

**Analyse von ligandenunabhängiger Assoziation der
IL-6-Typ Zytokinrezeptoren
mit Schwerpunkt auf der gp130-gp80 Interaktion**

Von der Medizinischen Fakultät
der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen
zur Erlangung des akademischen Grades
eines Doktors der Medizin
genehmigte Dissertation

vorgelegt von
Michael Bernhard Sommerauer
aus
Bochum

Berichter: Herr Professor
Dr. rer. nat. Gerhard Müller-Newen

Frau Universitätsprofessorin
Dr. med. Ruth Knüchel-Clarke

Tag der mündlichen Prüfung: 15. Oktober 2010

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Hochschulbibliothek online verfügbar

Veröffentlichungen

Teile der vorliegenden Arbeit wurden veröffentlicht:

Giese B*, Roderburg C*, Sommerauer M, Wortmann SB, Metz S, Heinrich PC, Müller-Newen G, *Dimerization of the cytokine receptors gp130 and LIFR analyzed in single cells.*

J Cell Sci 118, 5129-5140

**both authors contributed equally*

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	I
VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN	V
1 EINLEITUNG	1
1.1 Zytokine	1
1.1.1 Interleukin-6 und Interleukin-6-Typ Zytokine	2
1.1.2 Interleukin-6-Typ Zytokinrezeptoren	3
1.1.2.1 Signaltransduktion der Interleukin-6-Typ Zytokinrezeptoren	4
1.1.2.2 Der IL-6 α -Rezeptor gp80	6
1.1.2.3 Der gemeinsame IL-6-Typ Zytokinrezeptor gp130	7
1.1.2.4 Der Interleukin-6 Rezeptorkomplex	8
1.1.2.5 Der <i>leukemia inhibitory factor</i> Rezeptor	9
1.1.2.6 Der LIF Rezeptorkomplex	10
1.2 Die Analyse von Proteininteraktionen mit Hilfe der konfokalen <i>laser-scanning</i> Mikroskopie	11
1.2.1 Das grüne fluoreszierende Protein (GFP) und seine Derivate.....	11
1.2.2 <i>Fluorescence recovery after photobleaching</i> (FRAP).....	13
1.2.3 <i>Fluorescence resonance energy transfer</i> (FRET)	16
1.2.4 <i>Bimolecular fluorescence complementation</i> (BiFC).....	19
1.3 Zielsetzung der Arbeit.....	21
2 MATERIAL UND METHODEN	22
2.1 Chemikalien, Enzyme und Lösungen	22
2.2 Zytokine und lösliche Rezeptoren.....	22
2.3 Antikörper	22
2.4 DNS	23
2.4.1 Plasmide.....	23
2.4.2 Oligonukleotide.....	27
2.5 Prokaryotische Zellen und deren Kultivierung	28
2.6 Präparation und Analyse von Plasmid-DNS	28
2.6.1 Isolierung von Plasmid-DNS.....	28
2.6.1.1 Präparation von Plasmid-DNS im kleinen Maßstab	28

2.6.1.2 Präparation von Plasmid-DNS im großen Maßstab.....	28
2.6.2 Quantitative Nukleinsäurebestimmung.....	28
2.6.3 DNS-Fällung.....	29
2.6.4 DNS-Restriktionsverdau.....	29
2.6.5 Dephosphorylierung linearisierter DNS.....	29
2.6.6 Gelelektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren.....	30
2.6.6.1 TAE-Agarose-Gelelektrophorese.....	30
2.6.6.2 Isolierung von DNS Fragmenten aus Agarose-Gelen.....	30
2.6.7 Ligation von DNS.....	30
2.6.8 Transformation von Bakterien.....	31
2.6.8.1 Herstellung kompetenter Bakterien.....	31
2.6.8.2. Transformation kompetenter Bakterien.....	31
2.6.9 Automatische DNS-Sequenzierung.....	31
2.6.10 PCR-Reaktion.....	32
2.6.11 Kolonie-PCR.....	33
2.7 Eukaryotische Zelllinien und deren Kultivierung.....	34
2.7.1 Permanente Zelllinien.....	34
2.7.2 Nährmedien und Lösungen für die Zellkultur.....	34
2.8 Expression von Proteinen in eukaryotischen Zellen.....	35
2.8.1 Transfektion von Hek293T-Zellen.....	35
2.8.2 Stimulation von Hek293T-Zellen mit IL-6, IL-6/sgp80 oder LIF.....	35
2.8.3 Kultivierung von Zellen für die BiFC-Experimente.....	35
2.9 Methoden mit Zellyse.....	36
2.9.1 Herstellung von Zellysaten.....	36
2.9.2 Immun- bzw. Koimmunpräzipitation von Proteinen.....	36
2.9.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese.....	37
2.9.4 Western blotting.....	38
2.9.5 ECL-Immundetektion.....	39
2.9.6 Blaue native Polyacrylamid-Gelelektrophorese (BN-PAGE) und Fluoreszenz Detektion mit dem Fluoreszenzscanner Typhoon.....	39
2.9.7 Vernetzung von Proteinen mit dem <i>crosslinker</i> BS ³	40
2.10 Methoden ohne Zellyse.....	41
2.10.1 BiFC Fluoreszenz Messung mittels FACS.....	41
2.10.2 Konfokale Mikroskopie.....	41
2.10.2.1 Herstellung einer Paraformaldehydlösung.....	41

2.10.2.2 Beschichtung der Deckgläschen	42
2.10.2.3 Paraformaldehydfixierung eukaryotischer Zellen	42
2.10.2.4 Konfokale Bildaufnahme	43
2.10.2.5 Konfokale Mikroskopie lebender Zellen.....	44
2.10.2.6 FRAP-Messungen	44
2.10.2.7 FRET-Messungen	45
2.11 Statistik	48
2.11.1 Prüfung der Signifikanz der BiFC Experimente	48
2.11.2 Prüfung der Signifikanz der FRET Experimente 3.2.6.1	48
2.11.3 Prüfung der Signifikanz der FRET Experimente 3.2.6.2	49
2.11.4 Standardabweichung.....	49
<u>3 ERGEBNISSE.....</u>	<u>50</u>
3.1 Untersuchungen an Zelllysaten	50
3.1.1 Koimmunpräzipitation von gp130 und gp80	50
3.1.2. BN-PAGE Untersuchungen des IL-6 Rezeptorkomplexes.....	52
3.1.3 Vernetzung von gp130 durch den <i>crosslinker</i> BS ³	54
3.2 Experimente an Zellen mit intakter Zellmembran	57
3.2.1 Untersuchungen an gp130 Rezeptorkomplexen mittels BiFC	57
3.2.2 BiFC Untersuchungen mit gp130 und gp80.....	57
3.2.3 BiFC Untersuchungen mit gp130 und weiteren Rezeptoren.....	60
3.2.4 Rezeptorkonstrukte für FRAP- und FRET-Messungen.....	61
3.2.5 FRAP Untersuchungen von gp80 Mutanten in Gegenwart von immobilisiertem gp130	67
3.2.6 FRET Analyse des IL-6 Rezeptorkomplex.....	71
3.2.6.1 FRET Untersuchungen an gp130 und gp80.....	71
3.2.6.2 Bestimmung des gp130-gp80 Verhältnis im IL-6 Rezeptorkomplex mittels FRET	75
<u>4 DISKUSSION.....</u>	<u>80</u>
4.1 Assoziationszustand von gp130 und seinen Korezeptoren LIFR und gp80.....	81
4.2 Lokalisation der Präassoziation zwischen gp130 und gp80.....	83
4.3 Stöchiometrie des gp130-gp80 Komplexes	85
<u>5 ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE</u>	<u>86</u>
<u>6 LITERATURVERZEICHNIS.....</u>	<u>88</u>

7 DANKSAGUNG.....	95
8 ERKLÄRUNG § 5 ABS. 1 ZUR DATENAUFBEWAHRUNG	96
9 LEBENSLAUF	97

Verzeichnis der Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ATP	Adenosintri-phosphat
BiFC	<i>bimolecular fluorescence complementation</i>
BN-PAGE	blaue native Polyacrylamid Gelelektrophorese
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
bzw.	beziehungsweise
CBM	<i>cytokine binding module</i>
cDNS	<i>complementary DNS</i>
CFP	<i>cyan fluorescent protein</i>
CLC	<i>cardiotrophin-like cytokine</i>
CNTF	<i>ciliary neurotrophic factor</i>
CT-1	Cardiotrophin-1
D	Domäne
d.h.	das heißt
dATP	Desoxyadenosintri-phosphat
dCTP	Desoxycytidintri-phosphat
dGTP	Desoxyguanosintri-phosphat
DMEM	<i>Dulbeccos modified eagle medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtri-phosphat
dTTP	Desoxythymidintri-phosphat
e	<i>enhanced</i>
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
E _f	FRET-Effizienz
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
EPO	Erythropoetin
FKS	fötales Kälberserum
fl	<i>full length</i>
FN	Fibronektin
FRAP	<i>fluorescence recovery after photobleaching</i>

FRET	<i>fluorescence resonance energy transfer</i>
GFP	grün fluoreszierendes Protein (<i>green fluorescent protein</i>)
GH	<i>growth hormone</i>
Gl.	Gleichung
gp	Glykoprotein
HGF	<i>hepatocyte growth factor</i>
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
id	Internalisierungs-defizient
IFN- γ	Interferon- γ
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
NA	Numerische Apertur
NP	Neuropoetin
OD	optische Dichte
OSM	Oncostatin M
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PDGF	<i>platelet derived growth factor</i>
PMT	<i>photo multiplier tube</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
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>
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TNF- α	<i>tumor necrosis factor-α</i>

Tris	Trishydroxymethylaminoethan
U	<i>unit</i>
UV	ultraviolett
vgl.	vergleiche
WB	Western <i>blotting</i>
YFP	<i>yellow fluorescent protein</i>
z.B.	zum Beispiel

1 Einleitung

1.1 Zytokine

Innerhalb eines mehrzelligen Organismus ist es von lebenswichtiger Bedeutung, dass die Zellen miteinander kommunizieren können. Dies ist über kurze Strecken durch direkte Zell-Zell Kontakte möglich. Für höhere Organisationsformen hat sich die Kommunikation über Botenstoffe durchgesetzt. Das in dieser Richtung am weitesten differenzierte System beim Menschen stellt wohl das endokrine System dar. Die in den endokrinen Drüsen gebildeten Botenstoffe, die klassischen Hormone, werden über den Blutkreislauf auf den gesamten Organismus verteilt. Zytokine dagegen werden von verschiedensten Zelltypen in nahezu allen Geweben gebildet. Sie entfalten ihre Wirkung meist auf benachbarte Zellen (parakrin), auf die Ausgangszelle (autokrin) und eher seltener auf weit entfernte Zellen. Bei Zytokinen handelt es sich um meist lösliche Glykoproteine, die von ihren Ausgangszellen sezerniert werden, es sind aber auch membranständige und intrazellulär aktive Varianten bekannt. Sie werden typischerweise durch äußere Stimuli von den Zellen *de novo* synthetisiert. An ihren Zielzellen binden sie an spezifischen Membranrezeptoren und nehmen dadurch mittels posttranslationaler Modifikation von Proteinen und Veränderung der Genexpression Einfluss auf die Zelle. Dabei kann ein Zytokin auf unterschiedliche Zellen wirken, was als Pleiotropie bezeichnet wird. Gleichzeitig können aber auch verschiedene Zytokine an einer Zelle die gleiche Wirkung zeigen, was Redundanz genannt wird. Zytokine sind vor allem an Prozessen der Hämatopoese, der Entzündung, der Tumorentstehung und der Embryogenese beteiligt [1].

Aufgrund der oft vielgestaltigen biologischen Effekte und der Überschneidung der Wirkungen einzelner Zytokine ist eine Klassifizierung nach der Struktur der Zytokine eindeutiger als nach ihrer Wirkung [1, 2]. Man unterscheidet vier strukturelle Klassen:

1. Zytokine, die über eine 4 α -Helixbündel-Struktur verfügen. Diese Gruppe wird weiter unterteilt in Zytokine mit langen und kurzen Helices. Lange Helices haben die IL-6 Typ Zytokine, Vertreter mit kurzen Helices sind Interleukin-2 (IL-2) und Interferon- γ (IFN- γ).
2. Zytokine, deren Struktur aus antiparallelen β -Faltblättern besteht. Dazu gehören der *tumor necrosis factor- α* (TNF- α) und Interleukin-1 (IL-1).
3. Zytokine, die mindestens zwei antiparallele β -Faltblätter und ein C-terminales α -

helicales Segment besitzen wie der *epidermal growth factor* (EGF).

4. Zytokine, die nicht zu den ersten drei Gruppen gehören und eine Mosaikstruktur aufweisen. Ein Vertreter ist der *hepatocyte growth factor* (HGF).

1.1.1 Interleukin-6 und Interleukin-6-Typ Zytokine

Da in dieser Arbeit die IL-6-Typ Zytokine und ihre Rezeptoren im Mittelpunkt stehen, werden diese eingehender vorgestellt. Zu der Familie dieser Zytokine gehören insgesamt neun Polypeptide zwischen 20 und 45 kDa. Ihre gemeinsame Eigenschaft ist, dass sie gp130 als Rezeptoruntereinheit benutzen [3, 4]. Namentlich sind es Interleukin-6 (IL-6), Interleukin-11 (IL-11), *leukemia inhibitory factor* (LIF), Onkostatin M (OSM), *ciliary neurotrophic factor* (CNTF) [5], *cardiotrophin-1* (CT-1) [6], Interleukin-27 (IL-27) [7], Neuropoetin (NP) [8] und *cardiotrophin-like cytokine* (CLC) [9, 10].

Die oben beschriebene 4 lange- α -Helixbündel-Struktur wurde bei einem Teil der IL-6-Typ Zytokine durch die Kristallstruktur nachgewiesen [11-14].

Interleukin-6 besteht aus 184 Aminosäuren und besitzt eine Masse von 24 kD. Es wird sowohl N- wie O-glykosyliert, wodurch seine biologische Aktivität gesteigert wird [15]. Weiterhin enthält IL-6 vier Cysteinreste, von denen zwei für die Aufrechterhaltung der Tertiärstruktur und Aktivität entscheidend sind [16]. 1997 wurde die räumliche Struktur des IL-6 gelöst [14, 17] und durch weitergehende Mutagenesestudien konnten drei Rezeptorbindungsstellen (*sites*) nachgewiesen werden [18]. IL-6 bindet mit *site I* an gp80 und mit den *sites II* und *III* an gp130 (s. Abb. 1) [19]. Die vier Helices sind so angeordnet, dass die Helices A und B in dieselbe Richtung und die Helices C und D in die gegensätzliche Richtung verlaufen.

Bei einer Vielzahl von Krankheiten des menschlichen Organismus spielt IL-6 eine wichtige Rolle. Sowohl bei der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen wie der rheumatoiden Arthritis [20, 21], als auch bei Diabetes Mellitus Typ II [22], bei Osteoporose [23] und bei durch Stress ausgelösten Erkrankungen lässt sich ein Zusammenhang mit dem IL-6-System herstellen [24]. Sowohl für das Multiple Myelom [25], das Hepatozelluläre Karzinom [26] und für das Glioblastom [27] ist eine Beziehung zu IL-6 gesichert. Erhöhte IL-6 Serumkonzentrationen sind sowohl ein kardio- als auch zerebrovaskulärer Risikofaktor [28-31].

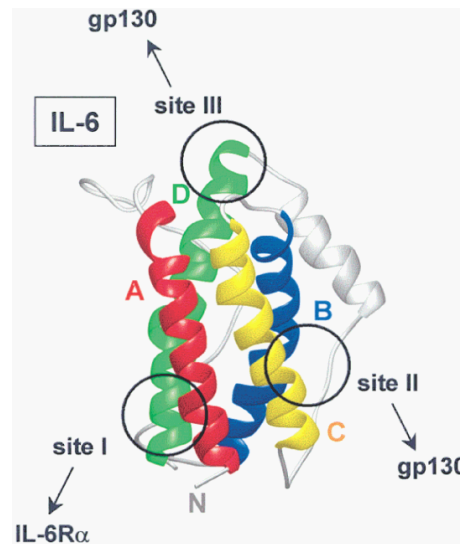


Abbildung 1: Räumliche Struktur von IL-6 mit Rezeptorbindungsstellen [6]

Details siehe Text

1.1.2 Interleukin-6-Typ Zytokinrezeptoren

Die Rezeptoren der IL-6-Typ Zytokine gehören zu der Gruppe der hämatopoetischen Zytokinrezeptoren. Diese zeichnen sich durch das sogenannte Zytokin-bindende Modul aus (*cytokine binding module*, CBM) [32]. Dieses besteht aus zwei Fibronectin Typ-III ähnlichen Domänen. Dabei enthält die N-terminale Domäne vier konservierte Cysteinreste und die C-terminale Domäne ein WSXWS-Motiv [33]. Weitere Vertreter der hämatopoetischen Zytokinrezeptoren sind unter anderem die Rezeptoren des *growth hormone* (GH), Erythropoetin (Epo), *granulocyte colony-stimulating factor* (G-CSF), Interleukin-3 (IL-3) und Interleukin-2 (IL-2). IL-6-Typ Zytokine sind ferner dadurch definiert, dass gp130 innerhalb des Rezeptorkomplexes enthalten ist, wodurch die weiter oben angesprochene Redundanz der Wirkung erklärt werden kann. Gp130 ist in diesen Komplexen entweder als Homodimer (IL-6 und IL-11) oder in einem Heterodimer mit einem weiteren signalisierungskompetenten Rezeptor vertreten. Durch die zusätzliche Rekrutierung spezifischer Rezeptorketten können die Unterschiede in ihrer Wirkung erklärt werden. Den signalisierungskompetenten Rezeptoren gemeinsam ist außerdem, dass sie über keine intrinsische Kinaseaktivität verfügen, sondern zytoplasmatische Kinasen vom Janus-Typ gebunden haben.

Alle IL-6-Typ Zytokinrezeptoren sind Klasse I Membranrezeptoren mit Ausnahme des CNTF-Rezeptors, der einen Glykosylphosphatidylinositol-Anker besitzt. Dies bedeutet, dass sie aus einem N-terminalen Extrazellulär-, einem Transmembran- und einem C-

terminalen zytoplasmatischen Teil bestehen und die Transmembrandomäne nur einmal die Plasmamembran durchzieht. Daher müssen immer mindestens zwei Rezeptoren an einem signalkompetenten Rezeptorkomplex beteiligt sein, denn nur so kann sich eine extrazelluläre Veränderung zytoplasmatisch als räumliche Veränderung der Rezeptoren zueinander widerspiegeln. Bei einem Teil der Rezeptorkomplexe sind signalinkompetente α -Rezeptoren beteiligt, die nur einen kurzen zytoplasmatischen Teil aufweisen (s. Abb. 2).

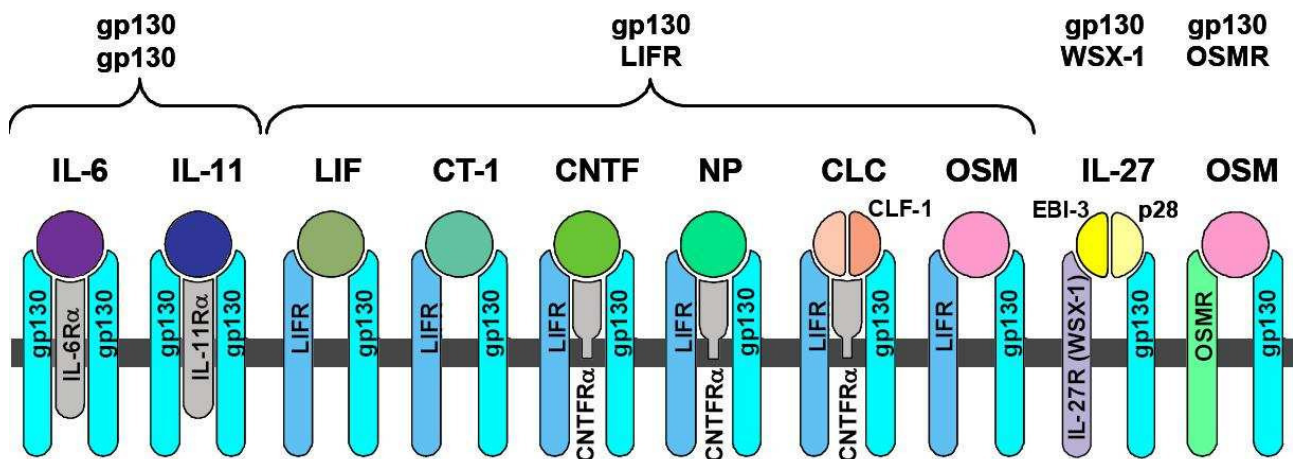


Abbildung 2: Schematische Darstellung der IL-6-Typ Zytokinrezeptoren

IL-6-Typ Zytokine signalisieren über Rezeptorkomplexe, an denen immer gp130 beteiligt ist und wahlweise der LIFR, WSX-1 oder der OSMR. Nicht signalisierungskompetente Rezeptoren sind grau dargestellt. Modifiziert nach [6].

1.1.2.1 Signaltransduktion der Interleukin-6-Typ Zytokinrezeptoren

Nach Aktivierung des Rezeptorkomplexes durch sein spezifisches Zytokin erfolgt die Autophosphorylierung der Januskinasen und damit deren Aktivierung. Die aktivierten Januskinasen phosphorylieren Tyrosinreste im zytoplasmatischen Teil der Rezeptoren. Die Phosphotyrosine dienen dann als Bindungsstellen für die Transkriptionsfaktoren der STAT Familie (*signal transducer and activator of transcription*). Die STATs werden von den Januskinasen ebenfalls phosphoryliert und dadurch aktiviert. Im nächsten Schritt lösen sie sich vom Rezeptor und translozieren als Dimere in den Zellkern. Dort führen sie zusammen mit weiteren Faktoren zur Transkription von Zytokin-responsiven Genen.

IL-6 Typ Zytokine aktivieren auch den Ras-Raf-MAP-Kinase Signalweg. Dabei wird über Adaptorproteine das membrangebundene G-Protein Ras aktiviert. Dies führt zur Aktivierung und Phosphorylierung einer Kinaskaskade an deren Ende die MAP-Kinase (MAPK) steht. Die MAPK aktiviert schließlich Transkriptionsfaktoren. Abbildung 3 zeigt schematisch die Signaltransduktion am Beispiel des IL-6-Rezeptors.

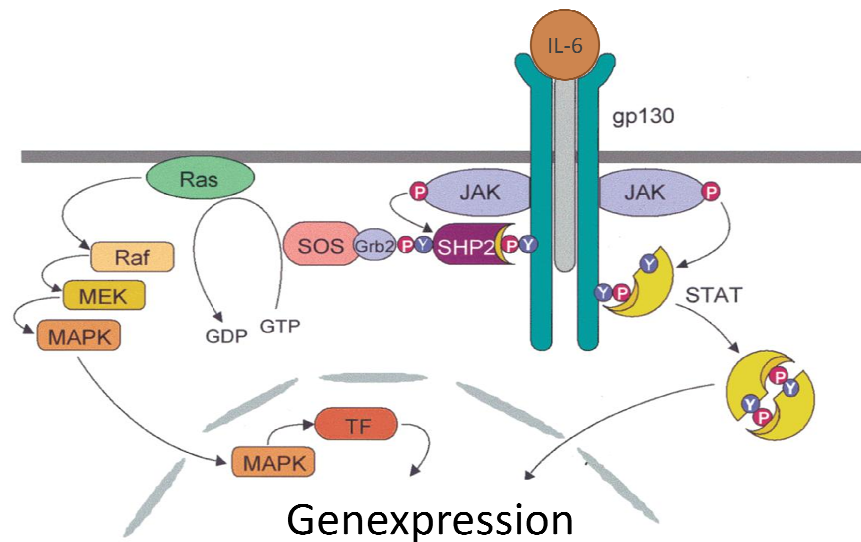


Abbildung 3: Schematische Darstellung der IL-6 Signaltransduktion

Durch Aktivierung des IL-6 Rezeptorkomplexes werden die Januskinasen phosphoryliert, welche dann zur Aktivierung der STAT (rechts dargestellt) und des Ras-Raf-MAP-Kinase Weges (links dargestellt) führen. Als Adaptorprotein ist unter anderem die Tyrosinphosphatase SHP 2 beteiligt. Modifiziert nach [6].

Als Beginn der Aktivierung der hämatopoetischen Rezeptorkomplexe galt bisher die Vermutung, dass durch das entsprechende Zytokin eine Assemblierung der einzelnen Rezeptoren hervorgerufen wird. Dabei bindet das Zytokin zuerst an einen Rezeptor des Komplexes und durch zufälliges, diffusionsgetriebenes Treffen mit dem weiteren Rezeptor auf der Membran kommt es zur Ausbildung des Komplexes. Durch die dadurch hervorgerufene Nähe der zytoplasmatischen Teile der Rezeptoren beginnt dann die Signaltransduktion mit Phosphorylierung der Januskinasen. Es mehren sich aber die Anhaltspunkte, dass diese Theorie gegen eine neue ersetzt werden sollte, bei der die einzelnen Rezeptoren schon präassoziiert vorliegen und die Aktivierung durch das Zytokin lediglich in einer Konformationsänderung und Stabilisierung der bereits vollständig ausgebildeten Rezeptorkomplexe besteht. Dadurch wäre die Initiation der Signaltransduktion kinetisch gesehen deutlich vereinfacht.

Hinweise für die neue Theorie gibt es innerhalb der hämatopoetischen Rezeptorfamilie

bereits für den GH-Rezeptor, für den unter anderem gezeigt werden konnte, dass er bereits im endoplasmatischen Retikulum als Dimer vorliegt [34-36]. Auch für den IL-2 Rezeptor konnte mittels FRET eine Präassoziation der Untereinheiten nachgewiesen werden [37]. Der Rezeptor des Erythropoetin (Epo) kristallisierte in der Abwesenheit seines Liganden als Dimer [38]. Weiterhin konnten sowohl für den GH-Rezeptor und den Epo-Rezeptor gezeigt werden, dass eine bloße räumliche Nähe der zytoplasmatischen Januskinasen für eine Aktivierung nicht ausreichend ist, sondern eine bestimmte räumliche Konfiguration notwendig ist [34, 39, 40].

Innerhalb der IL-6-Typ Zytokinrezeptoren ist bei der Möglichkeit der Präassoziation einzelner Rezeptoren zu berücksichtigen, dass gp130 in verschiedenen Komplexen mit unterschiedlichen Partnern vertreten ist, wodurch flexiblere Bindungsverhältnisse erforderlich sind. Aber auch hier gibt es Hinweise, dass gp80 des IL-6-Rezeptors ligandenunabhängig dimerisieren kann [41]. Weiterhin ist bekannt, dass für die Aktivierung von gp130 eine ganz bestimmte Konformation der zytoplasmatischen Bereiche zueinander entscheidend ist und nicht nur die bloße Nähe [42].

1.1.2.2 Der IL-6 α -Rezeptor gp80

Das *glycoprotein* 80 (gp80) ist der nicht signalisierungskompetente α Rezeptor (Synonym: IL-6R α) des IL-6 Rezeptorkomplexes. Es besteht aus 468 Aminosäuren und hat eine Masse von 80 kD [43]. Drei der vier potentiellen N-Glykosilierungsstellen werden genutzt [44]. Der Rezeptor besteht extrazellulär aus drei Domänen. Der N-terminalen Ig-ähnlichen Domäne schließt sich ein CBM an (s. Abb. 4) [45]. Zwischen diesen drei Domänen und der Transmembrandomäne befindet sich die *stalk* Region, die nicht weiter strukturiert ist. Der zytoplasmatische Teil des gp80 ist relativ kurz und ist weder in der Signaltransduktion noch bei der Rezeptorinternalisierung beteiligt [46]. Dieser Teil scheint lediglich bei der Ausrichtung des Rezeptors in polarisierten Zellen eine Rolle zu spielen [47].

Lösliche Formen des gp80 können zum einen an der Plasmamembran durch Metalloproteasen mittels limitierte Proteolyse (*shedding*) oder durch alternatives Spleißen der mRNA entstehen [48, 49]. Das so entstandene lösliche gp80 (sgp80) kann agonistisch auf Zellen wirken, die lediglich gp130 auf ihrer Plasmamembran exprimieren und die mit IL-6 und dem sgp80 stimuliert werden. Dadurch wird die biologische Reichweite von IL-6 enorm vergrößert, da gp130 ubiquitär exprimiert wird, gp80 dagegen nur von wenigen Zelltypen. Dieser Effekt ist als pathologischer Faktor für mehrere Krankheiten beschrieben worden, wie der juvenilen Arthritis, dem Multiplem Myelom und dem Prostatakarzinom

[50].

