. J. Simpson, and J. E. Layton. 2000. Ligand-specific utilization of the extracellular membrane-proximal region of the gp130-related signalling receptors. *Biochem J* 345 (Pt 1):25.
74. Varghese, J. N., R. L. Moritz, M. Z. Lou, A. Van Donkelaar, H. Ji, N. Ivancic, K. M. Branson, N. E. Hall, and R. J. Simpson. 2002. Structure of the extracellular domains of the human interleukin-6 receptor alpha -chain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:15959.
75. Tanaka, M., T. Hara, N. G. Copeland, D. J. Gilbert, N. A. Jenkins, and A. Miyajima. 1999. Reconstitution of the functional mouse oncostatin M (OSM) receptor: molecular cloning of the mouse OSM receptor beta subunit. *Blood* 93:804.
76. Modrell, B., J. Liu, H. Miller, and M. Shoyab. 1994. LIF and OM directly interact with a soluble form of gp130, the IL-6 receptor signal transducing subunit. *Growth Factors* 11:81.
77. Diveu, C., E. Venereau, J. Froger, E. Ravon, L. Grimaud, F. Rousseau, S. Chevalier, and H. Gascan. 2006. Molecular and functional characterization of a soluble form of oncostatin M / interleukin-31 shared receptor. *J Biol Chem* in press.

78. Gearing, D. P., M. R. Comeau, D. J. Friend, S. D. Gimpel, C. J. Thut, J. McGourty, K. K. Brasher, J. A. King, S. Gillis, B. Mosley, and et al. 1992. The IL-6 signal transducer, gp130: an oncostatin M receptor and affinity converter for the LIF receptor. *Science* 255:1434.
79. Kiessig, S., J. Reissmann, C. Rascher, G. Kullertz, A. Fischer, and F. Thuncke. 2001. Application of a green fluorescent fusion protein to study protein-protein interactions by electrophoretic methods. *Electrophoresis* 22:1428.
80. Brakenhoff, J. P., M. Hart, and L. A. Aarden. 1989. Analysis of human IL-6 mutants expressed in Escherichia coli. Biologic activities are not affected by deletion of amino acids 1-28. *J Immunol* 143:1175.
81. Matthews, J. M., A. Hammacher, G. J. Howlett, and R. J. Simpson. 1998. Physicochemical characterization of an antagonistic human interleukin-6 dimer. *Biochemistry* 37:10671.
82. Ward, L. D., G. J. Howlett, G. Discolo, K. Yasukawa, A. Hammacher, R. L. Moritz, and R. J. Simpson. 1994. High affinity interleukin-6 receptor is a hexameric complex consisting of two molecules each of interleukin-6, interleukin-6 receptor, and gp-130. *J Biol Chem* 269:23286.
83. Layton, M. J., P. Lock, D. Metcalf, and N. A. Nicola. 1994. Cross-species receptor binding characteristics of human and mouse leukemia inhibitory factor suggest a complex binding interaction. *J Biol Chem* 269:17048.
84. Bitard, J., S. Daburon, L. Duplomb, F. Blanchard, P. Vuisio, Y. Jacques, A. Godard, J. K. Heath, J. F. Moreau, and J. L. Taupin. 2003. Mutations in the immunoglobulin-like domain of gp190, the leukemia inhibitory factor (LIF) receptor, increase or decrease its affinity for LIF. *J Biol Chem* 278:16253.
85. Delage, G., J. F. Moreau, J. L. Taupin, S. Freitas, E. Hambartsoumian, F. Olivennes, R. Fanchin, H. Letur-Konirsch, R. Frydman, and G. Chaouat. 1995. In-vitro endometrial secretion of human interleukin for DA cells/leukaemia inhibitory factor by explant cultures from fertile and infertile women. *Hum Reprod* 10:2483.
86. Hambartsoumian, E. 1998. Endometrial leukemia inhibitory factor (LIF) as a possible cause of unexplained infertility and multiple failures of implantation. *Am J Reprod Immunol* 39:137.
87. Dillon, S. R., C. Sprecher, A. Hammond, J. Bilsborough, M. Rosenfeld-Franklin, S. R. Presnell, H. S. Haugen, M. Maurer, B. Harder, J. Johnston, S. Bort, S. Mudri, J. L. Kuijper, T. Bukowski, P. Shea, D. L. Dong, M. Dasovich, F. J. Grant, L. Lockwood,