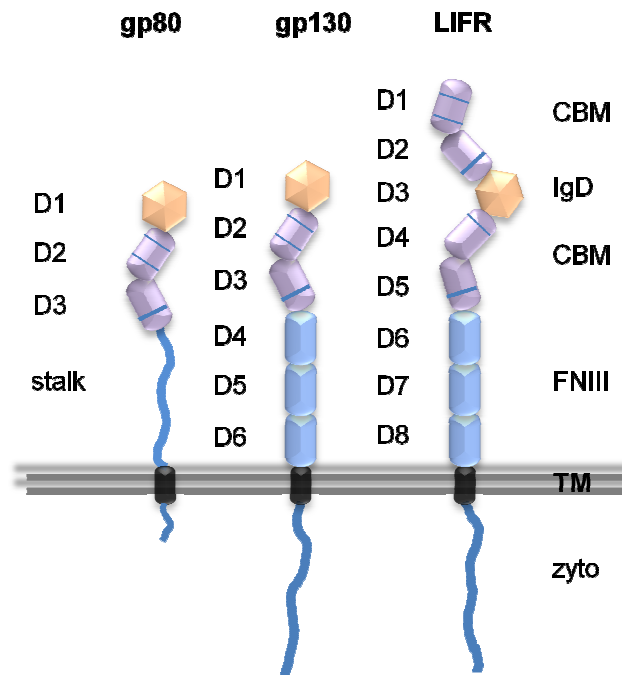


Abbildung 4: Domänenstruktur von gp80, gp130 und LIFR

Innerhalb des CBM (cytokine binding module) ist eine Cysteinbrücke mit einer dünnen Linie und ein WSXWS-Motiv mit einer dicken Linie markiert. IgD = Immunglobulin ähnliche Domäne, FNIII = Fibronectin-Typ-III Domäne, TM = Transmembrandomäne, zyto = zytoplasmatischer Teil

1.1.2.3 Der gemeinsame IL-6-Typ Zytokinrezeptor gp130

Das *glycoprotein* 130 (gp130) ist der signalisierungs-kompetente Rezeptor aller IL-6-Typ Zytokine. Es besteht aus 918 Aminosäuren und hat eine Masse von 130 kD. Es besitzt insgesamt elf potentielle N-Glykosylierungsstellen, von denen neun genutzt werden [44], wodurch zum einen die Stabilität des Rezeptors und zum anderen die Bindungsaffinität gewährleistet wird [51]. Sein Extrazellulärteil besteht aus sechs Domänen (s. Abb. 4). N-terminal befindet sich eine Immunglobulin ähnliche Domäne, gefolgt von einem *cytokine binding module* (CBM) mit den typischen Aminosäuremotiven. Domänen D4 bis D6 sind Fibronectin Typ-III (FNIII) Domänen. Die Domänen D1 bis D3 konnten bereits im Komplex mit IL-6 und sgp80 kristallographisch dargestellt werden [19]. Weiterhin konnte der komplette Extrazellulärteil des gp130 mittels Einzelprotein Elektronenmikroskopie im Komplex mit IL-6 und sgp80 beschrieben werden [52]. Ist der extrazelluläre Anteil des gp130 klar strukturiert, so ist der zytoplasmatische Teil nach aktuellem Kenntnisstand deutlich unstrukturierter [53]. Die *box1/box2* Region, die innerhalb der ersten 61 zytoplasmatischen Aminosäuren liegt [54], ist für die Bindung der Januskinasen essentiell und innerhalb der signalisierungs-kompetenten Zytokinrezeptoren hoch konserviert [55]. C-

terminal dieser Region befinden sich noch sechs Tyrosinreste und zehn Serin/Threoninmotive, die potentiell phosphoryliert werden können und in der Signaltransduktion von entscheidender Bedeutung sind. Für die Internalisierung des Rezeptors ausschlaggebend ist ein Dileucin-Motiv [56]. Wird der Rezeptor zytoplasmatisch vor diesem Motiv verkürzt, ist das entstandene Konstrukt internalisierungsdefizient und reichert sich an der Plasmamembran an.

1.1.2.4 Der Interleukin-6 Rezeptorkomplex

Wie weiter oben beschrieben besitzt IL-6 drei Rezeptor-Bindungssepitope. Die Bindung von *site* I an das CBM von gp80 markiert dabei den ersten Schritt der Rezeptoraktivierung. Die Reihenfolge, mit der sich der weitere Komplex unter IL-6 Stimulation bildet, ist noch nicht abschließend geklärt. Nach Pflanz *et al.* bindet zuerst ein IL-6 mit *site* I an gp80, dann mit *site* III an die Domäne D1 des gp130 (trimerer Komplex) und anschließend wird ein zweites gp130 über *site* II rekrutiert, so dass ein signalkompetenter tetramerer Komplex entsteht [57].

Boulanger *et al.* dagegen favorisieren einen hexameren Komplex des Rezeptors. Durch die Bindung von *site* I an gp80 werden *site* II und III erst komplettiert: beide bestehen zu einem Teil aus Bereichen des IL-6 und zum anderen aus Bereichen des gp80. *Site* IIa beschreibt das Bindungssepitop, welches zwischen IL-6 und der CBM von gp130 liegt, *site* IIb ist das Epitop zwischen den Domänen D3 von gp130 und D3 von gp80. Innerhalb der *site* IIIa entsteht eine Bindung von IL-6 zu der Domäne D1 des gp130, *site* IIIb bildet sich zwischen dieser Domäne D1 und der Domäne D2 des gp80 aus (s. Abb. 5). In der Aktivierungskaskade bedeutet dies, dass sich zuerst zwei IL-6 – gp80 – gp130 Komplexe über die Bindungen an *site* I und *site* II ausbilden (zwei Trimere), die sich dann zu einem Hexamer zusammenlagern [19]. Weiterhin konnte diese Arbeitsgruppe über Einzelprotein Elektronenmikroskopie den Komplex mit allen Extrazellulärdomänen des gp130, den Domänen D2 bis D3 von gp80 und zwei IL-6 darstellen. Es konnte gezeigt werden, dass durch die Bindung von IL-6 die membranproximalen Domänen des gp130 innerhalb des hexameren Komplexes nah beieinander liegen [52].

Einen Versuch beide Theorien zusammenzuführen stellt die Arbeit von Schroers *et al.* dar, in der sich verschiedene Komplexe abhängig von der IL-6 Konzentration ausbilden können: bei geringer Konzentration bildet sich demnach ein Tetramer aus, bei hohen dagegen ein Hexamer [58].

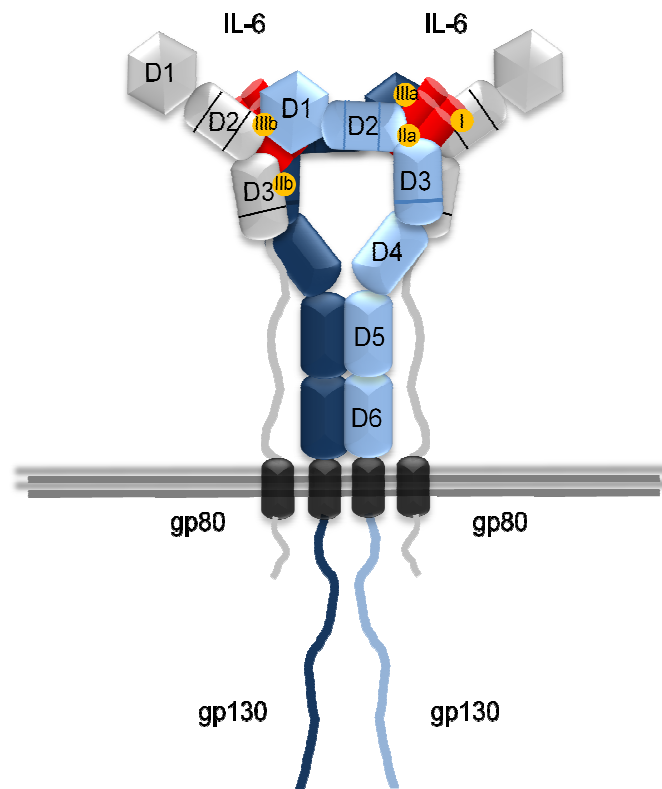


Abbildung 5: Der hexamere IL-6 Rezeptorkomplex

Die Bindungs epitope (sites) sind gelb hervorgehoben und mit römischen Ziffern gekennzeichnet, nach Boulanger et al. [19], weitere Einzelheiten siehe Text.

Allen Annahmen ist gemeinsam, dass sie immer von einem mehrstufigen Prozess ausgehen, dessen treibende Kraft die Diffusion darstellt. Durch eine Präformierung der benötigten Rezeptoren würde dieser vom Zufall gesteuerte Prozess umgangen.

1.1.2.5 Der leukemia inhibitory factor Rezeptor

Der leukemia inhibitory factor Rezeptor (LIFR) ist beteiligt an den Rezeptorkomplexen für die Zytokine LIF, CT-1, CNTF, CLC, NP und OSM (s. Abb. 2). Er besteht aus 1053 Aminosäuren und hat eine molekulare Masse von 190 kD. Extrazellulär besteht der LIFR aus acht Domänen. Er besitzt zwei CBM, die durch eine Immunglobulin ähnliche Domäne (D3) voneinander getrennt sind. Das CBM aus Domäne D4 und D5 besitzt in Domäne D4 dabei nur eine Cysteinbrücke [59]. Die membranproximalen Domänen D6 bis D8 sind wie bei gp130 Fibronectin Typ-III Domänen. Der LIFR verfügt über 19 potentielle N-Glykosylierungsstellen. Skiniotis et al. gelang 2008 die Kristallisation der Domänen D1 bis D5, die sich räumlich ähnlich einem „V“ darstellen (s. Abb. 4) [53]. Zytoplasmatisch besitzt der LIFR eine *box1* und eine *box2*, mit denen er in der Lage ist, Januskinasen zu binden und er ist somit wie gp130 signalisierungskompetent. Ebenso besitzt der LIFR mehrere

zytoplasmatische Tyrosinreste, die phosphoryliert werden können und an denen dann STATs und der MAP-Kinase Weg aktiviert werden [60].

1.1.2.6 Der LIF Rezeptorkomplex

Der LIF-Rezeptorkomplex ist ein trimere Komplex aus LIF, gp130 und dem LIFR. LIF besitzt im Gegensatz zu IL-6 lediglich zwei, statt drei, Bindungsepitope. Mit *Site II* bindet LIF an der Ig-ähnliche Domäne (D3) des LIFR. Mit *site III* bindet es an das CBM des gp130 [61-63]. Die Kristallstruktur des Komplexes von LIF und der CBM des gp130 konnte bereits gelöst werden. Weiterhin konnte ebenfalls die Struktur von gp130 mit dem LIFR und CNTF und seinem α Rezeptor (CNTF-R α) dargestellt werden [53, 63]. Auch die Struktur von murinem LIF gebunden an den humanen LIFR ist ebenfalls gelöst [64]. Anhand dieser Ergebnisse ist es möglich ein Schema für den trimere Komplex zu erstellen (s. Abb. 6).

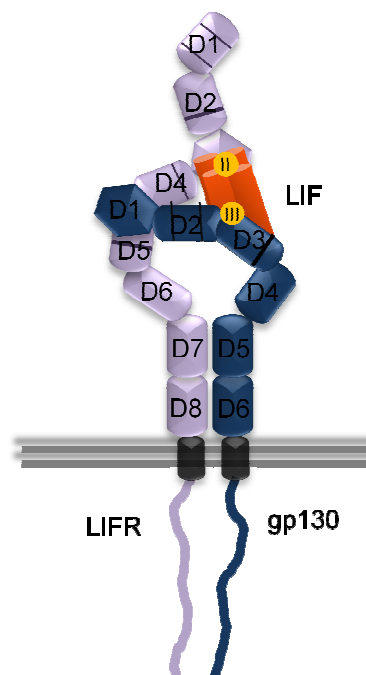


Abbildung 6: Der trimere LIF Rezeptorkomplex

Die Bindungsepitope (*sites*) sind gelb hervorgehoben und mit römischen Ziffern gekennzeichnet, nach [63, 64], weitere Einzelheiten siehe Text.

Die Reihenfolge in der Entstehung des Komplexes ist dabei beliebig, da es kein zusammengesetztes Bindungsepitop aus Zytokin plus Rezeptor wie im IL-6-Rezeptor gibt. Die Bindung von LIF an den LIFR erhöht somit nicht die Affinität zu gp130 und umgekehrt [63].

1.2 Die Analyse von Proteininteraktionen mit Hilfe der konfokalen laser-scanning Mikroskopie

Ein Großteil der Ergebnisse dieser Arbeit entstand mit Hilfe der konfokalen *laser-scanning* Mikroskopie. Der Unterschied eines konventionellem Mikroskops zu einem konfokalen Mikroskop besteht im Besonderen in der konfokalen Blende (*pinhole*). Durch das Einfügen einer Lochblende in der Größenordnung von wenigen hundert Mikrometern in den Strahlengang wird sowohl Streulicht wie auch Licht außerhalb der Fokusebene ausgeschlossen. Somit ist es möglich Aufnahmen von einer wenige Mikrometer feinen Schicht aus dem Objekt zu machen, die zudem ein hohes Maß an Kontrast aufweisen. Weiterhin kommen bei der konfokalen *laser-scanning* Mikroskopie Fluorophore mit unterschiedlichen Anregungs- und Emissionseigenschaften zum Einsatz. In dieser Arbeit wurden ausschließlich Derivate des von Shimomura *et al.* in der Qualle *Aequorea victoria* 1962 entdeckten grün fluoreszierenden Proteins (GFP) benutzt [65]. Durch die Anregung der Probe mittels monochromatischen Laserlichtes und die Filterung des emittierten Fluoreszenzlichtes ist es weiterhin möglich, selektiv Fluorophore darzustellen und innerhalb einer Zelle unterschiedliche Fluorophore zu unterscheiden. Die zu untersuchenden Proteine werden mit Derivaten des GFP auf DNA-Ebene fusioniert, nach Transfektion der Konstrukte von den Zellen exprimiert und schließlich mittels der konfokalen Mikroskopie innerhalb der Zelle detektiert. Die konfokale *laser-scanning* Mikroskopie ermöglicht dank ihrer hohen Auflösung die genaue Darstellung der subzellulären Verteilung der einzelnen Proteine. Durch den Einsatz von weiteren Techniken ist es aber auch möglich, über das bloße Bild hinauszugehen und Proteindiffusion und Proteininteraktionen nachzuweisen.

Im Folgenden wird das grün fluoreszierende Protein (GFP) vorgestellt und die drei in dieser Arbeit verwendeten Spezialtechniken der konfokalen *laser-scanning* Mikroskopie: FRAP (*fluorescence recovery after photobleaching*), FRET (*fluorescence resonance energy transfer*) und BiFC (*bimolecular fluorescence complementation*).

1.2.1 Das grüne fluoreszierende Protein (GFP) und seine Derivate

Von der Entdeckung des GFP 1962 durch Shimomura *et al.* [65] bis zur erstmaligen Klonierung durch Prasher *et al.* 1992 [66] vergingen 30 Jahre. Die Kristallstruktur wurde 1996 von Yang *et al.* [67] gelöst. Das GFP Molekül besteht aus 238 Aminosäuren, die 11 β -*strands* ausbilden, welche sich als β -Faltblattstruktur fassförmig um das zentral

gelegene Fluorophor gruppieren, was dieser Struktur auch den Namen " *β -barrel*" einbrachte (s. Abb. 7).

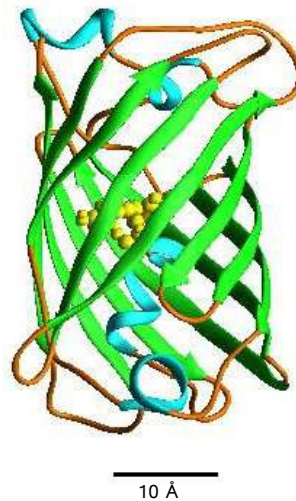


Abbildung 7: Die Struktur des GFP

Das grün fluoreszierende Protein (GFP) besteht aus 11 β -strands (grün), die sich in Form eines Fasses anordnen, über eine α -Helix (blau) ragt das Fluorophor (gelb) ins Innere des Proteins [67].

Das eigentliche Fluorophor wird aus der Tripeptidsequenz Ser65-Tyr66-Gly67 gebildet. Über eine α -Helix mit dem Zylinder verbunden ragt das Fluorophor ins Innere des Zylinders. Durch weitere Strukturelemente wird die Ober- und Unterseite des Fasses weitestgehend geschlossen, somit ist das Fluorophor vor Umgebungseinflüssen geschützt. Auch nach Denaturierung durch Hitze, extreme pH Werte und chemische Agenzien reorganisiert sich das Protein spontan und die Fluoreszenz ist wieder hergestellt [68]. Diese Reorganisationsfähigkeit wird auch in der weiter unten beschriebenen BiFC Technik genutzt.

Seit der Klonierung des GFP gab es große Bestrebungen durch Mutationen im Protein die Fluoreszenzeigenschaften zu modifizieren und zu verbessern. Dadurch entstanden die heute sehr gebräuchlichen Derivate eGFP, eCFP und eYFP, die sich unter anderem durch verbesserte Fotostabilität und veränderte Fluoreszenzspektren auszeichnen. Dabei steht "e" für *enhanced*, was die erhöhte Photonenausbeute beschreibt, also die Fähigkeit, die Lichtanregung in Fluoreszenz umzuwandeln. Tabelle 1 gibt die Eigenschaften, der in dieser Arbeit verwendeten fluoreszierenden Proteine wieder. Im Folgenden wird zur besseren Lesbarkeit die Abkürzungen GFP, CFP und YFP benutzt, wobei damit die *enhanced* fluoreszierenden Proteine gemeint sind.

Tabelle 1: Ausgewählte Eigenschaften der GFP Derivate, die in dieser Arbeit verwendet wurden

nach Tsien et al. (1998) [69].

Name	Mutationen gegenüber GFP	Maximum des Anregungsspektrums	Maximum des Emissionsspektrums
YFP	S65G, V68L, S72A, T203Y	514 nm	527 nm
CFP	N146I, M153T, V163A	452 nm	505 nm

1.2.2 Fluorescence recovery after photobleaching (FRAP)

Mittels der FRAP Technik ist es möglich, die Diffusion von fluoreszenzmarkierten Proteinen in lebenden Zellen zu untersuchen. Das zu untersuchende Protein wird hierzu mit dem GFP oder einem seiner Derivate gekoppelt. Dabei macht man sich zu Nutze, dass die Fluorophore durch Bestrahlung mit hohen Lichtintensitäten irreversibel geblichen werden können. Es wird in einer *region of interest*, kurz das ROI, das Fluorophor geblichen und dann, mittels mehrerer darauffolgenden Aufnahmen, die Fluoreszenzwiederkehr aufgezeichnet. Der Wiederanstieg ist durch die Diffusion von ungeblichen Fluorophoren aus der Nachbarschaft des ROI zu erklären, die die geblichenen Moleküle ersetzen. Durch die räumliche Auflösung des *laser-scanning* Mikroskops ist es weiterhin möglich, selektiv in bestimmten Arealen der lebenden Zelle zu bleichen, so dass die Diffusion der Proteine in definierten zellulären Kompartimenten bestimmt werden kann. Da das Fluorophor des GFP durch die β -barrel Struktur abgeschirmt ist, ist der durch das Bleichen provozierte oxidative Stress für die angrenzenden Moleküle minimal.

Durch FRAP Messungen können zwei Parameter bestimmt werden: Zum einen die Diffusionskonstante D_f und zum anderen die Mobile Fraktion eines Proteins M . Die Diffusionskonstante D_f ist aus der Stokes Einstein Formel zu errechnen und hat meist die Einheit $\mu\text{m}^2/\text{s}$:

$$D = \frac{kT}{6\pi\eta R}$$

Dabei ist k die Boltzmannkonstante, T die absolute Temperatur, η die Viskosität des Mediums und R der hydrodynamische Radius des Partikels. Bei Transmembranproteinen wird davon ausgegangen, dass die Diffusion des transmembranären Teils entscheidend ist für die Diffusionsgeschwindigkeit des gesamten Proteins [70].

Bei der Mobilen Fraktion handelt es sich um den Anteil der Proteine, die frei in dem untersuchten Kompartiment diffundieren können, typischerweise ist die Mobile Fraktion stets kleiner als 100 Prozent. Bei Transmembranrezeptoren kann der immobile Teil zum Beispiel durch Verankerung mit dem Zytoskelett hervorgerufen sein, aber auch Diffusionsbarrieren wie *lipid rafts* innerhalb einer Membran können die Mobilität einschränken. Die mobile Fraktion wird aber nicht nur von zelleigenen Faktoren beeinflusst, sondern kann auch durch den Experimentator willentlich verändert werden. Durch den Einsatz von zwei monoklonalen Antikörpern, die unterschiedliche Epitope des Zytokinrezeptors gp130 erkennen, ist es möglich den Rezeptor selektiv an der Plasmamembran zu vernetzen und vollständig zu immobilisieren (s. Abb. 8) [71].

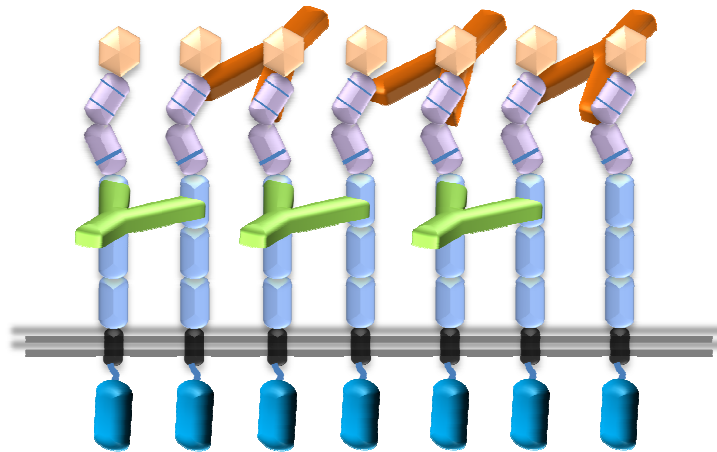


Abbildung 8: Schematische Darstellung der Immobilisierung von gp130id-CFP durch monoklonale Antikörper

Die monoklonalen Antikörper sind in orange und grün dargestellt und erkennen unterschiedliche Epitope des gp130.

Die immobile Fraktion von gp130 steigt dadurch auf nahezu 100 Prozent. Durch die differenzierte Anregung und Detektion von YFP und CFP mittels des *laser-scanning* Mikroskops kann gleichzeitig die Diffusion von zwei unterschiedlich markierten Rezeptoren innerhalb einer Messung dargestellt werden. Somit ist es möglich, die Diffusion weiterer Rezeptoren in Abhängigkeit von der Mobilität des gp130 zu studieren. Abbildung 9 zeigt den in dieser Arbeit verwendeten Aufbau am *laser-scanning* Mikroskop für eine FRAP Messung von IL-6 Typ Zytokinrezeptoren. Dabei werden drei ROIs (*region of interest*) benutzt, zwei davon sind an der Plasmamembran lokalisiert, das dritte ist zur Messung der Hintergrundfluoreszenz neben der Zelle lokalisiert. In dem einen ROI an der

Plasmamembran wird nach fünf Aufnahmen gebleicht und die Fluoreszenzwiederkehr ermittelt, das zweite ROI dient der Messung von eventuellen Zellbewegungen. Die Analyse der Diffusionsfähigkeit erfolgt daraufhin graphisch als relative Fluoreszenzwiederkehr vom Ausgangswert vor dem Bleichen.

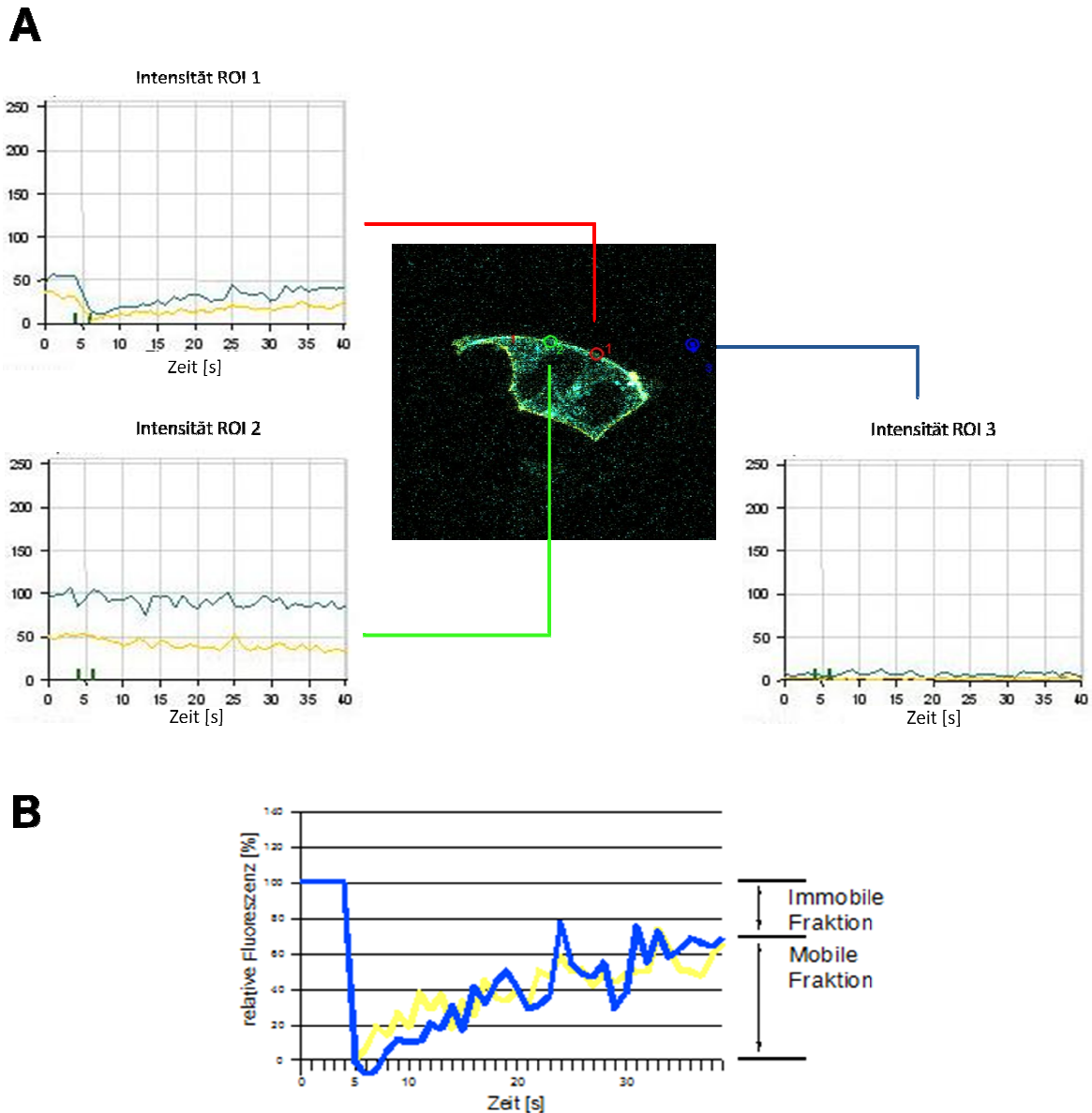


Abbildung 9: Messung von FRAP an der Plasmamembran

A: HEK293T Zellen wurden transient mit Vektoren für gp130id-CFP, dabei handelt es sich um ein internalisierungsdefizientes gp130, und gp80-YFP transfiziert. 48 Stunden nach Transfektion wurden sie in einer Lebendzellkammer mittels laser-scanning Mikroskopie untersucht. Das blaue ROI dient der Aufnahme der Hintergrundfluoreszenz, das grüne ROI ist zur Kontrolle von Zellbewegungen an der Plasmamembran lokalisiert. In dem roten ROI werden nach 5 Aufnahmen beide Fluorophore gebleicht. Die Diagramme zeigen die Fluoreszenzentwicklung in den angezeigten ROIs über die Zeit von circa 40 Sekunden. Dabei werden die Fluoreszenzen von CFP und YFP durch blaue bzw. gelbe Graphen dargestellt.

B: Das Diagramm stellt die relative Fluoreszenzentwicklung aus dem roten ROI aus A dar, wobei die Hintergrundfluoreszenz subtrahiert wurde. Die ersten fünf Messwerte wurden gemittelt und als 100% gesetzt. Der erste Wert nach Bleichen wurde als 0% gesetzt. Außerdem sind die Mobile und die Immobiler Fraktion eingezeichnet.

1.2.3 Fluorescence resonance energy transfer (FRET)

Bei FRET handelt es sich um einen strahlungsfreien Energietransfer zwischen zwei verschiedenen Fluorophoren. Der Donor überträgt dabei seine durch Lichtanregung erworbene Energie auf den Akzeptor, dadurch wird die Fluoreszenz des Donors geringer und die des Akzeptors größer. Für diese Art der Energieübertragung müssen mehrere Bedingungen erfüllt sein. Zum einen müssen die eingesetzten Fluorophore so beschaffen sein, dass das Emissionsspektrum des Donors mit dem Anregungsspektrum des Akzeptors überlappt. In dieser Arbeit wurde ein Paar aus dem *cyan fluorescent protein* (CFP) als Donor und *yellow fluorescent protein* (YFP) als Akzeptor gewählt.

Eine weitere Bedingung ist die räumlich Nähe der beiden Fluorophore zueinander [72, 73]. Dies wird mathematisch beschrieben durch die von Förster aufgestellte Gleichung:

$$E_f = \frac{1}{1 + (r/R_0)^6}$$

Dabei ist E_f die FRET Effizienz, r der Abstand der beiden Fluorophore zueinander und R_0 eine Funktion abhängig von der Überlagerung der Donoremission und der Akzeptorabsorption, sowie der Orientierung der beiden Fluorophore zueinander. Der Försterradius entspricht dem Abstand der Fluorophore zueinander, bei der die Energieübertragung 50% beträgt. Für das Paar CFP und YFP beträgt der Försterradius 50 Å. Ab einem doppelten Försterradius findet nahezu kein Energietransfer mehr statt [74]. Die räumliche Nähe der beiden Fluorophore zueinander wird im FRET Experiment durch die räumliche Nähe der Proteine, an die sie gekoppelt sind, hergestellt. Die Größe des FRET Effektes gibt einem somit Aufschluss über die Interaktion zweier Proteine. Dabei gibt es mehrere Möglichkeiten, den Energietransfer zu messen: über verlängerte "Lebenszeit" des Donors (*fluorescence lifetime imaging*) oder über Anregung des Donors und Messen der Akzeptor Fluoreszenz (*sensitized emission*). An dieser Stelle sei die in dieser Arbeit verwendete Methode des Akzeptor Bleichens (*acceptor photobleaching*) näher beschrieben. Dabei misst man FRET indem man den Akzeptor bleicht, wodurch anschließend die Donorfluoreszenz steigt. Dies begründet sich darin, dass vor dem Bleichen stets ein Teil der Energie vom Donor über FRET an den Akzeptor weitergegeben

wurde. Nach Bleichen des Akzeptors ist der Energietransfer nicht mehr möglich und der Donor fluoresziert nun stärker (s. Abb. 10). Der FRET-Nachweis durch Akzeptor Bleichen erfolgt an fixierten Zellen, da die Diffusion der Fluorophore in lebenden Zellen das Ergebnis verfälschen würde.

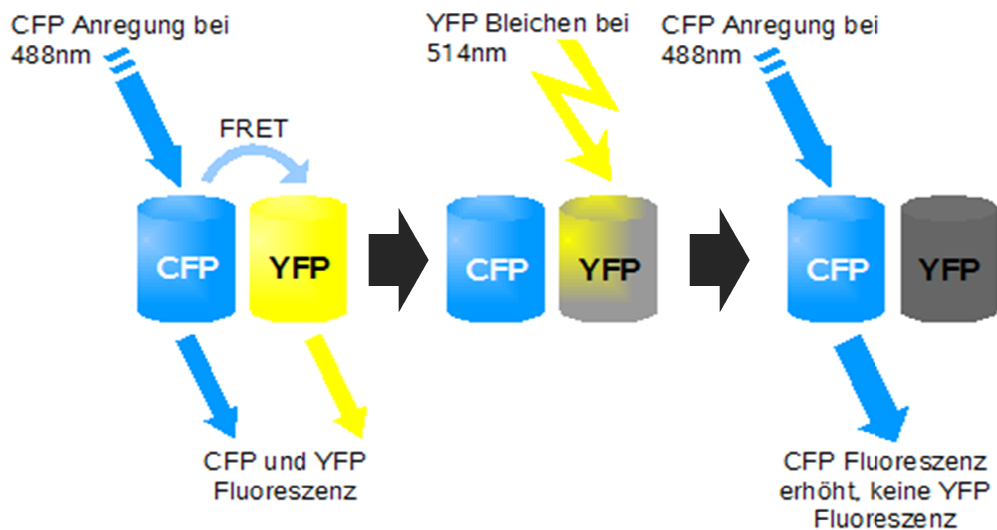


Abbildung 10: Schematische Darstellung der Messung von FRET durch Akzeptor Bleichen
Einzelheiten siehe Text.

Der in dieser Arbeit verwendete mikroskopische Versuchsablauf ist in Abbildung 11 dargestellt. Als FRET Positiv-Probe dient dabei der internalisierungsdefiziente Zytokinrezeptor gp130, der sowohl mit CFP wie auch mit YFP gekoppelt ist (gp130id-CYFP). Beide Fluorophore sind lediglich mit einem kurzem *linker* verbunden, so dass FRET maximal ist. Wie bei der FRAP Messung wurden wieder drei ROIs definiert: eines für die Hintergrundfluoreszenzmessung, ein zweites als Kontrolle an der Membran und ein drittes für die eigentliche Messung an der Plasmamembran. In dem Mess-ROI wird nach zwei Bildaufnahmen das YFP gebleicht. Weitere zwei Bildaufnahmen folgen dem Bleichen. Aus der Differenz der CFP Intensität nach dem Bleichen und vor dem Bleichen wird die FRET Effizienz errechnet.

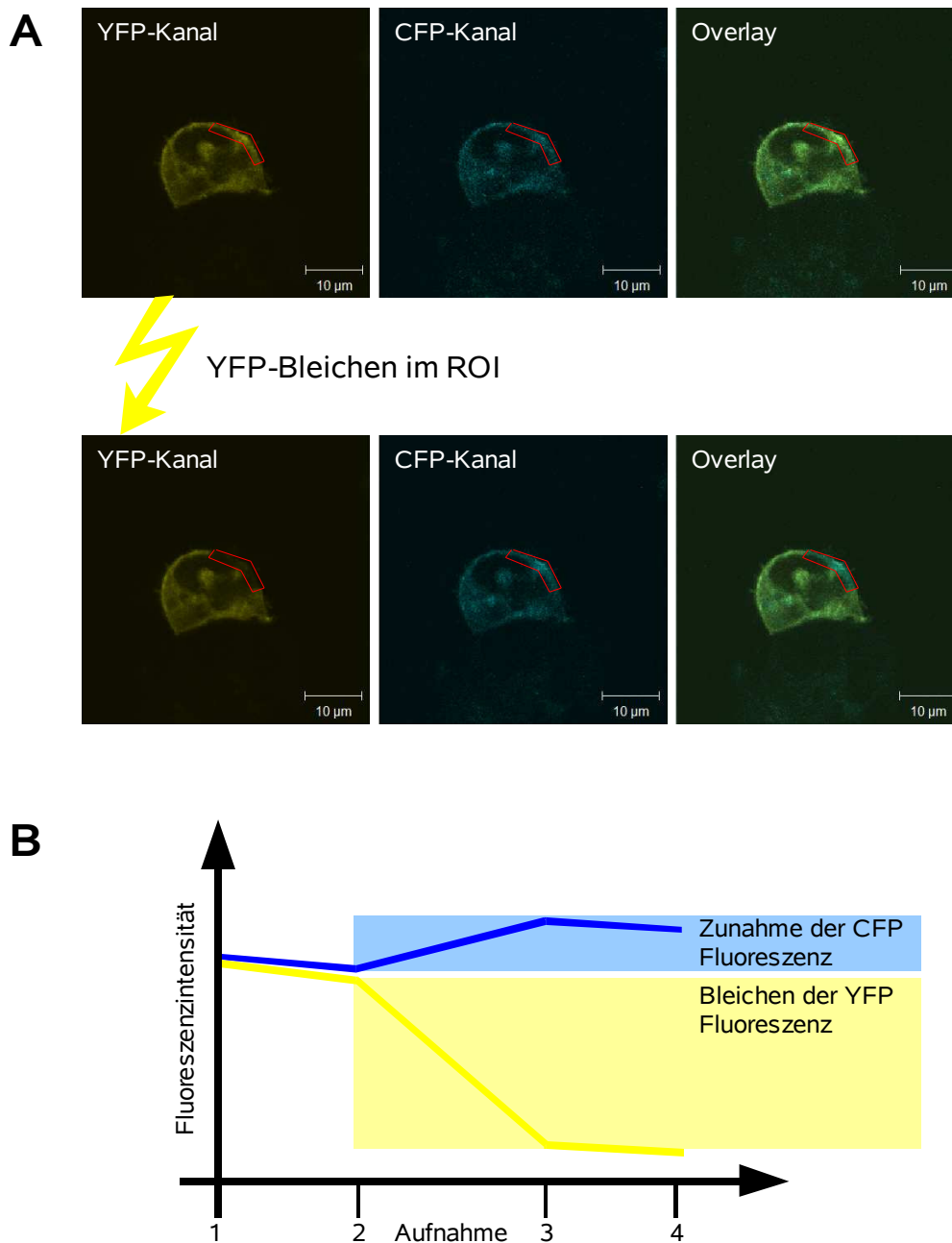


Abbildung 11: Qualitative Messung des FRET durch Akzeptor Bleichen und deren Auswertung

A: HEK293T Zellen wurden transient mit dem Vektor für gp130id-CYFP transfiziert, 48 Stunden nach Transfektion fixiert und anschließend mittels der laser-scanning Mikroskopie untersucht. Rot eingezeichnet ist das ROI, in dem YFP geblichen wird. Die oberen Bilder wurden vor dem Bleichen aufgenommen, die Unteren danach.

B: Das Diagramm zeigt schematisch die Fluoreszenzentwicklung in dem ROI, in dem YFP geblichen wird.

1.2.4 Bimolecular fluorescence complementation (BiFC)

Hu *et al.* stellten 2002 die BiFC Technik zur Visualisierung von Protein-Interaktionen vor [75]. Die Technik macht sich zu Nutze, dass sich N- und C-terminale Hälften des GFP und Hälften von dessen Derivaten komplementieren können. Die einzelnen Hälften fluoreszieren dabei nicht. Erst durch die Komplementierung der passenden Hälften entsteht ein funktionsfähiges Fluorophor (s. Abb. 12).

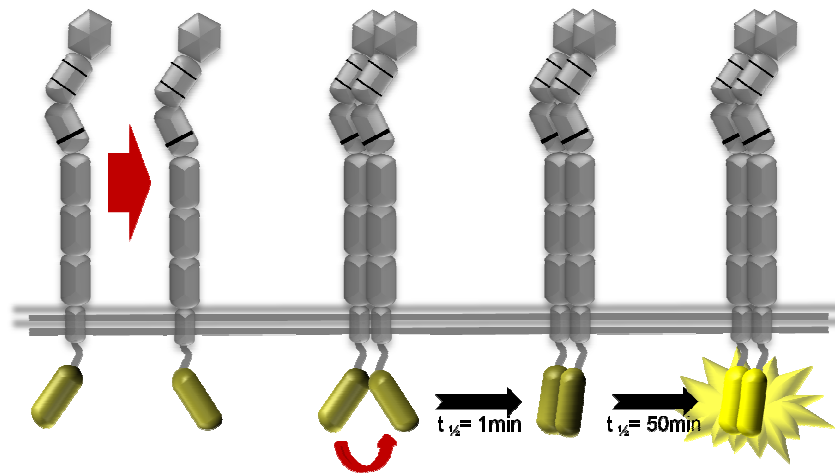


Abbildung 12: Schematische Darstellung der bimolecular fluorescence complementation (BiFC)

*N- und C-terminalen Hälften des YFP sind jeweils an ein Protein gekoppelt (hier gp130id). Durch Interaktion der Proteine (erster roter Pfeil) kommt es zur Annäherung der beiden Hälften (zweiter roter Pfeil, Komplementierung der Hälften (erster schwarzer Pfeil) und Ausbildung eines funktionsfähigen Fluorophors (zweiter schwarzer Pfeil). Die Zeiten unter den schwarzen Pfeilen geben die Halbwertszeiten für die einzelnen Schritte an (nach Hu *et al.* (2002) [75]).*

Voraussetzung ist, dass die beiden Hälften des fluoreszierenden Proteins über einen längeren Zeitraum in direkter Nähe sind. Die von Hu *et al.* ermittelte Halbwertszeit für die Assoziation mit Komplementierung beträgt 60 Sekunden. Der abgeschlossene Prozess der Komplementierung ist im biologischen System irreversibel. An die Assoziation und Komplementierung der beiden Hälften schließt sich die Reifung des Fluorophors an. Diese geschieht mit einer Halbwertszeit von 50 Minuten und kann durch eine Inkubation bei 30° Celsius unterstützt werden [76]. Die Komplementierung wird dabei durch die räumliche Nähe der zu untersuchenden Proteine hergestellt, mit denen die Hälften verbunden sind. Dies setzt eine Interaktion der zu untersuchenden Proteine voraus, die länger als die Halbwertszeit der Komplementierung (60s) ist. Es ist weiterhin möglich, dass sich Hälften aus verschiedenen Ausgangsfluorophoren komplementieren und ein Fluorophor mit völlig

neuen spektralen Eigenschaften ausbilden [77]. Tabelle 2 zeigt die Charakteristika der in dieser Arbeit verwendeten BiFC-Paare. Durch die hohe räumliche Auflösung der *laser-scanning* Mikroskopie ist es möglich, den Ort der Interaktion festzustellen. Dagegen ist es schwierig über Aufnahmen von Einzelzellen Aussagen über die Gesamtpopulation zu gewinnen. Hierfür ist die quantitative Erfassung der BiFC Fluoreszenz mittels des *fluorescence activated cell sorter* (FACS) besser geeignet.

Tabelle 2: Ausgewählte Eigenschaften der BiFC-Paare, die in dieser Arbeit verwendet wurden

Modifiziert nach Hu et al. (2003) [77]

Paar	Aminosäuren	Maximum des Anregungsspektrum	Maximum des Emissionsspektrum
YN173	N-Terminus von YFP bis AS 172	515 nm	527 nm
YC173	C-Terminus von YFP ab AS 173		
CN173	N-Terminus von CFP bis AS 172	466 nm	497 nm
YC173	C-Terminus von YFP ab AS 173		
YN173	N-Terminus von YFP bis AS 172	503 nm	515 nm
CC155	C-Terminus von CFP ab AS 155		

1.3 Zielsetzung der Arbeit

In dieser Arbeit sollte der Frage nachgegangen werden, ob innerhalb der Familie der IL-6-Typ Zytokinrezeptoren stimulationsunabhängige Assoziationen zwischen den Rezeptoren bestehen. Der besondere Schwerpunkt der Untersuchungen sollte dabei auf den IL-6 Rezeptor bestehend aus gp80 und gp130 liegen. Der biologische Vorteil einer Präassoziation liegt darin, dass die Signaltransduktion von extra- zu intrazellulär nicht durch einen diffusionsgerichteten Schritt verzögert wird. Gleichzeitig würden aber im gp130-Rezeptorsystem allzu starre Bindungsverhältnisse die Dynamik bei der Ausbildung der verschiedenen Komplexe stören. Da die Integrität von Transmembranproteinen naturgemäß bei einer Zellyse mit Detergenzien am stärksten betroffen ist, ist es denkbar, dass die Wechselwirkungen ein solches Prozedere nicht überdauern. Daher ist diese Arbeit in zwei Teile geteilt, nämlich in Untersuchungen an Zelllysaten und Experimente an intakten Zellen. Für die Versuche an intakten Zellen wurden moderne Fluoreszenztechniken eingesetzt, die Messungen bei größtmöglicher Schonung der Zelle zulassen. Dadurch ist es möglich, auch schwache Interaktionen zu beobachten und in der Zusammenschau beider Arbeitsteile eine qualitative Aussage über die Bindungsverhältnisse abzugeben. Weiterhin sollte bei Feststellung von stimulationsunabhängiger Interaktion der Rezeptoren geklärt werden, über welche Bereiche der Proteine die Wechselwirkung erfolgt.

Durch FRET Messungen ist es ebenfalls möglich, Aussagen über die Stöchiometrie von Proteinen in einem Komplex zu machen. Dieser Ansatz sollte genutzt werden, um die Zusammensetzung des IL-6 Rezeptorkomplexes aus gp130 und gp80 an der Membran zu untersuchen, da die vorangegangene Arbeiten immer mit löslichen Rezeptorproteinen durchgeführt wurden [19, 58].

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien, Enzyme und Lösungen

Die verwendeten Chemikalien waren in der Regel von *pro analysis* Qualität. Enzyme wurden von den Firmen Roche Diagnostics GmbH (Deutschland), New England Biolabs (Deutschland), Fermentas GmbH (Deutschland) und Invitrogen GmbH (Deutschland) bezogen, soweit nicht anders im Text vermerkt. Alle wässrigen Lösungen wurden mit durch doppelte Osmose gereinigtem Wasser hergestellt (Qualität: Millipore; Millipore, Deutschland).

2.2 Zytokine und lösliche Rezeptoren

IL-6 Rekombinantes humanes IL-6 wurde nach der Methode von Arcone et al. [78] hergestellt. Die spezifische Aktivität betrug 2×10^6 BSF2 (*B-cell stimulatory factor 2*) U/mg.

LIF Rekombinantes humanes LIF wurde von Calbiochem, EMD (USA) bezogen.

sgp80 Die lösliche Form des gp80 wurde rekombinant mit dem Baculovirus-Expressionssystem hergestellt [79].

sgp130 Lösliches, humanes gp130 wurde von R&D Systems (USA) bezogen.

2.3 Antikörper

GFP-Antikörper polyklonaler Antikörper gegen das *green fluorescent protein* (Rockland, USA). Der Antikörper erkennt auch die *cyan* (CFP) und *yellow* (YFP) Varianten des Proteins.

BT2	monoklonaler Antikörper gegen die erste Domäne von humanem gp130 [80]
B-P8	monoklonaler Antikörper gegen das ZBM von humanem gp130 [80]
B-S12/G7	monoklonaler Antikörper gegen das ZBM von humanem gp130 [80, 81]
B-P4	monoklonaler Antikörper gegen die vierte Domäne von humanem gp130 [80]
gp130fl	polyklonaler Antikörper gegen humanes gp130 (upstate, USA)
gp80 (pAk Liège)	polyklonaler Antikörper gegen humanes gp80
anti-Maus, HRP konjugiert	polyklonaler Antikörper hauptsächlich gegen den konstanten Bereich des Maus-IgG gerichtet (Dako, Deutschland)
anti-Kaninchen, HRP konjugiert	polyklonaler Antikörper hauptsächlich gegen den konstanten Bereich des Kaninchen-IgG gerichtet (Dako, Deutschland)
anti-Ziege, HRP konjugiert	polyklonaler Antikörper hauptsächlich gegen den konstanten Bereich des Ziege-IgG gerichtet (Dako, Deutschland)

2.4 DNS

2.4.1 Plasmide

pSVL Δ EcoR/gp130fl	enthält die vollständige cDNS für humanes gp130.
pSVL Δ EcoR/gp130fl-CFP	enthält cDNS für ein Fusionsprotein aus humanem gp130 in voller Länge und CFP (CFP am C-Terminus von gp130).

pSVL Δ EcoR/gp130fl-YFP	enthält cDNS für ein Fusionsprotein aus humanem gp130 in voller Länge und YFP (YFP am C-Terminus von gp130).
pSVL Δ EcoR/gp130id-CFP	enthält cDNS für ein verkürztes Fusionsprotein aus humanem gp130 und CFP, in welchem Val1 von CFP direkt auf Pro668 von gp130 folgt.
pSVL Δ EcoR/gp130id-CYFP	enthält cDNS für ein verkürztes Fusionsprotein aus humanem gp130 und einem Fusionsprotein aus CFP und YFP, Val1 von CFP folgt direkt auf Pro668 von gp130, nach Lys238 von CFP folgt ein 28 Aminosäuren enthaltender Linker, danach Ser2 von YFP.
pSVL Δ EcoR/gp130id-EX/EpoR-CFP	enthält cDNS für ein verkürztes Fusionsprotein aus humanem gp130 und CFP, in welchem Val1 von CFP direkt auf Pro668 von gp130 folgt. Die Extrazellulärdomänen des gp130 (Met1 – Glu619) wurden gegen die des Epo Rezeptors getauscht (Met1 - Pro250).
pSVL Δ EcoR/gp130 Δ Box1-CFP	enthält cDNS für ein verkürztes Fusionsprotein aus humanem gp130 und CFP, in welchem Val1 von CFP direkt auf Pro668 von gp130 folgt; zusätzlich sind Ile651 bis einschließlich Pro658 (Box 1) von gp130 entfernt.
pSVL Δ EcoR/gp130id-YN173	enthält cDNS für ein verkürztes Fusionsprotein aus humanem gp130 und N-terminaler Hälfte von YFP, in dem Val1 von YFP direkt auf Pro668 von gp130 folgt, YFP endet mit Glu172
pSVL Δ EcoR/gp130id-YC173	enthält cDNS für ein verkürztes Fusionsprotein aus humanem gp130 und C-terminaler Hälfte von YFP, in dem Asp173 von YFP direkt auf Pro668 von gp130 folgt
pSBCLIFRfl	Enthält die vollständige cDNS für den humanem LIFR

pSBCLIFRid-CFP	enthält cDNS für ein verkürztes Fusionsprotein aus humanem LIFR und N-terminaler Hälfte von CFP, in dem nach Leu882 des LIFR ein Verbindungsstück aus Ser-Arg und anschließend CFP, beginnend mit Val1 folgt.
pSBCLIFRid-CN173	enthält cDNS für ein verkürztes Fusionsprotein aus humanem LIFR und N-terminaler Hälfte von CFP, in dem nach Leu882 des LIFR ein Verbindungsstück aus Ser-Arg und anschließend Val1 von CFP folgt, CFP endet mit Glu172.
pSVL Δ EcoR/gp80f	Enthält die vollständige cDNS für das humane gp80.
pSVL Δ EcoR/gp80-YFP	enthält cDNS für ein verkürztes Fusionsprotein aus humanem gp80 und YFP, in dem nach Ser443 des gp80 zuerst Arg als zusätzliche Aminosäure und dann Val1 von YFP folgt.
pSVL Δ EcoR/gp80-CFP	enthält cDNS für ein verkürztes Fusionsprotein aus humanem gp80 und CFP, in dem nach Ser443 des gp80 zuerst Arg als zusätzliche Aminosäure und dann Val 1 von CFP folgt.
pSVL Δ EcoR/gp80 Δ EX-YFP	enthält cDNS für ein verkürztes Fusionsprotein aus humanem gp80 und YFP, in dem nach Ser443 des gp80 zuerst Arg als zusätzliche Aminosäure und dann Val1 von YFP folgt, weiterhin ist die Extrazellulärdomäne deletiert, der Signalsequenz (Met1 – Arg19) folgt direkt Ser359 der Transmembran-domäne.
pSVL Δ EcoR/gp80 Δ D2,D3-YFP	enthält cDNS für ein verkürztes Fusionsprotein aus humanem gp80 und YFP, in dem nach Ser443 des gp80 zuerst Arg als zusätzliche Aminosäure und dann Val1 von YFP folgt, weiterhin sind die Extrazellulärdomänen 2 und 3 deletiert, auf Val112 der Domäne 1 folgt Arg346 der <i>stalk</i>

Region.

- pSVL Δ EcoR/gp80TM/LIFR-YFP enthält cDNS für ein verkürztes Fusionsprotein aus humanem gp80 und YFP, in dem nach Ser443 des gp80 zuerst Arg als zusätzliche Aminosäure und dann Val1 von YFP folgt, weiterhin ist die Transmembrandomäne von gp80 (Ser359 – Leu386) gegen die des LIF Rezeptors getauscht (Glu831 – Tyr859).
- pSVL Δ EcoR/gp80TM/EpoR-YFP enthält cDNS für ein verkürztes Fusionsprotein aus humanem gp80 und YFP, in dem nach Ser443 des gp80 zuerst Arg als zusätzliche Aminosäure und dann Val1 von YFP folgt, weiterhin ist die Transmembrandomäne von gp80 (Ser359 – Leu386) gegen die des Epo Rezeptors ausgetauscht (Leu251 – Leu272).
- pSVL Δ EcoR/gp80 Δ cyto-YFP enthält cDNS für ein verkürztes Fusionsprotein aus humanem gp80 und YFP, in dem nach Ser359 des gp80 zuerst Arg, Ser und Arg als zusätzliche Aminosäuren und dann Val1 von YFP folgen.
- pSVL Δ EcoR/gp80 Δ cyto-CFP enthält cDNS für ein verkürztes Fusionsprotein aus humanem gp80 und CFP, in dem nach Ser359 des gp80 zuerst Arg, Ser und Arg als zusätzliche Aminosäuren und dann Val1 von CFP folgen.
- pSVL Δ EcoR/gp80-CC155 enthält cDNS für ein verkürztes Fusionsprotein aus humanem gp80 und C-terminaler Hälfte von CFP, in dem nach Ser443 des gp80 ein Verbindungsstück aus Ser-Arg und anschließend Asp155 von CFP folgt.
- peYFP enthält die vollständige cDNS für das *enhanced yellow fluorescent protein*.

2.4.2 Oligonukleotide

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

1.	MSgp80dEsp	5' - TCG AGT CTA GAG GTA CCA TGC TGG CCG TCG GCT GCG CGC TGC TGG CTG CCC TGC TGG CCG CGC CGG GAG CGG CGT CTT CTT CAG TAC CA - 3'
2.	# 1.37	5' - CAT TTG CCG GTG TTC AAG - 3'
3.	MSgp80D1as	5' - CAT TTG CAG AAT CTC TAA CAT CCA CCA GCA AGT G - 3'
4.	MSgp80stalks	5' - AGA GAT TCT GCA AAT GCG AC - 3'
5.	SMmLIFRD1seqs	5' - ACT GGGGGT CCT CAG TGG ATG TTG - 3'
6.	#1.58	5' - CTC CTT GAA GTC GAT GC - 3'
7.	gp80EpoRsp	5' - GAT GAT AAT ATT CTC TTC AGA GAT TCT GGGGGA AAT GCG ACA AGC CTC CCA GTG CAA GAT CTC ATC CTG ACG C - 3'
8.	gp80EpoRrp	5' - GGA TGC ATA CTA GTC TTG CCT TCC TTC CAG AGC CCG CAG CTT CCA CGT CTT CTT GAA CCT GAG CAG CGC GAG CAC G - 3'
9.	#17.1	5' - CTC AGT GTC ACC TGG CAA GAC - 3'
10.	gp80tmXholrp	5' - GTA ACT CGA GCG CAG AAC AAT GGC - 3'
11.	#1.13	5' - GGT GTT GAT CTT ACG TCA C - 3'
12.	#1.18	5' - CCT GTA CGG AAG TGT TAC - 3'

Die Primer wurden zur Klonierung folgender Konstrukte mittels PCR genutzt:

<u>Primer</u>	<u>Konstrukt</u>
1,2	pSVL Δ EcoR/gp80 Δ EX-YFP
3,4,5,6	pSVL Δ EcoR/gp80 Δ D2,D3-YFP
7,8	pSVL Δ EcoR/gp80TM/EpoR-YFP
9,10	pSVL Δ EcoR/gp80 Δ CYTO-YFP
9,10	pSVL Δ EcoR/gp80 Δ CYTO-CFP

2.5 Prokaryotische Zellen und deren Kultivierung

Für die in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Experimente wurden die *E.coli*-Stämme XL1Blue und JM83 verwendet. Sie wurden zur Transformation mit rekombinanten Plasmiden eingesetzt.

Die Kultivierung der Bakterien erfolgte in LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin. Die Stammhaltung erfolgte in Form einer Gefrierkultur bei -80°C in LB-Medium mit 20% Glycerol (Roth, Deutschland). Um transformierte Klone zu selektieren, wurden die Bakterien auf LB-Platten mit 100 µg/ml Ampicillin ausgestrichen. Die Herstellung der LB-Platten erfolgte durch Zugabe von 2% Bacto-Agar (Life Technologies, Deutschland).

LB-Medium 10 g/l Bactotrypton (Difco)
 5 g/l Hefeextrakt (Difco)
 5 g/l NaCl

2.6 Präparation und Analyse von Plasmid-DNS

2.6.1 Isolierung von Plasmid-DNS

2.6.1.1 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, Deutschland) 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, Deutschland) nach Protokoll des Herstellers aufgearbeitet. Die isolierte DNS wurde in Wasser aufgenommen.

2.6.2 Quantitative Nukleinsäurebestimmung

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 $\lambda = 280 \text{ nm}$ ermittelt. Bei reiner DNS liegt der Quotient $A_{260\text{nm}} : A_{280\text{nm}}$ zwischen 1,7 und 2.

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°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 mit Restriktionsendonukleasen verdaut. Hierbei wurden die Empfehlungen der Enzymhersteller berücksichtigt. In einen analytischen Restriktionsverdau wurden 0,5-1 μg DNS eingesetzt, in einen präparativen 2-5 μg 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 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 μg 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°C inkubiert. Anschließend wurde die Phosphatase 5 min bei 65°C inaktiviert und der dephosphorylierte Vektor in die Ligation eingesetzt.

2.6.6 Gelelektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren

2.6.6.1 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 µg/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- 0,4% Xylencyanol

Probenpuffer: 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% SeaKem LE Agarose (Cambrex Bio Science, Belgien)

2.6.6.2 Isolierung von DNS Fragmenten aus Agarose-Gelen

DNS-Fragmente aus Restriktionen oder PCR-Amplifikationen wurden im Agarosegel aufgetrennt (vgl. Kapitel 2.6.6.1), mit Hilfe des *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen, Deutschland) aus der Gelmatrix isoliert und in Wasser aufgenommen.

2.6.7 Ligation von DNS

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 (2.6.8) vermischt.

2.6.8 Transformation von Bakterien

2.6.8.1 Herstellung kompetenter Bakterien

500 ml LB-Medium wurden mit einer Übernacht-Vorkultur zu einer OD_{600} von 0,02 angeimpft. Die Hauptkultur wurde bei 37°C in einem Schüttelinkubator bebrütet, bis eine OD_{600} 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 $CaCl_2$ -Lösung resuspendiert und 20 min in Eiswasser inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien 5 min bei 3.000g zentrifugiert und das Sediment in 25 ml $CaCl_2$ -Lösung mit 10% Glycerin aufgenommen. Die kompetente Bakteriensuspension wurde in 400- μ l-Aliquots in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

2.6.8.2. Transformation kompetenter Bakterien

100 μ l kompetente Bakteriensuspension (2.6.8.1) wurde auf Eis aufgetaut, mit dem Ligationsansatz (2.6.7) oder 0,5 μ g 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 μ l 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) ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Herangewachsene Bakterienkolonien wurden mittels Kolonie-PCR (2.6.11) oder DNS Präparation (2.6.1) und Restriktionsverdau (2.6.4) analysiert.

2.6.9 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, Deutschland) verwendet.

PCR-Ansatz: 4 μ l *Big Dye 1.1-Terminator-Mix*
 0,5-1 μ g doppelsträngige DNS
 10 pmol Oligonukleotid

ad 20 µl mit Wasser

PCR-Reaktionszyklus:	1.	20 s	96°C	erste Denaturierung
	2.	20 s	48-50°C	Hybridisierung
	3.	240 s	60°C	Elongation
	4.	20 s	96°C	Denaturierung
	5.	240 s	60°C	letzte Elongation

Schritte 2 bis 4 wurden innerhalb 25 Zyklen wiederholt. 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.

2.6.10 PCR-Reaktion

PCR-Reaktionen wurden wie folgt angesetzt:

PCR-Ansatz:	500 ng	DNS-Matrize
	45 pmol	<i>forward</i> Primer
	45 pmol	<i>reverse</i> 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:	1.	120 s	94°C	erste Denaturierung
	2.	90 s	xx°C	Hybridisierung
	3.	90 s	72°C	Elongation
	4.	60 s	94°C	Denaturierung
	5.	240 s	72°C	letzte Elongation

Schritte 2 bis 4 wurden innerhalb 30 Zyklen wiederholt.

Die Temperatur "xx" hängt vom A/T- und G/C-Gehalt der hybridisierenden Sequenzen ab.

Die Schmelzpunkte (T_m) der Oligonukleotide wurden mit folgender Formel berechnet:

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

Als Hybridisierungstemperatur wurde eine gegenüber der berechneten Schmelztemperatur um einige Grade niedrigere Temperatur gewählt.

2.6.11 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. Als Primerpaare wurden zu dessen Amplifikation Nr. 11 und 12 benutzt (vgl. 2.4.2).