- S. D. Levin, C. LeCiel, K. Waggie, H. Day, S. Topouzis, J. Kramer, R. Kuestner, Z. Chen, D. Foster, J. Parrish-Novak, and J. A. Gross. 2004. Interleukin 31, a cytokine produced by activated T cells, induces dermatitis in mice. *Nat Immunol* 5:752.
88. Gross, J. F., C. Sprecher, A. Hammond, S. Dillon, M. Dasovich, J. Kuijper, J. Kramer, F. Grant, S. Presnell, Z. Gao, T. Whitmore, R. Kuestner, M. Maurer, J. Billsborough, B. Harder, M. Rosenfeld-Franklin, S. Mudri, J. Johnson, C. Clegg, H.-P. Ren, K. Waggie, P. Shea, D. Dong, T. R. Bukowski, J. Parrish-Novak, and D. Foster. 2003. IL-31, a novel cytokine made by activated T cells, signals through a novel heterodimeric receptor complex expressed in skin. *European Cytokine Network* 14:109; A308.
89. Dreuw, A., Radtke, S., Pflanz, S., Lippok, B.E., Heinrich, P.C., Hermanns, H.M. 2004. Characterization of the signaling capacities of the novel gp130-like cytokine receptor. *J Biol Chem* 279:36112.
90. Sonkoly, E., A. Muller, A. I. Lauerma, A. Pivarsci, H. Soto, L. Kemeny, H. Alenius, M. C. Dieu-Nosjean, S. Meller, J. Rieker, M. Steinhoff, T. K. Hoffmann, T. Ruzicka, A. Zlotnik, and B. Homey. 2006. IL-31: a new link between T cells and pruritus in atopic skin inflammation. *J Allergy Clin Immunol* 117:411.
91. Billsborough, J., D. Y. Leung, M. Maurer, M. Howell, M. Boguniewicz, L. Yao, H. Storey, C. LeCiel, B. Harder, and J. A. Gross. 2006. IL-31 is associated with cutaneous lymphocyte antigen-positive skin homing T cells in patients with atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 117:418.
92. Pflanz, S., L. Hibbert, J. Mattson, R. Rosales, E. Vaisberg, J. F. Bazan, J. H. Phillips, T. K. McClanahan, R. de Waal Malefyt, and R. A. Kastelein. 2004. WSX-1 and glycoprotein 130 constitute a signal-transducing receptor for IL-27. *J Immunol* 172:2225.
93. Artis, D., A. Villarino, M. Silverman, W. He, E. M. Thornton, S. Mu, S. Summer, T. M. Covey, E. Huang, H. Yoshida, G. Koretzky, M. Goldschmidt, G. D. Wu, F. de Sauvage, H. R. Miller, C. J. Saris, P. Scott, and C. A. Hunter. 2004. The IL-27 receptor (WSX-1) is an inhibitor of innate and adaptive elements of type 2 immunity. *J Immunol* 173:5626.

---

## **Danksagung**

Herrn Prof. Dr. Peter C. Heinrich danke ich herzlich für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, sein stetes Interesse am Fortgang meiner Arbeit und die mir gewährte Unterstützung.

Besonders danke ich Herrn Prof. Dr. Gerhard Müller-Newen für die engagierte Betreuung meiner Arbeit, für die wertvollen Ratschläge und Gespräche und für seinen ständigen Optimismus und Ideenreichtum beim Scheitern so mancher Experimente. Bedanken möchte ich mich natürlich auch für die Hilfe bei der Erstellung der vorliegenden Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Fritz Kreuzaler danke ich für die freundliche Übernahme des Koreferats.

Ich möchte mich herzlich bei Heike Lauks und Günther Schmalzing für ihre Kooperationsbereitschaft und Hilfe bei der Etablierung der BN-PAGE in unserem Labor bedanken.

Ich danke meinen Kolleginnen und Kollegen aus dem Labor 10, Monique Wiesinger, Gudrun Naeth, Michael Vogt, Tobias Recker, Andreas Herrmann und Michael Sommerauer für die kollegiale und konstruktive Arbeitsatmosphäre. Dieser Dank gilt auch meinen ehemaligen Kolleginnen und Kollegen aus dem Labor 10, Andrea Küster, Bernd Giese, Cécile Ancy, Albert Pranada, Cornelia Goßlar und Christoph Roderburg.

Andrea Küster danke ich ganz besonders für ihr Engagement und ihre Mühe bei der Herstellung des IL-6-Inhibitors, die wesentlich zum Gelingen dieses Projekts beigetragen haben. Außerdem bedanke ich mich herzlich bei Andrea Küster und Hildegard Schmitz-Vande-Leur für die Überlassung einiger wichtiger Klonierungen und für die wertvolle Hilfe beim Entwerfen von Klonierungsstrategien.

Christa Gerlach danke ich für den ständigen Nachschub an „frischen Zellen“. Für Hilfe und Anregungen bei der Arbeit am konfokalen Mikroskop bedanke ich mich herzlich bei Michael Vogt, Bernd Giese und Andreas Herrmann.

Ich möchte mich herzlich bei Fred Schaper, Gerhard Müller-Newen und Thomas Clahsen bedanken, die mich bei Computerproblemen während der Erstellung dieser Arbeit tatkräftig unterstützt haben.

Allen Mitarbeitern des Instituts für Biochemie danke ich für die gute Zusammenarbeit und ihre Hilfs- und Diskussionsbereitschaft.

Zuletzt danke ich meinem lieben Freund Stefan für seine Unterstützung und sein Verständnis.

---

# Lebenslauf

## Persönliche Daten:

Silke Metz

20.07.1977 in Aachen geboren

## Schulbildung:

1984 – 1988                      Gemeinschafts-Grundschule II, Baesweiler

1988 – 1997                      Gymnasium der Stadt Baesweiler,  
Abschluss: Abitur (Note: 1,6)

## Studium:

10/1997 – 10/2002              Studium der **Biologie** an der RWTH Aachen

**Forschungspraktikum:**      am Institut für Medizinische Mikrobiologie, Forschungsgebiet  
01/2001 – 03/2001              Virologie der Medizinischen Fakultät der RWTH Aachen

**Diplomarbeit:**                am Institut für Medizinische Mikrobiologie, Forschungsgebiet  
11/2001 – 10/2002              Virologie der Medizinischen Fakultät der RWTH Aachen  
Titel der Arbeit: Untersuchungen zu Signaltransduktions-  
mechanismen bei der Proteinkinase B-getriggerten  
Reaktivierung des Epstein-Barr-Virus

**Wissenschaftliche**              Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Biochemie der  
**Tätigkeit:**                      medizinischen Fakultät der RWTH Aachen

seit 01/2003

**Stipendiatin:**                 Im Rahmen des Graduiertenkollegs „Biointerface – Detektion  
07/2004 – 12/2005              und Steuerung grenzflächeninduzierter biomolekularer und  
zellulärer Funktionen“