PCR-Ansatz:

- 10 µl Bakterienlysat
- 15 pmol *forward* Primer
- 15 pmol *reverse* Primer
- 10 mM dNTPs (je 25 mM dATP, dGTP, dCTP, dTTP)
- 2,5 µl 10x Taq-Polymerase-Puffer (New England Biolabs)
- 1,25 U Taq-Polymerase (New England Biolabs)

ad 25 µl mit Wasser

PCR-Reaktionszyklus:

1.	60 s	94°C	erste Denaturierung
2.	60 s	50°C	Hybridisierung
3.	xx s	72°C	Elongation
4.	60 s	94°C	Denaturierung
5.	300 s	72°C	letzte Elongation

Schritte 2 bis 4 wurden innerhalb 30 Zyklen wiederholt. Die Zeit xx berechnet sich als 60 s pro 1.000 Basen des zu erwarteten Inserts.

2.7 Eukaryotische Zelllinien und deren Kultivierung

2.7.1 Permanente Zelllinien

HEK293T SV40-T-Antigen exprimierendes Derivat der adhärent wachsenden humanen embryonalen Nierenzellen HEK293, adenoviral transformiert (DSMZ, Deutschland)

2.7.2 Nährmedien und Lösungen für die Zellkultur

DMEM Flüssigmedium mit 4,5 g/l Glukose, GlutaMAX I und Pyruvat (Gibco/Invitrogen)

FKS mycoplasmenfreies fötales Kälberserum (CytoGen GmbH, Deutschland)

Optimem Flüssigmedium mit GlutaMAX I (Gibco/Invitrogen)

PBS
0,2 M NaCl
2,5 mM KCl
8 mM NaH₂PO₄
1,5 mM KH₂PO₄
pH 7,4

Die Zellen wurden in DMEM kultiviert. Dem Medium wurde 10% Hitze-inaktiviertes FKS sowie 60 mg/l Penicillin und 100mg/l Streptomycin zugesetzt, es wird im weiteren als DMEM^{+/+} bezeichnet.

Die Kultivierung der Zellen erfolgte bei 37°C in wassergesättigter Luft mit 5 Vol-% CO₂. Zur Weiterkultivierung wurden konfluente Zellen nach Absaugen des Mediums und Waschen mit PBS mit Kulturmedium von der Platte gespült. Anschließend wurden die Zellen in Verdünnungen von 1:2 bis 1:10 in neuem Medium aufgenommen. Eine Langzeitlagerung der Zellen in Tieftemperaturgefäßen erfolgte nach Zugabe von 10% DMSO und 10% FKS in das Kulturmedium in flüssigem Stickstoff.

2.8 Expression von Proteinen in eukaryotischen Zellen

2.8.1 Transfektion von Hek293T-Zellen

Hek293T-Zellen wurden mit Fugene (Roche, Schweiz) transfiziert. Das Transfektionsprotokoll des Herstellers wurde in abgewandelter Form verwendet. 40 - 60% konfluente Zellkulturschalen mit einer effektiven Bewuchsfläche von 78 cm² wurden einmal mit PBS gewaschen, mit 10 ml Optimem (Invitrogen) gefüllt und ein vorbereitetes Transfektionsgemisch auf die Schalen gegeben.

Dieses Transfektionsgemisch bestand aus 1 - 8 µg DNS, je 1,5 µl Fugene pro 1 µg DNS und Optimem ad 100 µl bis 4 µg DNS und 200 µl ab 4 µg DNS. Nach 20-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde das Transfektionsgemisch auf die Zellkulturschalen gegeben und über Nacht auf den Zellen belassen. Am Tag nach der Transfektion wurde das Medium beim Splitten der Zellen gegen DMEM^{+/+} ausgetauscht.

2.8.2 Stimulation von Hek293T-Zellen mit IL-6, IL-6/sgp80 oder LIF

Hek293T-Zellen wurden mit IL-6, IL-6 und sgp80 in den Konzentrationen von 5 - 25 ng/ml DMEM^{+/+} bzw. 1 mg/ml DMEM^{+/+} stimuliert. Die LIF-Stimulationskonzentration betrug 20 ng/ml DMEM^{+/+}.

2.8.3 Kultivierung von Zellen für die BiFC-Experimente

Hek293T-Zellen wurden wie in 2.8.1 beschrieben mit Vektoren für BiFC-taugliche Fusionsproteine transfiziert und am darauffolgenden Tag auf jeweils zwei Zellkulturschalen gesplittet. 26 h nach der Transfektion erfolgte die Stimulation einer Hälfte der gesplitteten Zellen mit IL-6, IL-6/sgp80 bzw. LIF. 4 h nach der Stimulation wurde die 37°C-Inkubation der Zellen beendet und die Ansätze bei 30°C zur Ausbildung der BiFCKomplexe [75] inkubiert. Nach 18-stündiger 30°C-Inkubation wurden die Zellen mittels FACS untersucht oder wie unter 2.10.2.3 beschrieben fixiert.

2.9 Methoden mit Zellyse

2.9.1 Herstellung von Zelllysaten

Zur Herstellung von Lysaten wurden die Zellen in 0,1 bis 0,9 ml Triton X-100 oder Brij-96-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 wurden direkt ohne Lagerung weiterverwendet.

Triton X-100	0,0932 mol	Na ₂ HPO ₄
Lysispuffer	0,0068 mol	NaH ₂ PO ₄
	0,5%	Triton X-100
	gelöst in Wasser	
Brij-96 Lysispuffer	0,0932 mol	Na ₂ HPO ₄
	0,0068 mol	NaH ₂ PO ₄
	0,5%	Brij-96
	gelöst in Wasser	
vor Verwendung	1 mM	Na ₃ VO ₄
zugeetzte	0,5 mM	EDTA
Proteaseinhibitoren	0,25 mM	Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)
	5 µg/ml	Aprotinin
	1 µg/ml	Leupeptin

2.9.2 Immun- bzw. Koimmunpräzipitation von Proteinen

Die Immunpräzipitation dient der Anreicherung bestimmter Proteine aus Zelllysaten. Bei der Koimmunpräzipitation werden auch mit diesen Proteinen assoziierte, andere Proteine aufgereinigt. Für Immun- bzw. Koimmunpräzipitations-Studien wurden HEK293T Zellen transient wie unter 2.8.1 beschrieben transfiziert und 48 Stunden zur Proteinproduktion kultiviert und teilweise wie unter 2.8.2 beschrieben stimuliert. Danach wurden die Zellen lysiert (2.9.1). Für eine Immunpräzipitation wurden die Lysate über Nacht bei 4°C mit 1,2 µg/Ansatz GFP-Antikörper (2.3) inkubiert, welcher vorher an Protein A Sepharose (5

mg/Ansatz, Amersham Biosciences) immobilisiert wurde. Am nächsten Tag wurde die Sepharose mit den Präzipitaten abzentrifugiert. 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 gp130 (2.3) detektiert. Nach Strippen (2.9.5) der Membran wurde eine weitere Immundetektion mit einem gp80-Antikörper (2.3) durchgeführt.

2x Lämmli-Puffer	20% Glycerin
	10% β -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-)Immünpräzipitate werden in 1x bzw. 2x Lämmli-Puffer aufgenommen und bei 95°C für 10 min erhitzt, um die Proteine zu denaturieren. Disulfidbrücken werden durch β -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. Es wurden 10%ige Trenngele mit 6%igen Sammelgelen verwendet. Die Elektrophorese wurde in einer Biometra-Kammer bei 30 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 Glycin 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°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 ϵ -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°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 5 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 zugesetzt

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

Die blaue 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 [82, 83]. Um die Eigenladungen der Proteine zu überdecken, wird bei der BN-PAGE der Farbstoff Coomassie verwendet, der an die Proteine bindet und sie negativ lädt. Die Proteine bewegen sich daher im elektrischen Feld zur Anode und werden nach ihrer Größe in ihrer Quartärstruktur aufgetrennt. Fluoreszierende Proteine im aufzutrennenden Proteingemisch können nach Ablauf der

BN-PAGE mit Hilfe des Fluoreszenzscanners *Typhoon gel imager* (Amersham Biosciences) sichtbar gemacht werden. Bei den durchgeführten BN-PAGE wurden Zelllysate (2.9.1) von transient transfizierten HEK293T Zellen (2.8.1), welche teilweise vor Lyse stimuliert wurden (2.8.2), verwendet. Die Lysate wurden mit 1/5 Volumen 5x Probenpuffer versetzt, der Coomassie enthielt. Die Proteine wurden in Gradienten-Polyacrylamid-Gelen aufgetrennt (4%-20%) oder in einem durchgehend 8 prozentigen Polyacrylamid-Gel und die Elektrophorese in einer Biometra-Kammer bei 120 V über 18 h durchgeführt. 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.

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 Vernetzung von Proteinen mit dem *crosslinker* BS³

Bei dem *crosslinker* BS³ (Thermon Scientific, *Pierce products*, USA) handelt es sich um einen homobifunktionalen, wasserlöslichen, nicht spaltbaren und nicht membranpermeablen *crosslinker*. Dieser besitzt im Abstand von 11,4 Å zwei amino-reaktive N-hydroxysulfosuccinimid-Gruppen, die mit primären Aminen reagieren können. Der optimale pH Bereich für diese Reaktion liegt bei pH 8. Für die Experimente wurde das Medium von transient transfizierten HEK293T Zellen (2.8.1) 48 h nach Transfektion gegen 5 ml PBS⁺⁺ pH 8 nach dreimaligem Waschen mit PBS⁺⁺ pH 8 und einer Temperatur von 20°C ausgetauscht. Dadurch konnten unspezifische Reaktionen des *crosslinkers* mit Proteinen im Medium vermieden werden. Anschließend erfolgte bei einem Teil der Zellen

eine Stimulation mit IL-6, IL-6 + sgp80 oder LIF in PBS⁺⁺ pH 8 für 15 min. Darauf folgend wurde der *crosslinker* in einer Endkonzentration von 1 mmol zu den Zellen gegeben. 30 min nach Zugabe wurden die reaktiven Gruppen des *crosslinkers* durch Zufügen der Stopplösung in einer Endkonzentration von 0,02 mol gesättigt. Dieser Reaktion wurde 10 min Zeit gelassen bis die Zellen in ein Falcon überführt und bei 1000 rpm für 5 min zentrifugiert wurden. Anschließend wurden die Zellen lysiert (2.9.1) und die Lysate mittels SDS-PAGE (2.9.3), *western-blotting* (2.9.4) und ECL-Immundetektion (2.9.5) untersucht.

PBS ⁺⁺ pH 8	1 mM MgCl ₂ 0,1 mM CaCl ₂ gelöst in PBS, mit NaOH auf pH 8,0 titriert
Stopplösung	1M Tris pH 7,4

2.10 Methoden ohne Zellyse

2.10.1 BiFC Fluoreszenz Messung mittels FACS

Zellen wurden wie unter 2.8.3 beschrieben kultiviert und anschließend nach Waschen mit PBS in FACS Puffer aufgenommen und in ein FACS Röhrchen überführt, dies geschah mit Kühlung auf Eis. Die Messung der Fluoreszenz erfolgte an einem Facscalibur Gerät (Becton-Dickinson), wobei Laserlicht der Wellenlänge 488 nm zur Anregung genutzt wurde und die Detektion über einen 515-545 nm Bandpassfilter geschah. Pro Messung wurden 10000 bis 50000 Zellen analysiert.

FACS Puffer	5% FCS 15 mM Na-Azid gelöst in PBS
-------------	--

2.10.2 Konfokale Mikroskopie

2.10.2.1 Herstellung einer Paraformaldehydlösung

Zur Herstellung einer 3 prozentigen Paraformaldehydlösung wurden 3 g Paraformaldehyd in 60 ml Wasser gegeben. Die Suspension wurde unter Rühren bei 60°C mit NaOH

Ammoniumchloridlösung 50 mM NH₄Cl
gelöst in PBS⁺⁺

2.10.2.4 Konfokale Bildaufnahme

Die mikroskopische Analyse der fluoreszierenden Proteine in Zellen erfolgte an einem konfokalen *laser-scanning* Mikroskop des Typs Zeiss LSM510 (Zeiss, Deutschland). Das Mikroskop war mit einem Argonionen Laser und einen Helium-Neon Laser ausgestattet. Der Argonionen Laser kann Licht der Wellenlängen 458, 488 und 514 nm gleichzeitig emittieren, bei einer maximalen Leistung von 25 mW. Diese Leistung kann im Bereich von 25-100% der 25 mW geregelt werden. Der Helium-Neon Laser emittiert Licht der Wellenlänge 543 nm bei einer festen Leistung von 5 mW.

Für die Bildaufnahmen wurde ein 63-fach vergrößerndes, wasserkorrigiertes Objektiv mit einer numerischen Apertur von 1,2 vom Typ Zeiss C-Apochromat 63/1.2w Korr. (Zeiss, Deutschland) verwendet, es sei denn es ist anders im Text vermerkt. Für die Anregung von CFP wurde auf die 458 nm Linie des Argon-Ionen Lasers und einen 458 nm Hauptfarbteiler zurückgegriffen. Die Detektion der CFP-Emission erfolgte mit einem 470-490 nm Bandpassfilter. Durch das enge Detektionsband werden Signale der Emmission von YFP, das auch mit 458 nm angeregt werden kann, abgeschirmt. Für die Anregung von YFP wurde auf die 514 nm Linie des Argon-Ionen Lasers und einen 514 nm Hauptfarbteiler zurückgegriffen. Die Detektion der YFP-Emission erfolgte mit einem 530-600 nm Bandpassfilter. CFP wird durch Licht mit einer Wellenlänge von 514 nm nicht angeregt. Die Verwendung unterschiedlicher Anregungswellenlängen und geeigneter Filtersysteme ermöglichte die aufeinanderfolgende, getrennte Detektion von CFP und YFP in einer Probe mit den beschriebenen Strahlengängen (*Multi-tracking*, Zeiss, Deutschland). Das resultierende Zweikanalbild ist eine Überlagerung der Einzelbilder der CFP- und der YFP-Fluoreszenz.

Der Durchmesser der konfokalen Blende war bei allen Aufnahmen, wenn nicht anders vermerkt, in Abhängigkeit von der Anregungswellenlänge auf eine *Airy Unit* eingestellt. Für die verwendeten Anregungswellenlängen ergibt diese Einstellung eine Ebenenschichtdicke der konfokalen Aufnahmen von ca. 1 µm.

2.10.2.5 Konfokale Mikroskopie lebender Zellen

Transient transfizierte HEK293T Zellen (2.8.1) wurden 24 h nach der Transfektion in 12-well Zellkulturschalen auf 18 mm Deckgläschen ausgesät. 48 h nach der Transfektion erfolgte die Umsetzung der Deckgläschen in eine selbstgebaute geschlossene Perfusionskammer. Die Perfusionskammer wurde mit auf 37°C erwärmtem DMEM^{+/+} Medium gefüllt und durch eine elektrische Heizmatte temperiert. Das im Fall der Lebendzellmikroskopie ausschließlich verwendete 63-fach vergrößernde Wasserimmersionsobjektiv wurde durch einen elektrischen Objektivheizring ebenfalls auf 37°C erwärmt. Damit wurde ein Wärmeverlust der Zellschicht auf dem nur ca. 0,16 mm starken Deckgläschen über den Wassertropfen zum Objektiv hin vermieden.

2.10.2.6 FRAP-Messungen

Tangentiales Bleichen einer seitlichen Plasmamembranregion kennzeichnet die zur Ermittlung der Fluoreszenzwiederkehr angewandte FRAP-Methode (*fluorescence recovery after photobleaching*). Der Strahlengang zur Detektion der YFP- und CFP Fluoreszenz wurde zu dem im Kapitel 2.10.2.4 beschriebenen Vorgehen folgendermaßen abgeändert: Die Anregung erfolgte im *multi-track* Modus mit den beschriebenen Wellenlängen (458 nm und 514 nm), jedoch ließ der Hauptfarbteiler sowohl Licht der Wellenlänge 458 nm wie 514 nm durch. Die Detektion der CFP Fluoreszenz erfolgte wie beschrieben mit einem 470-490 nm Bandpassfilter im ersten Kanal, die Detektion der YFP Fluoreszenz erfolgte im Detektionsbereich von 531-605 nm des Meta-Detektors (Zeiss, Meta-System) im zweiten Kanal. Dem Metadetektor war ein Nebenfarbteiler vorgeschaltet, der nur Licht der Wellenlängen über 515 nm durchließ. Dadurch konnte die Zeit, die für eine Aufnahme gebraucht wurde, gesenkt werden, da während der einzelnen *tracks* der Aufnahme die Filter nicht gewechselt werden mussten, sondern lediglich die Wellenlänge des Lasers und der detektierende Kanal. Der Durchmesser der konfokalen Blende in diesem Strahlengang war so gewählt, dass sich eine Schichtdicke von 2 µm ergab. Nach 5 Aufnahmen einer kreisförmigen Region (*region of interest*, kurz ROI) von 1,3 µm Durchmesser an der Plasmamembran in einer Zeitserie mit einer Aufnahme pro Sekunde, wurde dieses ROI (ROI 1) gebleicht. Diese Form des Bleichens kann als tangentiales Bleichen bezeichnet werden, da der Laserstrahl nur auf die seitliche Plasmamembran der untersuchten Zellen gerichtet ist. Nach dem Bleichen wurde die Zeitserie fortgesetzt und die Fluoreszenzwiederkehr in 35 weiteren Messungen aufgezeichnet. Ein zweites ROI an der Plasmamembran (ROI 2) wurde in gleicher Weise wie das ROI 1 behandelt, aber nicht

geblichen. Dieses zweite ROI diente der Registrierung zellulärer Bewegungen und bleichunabhängiger Fluoreszenzfluktuationen während der insgesamt 40 Bilder umfassenden Zeitserie. Zur Bestimmung der Hintergrundfluoreszenz wurde ein drittes ROI (ROI 3) auf eine Fläche außerhalb der Zellen platziert. Das ROI 2 und 3 besaßen den gleichen Durchmesser wie das ROI 1. Für die Bilder der Zeitserie und das Bleichen wurden 80% der verfügbaren Laserleistung von 25 mW genutzt. Eine Transmissionseinstellung von 1% (514 nm) bzw. 17% (458 nm) verminderte die Anregungsleistung zur Bildaufnahme. Für das Bleichen nach der 5. Aufnahme der Zeitserie wurde die Transmission beider Laserwellenlänge auf 100% geöffnet. Zum Bleichen des ROI 1 wurden 100 Iterationen der Laserabtastung durchgeführt. Die gesamte Bleichdauer des ROI 1 betrug 1,7-1,8 s. Bei der Bildaufnahme und beim Bleichen war die Abtastgeschwindigkeit auf eine Pixelzeit von 6,4 μ s eingestellt. Der elektronische Vergrößerungsfaktor betrug 2,1. Aufgrund der geringen Laserleistung und der kurzen Pixelzeit während der Bildaufnahme blieb der Bleicheffekt durch die Bildaufnahme während der 40 Aufnahmen der Zeitserie vernachlässigbar klein. Am Sekundärelektronenvervielfacher (*Photo Multiplier Tube* = PMT) lag während der Bildaufnahme eine Spannung von 770 V für den YFP Kanal und 1020 V für den CFP Kanal an. Die durchschnittlichen Fluoreszenzintensitäten innerhalb der ROIs einer jeden Messung wurden zur Auswertung in das Programm Microsoft Excel (Microsoft, USA) übertragen und die Intensität der Hintergrundfluoreszenz abgezogen.

Um den Einfluss der Immobilisierung von gp130 durch Paare monoklonaler Antikörper auf andere fluoreszierende Proteine zu untersuchen, wurden die Zellen in der Perfusionskammer mit den Antikörpern BT2 und BP4 oder BS12/G7 und BP8 (2.3) in einer Konzentration von jeweils 10 μ g/ml behandelt. Die Immobilisierungsexperimente wurden durch den Vergleich der erzeugten Kurven der Fluoreszenzwiederkehr ausgewertet. Eine nur geringe Erhöhung der Fluoreszenzintensitäten nach dem Bleichen deutete auf ein hohes Maß an Immobilisierung hin. Dabei wurden der Mittelwert der ersten 5 Messungen (vor dem Bleichen) nach Subtraktion der Hintergrundfluoreszenz als 100% gesetzt und der erste Wert nach dem Bleichen (6. Messung) als 0%. Alle weiteren Werte wurden in Relation zu diesen Werten aufgetragen.

2.10.2.7 FRET-Messungen

Die FRET-Effizienz wurde anhand der Donorfluoreszenzveränderung nach Ausbleichen des Akzeptors („*acceptor photobleaching*“) bestimmt [72, 84]. Die Messung und

Auswertung der FRET-Effizienz wurde in Anlehnung an die von Karpova *et al.* [73] vorgeschlagene Methode mit modifizierten Aufnahme- bzw. Auswertungswegen durchgeführt. Nach 48 h transienter Expression der zu untersuchenden Fusionsproteine wurden HEK293T-Zellen fixiert und eventuell 15 Minuten zuvor stimuliert. Zur Bildaufnahme während der FRET-Messung wurde der *multi-track* Modus verwendet, wodurch eine strikte Trennung der YFP von der CFP Fluoreszenz und umgekehrt möglich war. Da während der Arbeit der Laser des *laser-scanning* Mikroskopes ausgetauscht werden musste erfolgten die Messungen zur Stöchiometrie der Rezeptoren gp130 und gp80 (siehe 3.2.6.2) unter folgenden Bedingungen:

Modus:	<i>Multi-track</i>
Anregung:	458 nm für CFP 514 nm für YFP
Leistung des Lasers:	40% von 25 mW des Argonlasers
Transmission:	6% für CFP (458 nm) 0,3% für YFP (514 nm)
Hauptfarbteiler:	458 nm und 514 nm
Detektion:	470-490 nm Bandpassfilter für die CFP-Fluoreszenz 530-600 nm Bandpassfilter für die YFP-Fluoreszenz
Verstärkungsspannung	900 V für den CFP-Kanal 650 V für den YFP-Kanal

Alle weiteren FRET-Messungen erfolgten nach dem Austausch des Lasers unter diesen Bedingungen:

Modus:	<i>Multi-track</i>
Anregung:	458 nm für CFP 514 nm für YFP
Leistung des Lasers:	60% von 25 mW des Argonlasers
Transmission:	14% für CFP (458 nm) 0,6% für YFP (514nm)
Hauptfarbteiler:	458 nm und 514 nm
Detektion:	470-490 nm Bandpassfilter für die CFP-Fluoreszenz 530-600 nm Bandpassfilter für die YFP-Fluoreszenz

Verstärkungsspannung: 900 V für den CFP-Kanal
650 V für den YFP-Kanal

Unabhängig von diesen mikroskopischen Einstellungen verliefen alle FRET Experimente gleich. Zum Akzeptor Bleichen wurde nach der zweiten der insgesamt 4 Aufnahmen einer FRET-Messreihe der Akzeptor mit der 514 nm Laserlinie des Argon-Ionen Lasers (100 Iterationen) gebleicht. Dabei betrug die Transmission 100%. Bei der gesamten FRET-Messreihe waren die Lochblenden des CFP- und des YFP-Kanals auf eine Ebenenschichtdicke von 1,5 μm eingestellt. Der elektronische Zoomfaktor von 2,9 und das verwendete 63-fach vergrößernde, wasserkorrigierte Objektiv in Verbindung mit einer Bildgröße von 256 x 256 Pixeln bedingen eine Pixelgröße von 0,2 x 0,2 μm . Alle Aufnahmen der Bilderserie wurden ohne Pausenzeiten direkt nacheinander aufgenommen, dabei betrug die Pixelzeit 6,4 μs . Die mittleren CFP und YFP Fluoreszenzintensitäten einer FRET-Messreihe wurden in drei ROIs erfasst. Mit dem ersten ROI (ROI 1) wurde ein Teil der Plasmamembran einer Zelle umrissen. Die mittlere Fluoreszenzintensität (I) des CFP und des YFP wurden innerhalb des ROI vor und nach dem Ausbleichen des YFP in insgesamt vier Aufnahmen (I1-I4) bestimmt. Aus der Differenz der Intensitäten des CFP vor (I2) und unmittelbar nach dem Bleichen des Akzeptors (I3) in dem ROI 1 wurde die Effizienz des FRET (FRET-Effizienz, Ef) nach Lakowicz (Gl. 1) [85] unter Berücksichtigung der Hintergrundfluoreszenz prozentual berechnet (Gl. 2).

$$E_f = 1 - (I_2/I_3) \quad \text{Gl. 1}$$

$$E_f = (I_3 - I_b) - (I_2 - I_b) * 100 / (I_3 - I_b) \quad \text{Gl. 2}$$

I_b bezeichnet die mittlere Fluoreszenzintensität des Hintergrundes in einer ROI neben den untersuchten Zellen (ROI 3).

An einer fixierten Zelle wurde jeweils nur eine FRET-Messung durchgeführt. In die Auswertung der Messergebnisse wurden nur Zellen einbezogen, deren Verhältnis von Donor zu Akzeptorfluoreszenzintensität und Gesamtfluoreszenz vergleichbar waren.

2.11 Statistik

2.11.1 Prüfung der Signifikanz der BiFC Experimente

Die Signifikanz der Unterschiede der Mittelwerte zweier Messwertgruppen wurde mit einem t-Test im Programm Microsoft Excel (Microsoft, USA) ermittelt. Dabei wurde als Nullhypothese die Annahme zugrunde gelegt, dass die Mittelwerte beider Stichproben identisch sind. Zwei Mittelwerte wurden als signifikant unterschiedlich betrachtet, wenn die Nullhypothese mit einer Fehlerwahrscheinlichkeit von $p \leq 0,05$ zurückgewiesen werden konnte. Dabei wird ein $p < 0,05$ als signifikanter Unterschied, ein $p < 0,01$ als hochsignifikanter Unterschied gewertet.

2.11.2 Prüfung der Signifikanz der FRET Experimente 3.2.6.1

Die Signifikanzüberprüfung auf Unterschiede in der FRET-Effizienz durch Stimulation oder Rezeptormutation erfolgte durch Einweg-Varianzanalysen gegen jeweils eine der drei Kontrollen als globaler Test (Positivkontrolle: gp130id-CYFP, Negativkontrollen: gp130id-CFP + YFP und gp80-CFP + YFP). Falls der globale Test einen signifikanten p-Wert < 0.05 ergab, wurden die 6 Konstrukte jeweils paarweise mit der entsprechenden Kontrolle verglichen. Weiterhin wurden auch die 4 Stimulationsgruppen untereinander sowie jeweils gegen eine der beiden Rezeptormutationsgruppen in gleicher Weise statistisch auf Unterschiede geprüft.

Um die Aussagekraft obiger statistischer Auswertung bezüglich der FRET-Effizienz zu beurteilen, wurden die Gruppen auch bezüglich des Verhältnisses und der Dichte statistisch untersucht. Alle 9 FRET-Kombinationen wurden auf Unterschiede in dem Verhältnis global mit einer Einweg-Varianzanalyse geprüft. Falls der globale Test einen signifikanten p-Wert < 0.05 ergab, wurden alle Gruppen jeweils paarweise mit der Positivkontrolle verglichen, da die Positivkontrolle Äquimolarität angibt und daher als Vergleichsgröße dient. Auf Unterschiede der 6 Rezeptorkombinationen in der Dichte wurde durch Einweg-Varianzanalysen gegen jeweils eine der drei Kontrollen (oben erwähnt) als globaler Test geprüft. Falls der globale Test einen signifikanten p-Wert < 0.05 ergab, wurden die 6 Rezeptorkombinationen jeweils paarweise mit der entsprechenden Kontrolle verglichen. Weiterhin wurden auch die 6 Rezeptorkombinationen untereinander in gleicher Weise auf Unterschiede getestet.

2.11.3 Prüfung der Signifikanz der FRET Experimente 3.2.6.2

Die Signifikanzprüfung auf Unterschiede in der FRET-Effizienz durch Fluorophoraustausch erfolgte jeweils paarweise innerhalb einer Stimulationsgruppe durch Einweg-Varianzanalysen. Um die Aussagekraft obiger statistischer Auswertung bezüglich der FRET-Effizienz zu beurteilen, wurden die Gruppen auch bezüglich des Verhältnisses und der Dichte statistisch untersucht. Alle 9 FRET-Kombinationen wurden auf Unterschiede in dem Verhältnis global mit einer Einweg-Varianzanalyse geprüft. Falls der globale Test einen signifikanten p-Wert < 0.05 ergab, wurden alle Gruppen jeweils paarweise mit der Positivkontrolle verglichen, da die Positivkontrolle Äquimolarität angibt und daher als Vergleichsgröße dient. Die Untersuchung auf Unterschiede in der Dichte erfolgte entsprechend dem Prozedere der Prüfung der FRET-Effizienzen.

2.11.4 Standardabweichung

Die Standardabweichung der Messwertgruppen wurde als Standardabweichung einer Stichprobe aus einer Grundgesamtheit im Programm Microsoft Excel (Microsoft, USA) berechnet und ist in den Diagrammen als Linie mit Endstrich dargestellt.

3 Ergebnisse

In dieser Arbeit werden Interaktionen des Zytokinrezeptors gp130 mit seinen Korezeptoren untersucht. Dabei steht die Untersuchung der Wechselwirkung zwischen gp130 und gp80 im Vordergrund. Es soll überprüft werden, ob Interaktionen zwischen den Rezeptoren nur durch das Zytokin vermittelt werden oder auch stimulationsunabhängig stattfinden.

Der erste Abschnitt dieses Kapitels beschäftigt sich ausschließlich mit Experimenten, bei denen Zellen lysiert wurden. Der zweite Abschnitt dagegen behandelt Experimente, die an intakten Zellen durchgeführt wurden. Es werden dort vorrangig Versuche beschrieben, die an dem konfokalen *laser-scanning* Mikroskop durchgeführt wurden. Schwache Protein-Interaktionen zweier Rezeptoren können *per se* zu instabil sein, um die Lyse der Zellen mit Detergens zu überstehen. Das ist im Besonderen denkbar für gp130, da es sich zum einen um ein Transmembranprotein handelt, wodurch es natürlicherweise von der Lyse mit einem Detergens stark betroffen ist. Zum anderen aber interagiert dieser Rezeptor mit einer Vielzahl von Korezeptoren, wodurch starre Bindungsverhältnisse in diesem System eher vom Nachteil wären. Daher ist es auch möglich, dass sich an lysierten Zellen keine Interaktionen feststellen lassen, an intakten Zellen aber sehr wohl.

3.1 Untersuchungen an Zelllysaten

3.1.1 Koimmunpräzipitation von gp130 und gp80

Eine klassische biochemische Methode zur Analyse von Proteininteraktionen ist die Koimmunpräzipitation zweier Proteine. Um eine Wechselwirkung zwischen gp130 und gp80 nachzuweisen, wurden HEK293T Zellen transient mit Expressionsvektoren für gp130fl-YFP sowie gp80fl oder gp130fl sowie gp80-YFP transfiziert. Dabei ist mit "fl" "*full length*" gemeint, also das gesamte Protein wie es natürlicherweise exprimiert wird, Gp80-YFP ist gegenüber dem natürlichen gp80 um wenige zytoplasmatische Aminosäuren verkürzt und C-terminal mit dem *yellow fluorescent protein* (YFP) fusioniert. Nach 48 Stunden wurden die Zellen mit 0,5% Triton X-100 Phosphatpuffer lysiert und die Fusionsproteine mittels eines YFP Antikörpers präzipitiert. Die präzipitierten Proteine wurden mit einer SDS-PAGE aufgetrennt, geblottet und es folgte eine Analyse mit spezifischen Antikörpern sowie HRP-konjugierten Sekundärantikörpern.

Lediglich nach einer der Lyse vorangegangenen IL-6 Stimulation konnte eine

Koimmunpräzipitation der Rezeptoren beobachtet werden (s. Abb. 13, unterer Blot, Spur 6). Diese Kopräzipitation gelang nur für die Transfektion von gp130fl-YFP und gp80fl, was höchstwahrscheinlich an dem geringen Signal des Detektionsantikörpers für gp130 lag, das zu schwach für den Nachweis des kopräzipitierten gp130 bei der Immunpräzipitation von gp80-YFP war. Gp130 und gp80 bilden somit erst durch die Stimulation mit IL-6 einen Komplex aus, der stabil genug ist, die Lyse der Zellen zu überstehen.

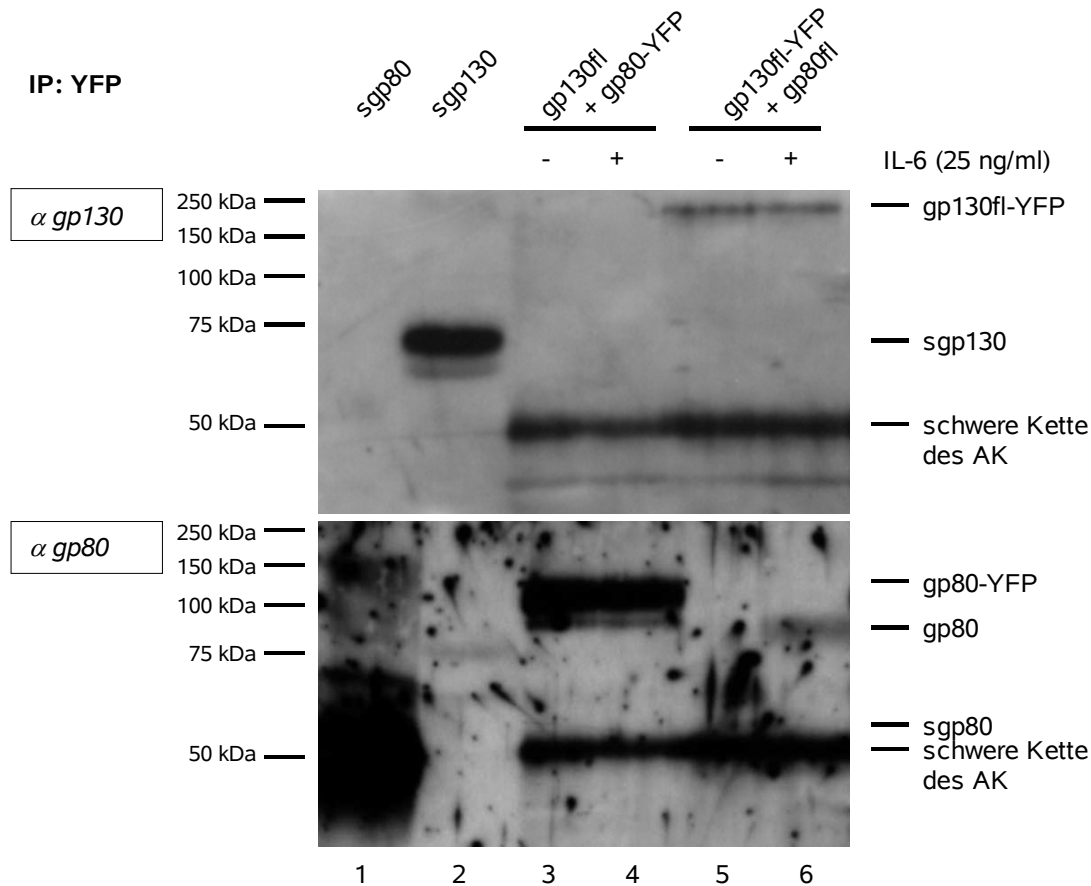


Abbildung 13: Koimmunpräzipitation von gp130 mit gp80

HEK293T Zellen wurden transient mit pSVL Expressionsvektoren für die angegebenen Rezeptoren transfiziert. 48 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen für 30 Minuten mit 25 ng/ml IL-6 stimuliert oder unstimuliert belassen. Anschließend wurden die Zellen mit 0,5% Triton X-100 Phosphatpuffer lysiert. Es folgte eine Immunpräzipitation mit einem GFP-Antikörper gekoppelt an Protein A Sepharose. Die Protein-Komplexe wurden dann von der Protein A-Sepharose eluiert und mittels SDS-PAGE und Western blotting aufgetrennt. Die Detektion erfolgte mit einem gp80- oder gp130-Antikörper. Als Detektionskontrolle wurden sowohl 100 ng lösliches gp80 als auch 100 ng lösliches gp130 aufgetragen.

3.1.2. BN-PAGE Untersuchungen des IL-6 Rezeptorkomplexes

Im folgenden Experiment wurde die native Gelelektrophorese verwendet, um zu prüfen, ob gp130 und gp80 in der Abwesenheit von IL-6 interagieren. Bei der blauen nativen Polyacrylamid Gelelektrophorese (BN-PAGE) handelt es sich um ein nicht denaturierendes Proteinauftrennungsverfahren, bei dem der blaue Farbstoff Commassie anstelle von SDS verwendet wird, um die Eigenladung der Proteine zu überdecken. Die feuchten Gele können direkt nach der Elektrophorese mittels eines Fluoreszenz Scanners analysiert werden. Somit ist es möglich, YFP gekoppelte Proteine in ihrer Quartärstruktur direkt im Gel zu detektieren. Es wurden HEK293T Zellen transient mit Vektoren für gp130fl-YFP und gp80-YFP transfiziert und nach 48 Stunden entweder mit 0,5% Triton X-100 oder mit 0,5% Brij-96 gelöst in Phosphatpuffer lysiert. Die Volllysate wurden mittels BN-PAGE aufgetrennt und am Fluoreszenz Scanner analysiert. Bei beiden eingesetzten Detergenzien konnte nur nach einer der Lyse vorangegangener Stimulation mit IL-6 ein höhermolekularer Komplex beobachtet werden (s. Abb. 14A und 14B, jeweils Spuren 5 und 6). Wenn die Zellen lediglich gp130fl-YFP (Spuren 3 und 4) oder gp80-YFP (Spuren 1 und 2) exprimierten, konnte durch die Stimulation mit IL-6 und bei gp130fl-YFP zusätzlich mit löslichem gp80 (sgp80) keine Komplexierung im nativen Blaugel festgestellt werden. Wie zuvor bei der Koimmunpräzipitation gezeigt, bildet sich erst durch die Stimulation mit IL-6 ein Komplex zwischen gp130 und gp80 aus, der stabil genug ist, die Lyse zu überstehen. Außerdem scheint es, dass der Komplex aus rein membrangebundenen Rezeptoren und IL-6 stabiler ist, als ein Pendant mit IL-6 und löslichem gp80.

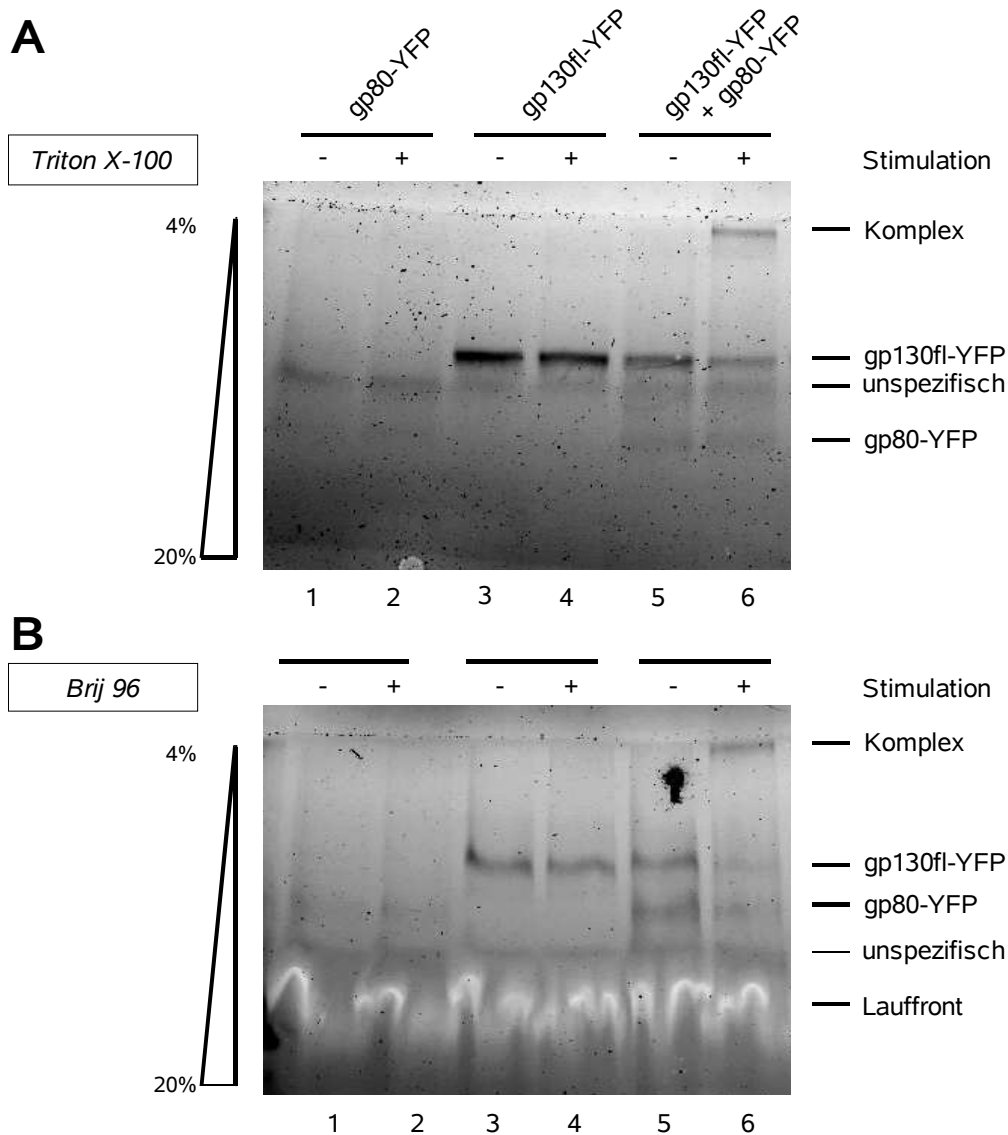


Abbildung 14: BN-PAGE von gp130-gp80 Komplexen

HEK293T Zellen wurden transient mit pSVL Vektoren wie in der Abbildung angegeben transfiziert. 48 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen für 30 Minuten stimuliert worauf die Lyse erfolgte.

A. Es wurde mit 25 ng/ml IL-6 + 1 µg/ml lösliches gp80 (für gp130fl-YFP) oder nur mit 25 ng/ml IL-6 (für gp80-YFP und gp80-YFP + gp130fl-YFP) stimuliert und mit 0,5% Triton X-100 gelöst in Phosphatpuffer lysiert. Die Proben wurden auf ein natives Blaugel mit einem 4%-20% Polyacrylamid Gradienten aufgetragen. Nach dem Lauf wurde das feuchte Gel mittels des Typhoonscanners analysiert. Fluoreszenz wird von der Software schwarz dargestellt.

B. Die Zellen wurden wie in A beschrieben behandelt, aber mit Phosphatpuffer mit 0,5% Brij 96 lysiert. Die Behandlung des Gels erfolgte wie in A beschrieben.

Um der Frage nach einer Stimulationsabhängigkeit der Interaktion von gp130 mit dem leukemia inhibitory factor Rezeptor (LIFR) nachzugehen, also einem Rezeptor für ein anderes IL-6 Typ Zytokin, wurden HEK293T Zellen transient mit Vektoren für gp130fl-YFP

und LIFRfl transfiziert. Nach 48 Stunden wurden die Zellen mit 0,5% Triton X-100 gelöst in Phosphatpuffer lysiert. Die Lysate wurden wie oben beschrieben mittels BN-PAGE analysiert. Erst nach vorangegangener Stimulation mit dem *leukemia inhibitory factor* (LIF) bildete sich ein Rezeptorkomplex aus (s. Abb. 15). Somit ist auch für gp130 und dem LIFR die Stimulation für die Ausbildung eines stabilen Komplexes nötig

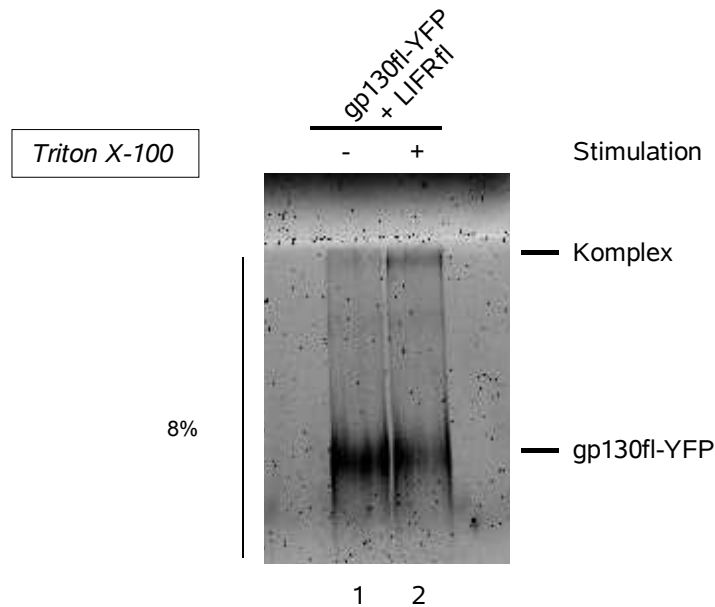


Abbildung 15: BN-PAGE von gp130-LIFR Komplexen

HEK293T Zellen wurden transient mit pSVL Vektoren wie in der Abbildung angegeben transfiziert. 48 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen für 30 Minuten stimuliert worauf die Lyse erfolgte. Die Zellen wurden mit 20 ng/ml LIF stimuliert und mit 0,5% Triton X-100 gelöst in Phosphatpuffer lysiert. Die Proben wurden mit einer 8% BN-PAGE aufgetrennt. Nach dem Lauf wurde das feuchte Gel mittels des Typhoonscanners analysiert. Fluoreszenz wird von der Software schwarz dargestellt.

3.1.3 Vernetzung von gp130 durch den *crosslinker* BS³

Die vorangegangenen Experimente zeigten eine klare Stimulationsabhängigkeit für die Ausbildung von Rezeptorkomplexen, die nach Zellyse nachweisbar sind. Um eventuelle stimulationsunabhängige schwache Bindungen zwischen den Rezeptoren zu stabilisieren eignen sich *crosslinker*, die vor der Lyse dem Medium der Zellen zugegeben werden.

Um schwächere Interaktionen von gp130 mit anderen IL-6 Typ Zytokinrezeptoren nachzuweisen, wurde in dieser Arbeit der *crosslinker* BS³ benutzt. BS³ ist ein nicht membranpermeabler, wasserlöslicher *crosslinker*, der zwei Amino-reaktive Gruppen im Abstand von 11,4 Å (= 1,14 nm) besitzt. Diese Gruppen reagieren mit primären Aminen,

wie sie in der Seitenkette der Aminosäure Lysin zu finden sind, und bilden mit diesen eine kovalente Amidbindung aus. HEK293T Zellen wurden transient mit Vektoren für gp130fl und zusätzlich wahlweise für gp130id-YFP, gp80-YFP oder LIFRid-CFP kotransfiziert. Bei id-Konstrukten handelt es sich um zytoplasmatisch verkürzte Rezeptoren, die dadurch internalisierungsdefizient sind und sich somit an der Plasmamembran anreichern. Das Medium der Zellen wurde nach drei Waschschrritten gegen PBS⁺⁺ (PBS mit 10 mM CaCl₂ und 100 mM MgCl₂) ersetzt, um unspezifische Bindungen mit gelösten Proteinen zu minimieren. Dem PBS wurde Calcium und Magnesium zugesetzt, um die Bindung der Zellen über Integrine an der Kulturschale zu unterstützen. 15 Minuten nach Stimulation wurde BS³ zu den Zellen gegeben. Kontrollzellen wurden nicht mit dem *crosslinker* behandelt. Die Lyse erfolgte mit einem 0,5% Triton X-100 Phosphatpuffer nach vorangegangener Sättigung des *crosslinkers* mit Ammoniumchlorid. Die Proteine wurden mit einer SDS-PAGE aufgetrennt, geblottet und es folgte eine Analyse mit spezifischen Antikörpern sowie HRP-konjugierten Sekundärantikörpern. Sowohl mit als auch ohne Stimulation reduzierte sich der Anteil der als Monomere vorhandenen Rezeptoren durch die *Crosslinker*behandlung. Es bildeten sich Komplexe mit einer Größe über 250 kDa aus, unabhängig von der Rezeptorkombination (s. Abb. 16, Spuren 3 und 4, 7 und 8, sowie 12 und 13). Eine vorherige Stimulation der Zellen mit dem entsprechenden Zytokin für die Rezeptorkombination zeigte keinen Effekt auf die Vernetzung zu höhermolekularen Komplexen durch den *crosslinker*. Dieses Experiment zeigt, dass gp130 im unstimulierten Zustand im Komplex mit anderen Proteinen in der Membran vorliegt. Da das Medium während der *Crosslinker*behandlung als frei von gelösten Proteinen angesehen werden kann, der *crosslinker* nicht membranpermeabel ist und vor der Lyse gesättigt wurde, muss es sich um Interaktionen mit weiteren Transmembranproteinen handeln, die eine Extrazellulärdomäne besitzen.

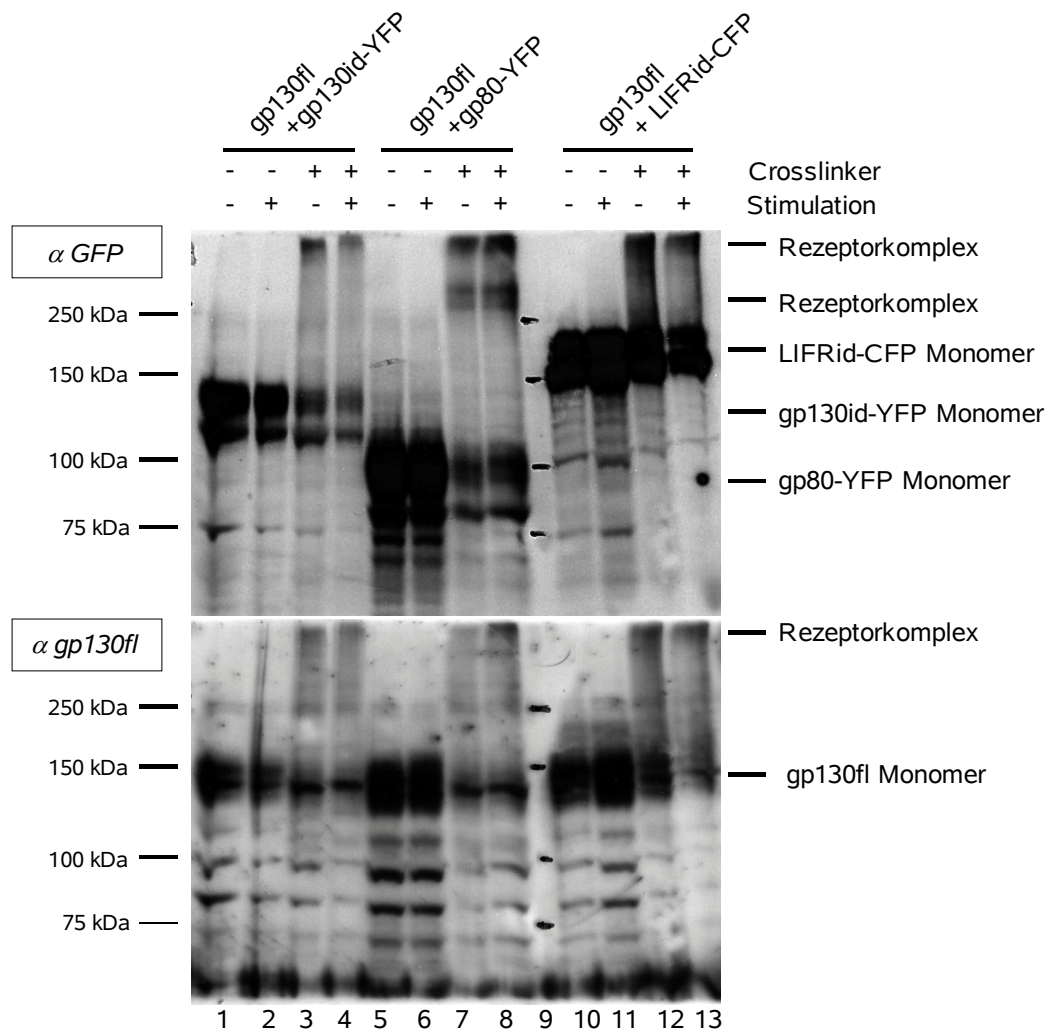


Abbildung 16: Einfluss des crosslinker BS³ auf die Komplexierung von gp130

HEK293T Zellen wurden transient mit pSVL Vektoren für die angegebenen Rezeptoren transfiziert. 48 Stunden nach Transfektion wurde das Medium durch PBS⁺⁺ ersetzt. Die Zellen wurden anschließend mit 25 ng/ml IL-6 + 1 μ g/ml lösliches gp80 (für gp130id-YFP + gp130fl), mit 25 ng/ml IL-6 (für gp80-YFP + gp130fl), mit 20 ng/ml LIF (für LIFRid-CFP + gp130fl) stimuliert oder unstimuliert belassen. 15 Minuten nach Stimulation wurden die Zellen wie in der Abbildung angegeben mit 1 mmol BS³ für 30 Minuten bei 20°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit 0,5% Triton X-100 Phosphatpuffer lysiert. Die Volllysate wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Nach Western blotting wurde sowohl mit GFP- und gp130-Antikörpern detektiert.

Nach Lyse der Zellen ist also eine Interaktion von gp130 zu anderen Rezeptoren nur festzustellen, wenn diese vorher entweder durch eine kovalente Vernetzung durch einen *crosslinker* oder durch das zum jeweiligen Korezeptor von gp130 passende Zytokin gefestigt wird. Im nächsten Teil der Arbeit soll die Interaktion der Rezeptoren an Zellen mit intakter Zellmembran studiert werden. Dazu eignen sich im Besonderen fluoreszenzmarkierte Rezeptoren in Kombination mit der konfokalen *laser-scanning*

Mikroskopie oder der Durchflusszytometrie, da hierbei die Integrität der Zellen für die Messung nicht aufgegeben werden muss.

3.2 Experimente an Zellen mit intakter Zellmembran

3.2.1 Untersuchungen an gp130 Rezeptorkomplexen mittels BiFC

Bei der *bimolecular fluorescence complementation* (BiFC) macht man sich zu Nutze, dass sich N- und C- terminale Hälften eines fluoreszierenden Proteins komplementieren und ein funktionierendes Fluorophor ausbilden können. Dazu müssen die Hälften über einen längeren Zeitraum in direkter Nähe sein, wodurch sie zunächst irreversibel komplementieren. Daran schließt sich die Reifung des Fluorophors an, die durch Inkubation bei 30° Celsius unterstützt werden kann. Schließlich entsteht ein Fluorophor, dessen Fluoreszenzeigenschaften von den Ausgangshälften abhängt [77].

Die zu untersuchenden Proteine werden jeweils mit einer Hälfte eines fluoreszierenden Proteins gekoppelt. Durch die Interaktion der Proteine, gelangen die Fluoreszenzhälften in räumliche Nähe und haben die Zeit, die sie für ihre Komplementierung benötigen. Über die Ausbildung der Fluoreszenz ist ein Rückschluss über die Interaktion der zu untersuchenden Proteine möglich. Siehe dazu auch das Kapitel "*bimolecular fluorescence complementation* (BiFC)" in der Einleitung (1.2.4).

3.2.2 BiFC Untersuchungen mit gp130 und gp80

Zunächst wurde die Heterodimerisierung von gp130 und gp80, den Untereinheiten des IL-6 Rezeptors, untersucht. Dazu wurde ein internalisierungsdefizientes gp130 mit der N-terminalen Hälfte von YFP gekoppelt (gp130id-YN173) und gp80 mit der C-terminalen Hälfte von CFP (gp80-CC155). Das daraus entstehende Fluorophor hat ein Anregungsmaximum bei 503 nm und ein Emissionsmaximum bei 515 nm, wobei die Fluoreszenzintensität relativ gering ist gegenüber einem vollständigen Fluoreszenzprotein. Um zu untersuchen, ob diese Rezeptoren exprimiert werden und sich Fluoreszenz ausbildet, wurde die konfokale *laser-scanning* Mikroskopie benutzt. Es wurden HEK293T Zellen mit den Vektoren für gp130id-YN173 und gp80-CC155 transfiziert. Nach 48 Stunden wurden die Zellen ohne vorherige Stimulation fixiert und untersucht. Abbildung 17 zeigt exemplarisch die Fluoreszenzverteilung dieses BiFC Paares. Vor allem an der Plasmamembran war ein Fluoreszenzsignal festzustellen. Die Proteine werden also an der

Zellmembran exprimiert und es kann BiFC stattfinden. Außerdem zeigt dieses Experiment, dass gp130 und gp80 schon im unstimulierten Zustand interagieren, wobei der Ort dieser Interaktion vorrangig die Plasmamembran ist.

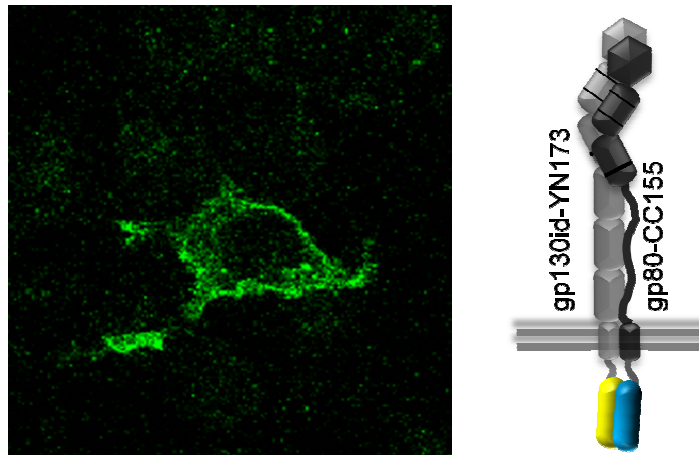


Abbildung 17: Fluoreszenzverteilung von gp130id-YN173 mit gp80-CC155 nach BiFC

HEK293T Zellen wurden transient mit pSVL Vektoren für gp130id-YN173 und gp80-CC155 transfiziert. 30 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen für 18 Stunden bei 30° C inkubiert. Es folgte danach die Bildaufnahme am LSM.

Um jedoch festzustellen, wie sich gesamte Zellpopulationen in Bezug auf ihre BiFC-Fluoreszenz darstellen, ist die Durchflusszytometrie (FACS) besser geeignet als die *laser-scanning* Mikroskopie. Hierbei können nämlich die Eigenschaften einer großen Zellzahl in einer Messung bestimmt werden. Außerdem bedarf es für die FACS Analyse keiner Fixierung der Zellen, sondern die lebenden Zellen können direkt untersucht werden. Das in dieser Arbeit benutzte FACS Gerät (Facscalibur, Becton-Dickinson) besitzt einen Anregungslaser von 488 nm und einen Detektionsfilter von 515-545 nm, womit die BiFC Fluoreszenzen detektiert werden können. Die zu erwartenden Fluoreszenzintensitäten sind aber relativ gering, da die BiFC Fluoreszenz *per se* geringer ist als die der ursprünglichen Fluoreszenzproteine [77] und des Weiteren besitzt das FACS Gerät nicht die optimale Filterausstattung für alle BiFC Konstrukte.

Es wurde nun untersucht, inwiefern sich die Stimulation mit IL-6 auf die Ausbildung der BiFC Fluoreszenz auswirkt. HEK293T Zellen wurden dazu mit Vektoren für gp130id-YN173 und gp80-CC155 kotransfiziert und nach 30 Stunden mit IL-6 stimuliert oder unstimuliert belassen. Als Kontrolle diente eine Einfachtransfektion mit nur einem BiFC-Rezeptorkonstrukt. Die Kontrollzellen wurden nicht stimuliert. 4 Stunden nach Stimulation wurden die Zellen für 18 Stunden bei 30° Celsius inkubiert und daran angeschlossen

erfolgte die FACS Analyse. Die mit beiden Rezeptoren transfizierten Zellen zeigten nahezu ausnahmslos unabhängig von der Stimulation einen gleichwertigen Fluoreszenzanstieg gegenüber der Negativkontrolle (s. Abb. 18A). Die Werte der Einzelmessungen wurden gemittelt und es ergab sich ein hochsignifikanter Unterschied (beide $p=0,0006$) sowohl der unstimulierten Zellen wie auch der stimulierten Zellen zu den Kontrollzellen (s. Abb. 18B). Die unstimulierten Zellen unterschieden sich dagegen nicht signifikant von den stimulierten Zellen ($p=0,387$).

Das Ergebnis ist so zu deuten, dass in intakten Zellen gp130 und gp80 vor wie nach der Stimulation miteinander assoziiert sind, wodurch die Fluorophorhälften daher in beiden Fällen über einen ausreichend langen Zeitraum verfügen, sich zu komplementieren. Dabei ist zu beachten, dass die Halbwertszeit der Komplementation bei 60 Sekunden liegt und es sich daher um eine zeitlich stabile Interaktion handeln muss.

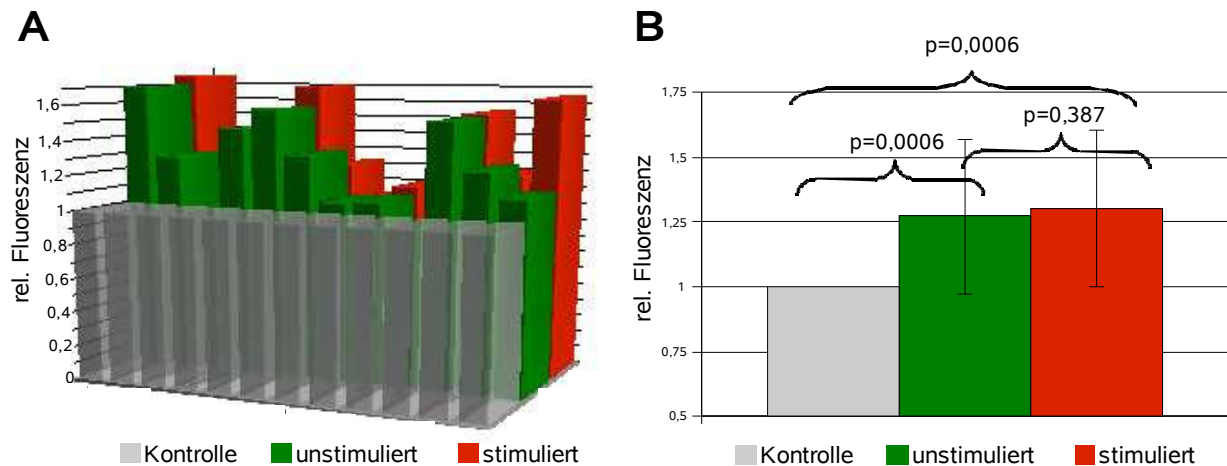


Abbildung 18: Messung der BiFC Fluoreszenz von gp130-gp80 Komplexen mittels FACS Analyse

HEK293T Zellen wurden transient mit pSVL Vektoren für gp130id-YN173 und gp80-CC155 transfiziert oder als Negativkontrolle nur mit gp130id-YN173. 30 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen mit 25 ng/ml IL-6 stimuliert oder unstimuliert belassen. 4 Stunden nach Stimulation wurden die Zellen dann für 18 Stunden bei 30° C inkubiert. Es folgte die Messung der Fluoreszenz am FACS Gerät bei 488 nm Anregungswellenlänge und einer Detektion bei 515 bis 545 nm. Abbildung A zeigt die Mittelwerte der Einzelmessungen an 10.000 bis 50.000 Zellen als Relativwerte zu der Negativkontrolle. Abbildung B zeigt die Mittelwerte aus allen Messungen.

3.2.3 BiFC Untersuchungen mit gp130 und weiteren Rezeptoren

Um zu testen, ob gp130 mit weiteren potenziellen Rezeptorpartnern der IL-6 Typ Zytokinfamilie vor Stimulation längere Assoziationen eingeht, wurde die gp130 Homodimerisierung und die Heterodimerisierung von gp130 mit dem LIFR untersucht. Dazu wurden HEK293T Zellen mit Vektoren für gp130id-YC173 und wahlweise mit Vektoren für gp130id-YN173 oder LIFRid-CN173 kotransfiziert, so dass sich die Fluorophorhälften potenziell komplementieren konnten. Als Negativkontrolle diente die Einfachtransfektion einer der Rezeptoren. Für beide Kombinationen zeigte Dr. Bernd Giese durch Einzelzellaufnahmen, dass die entsprechenden Rezeptoren exprimiert werden und BiFC stattfindet [86]. Die Zellen wurden wie zuvor beschrieben behandelt und der Rezeptorkombination entsprechend mit sgp80 und IL-6 oder mit LIF stimuliert. Die Fluoreszenz der Zellen wurde wieder mit einem FACS Gerät quantifiziert. Im Gegensatz zu dem zuvor beschriebenen Rezeptorpaar gp130-gp80 stieg bei den beiden hier verwendeten Rezeptorpaaren die Fluoreszenz erst durch die Stimulation deutlich an. Die Ergebnisse der Einzelmessungen zeigten nahezu immer einen Anstieg der Fluoreszenz durch die Stimulation (s. Abb. 19, obere Diagramme). Gemittelt unterschieden sich bei diesen Kombinationen lediglich die Fluoreszenzintensitäten der stimulierten Zellen hochsignifikant von der Negativkontrolle. Andererseits unterschieden sich aber bei dem gp130-gp130 Rezeptorpaar auch schon die unstimulierten Zellen einfach signifikant von der Negativkontrolle und die statistische Untersuchung zwischen der unstimulierten und stimulierten Populationen verfehlte nur knapp die statistische Signifikanz bei einem p-Wert von 0,524 (s. Abb. 19, untere Diagramme). Bei der gp130-LIFR Heterodimerisierung zeigte die Stimulation einen signifikanten Effekt mit einem p-Wert von 0,0268.

In intakten Zellen zeigt gp130 somit eine Tendenz zur Homodimerisierung im unstimulierten Zustand, wogegen die Interaktion mit dem LIFR sehr deutlich stimulationsabhängig geschieht. Dieses Phänomen untersuchten Dr. B. Giese und Dr. C. Roderburg eingehend [86]. Außerdem zeigt sich in der Zusammenschau der BiFC Ergebnisse, dass gp130 insbesondere spezifisch mit gp80 eine stimulationsunabhängige Verbindung eingeht, da nur bei diesem Paar, die Fluoreszenz der unstimulierten Zellen so deutlich von der Negativkontrolle abweicht und nur so gering von der der stimulierten Zellen.

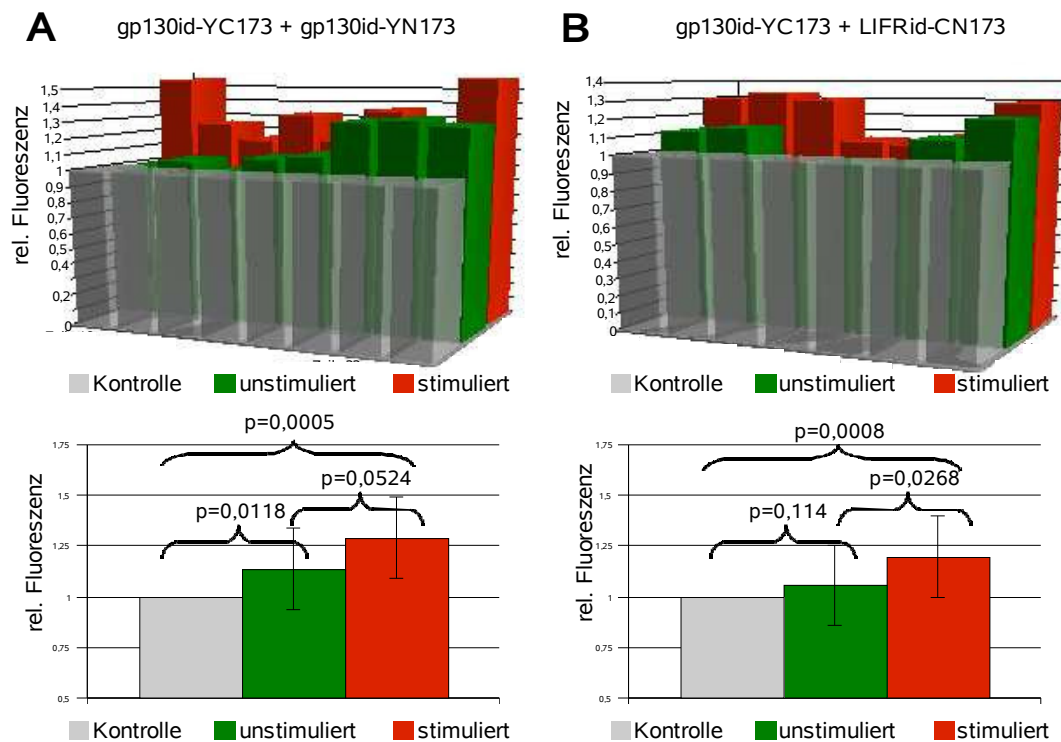


Abbildung 19: Messung der BiFC Fluoreszenz von gp130-gp130 Homodimeren und gp130-LIFR Heterodimeren mittels FACS Analyse

HEK293T Zellen wurden transient mit pSVL Vektoren für gp130id-YC173 und gp130id-YN173 (A) oder für gp130id-YC173 und LIFRid-CN173 (B) kotransfiziert. Als Negativkontrolle diente eine Transfektion mit Vektoren für gp130id-YC173. 30 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen mit 25 ng/ml IL-6 + 1 µg/ml löslichem gp80 stimuliert (A), mit 20 ng/ml LIF (B) oder unstimuliert belassen. 4 Stunden nach Stimulation wurden die Zellen für 18 Stunden bei 30° C inkubiert. Es folgte die Messung am FACS Gerät bei 488 nm Anregungswellenlänge und einer Detektion bei 515 bis 545 nm. Die oberen Diagramme zeigen die Mittelwerte der Einzelmessungen als Relativwerte zu der Negativkontrolle. Die unteren Diagramme zeigen die Mittelwerte aus allen Messungen.

3.2.4 Rezeptorkonstrukte für FRAP- und FRET-Messungen

Die Ergebnisse der BiFC Experimente zeigten, dass gp130 und gp80 in der Membran intakter Zellen präassoziiert sind. Die logische Frage, die sich daran anschließt, ist, über welche Bereiche innerhalb der Rezeptoren die Interaktion erfolgt. Um diese Frage zu klären, wurden Rezeptormutanten eingesetzt, die in einem der drei großen Anteile eines Rezeptors (extrazellulär, transmembranär oder zytoplasmatisch) deletiert bzw. substituiert wurden (s. Abb. 20, 21). Allen Konstrukten ist gemeinsam, dass sie zytoplasmatisch über einen kurzen *linker* entweder mit dem *cyan fluorescent protein* (CFP) oder dem *yellow*

fluorescent protein (YFP) gekoppelt sind. Die Ausgangskonstrukte gp130id-CFP und -YFP sind C-terminal der Box 2 und N-terminal der Internalisierungssequenz verkürzt. Bei dem Konstrukt gp130 Δ Box1-CFP ist zusätzlich die Box1 deletiert, wodurch es keine Januskinasen mehr binden kann. Das Konstrukt gp130id-CYFP ist sowohl mit CFP als auch mit YFP fusioniert. Dabei sind die Fluorophore hintereinander angeordnet und über einen *linker* aus 28 Aminosäuren verbunden. Aus klonierungstechnischen Gründen fehlen den gp80-CFP und -YFP Konstrukten 25 C-terminale Aminosäuren. Als zytoplasmatische Mutanten wurden gp80 Δ CYTO-CFP und -YFP erstellt, die ab der Transmembrandomäne (Ser359) vollständig deletiert sind. Zudem wurde die Transmembrandomäne von gp80 entweder durch die des LIF Rezeptors (gp80TM/LIFR-YFP) oder die des Epo Rezeptors (gp80TM/EpoR-YFP) ersetzt. Die Extrazellulärdomäne wurde vollständig entfernt (gp80 Δ EX-YFP), gegen die des Epo Rezeptors getauscht (gp130idEX/EpoR-CFP) oder um die Domänen D2 und D3 von gp80 verkürzt, die das CBM darstellen und für die IL-6 Bindung verantwortlich sind (gp80 Δ D2,D3-YFP).

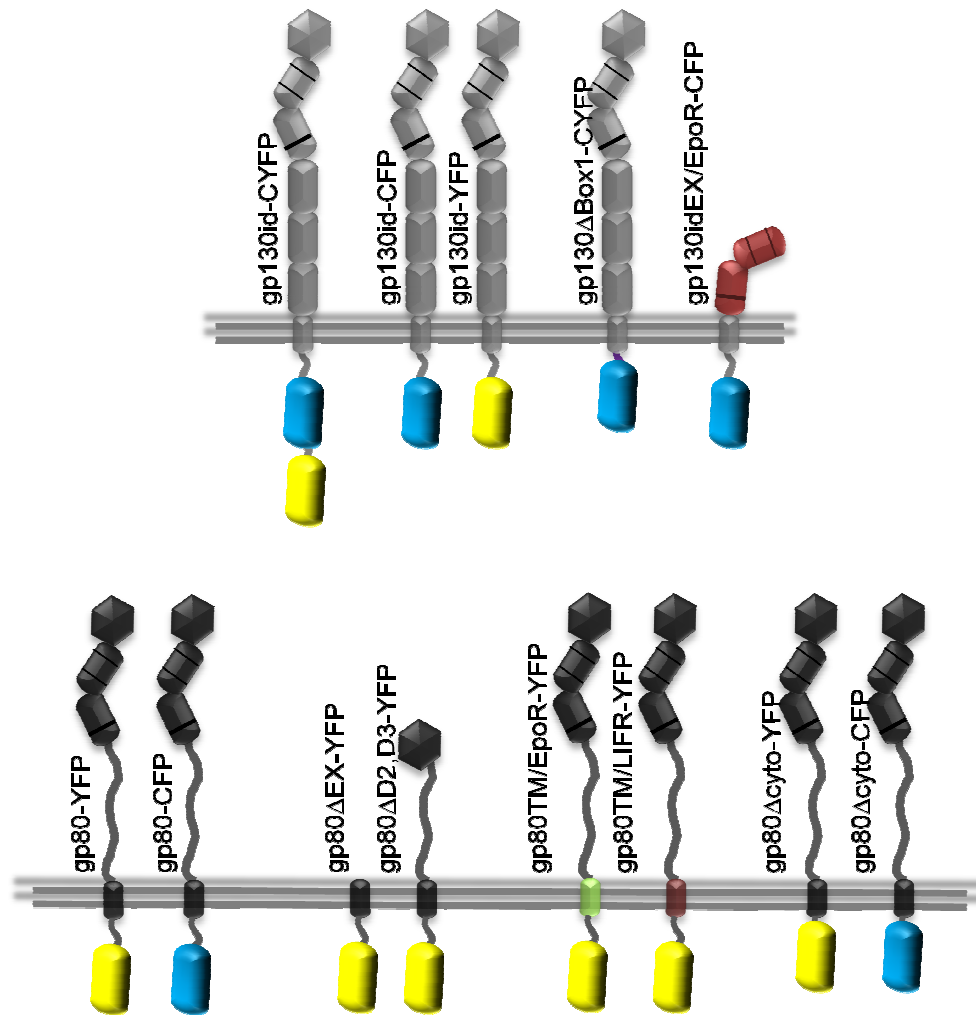


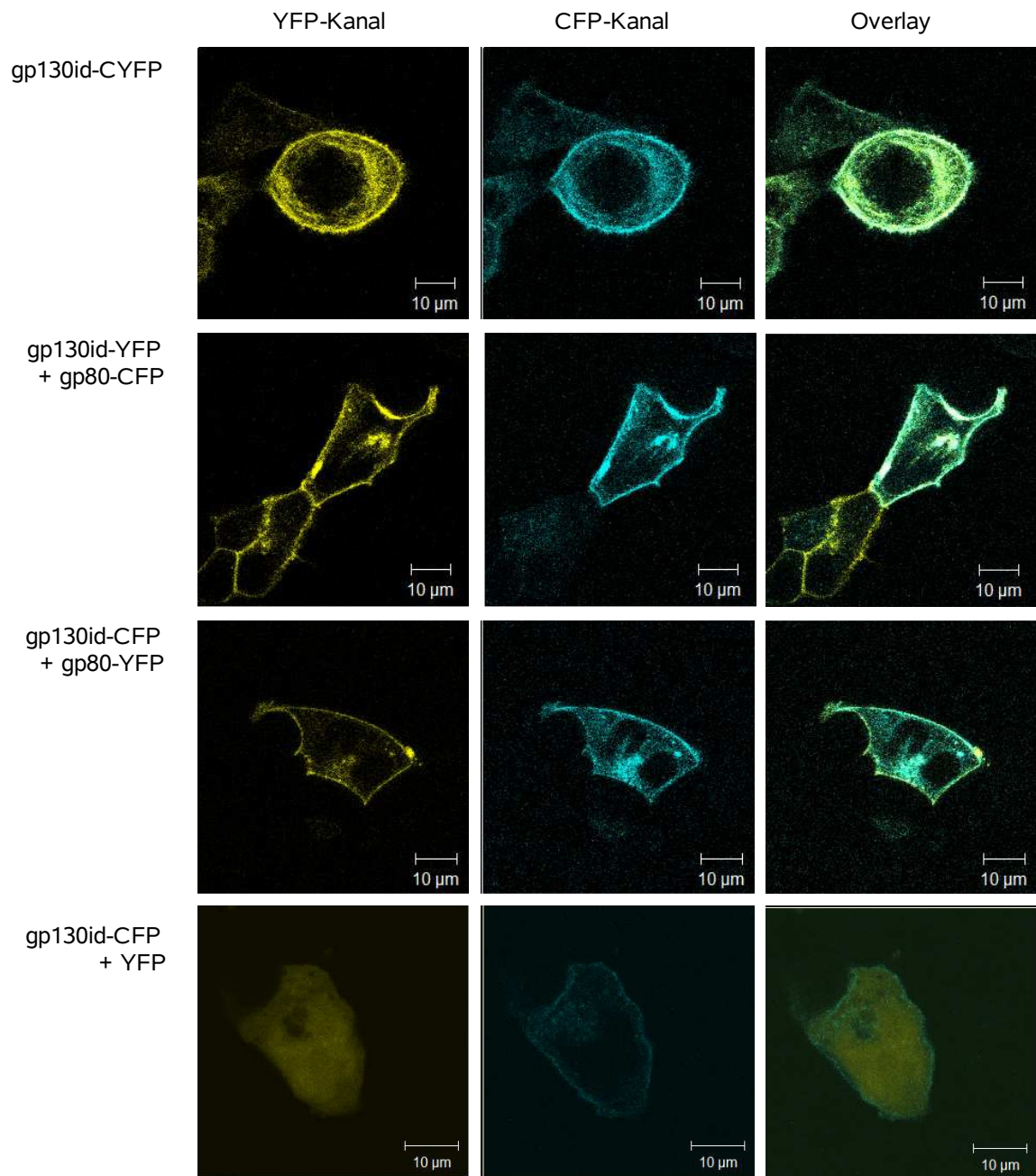
Abbildung 20: Schema der für die konfokale laser-scanning Mikroskopie verwendeten Rezeptorkonstrukte

Einzelheiten siehe Text.

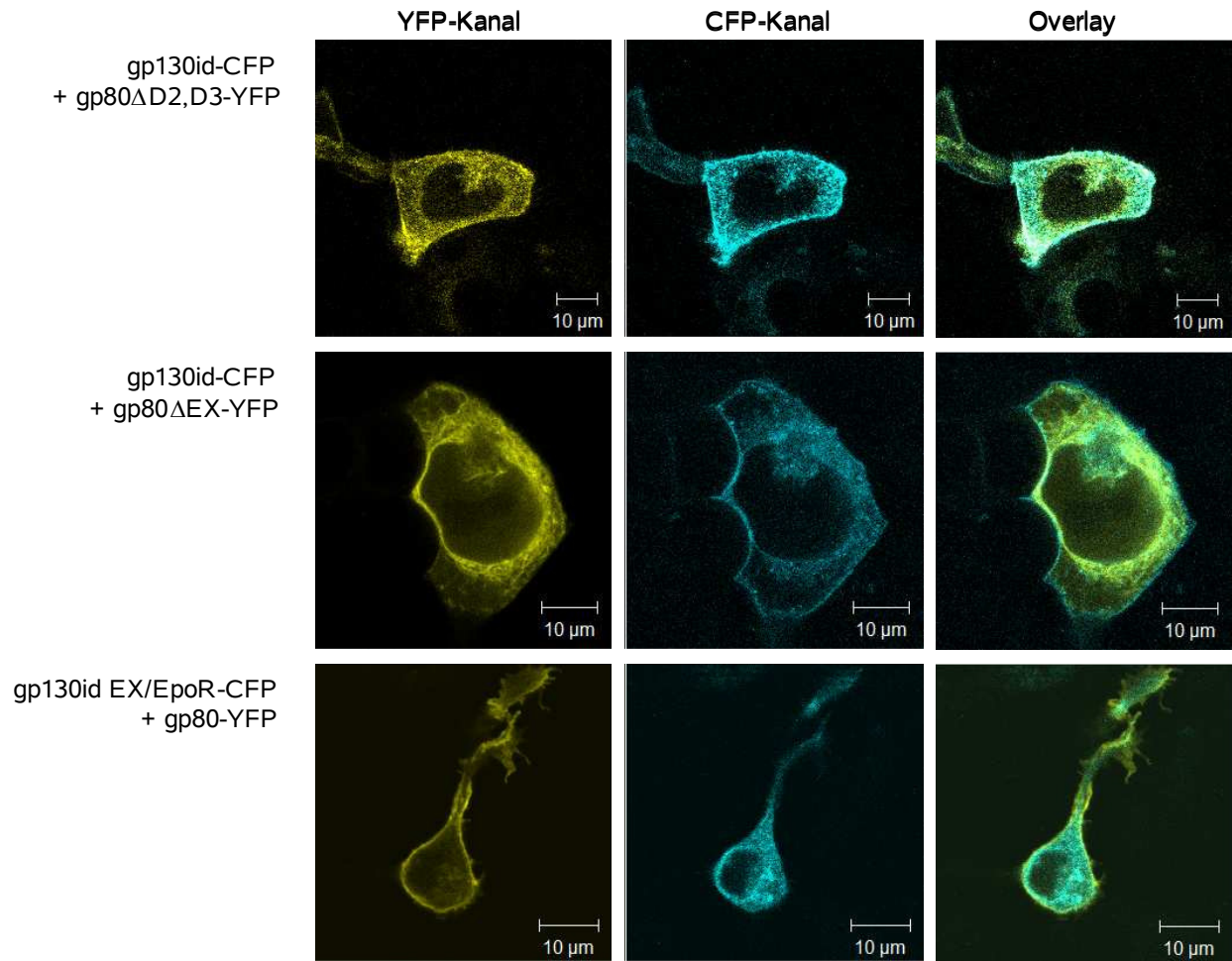
Vor der Analyse der gp130 gp80 Interaktion mittels FRAP und FRET wurde die intrazelluläre Verteilung der oben vorgestellten Konstrukte untersucht. Dazu wurden HEK293T Zellen transient mit den jeweiligen Vektoren transfiziert und am *laser-scanning* Mikroskop untersucht. Abbildung 21 zeigt die intrazelluläre Verteilung der Ausgangskonstrukte und der Mutanten. Als Ausgangskonstrukte wurden gp130id-CYFP und die Paare gp130id-YFP mit gp80-CFP, gp130id-CFP mit gp80-YFP und gp130id-CFP mit YFP untersucht, wobei es sich bei YFP um das ungekoppelte *yellow fluorescent protein* handelt. Alle Rezeptoren reichern sich in der Plasmamembran an, außerdem sind Signale in intrazellulären Membrankompartimenten zu sehen. Der Zellkern zeigt keine Fluoreszenz. Das freie YFP verteilt sich diffus innerhalb der Zelle und des Zellkerns (s. Abb. 21, Rubrik Ausgangskonstrukte). Die oben beschriebenen Mutanten wurden jeweils mit einem Ausgangskonstrukt kotransfiziert, wie sie auch in den späteren Messungen

verwendet wurden. Die klonierten Extrazellulärmutanten gp80 Δ EX-YFP und gp130idEX/EpoR-YFP zeigten im Gegensatz zu den kotransfizierten Ausgangskonstrukten keine Anreicherung in der Plasmamembran, sondern eine Retention im Endoplasmatischen Retikulum. Lediglich gp80 Δ D2,D3-YFP zeigte eine typische plasmamembranäre Lokalisation in den mikroskopischen Aufnahmen. Dies hatte zur Folge, dass die Untersuchungen mit Extrazellulärmutanten auf das letzte Konstrukt beschränkt bleiben mussten. Die Transmembranmutanten gp80TM/LIFR-YFP und gp80TM/EpoR-YFP verhalten sich innerhalb der Zelle ähnlich zu gp130id-CFP: Sie werden gut an der Plasmamembran exprimiert. Auch die verwendeten Intrazellulärmutanten gp80 Δ CYTO-CFP wie -YFP und gp130 Δ BOX1-CFP zeigen eine Anreicherung an der Zellmembran. Somit beeinflussen weder die Veränderungen in der Transmembrandomäne noch im zytoplasmatischen Anteil die Verteilung von gp80 und gp130. Lediglich Mutationen in der Extrazellulärdomäne wirken sich auf die Lokalisation der Rezeptoren aus, so dass von den Extrazellulärmutanten nur das Konstrukt gp80 Δ D2,D3-YFP für die weiteren Experimente genutzt werden konnte.

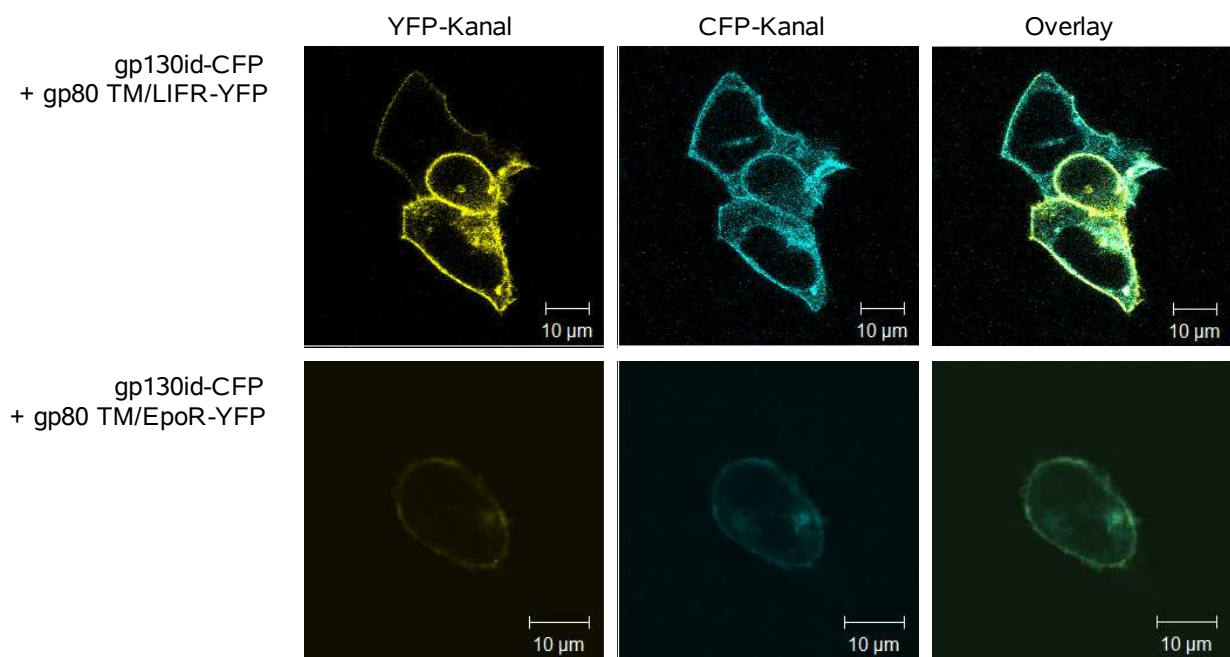
Ausgangskonstrukte



Extrazellulärmutanten



Transmembranmutanten



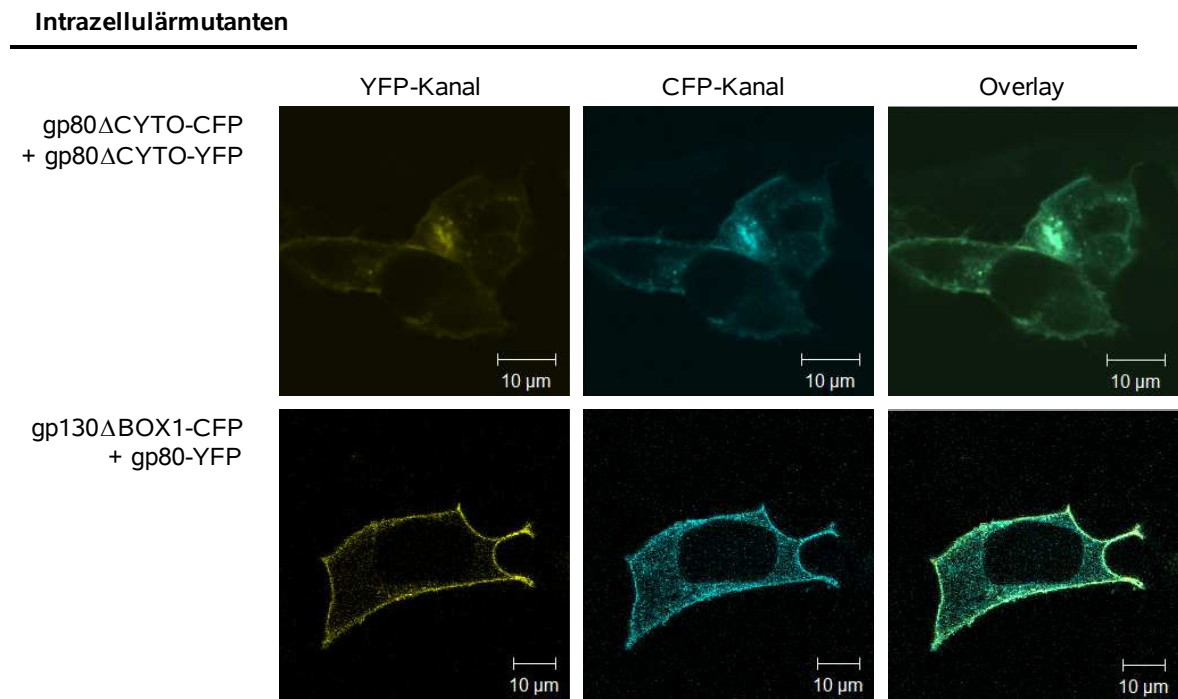


Abbildung 21: Rezeptorkonstrukte für die konfokale laser-scanning Mikroskopie

HEK293T Zellen wurden mit den Expressionsvektoren wie in der Abbildung erwähnt transfiziert und nach 48 Stunden fixiert. Es folgte eine Untersuchung am konfokalen laser-scanning Mikroskop.

3.2.5 FRAP Untersuchungen von gp80 Mutanten in Gegenwart von immobilisiertem gp130

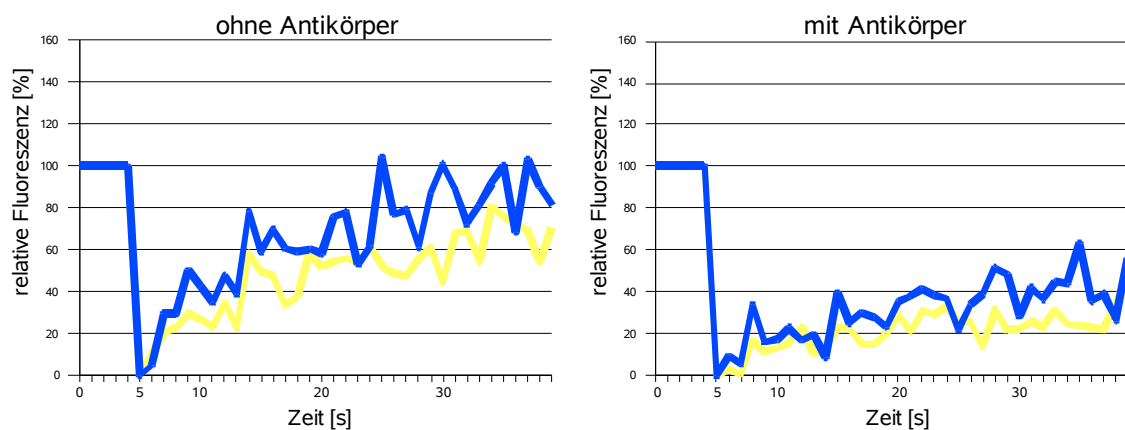
Wie schon weiter oben vorgestellt (s. Einleitung, Kapitel *fluorescence recovery after photobleaching*), ist die FRAP Technik eine Methode, um die Mobilität von fluoreszenzmarkierten Proteinen darzustellen. Dabei wird in einer *region of interest* (ROI) das Fluoreszenzprotein ausgebleicht und in demselben ROI wird die Fluoreszenzwiederkehr durch Diffusion aufgezeichnet. Durch den Einsatz von zwei monoklonalen Antikörpern, die unterschiedliche Epitope in der Extrazellulärregion des gp130 erkennen, kann dieses vollständig in der Plasmamembran immobilisiert werden wie Dr. A. Herrmann aus dem Institut für Biochemie bereits zeigen konnte [86]. Weiterhin konnten Dr. C. Roderburg und Dr. B. Giese, ebenfalls aus dem Institut für Biochemie, im Rahmen ihrer Dissertationen zeigen, dass gp80 koimmobilisiert wird, wenn gp130 an der Membran vernetzt wird, wogegen der LIF Rezeptor weiterhin frei in der Membran diffundieren kann.

Initial wurde innerhalb dieser Arbeit ebenfalls die Koimmobilisation von gp130 und gp80 angewendet und eine Positivkontrolle etabliert. Dazu wurden HEK293T Zellen transient

mit Vektoren für gp130id-CFP und gp80-YFP transfiziert und 48 Stunden nach Transfektion wurde die FRAP Analyse durchgeführt. Die Mobilität der Rezeptoren wurde sowohl vor wie auch nach Immobilisierung des gp130 gemessen, wobei die Rezeptoren zu keinem Zeitpunkt mit IL-6 stimuliert wurden. Als Positivkontrolle für die Koimmobilisierung diente das Konstrukt gp130id-CYFP, bei dem beide Fluorophore hintereinander an gp130id gekoppelt sind. Abbildung 22 A und B zeigt die Fluoreszenzwiederkehr an der Plasmamembran für die genannten Konstrukte.

Ohne Antikörpergabe stieg die Fluoreszenz beider Fluorophore nach dem Bleichen wieder rasch an. Bei der Positivkontrolle gp130id-CYFP waren wie erwartet nach Antikörpergabe beide Fluorophore immobilisiert. Gp80-YFP zeigte eine deutlich eingeschränkte Mobilität nach der Vernetzung von gp130 an der Plasmamembran. Dies zeigt, dass gp130 und gp80 in lebenden Zellen an der Zellmembran ohne vorherigen IL-6 Stimulus assoziiert sind.

A gp130id-CYFP



B gp130id-CFP + gp80-YFP

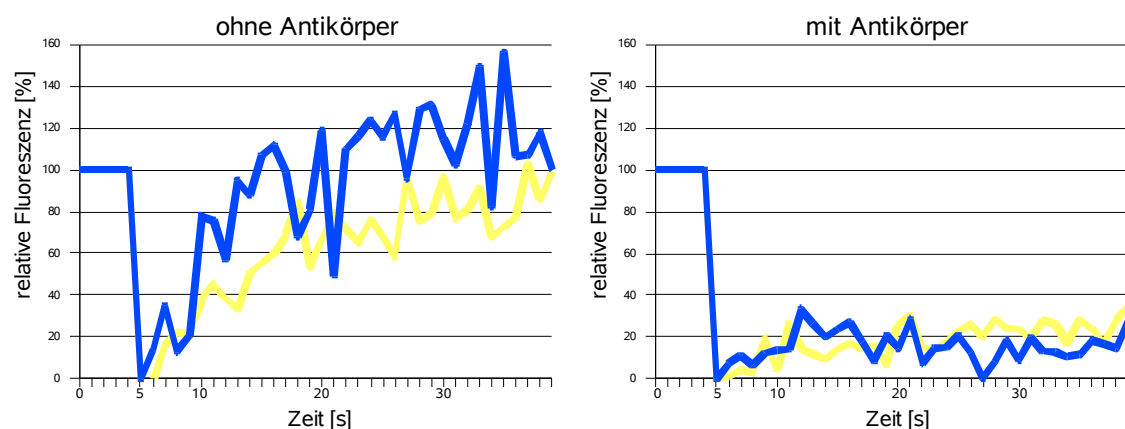


Abbildung 22: Immobilisierung von gp130 und gp80 mittels Antikörper

HEK293T Zellen wurden mit Vektoren für Rezeptoren wie in der Abbildung angegebenen

transfiziert und nach 48 Stunden wurde ein FRAP Experiment durchgeführt. Dazu wurden nach fünf Messungen CFP und YFP in einem begrenzten Areal auf der Plasmamembran gebleicht und die Fluoreszenzwiederkehr über 35 Sekunden gemessen. Die Intensitäten der ersten 5 Messungen wurden gemittelt und als 100% gesetzt. Wenn angegeben wurde gp130 durch zwei monoklonale Antikörper vor der Messung an der Plasmamembran immobilisiert. Die blauen und gelben Graphen stellen den zeitlichen Verlauf der CFP- (blau) bzw. YFP- (gelb) Fluoreszenz dar. Die transfizierten Konstrukte sind über den jeweiligen Diagrammen angegeben.

A. Bei gp130id-CYFP verhalten sich beide Fluorophore nach dem Bleichen gleich. Nach Immobilisierung von gp130id-CYFP ist für beide Fluorophore die Fluoreszenzwiederkehr deutlich verringert.

B. Vor Immobilisierung kehrt die Fluoreszenz in beiden Kanälen gleichförmig zurück, nach Immobilisierung von gp130id-CFP ist auch gp80-YFP an der Membran koimmobilisiert.

Als Weiterführung der Experimente wurde im Rahmen dieser Arbeit auch der Einfluss von Mutationen innerhalb der Rezeptoren auf die Koimmobilisation untersucht. Um die Bedeutung der Transmembrandomäne für die Präassoziation aufzuklären, wurden HEK293T Zellen mit Vektoren für gp130id-CFP und gp80TM/LIFR-YFP kotransfiziert. 48 Stunden nach der Transfektion wurde die FRAP Analyse durchgeführt. Dabei wurde die Mobilität beider Rezeptoren wieder vor der Immobilisierung von gp130 und danach gemessen (s. Abb. 23A), wobei im Folgenden lediglich die Graphen nach Antikörpergabe gezeigt werden. Es zeigte sich, dass gp80TM/LIFR-YFP ebenfalls von gp130 koimmobilisiert wurde. Zellen, die mit Vektoren für gp130 Δ Box1-CFP und gp80-YFP kotransfiziert wurden, wurden auf dieselbe Art und Weise untersucht (s. Abb. 23B). Auch bei der zytoplasmatischen Deletion der JAK Bindungsstelle waren beide Rezeptoren koimmobilisiert. Das Konstrukt gp80 Δ D2,D3-YFP wurde ebenfalls unter diesen Bedingungen mit gp130 koimmobilisiert (s. Abb. 23C).

Aus diesen Experimenten folgt, dass die Interaktion des gp80 mit dem gp130 weder über die Transmembrandomänen noch über die Januskinasen vermittelt ist. Auch die extrazelluläre Deletion der CBM von gp80 ist nicht ausreichend, um die Assoziation zu lösen.

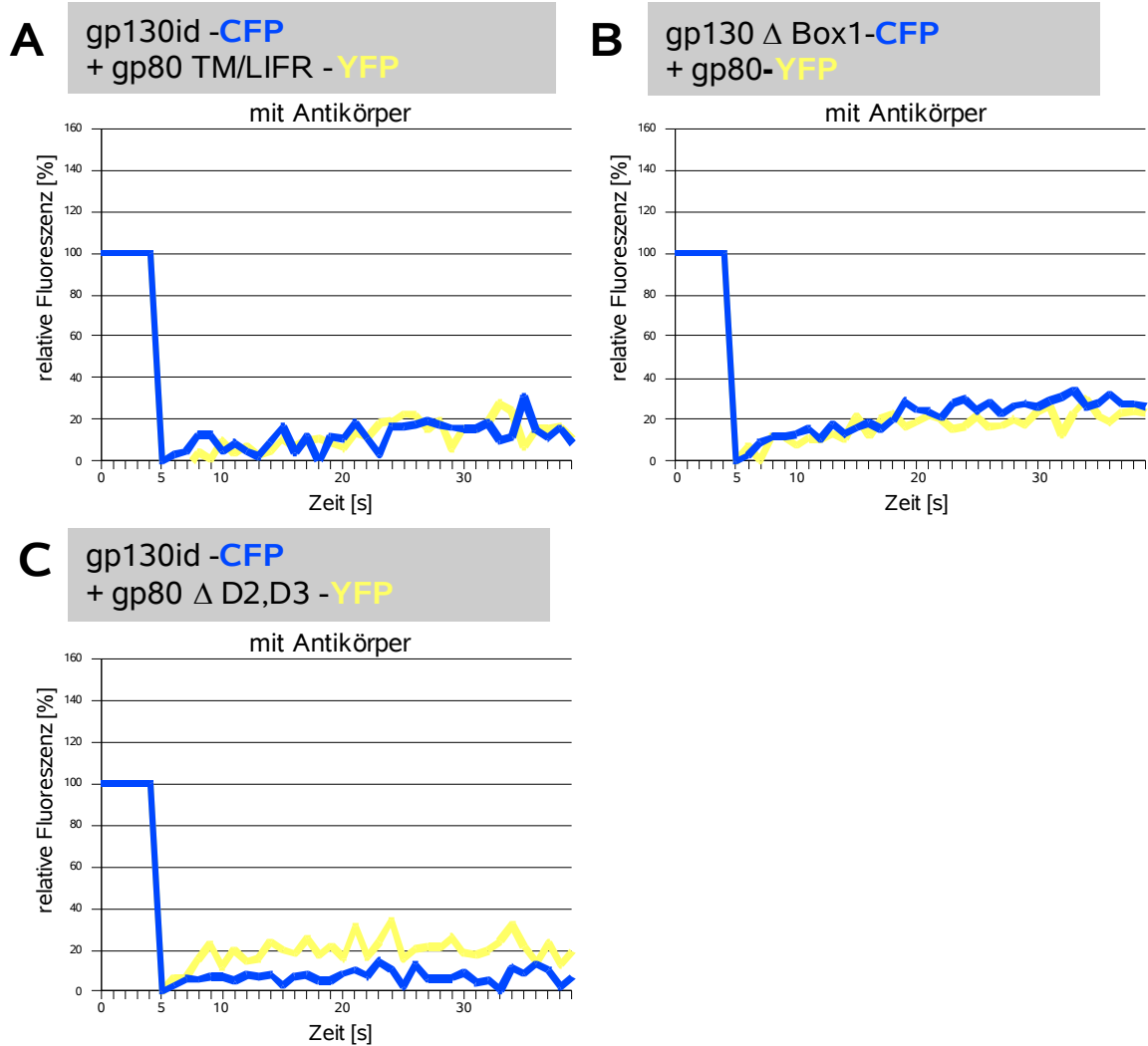


Abbildung 23: Immobilisierung von gp130 und gp80 Mutanten mittels Antikörper

FRAP Experimente wurden wie in Abbildung 22 beschrieben durchgeführt. Der blaue Graph stellt die Fluoreszenzintensität von CFP dar und der gelbe Graph steht für YFP. Die transfizierten Konstrukte sind über den jeweiligen Diagrammen angegeben. Es sind nur die Graphen nach Antikörpergabe gezeigt.

A. Die Diffusion von gp80^{TM/LIFR}-YFP wird ebenfalls durch die Immobilisierung von gp130-CFP stark beeinträchtigt.

B. Auch gp130 Δ Box1-CFP kann gp80-YFP koimmobilisieren.

C. Die Mutante gp80 Δ D2,D3-YFP ist ebenso von der Antikörperimmobilisierung von gp130-CFP beeinflusst.

3.2.6 FRET Analyse des IL-6 Rezeptorkomplex

3.2.6.1 FRET Untersuchungen an gp130 und gp80

Eine weitere Methode, Proteininteraktionen darzustellen, ist die Messung des *fluorescence resonance energy transfer* (FRET). Dabei macht man sich zu Nutze, dass zwischen zwei Fluorophoren von einem Donor Energie strahlungsfrei auf einen Akzeptor übertragen werden kann. Dabei muss das Emissionsspektrum des Donors innerhalb des Anregungsspektrums des Akzeptors liegen. In dieser Arbeit wurde ausschließlich das FRET-Paar bestehend aus dem *cyan fluorescent protein* (CFP) und dem *yellow fluorescect protein* (YFP) benutzt. Befinden sich diese Proteine in unmittelbarer Nähe zueinander wird nach Anregung Energie strahlungsfrei von CFP auf YFP übertragen.

Diesen Effekt kann man durch die Methode des Akzeptor Bleichens darstellen. Dabei wird die Fluoreszenz vor wie nach dem Ausbleichen von YFP (da dies der Akzeptor ist) gemessen. Steigt nach dem Bleichen die Fluoreszenz des CFP an, muss es vor dem Bleichen einen Teil seiner Energie über FRET strahlungsfrei an YFP abgegeben haben. Nach dem Ausbleichen wirkt YFP nämlich nicht mehr als Akzeptor und kann keine Energie mehr aufnehmen. Durch den so ermittelbaren Wert der FRET Effizienz kann man Rückschlüsse auf die Nähe der beiden Fluorophore ziehen. Die Nähe der beiden Fluorophore wird ähnlich wie bei dem vorher vorgestellten BiFC Experimenten wieder über die Kopplung an die zu untersuchenden Proteine, die miteinander interagieren, vermittelt. Die Methode des Akzeptor Bleichens lässt sich am konfokalen Mikroskop mit hoher subzellulärer Auflösung durchführen und wurde in der Arbeit ausschließlich an der Plasmamembran gemessen. Siehe dazu auch das Kapitel *fluorescence resonance energy tranfer* (FRET) in der Einleitung (1.2.3).

Die Interaktion von gp130 und gp80 wurde im Folgenden mittels FRET untersucht. Als Positivkontrolle diente das Konstrukt gp130id-CYFP, bei dem auf CFP über einen kurzen *linker* getrennt YFP folgt. Die Negativkontrollen waren cytoplasmatisch exprimiertes YFP mit entweder gp130id-CFP oder gp80-CFP. Bei diesen Paaren führen nur unspezifische Interaktionen zu einem Energietransfer. Auf FRET getestet wurde das Paar gp130id-CFP mit gp80-YFP, unstimuliert und in einer Stimulationsreihe von 5 ^{ng/ml}, 15 ^{ng/ml} und 25 ^{ng/ml} IL-6.

Außerdem wurde untersucht, ob zwischen gp130id-CFP und dem zytoplasmatisch verkürzten gp80 Δ CYTO-YFP und dem transmembranär veränderten gp80 TM/EpoR-YFP noch FRET stattfindet. Dazu wurden die Vektoren für die Konstrukte in HEK293T Zellen

transfiziert. Die Zellen wurden für 48 Stunden inkubiert und bei der Stimulationsreihe 15 Minuten vor Fixierung mit IL-6 stimuliert. Nach Fixierung erfolgten die Messungen am konfokalen *laser-scanning* Mikroskop. Dabei wurde der Energietransfer an der Plasmamembran ermittelt.

Die FRET Effizienz der Positivkontrolle (gp130id-CYFP) lag bei 23,8%, die der Negativkontrollen bei 3,5% (gp130id-CFP + YFP) und 2,9% (gp80-CFP + YFP). Davon unterschieden sich alle FRET Werte der gp130 und gp80 Konstrukte hochsignifikant ($p < 0,004$ im globalen Test gegen jeweils eine der drei Kontrollen). Die Stimulation von gp130id-CFP und gp80-YFP hatte keine signifikante Veränderung der Effizienz zur Folge: $E_f = 10,9\%$ unstimuliert, $E_f = 10,8\%$ für 5 ng/ml IL-6, $E_f = 12,9\%$ für 15 ng/ml IL-6 und $E_f = 12,4\%$ für 25 ng/ml IL-6; $p = 0,61$ im globalen Test. Weder der Austausch der Transmembrandomäne von gp80 mit der des Epo Rezeptors (FRET Effizienz 12,3%, $p = 0,67$ im globalen Test gegenüber den gp130id-CFP + gp80-YFP Werten), noch die Deletion des zytoplasmatischen Teils von gp80 (FRET Effizienz 12,2%, $p = 0,78$ im globalen Test gegenüber den gp130id-CFP + gp80-YFP Werten) hatten zu einem signifikanten Unterschied des Energietransfers gegenüber den Ausgangskonstrukten geführt (s. Abb. 24A).

Die Messungen der FRET Paare wurden ebenfalls statistisch auf ihre Vergleichbarkeit in Bezug auf das Verhältnis YFP/CFP und die Expression der Proteine an der Plasmamembran (= Dichte) untersucht (s. Abb. 24B und C). Diese Untersuchungen sind wichtig, um eventuelle Fehlerquellen zu erkennen. Im Bezug auf das Verhältnis der Fluorophore gibt die Positivkontrolle gp130id-CYFP den Bezugspunkt für Äquimolarität an, da es ein YFP und ein CFP Molekül enthält. Dabei muss das Verhältnis der CFP- und YFP-Fluoreszenzintensitäten nicht zwangsläufig 1 sein, da aufgrund von Einstellungen am *laser-scanning* Mikroskop die einzelnen Strahlengänge unterschiedlich verstärkt werden können.

Die statistische Auswertung zeigte keinen signifikanten Unterschied der CFP zu YFP Verhältnisse der Rezeptorpaare gegenüber der Positivkontrolle (alle p -Werte $> 0,6$ in der statistischen Auswertung). Lediglich beide Negativkontrollen unterschieden sich signifikant von gp130id-CYFP, im Sinne, dass das Verhältnis zu Gunsten des YFP verschoben ist. Dadurch wird der Energietransfer begünstigt, da der Akzeptor überproportional vorliegt, wodurch die FRET-Effizienz-Werte höher als bei Äquimolarität ausfallen.

In Bezug auf die Dichte unterschieden sich die Werte der Rezeptorpaare ebenfalls nicht signifikant von der Positivkontrolle ($p = 0,36$), der Negativkontrolle gp80-CFP und eYFP ($p = 0,49$) oder untereinander ($p = 0,66$). Lediglich der Wert der Negativkontrolle gp130id-

CFP mit YFP ist nochmals statistisch signifikant größer ($p=0,012$). Dies verursacht wiederum eine relative Erhöhung des FRET Wertes, da unspezifische Interaktionen durch Überexpression eher gefördert werden. Die Werte innerhalb aller Rezeptorpaare aber waren sowohl in Bezug auf ihre Dichte wie auch ihres YFP/CFP Verhältnisses vergleichbar, wodurch ihre FRET Effizienzen untereinander ebenfalls vergleichbar sind. Alle statistischen Auswertungen wurden mit Varianzanalyse berechnet.

Aus diesen Ergebnissen zeigt sich, dass gp80 und gp130 schon unstimuliert an der Plasmamembran miteinander interagieren, da FRET für dieses Rezeptorpaar signifikant größer ist als für die Negativkontrolle. Diese Interaktion wird durch eine Stimulation mit IL-6 nicht signifikant verstärkt, was die These der Präassoziation weiter stärkt. Weiterhin ist die Wechselwirkung zwischen den beiden Rezeptoren weder durch den zytoplasmatischen Teil noch durch die Transmembrandomäne vermittelt. Es wird an dieser Stelle noch mal darauf hingewiesen, dass es leider nicht möglich war, ein vollständig im Extrazellulärteil mutiertes Rezeptorkonstrukt zu etablieren, welches ausreichend an der Plasmamembran exprimiert wurde. Dennoch deuten die Ergebnisse darauf hin, dass genau dort der Ort der Interaktion von gp130 und gp80 liegt.

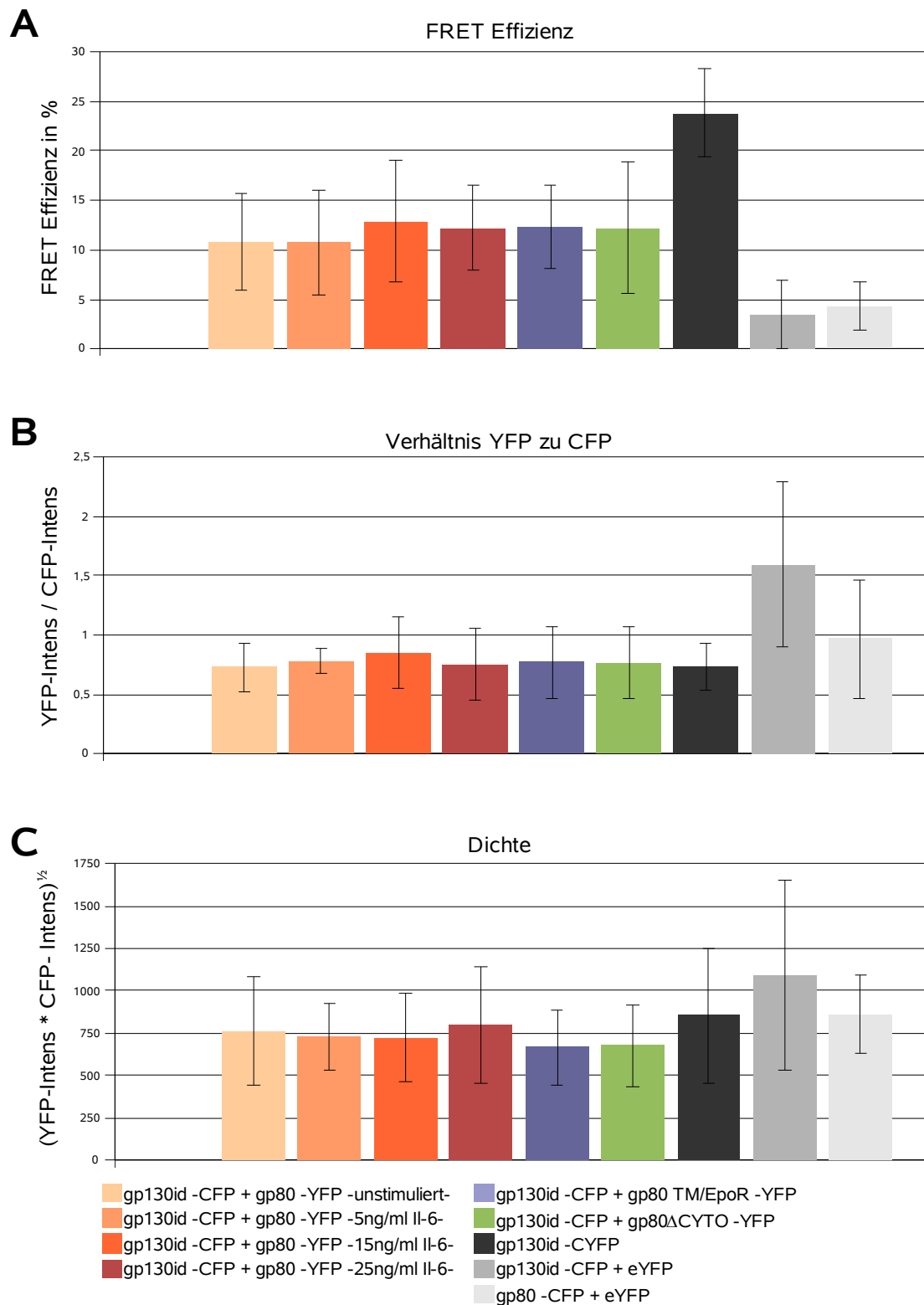


Abbildung 24: FRET Experimente von gp130id-CFP mit gp80-YFP und gp80 Mutanten.

HEK293T Zellen wurden entweder mit Vektoren für gp130id-CFP und gp80-YFP (rot), gp80TM/EpoR-YFP (blau) oder gp80^ΔCYTO-YFP (grün) kotransfiziert. 30 Minuten vor Fixierung der Zellen wurde diese wie angegeben mit IL-6 stimuliert. Als Positivkontrolle diente eine Transfektion mit gp130id-CYFP (dunkelgrau). Als Negativkontrolle wurden Zellen mit Vektoren für zytoplasmatisches YFP und gp130id-CFP oder gp80-YFP transfiziert (hellgrau). An fixierten Zellen

wurde die FRET Effizienz, wie in Abbildung 11 dargestellt mittels Akzeptor Bleichens an der Plasmamembran gemessen. Im Diagramm sind die Mittelwerte aus den Messungen (mindestens 10) dargestellt.

A. Es sind die Mittelwerte der FRET Effizienzen gegeneinander aufgetragen. Die Messreihen mit gp130id-CFP und YFP markierten gp80 Konstrukten unterscheiden sich untereinander nicht signifikant, wohl aber zu den drei Kontrollen (siehe Text).

B. Das Verhältnis der hintergrundfluoreszenzbereinigten YFP Fluoreszenz im Verhältnis zur hintergrundfluoreszenzbereinigten CFP Fluoreszenz ist aufgetragen. Lediglich die Werte der Negativkontrollen unterscheiden sich signifikant von denen der Positivkontrolle (siehe Text).

C. Die Dichte der Rezeptoren an der Membran wurde als Wurzel aus dem Produkt der hintergrundfluoreszenzbereinigten YFP und CFP Fluoreszenzen errechnet. Ein signifikanter Unterschied besteht zwischen der Negativkontrolle gp130id-CFP + YFP zu den Rezeptorpaaren (siehe Text).

3.2.6.2 Bestimmung des gp130-gp80 Verhältnis im IL-6 Rezeptorkomplex mittels FRET

Über die FRET Effizienz ist es auch möglich, Rückschlüsse über die Stöchiometrie der interagierenden FRET-Partner zu ziehen. Hierbei nutzt man aus, dass der Energietransfer bei erhöhtem Akzeptorangebot begünstigt wird [87]. Es wird diskutiert, ob gp130 und gp80 bei Stimulation einen 2:2 Komplex oder einen 2:1 Komplex eingehen. Dabei wurden bei den bisherigen Studien lediglich die Extrazellulärdomänen als gereinigte Proteine untersucht, nicht aber die beteiligten Rezeptoren innerhalb einer intakten Plasmamembran [19, 58]. In dieser Arbeit wurden für die Bestimmung des Verhältnisses CFP und YFP markiertes gp130 und gp80 benutzt. Bei einem 2:2 Verhältnis der Rezeptoren verändert sich das Verhältnis der einzelnen Fluorophorfarben zueinander nicht, wenn man die Fluorophorfarben zwischen den Rezeptoren austauscht. Bei einem 2:1 Verhältnis von gp130 zu gp80 würde sich der Farbwechsel zwischen den Rezeptoren direkt auf das Verhältnis Akzeptor zu Donor im FRET Experiment auswirken (s. Abb. 25). Bei dem Zustand von zwei Akzeptoren zu einem Donor würde man ein stärkeres FRET erwarten als bei zwei Donoren zu nur einem Akzeptor.

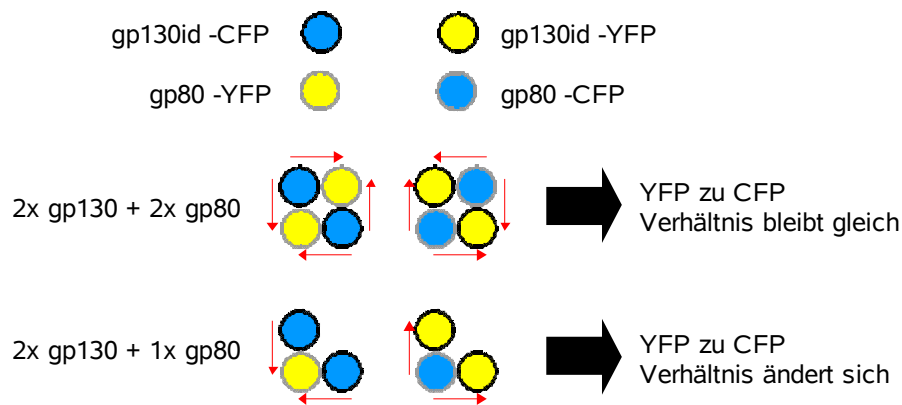


Abbildung 25: Schematische Darstellung der Stöchiometrie von CFP und YFP in Abhängigkeit des Verhältnisses von gp130 zu gp80

Mögliche FRET Ereignisse sind als rote Pfeile dargestellt. In Abhängigkeit des Verhältnisses der Rezeptoren zueinander variiert der FRET Effekt bei Fluorophoraustausch.

Um nun zu prüfen, inwiefern sich der Fluorophoraustausch zwischen gp130 und gp80 auf die FRET Effizienz auswirkt, wurden zum einen HEK293T Zellen gemessen, in denen gp130id-CFP mit gp80-YFP exprimiert wurde, und zum anderen HEK293T Zellen in denen sich gp130id-YFP mit gp80-CFP in der Plasmamembran befand. Beide Ansätze wurden sowohl unstimuliert wie auch mit 5 ng/ml, 15 ng/ml und 25 ng/ml IL-6 stimuliert untersucht. Dabei wurde FRET wieder über die Methode des Akzeptor Bleichens gemessen. Aufgrund eines Austausches des Lasers des Mikroskops wurden diese Messwerte unter anderen Bedingungen erhoben als die zuvor vorgestellten FRET Untersuchungen, so dass kein Vergleich zu den bereits erhobenen Messwerten zulässig ist. Als Positivkontrolle wurden wieder HEK293T Zellen untersucht, die gp130id-CYFP exprimierten. Dabei diente der Wert des YFP/CFP Verhältnisses der Kontrolle auch als Eichwert für ein ausgeglichenes Verhältnis beider Fluorophore zueinander, da beide Fluoreszenzproteine bei diesem Konstrukt äquimolar exprimiert werden. Bei einem ausgeglichenen Verhältnis der Fluorophore zueinander ist im Folgenden ebenfalls ein äquimolares Verhältnis der Rezeptoren anzunehmen.

Die FRET Effizienz der Positivkontrolle lag bei 25,8%, der YFP/CFP Quotient erreichte den Wert 1. Der Übersicht halber sind die Messwerte der FRET Effizienz für die Rezeptorpaare tabellarisch aufgezeigt und ebenfalls in Abbildung 26 graphisch veranschaulicht.

Tabelle 3: FRET Effizienzen der gp130-gp80 Stöchiometrie-Messungen

Transfizierte Rezeptorkonstrukte	unstimuliert	5 ^{ng/ml} IL-6	15 ^{ng/ml} IL-6	25 ^{ng/ml} IL-6
gp130id -CFP mit gp80 -YFP	7,4% ± 2,9	9,1% ± 2,71	10,1% ± 3,76	7,9% ± 4,11
gp130id -YFP mit gp80 -CFP	7,9% ± 3,26	7,6% ± 3,13	8,4% ± 4,11	8,9% ± 3,59
gp130id -CYFP	25,8% ± 2,58			

Die Werte der FRET Effizienz wurden jeweils paarweise bei gleicher Stimulation und unterschiedlicher Fluorophorverteilung statistisch auf Unterschiede geprüft. Dabei ergaben sich bei keinem Paar signifikante Abweichungen voneinander: unstimuliert $p = 0.6284$, 5^{ng/ml} $p = 0.1097$, 15^{ng/ml} $p = 0.1424$, 25^{ng/ml} $p = 0.4449$.

Weiterhin wurden die einzelnen Messungen auf ihre Vergleichbarkeit bei dem YFP/CFP Verhältnis und der Rezeptordichte an der Membran untersucht. In Hinblick auf das Verhältnis zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied der Rezeptorpaare gegenüber der Positivkontrolle: $p = 0.7947$ im globalen Test der Varianzanalyse. Dabei gibt der Wert der Positivkontrolle Äquimolarität an, da an ihr eine gleiche Anzahl von YFP wie CFP Moleküle gebunden ist, so dass nur sie als Bezugsgröße bei der statistischen Auswertung diene.

In Bezug auf die Rezeptordichte wurden wieder die einzelnen Paare wie bei der FRET-Effizienz untereinander verglichen. Hier ergab sich lediglich bei dem Paar der unstimulierten Zellen ein signifikanter Unterschied ($p = 0.0161$). Dadurch kann der FRET-Wert des gp130id-YFP + gp80-CFP Paares gegenüber dem gp130id-CFP + gp80-YFP Paar etwas zu hoch ausfallen. Alle weitere Kombinationen zeigten aber keine signifikanten Unterschiede: 5^{ng/ml} $p = 0.6750$, 15^{ng/ml} $p = 0.2233$, 25^{ng/ml} $p = 0.4836$. Somit sind die FRET Effizienzen untereinander vergleichbar, wobei lediglich der Wert des unstimulierten Paares gp130id-YFP mit gp80-CFP durch eine verstärkte Expression gegenüber dem Paar mit getauschter Farbkombination leicht erhöht ist. Dieser Wert ist bei den Messungen mit 7,9% bereits ein wenig größer ausgefallen als für gp130id-CFP mit gp80-YFP mit einer E_f von 7,4%, so dass mit Abzug des Expressionsartefaktes höchstwahrscheinlich kein signifikanter Unterschied entsteht.

Da der Farbtasch an den Rezeptoren nicht zu signifikanten Änderungen der FRET-Effizienz führt, bedeutet dies, dass sich das Fluorophorverhältnis innerhalb des Komplexes nicht verändert haben kann. Daher muss davon ausgegangen werden, dass sich vor

Stimulation und unter jeder IL-6 Konzentration ein äquimolarer Komplex aus gp130 und gp80 an der Plasmamembran ausbildet.

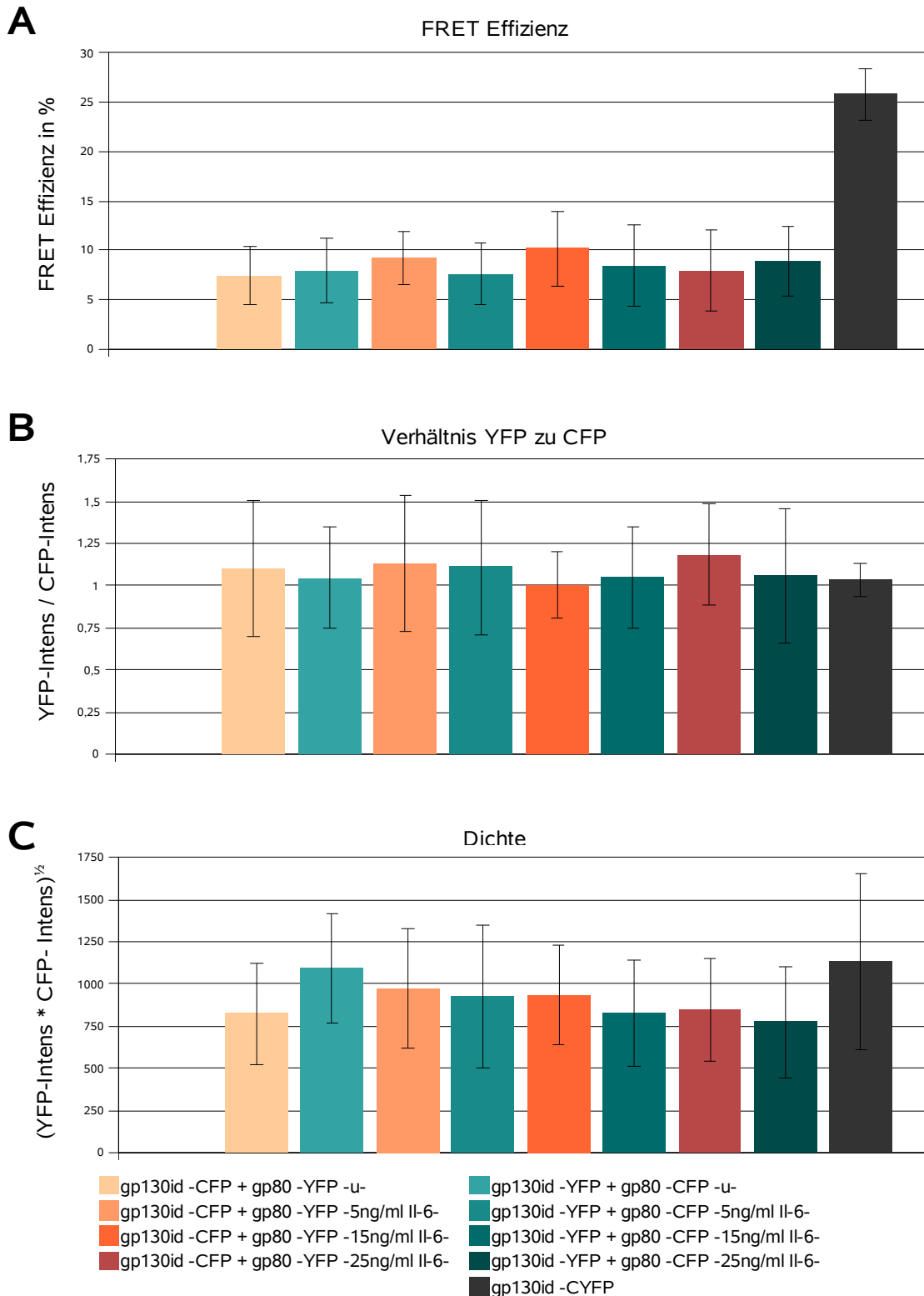


Abbildung 26: FRET Experimente von gp130id-CFP mit gp80-YFP und gp130id-YFP mit gp80-CFP

HEK293T Zellen wurden entweder mit Vektoren für gp130id-CFP und gp80-YFP (rot) oder mit Vektoren für gp130id-YFP und gp80-CFP (blau) kotransfiziert. 30 Minuten vor Fixierung der Zellen

wurden diese mit 5, 15 oder 25 ng/ml IL-6 stimuliert oder unstimuliert gelassen. Als Positivkontrolle diente eine Transfektion mit gp130id-CYFP (dunkelgrau). Die fixierten Zellen wurden auf FRET hin mittels des Akzeptor Bleichens untersucht. Im Diagramm sind die Mittelwerte aus den Messungen abgebildet (mindestens 17).

A. Es sind die Mittelwerte der FRET Effizienzen gegeneinander aufgetragen. Lediglich die Positivkontrolle unterscheidet sich statistisch signifikant von den anderen Messreihen.

B. Das Verhältnis der hintergrundfluoreszenzbereinigten YFP Fluoreszenz im Verhältnis zur hintergrundfluoreszenzbereinigten CFP Fluoreszenz ist aufgetragen. Die Werte unterscheiden sich nicht signifikant voneinander.

C. Die Dichte der Rezeptoren an der Membran wurde als Wurzel aus dem Produkt der hintergrundfluoreszenzbereinigten YFP und CFP Fluoreszenzen errechnet. Statistische Unterschiede sind im Diagramm angegeben.

4 Diskussion

Die IL-6-Typ Zytokinrezeptoren sind eine Gruppe von insgesamt sieben Rezeptoren, die für neun verschiedene Zytokine (IL-6, IL-11, LIF, CT-1, CNTF, NP, CLC, OSM, IL-27) den Empfänger bilden können. Allen Rezeptorkomplexen ist gemeinsam, dass sie mindestens ein gp130 enthalten. Dabei bildet gp130 entweder ein Homodimer flankiert von nicht signalisierungskompetenten α -Rezeptoren (gp80 für IL-6; IL-11R α für IL-11) oder bildet zusammen mit dem LIFR, dem OSMR oder WSX-1 ein signalisierendes Heterodimer (LIFR für LIF, CT-1, OSM; OSMR für OSM; WSX-1 für IL-27). Der Dimer aus LIFR und gp130 kann durch den CNTFR α erweitert werden und der entstehende Komplex bindet CNTF, NP oder CLC (s. Abb. 2).

Eine Präassoziation von gp130 mit einem weiteren Rezeptor, also eine Liganden-unabhängige Wechselwirkung, muss daher immer vor dem Hintergrund betrachtet werden, dass eine Bindung anderer Rezeptoren weiterhin möglich sein muss. Nur so ist es erreichbar, dass die Zelle weiterhin auf mehrere verschiedene IL-6-Typ Zytokine reagieren kann. Gleichwohl bedeutet eine Präassoziation eine Vereinfachung der ersten Schritte der Signaltransduktion von extra- nach intrazellulär: Trifft ein Botenstoff auf einen bereits vollausgebildeten Rezeptorkomplex ist zum einen die Affinität größer, da bereits alle Bindungsepitope vorhanden sind. Zum anderen ist auch die Geschwindigkeit der Signalweiterleitung erhöht, da der Schritt des Komplexaufbaus nicht mehr durch Diffusion der Untereinheiten zueinander geschehen muss, sondern es lediglich einer Konformationsänderung der Rezeptoren zueinander bedarf. Das ideale System für stimulationsunabhängige Interaktionen von gp130 würde beiden Erfordernissen Rechnung tragen: Es wären also Präassoziationen zu anderen Rezeptoren denkbar, die entweder in einem Fließgleichgewicht zueinander stehen, sich gegenseitig nicht behindern oder aber jeweils vorgefertigte Komplexe für jedes Zytokin ausbilden.

Dass sich nämlich Untereinheiten zusammengesetzter Rezeptoren schon vor Stimulation auf der Membran zu dem benötigten Komplex formieren, konnte bereits für dem gp130 ähnliche Rezeptoren dargestellt werden, wie für den EpoR, den GHR, den TNFR und den EGFR [36, 38, 88, 89]. Aber auch innerhalb des IL-6-Rezeptorkomplexes gibt es Hinweise, dass gp80 unstimuliert Multimere ausbildet [41].

In dieser Arbeit wurden vorwiegend Rezeptorkonstrukte verwendet, die intrazellulär mit einem *yellow fluorescent protein* (YFP) oder *cyan fluorescent protein* (CFP) versehen waren. Erst dadurch wurden die Experimente an intakten Zellen und mittels der nativen

Gelelektrophese möglich. Ähnliche Konstrukte wurden aber auch für die SDS-PAGE Experimente benutzt, um die molekulare Ausgangssituation bei allen Versuchen vergleichbar zu halten.

4.1 Assoziationszustand von gp130 und seinen Korezeptoren LIFR und gp80

Im ersten Teil der Arbeit wurden Experimente an Zellysaten durchgeführt. Gerade Transmembranrezeptoren sind durch ihre Lokalisation von einer Behandlung mit Detergenzien besonders betroffen. Nur relativ starke Wechselwirkungen überstehen eine Zellyse durch Detergenzien, da schwächere durch die Prozedur aufgebrochen werden. Es zeigte sich, dass gp80 mit gp130 nach klassischer Zellyse nur kopräzipitiert wurde, wenn zuvor mit IL-6 stimuliert wurde. Ein gleichartiges Resultat ergab sich auch bei einer Auftrennung der Proteine in einem nativen Gel, sowohl bei einer Lyse mit 0,5% Triton X-100 als auch mit 0,5% Brij-96. Diese Ergebnisse zeigen, dass sich eine feste Verbindung zwischen gp80 und gp130 erst durch Interleukin-6 ausbildet. Dieses steht im Einklang mit zuvor Gesagtem, dass zu starre ligandenunabhängige Bindungen zwischen gp130 und seinen Korezeptoren vom Nachteil wären, da sie der Vielseitigkeit des Systems nicht gerecht werden würden. Diese Deutung wird durch die Beobachtung unterstützt, dass der LIFR und gp130 ebenfalls erst durch die Stimulation mit LIF als Komplex im nativen Gel nachweisbar waren. Anzeichen für eine ligandenunabhängige Assemblierung der Rezeptoren lieferte hingegen die Behandlung mit dem *crosslinker* BS³. Durch dessen Zugabe vor der Lyse der Zellen konnten höher molekulare Rezeptorassoziationen von gp130 fixiert werden. Dadurch dass BS³ nicht membranpermeabel ist und das Medium der Zellen zuvor nach zweimaligem Waschen gegen proteinfreies PBS⁺⁺ ersetzt wurde, muss die Interaktion zwischen Plasmamembranproteinen erfolgt sein. Die Rezeptoren scheinen bereits ohne Stimulation schwächere Wechselwirkungen untereinander zu unterhalten, diese sind aber zu labil, um eine Lyse der Zellen zu überstehen. Erst durch den spezifischen Liganden oder aber eine unspezifische kovalente Stabilisierung durch den *crosslinker* werden die Interaktionen der Rezeptoren so gefestigt, dass sie die Zellyse überdauern.

Daraufhin wurden die Wechselwirkungen zwischen gp130 und seinen Korezeptoren LIFR und vor allem gp80 mittels der Fluoreszenztechniken BiFC, FRAP und FRET untersucht. Ihnen ist gemeinsam, dass sie an intakten Zellmembranen durchgeführt werden können.

Bei der *bimolecular fluorescence complementation* (BiFC) ergab sich ein differenzierteres Ergebnis für die einzelnen Rezeptoren. Es zeigte sich, dass gp130 schon im unstimulierten Zustand Homodimere ausbildet, durch Zugabe von IL-6 und sgp80 als Liganden wird diese Situation jedoch deutlich gestärkt. Offensichtlich wird dies an der signifikant höheren Fluoreszenz der unstimulierten Zellen zu der Negativkontrolle und dem weiteren Anstieg durch die Stimulation, der bei einem p-Wert von 0,0524 nur knapp das Signifikanzniveau verfehlte. Der LIFR zeigte eine deutliche Abhängigkeit der Interaktion zu gp130 von der Stimulation mit LIF. Erst durch den Liganden war ein signifikanter Unterschied der Fluoreszenzen sowohl gegenüber der Negativkontrolle wie auch den unstimulierten Zellen zu vermerken. Dr. Bernd Giese und Dr. Christoph Roderburg haben im Rahmen ihrer Dissertationen am Institut für Biochemie die Dynamik der gp130 Homodimerisierung und der Heterodimerisierung mit dem LIFR eingehender untersucht [86] und es werden daher zur Vervollständigung des Modells an dieser Stelle die Ergebnisse kurz vorgestellt:

Deletionsmutanten von gp130, denen entweder Domäne D1 oder die Domänen D2 und D3 fehlten, waren alleine nicht mehr fähig IL-6 plus sgp80 zu binden. Wurden aber beide Mutanten auf der Zelloberfläche exprimiert, konnte IL-6 und sgp80 gebunden werden. Dies ist nur durch stimulationsunabhängige Homodimerisierung von gp130 erklärbar, da dabei beide Bindungs epitope gleichzeitig zu Verfügung stehen und ein Epitop zu wenig für eine Bindung ist. Unterstützt wurde dies durch FRET-Messungen an gp130 Homodimeren, die vor wie nach Stimulation eine gleich hohe Effizienz zeigten. Weiterhin wurden BiFC Untersuchungen an Einzelzellen durchgeführt, die ein vergleichbares Ergebnis lieferten wie die in dieser Arbeit durchgeführten Messungen von Zellpopulationen mittels FACS, nämlich eine erhöhte Fluoreszenz in den unstimulierten Zellen zu der Negativkontrolle und einen weiteren Anstieg durch die Stimulation mit IL-6 und sgp80.

Dabei ist zu beachten, dass die Ausbildung eines funktionsfähigen Fluorophors durch BiFC mit einer Halbwertszeit von 60 Sekunden relativ langsam ist. Die FRET Aufnahmen an fixierten Zellen dagegen geben eine Momentaufnahme zum Zeitpunkt der Fixierung. Daraus ergibt sich, dass gp130 transient Homodimere ausbildet, die aber im Gleichgewicht stehen zu dem ungebundenen Zustand. Dabei bedeutet die Stimulation mit IL-6 und sgp80 eine längerfristige Stabilisierung des Homodimers.

Für die Heterodimerisierung von gp130 mit dem LIFR wurde durch FRET und BiFC Experimente an Einzelzellen herausgefunden, dass nur durch die Gabe von LIF ein starkes BiFC Signal zu Stande kam. In den FRET Untersuchungen zeigte sich zwar

auch in den unstimulierten Zellen eine höhere FRET-Effizienz gegenüber der Negativkontrolle, aber auch ein signifikanter Anstieg durch die Stimulation.

Zu diesem Korezeptor zeigt gp130 also nur eine sehr schwache Bindungsneigung und erst durch die Stimulation kommt es zur Ausbildung von stabileren Heterodimeren.

In dieser Arbeit wurde das Modell um die Interaktionen von gp130 mit gp80 erweitert. Die BiFC Untersuchungen am FACS und die FRET Messungen zeigten für dieses Rezeptorpaar ein gleich starkes Signal vor wie nach Stimulation mit IL-6, welches sich signifikant von den Negativkontrollen abhob. Damit lässt sich schlussfolgern, dass gp130 mit gp80 präassoziiert ist. Weiterhin ist aufgrund der oben erwähnten relativ langsamen Kinetik der *bimolecular fluorescence complementation* die Folgerung zulässig, dass es sich um eine längerfristige Bindung handeln muss.

Somit muss auch das in der Einleitung vorgestellte Modell der Liganden-induzierten Rezeptorassemblierung modifiziert werden. Dieses ging davon aus, dass erst durch den Liganden die Assemblierung der einzelnen Rezeptoren zu einem Komplex erfolgt, wobei es zuerst zu einer Bindung an einen Rezeptor kommt und im Anschluss durch Diffusion des fehlenden Rezeptors die Komplettierung erfolgt [19]. Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten vielmehr darauf hin, dass gp130 schon vor Stimulation mit seinen Korezeptoren schwächere Interaktionen unterhält, wobei aber die Affinitäten zu den einzelnen Rezeptoren unterschiedlich sind. Gp80 ist langfristig an gp130 gebunden. Gleichzeitig steht gp130 in einem Fließgleichgewicht zwischen dem Status als Homodimer und seiner monomeren Form. Der LIFR dagegen hat in Abwesenheit des Liganden die schwächste Affinität zu gp130. In diesem Modell darf die Präassoziation von gp130 zu gp80 nicht die Bindung von gp130 zu dem LIFR bei Stimulation mit LIF behindern. Ein entscheidender Faktor könnte hierbei die besonders flexible *stalk* Region des gp80 darstellen. Diese ist dadurch gekennzeichnet, dass sie über keine besondere Proteinkonformation verfügt, sondern die strukturierten Domänen D1 bis D3 und die Transmembrandomäne wie ein flexibler Blumenstiel verbindet (*stalk* englisch für Stängel). Dabei könnte gp80 außerhalb der Domänen, die für die Zytokinbindung verantwortlich sind, an gp130 gebunden sein und durch die Beweglichkeit der *stalk* Region genug Freiheit zur Verfügung stellen, um Bindungen von gp130 zu anderen Rezeptoren zuzulassen.

4.2 Lokalisation der Präassoziation zwischen gp130 und gp80

Die weiteren Untersuchungen dienten dazu, die Proteinbereiche für die Interaktion zwischen gp130 und gp80 näher einzugrenzen. Dabei diente ein FRAP Experiment von

Dr. Bernd Giese und Dr. Christoph Roderburg als Ausgangspunkt: Sie konnten zeigen, dass ein durch zwei monoklonale Antikörper an der Plasmamembran von lebenden Zellen fixiertes gp130 zur Koimmobilisierung von gp80 führt. Der LIFR dagegen diffundiert unabhängig von gp130. Es wurden innerhalb der Arbeit verschiedene Rezeptormutanten eingesetzt, um die Interaktion zwischen gp130 und gp80 einzugrenzen. Weder die zytoplasmatische Verkürzung von gp130 um die Bindungsregion der Januskinasen (Box1), noch der Austausch der Transmembranregion von gp80 gegen die des LIFR zeigten dabei einen Effekt. Auch die Deletion der extrazellulären Domänen D2 und D3 von gp80 war wirkungslos. Anhand von FRET Experimenten wurden weitergehende Rezeptormutationen analysiert. Der zytoplasmatische Teil von gp80 wurde vollständig deletiert. Dies hatte aber keinen Einfluss auf die FRET Effizienz, ebenso neutral verhielt sich ein Austausch der Transmembrandomäne des gp80 gegen die des Epo Rezeptors. Dabei wurde der Epo Rezeptor gewählt, da dieser Rezeptor nicht mit gp130 im Komplex signalisiert aber dennoch zu der größeren Familie der Zytokinrezeptoren gehört. Austausch und Deletion des gesamten Extrazellulärteils von gp130 bzw. gp80 führten zu einem so starken Rückgang der Expression an der Plasmamembran, dass keine Messungen mehr möglich waren. Dennoch ist in der Zusammenschau der Mutationsstudien genau dort der Ort der Interaktion zu vermuten, da sowohl die Änderung des zytoplasmatischen wie des transmembranären Teils keinen Effekt zeigten. Gestärkt wird diese Vermutung dadurch, dass bereits gezeigt werden konnte, dass im Serum von Menschen zirkulierendes sgp80 und sgp130 einen binären Komplex unabhängig von IL-6 eingehen [90]. Dabei sind wie oben dargestellt die Domänen D2 und D3 von gp80 nicht an der Präassoziation beteiligt. Diese sind Teil des zusammengesetzten Bindungsepitop II im hexameren Komplex mit IL-6, bei dem gp130 mit seiner CBM sowohl an IL-6 bindet wie an das CBM des gp80. Die CBM von gp80 unterhält im zusammengesetzten Bindungsepitop III auch Wechselwirkungen zu der Domäne D1 des gp130 [19]. Beide Epitope bieten sich dadurch auch für stimulationsunabhängige Wechselwirkungen an, die dann natürlich schwächer sind als komplettiert durch IL-6. Bezieht man aber ein, dass eine Präassoziation von gp80 zu gp130 die Bindung zu anderen IL-6-Typ Zytokinrezeptoren nicht behindern soll, wäre eine Interaktion innerhalb der Bindungsepitope für die Zytokine denkbar ungünstig. Da aber die Wechselwirkung innerhalb des Extrazellulärteils sein muss, kommt auch hier der *stalk* Region eine besondere Bedeutung zu. Eine Bindung des membranproximalen Anteils der *stalk* Region an gp130 würde den membrandistal gelegenen Domänen Freiheit lassen, sie aber gleichzeitig nah an gp130 heranzuführen, so dass eine Komplexbildung unter IL-6 rasch geschehen kann.

4.3 Stöchiometrie des gp130-gp80 Komplexes

Boulanger *et al.* konnten 2003 die Kristallstruktur des hexameren Komplexes aus den löslichen Formen des gp130, gp80 und IL-6 darstellen [19]. Dabei wurden die Domänen D2 und D3 des gp80 und die ersten drei Domänen des gp130 kristallisiert und es ergab sich ein molares Verhältnis der beteiligten Proteine von 2:2:2. Dieser Befund konnte in einer weiteren Untersuchung mittels Einzelprotein Elektronenmikroskopie bestätigt werden, wobei der vollständige Extrazellulärteil von gp130 benutzt wurde, wiederum aber nur das stark verkürzte gp80 [19, 52]. Weiterhin ist ein Modell in der Diskussion, in dem sich der Komplex abhängig von der IL-6 Konzentration zusammenfügt. Dabei soll bei niedrigen Konzentrationen ein tetramerer Komplex aus zwei gp130, ein gp80 und ein IL-6 entstehen und erst bei höherer IL-6 Konzentration kommt es zur Ausbildung des oben beschriebenen hexameren Komplexes [58, 91]. Dabei wurden in den bisherigen Studien niemals alle Rezeptoren in ihrer membranständigen Form untersucht, sondern ganz oder teilweise auf die löslichen Formen zurückgegriffen. In dieser Arbeit erfolgten zum ersten Mal Experimente zur Stöchiometrie von gp130 und gp80 im Rezeptorkomplex, bei denen die Proteine lediglich zytoplasmatisch verkürzt, aber beide in der Plasmamembran verankert waren. Es konnte gezeigt werden, dass ein Fluorophortausch zwischen den einzelnen Rezeptoren zu keinem Unterschied in der FRET-Effizienz führt. Dies spricht für ein äquimolares Verhältnis der Rezeptoren zueinander, da ein ungleiches Verhältnis der Rezeptoren zueinander auch ein ungleiches Verhältnis der Fluorophore zueinander bedeuten würde. Dadurch würde sich bei einem Farbwechsel an den Rezeptoren die Relation zwischen YFP zu CFP ändern, was sich in eine veränderte FRET-Effizienz niederschlagen würde [87]. Dies konnte aber bei keiner der verwendeten IL-6 Konzentrationen beobachtet werden. Dies bedeutet, dass die Ausbildung eines tetrameren Komplexes aus zwei gp130, einem gp80 und einem IL-6 bei niedrigen Stimulationskonzentrationen unwahrscheinlich ist. Vielmehr deuten die Befunde zusammen mit den Ergebnissen der Kristallstruktur darauf hin, dass der IL-6 Rezeptorkomplex unstimuliert und bei jeder IL-6 Konzentration in einem Verhältnis von zwei gp80 zu zwei gp130 vorliegt.

5 Zusammenfassung der Ergebnisse

Zytokine sind essenzielle Botenstoffe innerhalb des menschlichen Organismus. Den IL-6-Typ Zytokinen, namentlich IL-6, IL-11, IL-27, LIF, CT-1, CNTF, CLC, NP und OSM, kommt dabei eine besondere Rolle bei der Akutphase-Reaktion, der Hämatopoese, der Embryonalentwicklung sowie entzündlichen Prozessen und bestimmten Tumorerkrankungen zu. Diese Zytokinfamilie signalisiert über Rezeptorkomplexe aus mehreren verschiedenen Typ-I Transmembranproteinen. Dabei ist gp130 der essentielle Rezeptor, da es an allen Rezeptorkomplexen beteiligt ist. Innerhalb dieser Arbeit wurden der IL-6 Rezeptorkomplex bestehend aus gp130 und gp80 sowie der LIF Rezeptorkomplex bestehend aus gp130 und LIFR auf etwaige ligandenunabhängige Assoziationen untersucht.

Im ersten Teil wurden **Experimente mit Zellyse** verwandt. Dabei konnte gp80 nur nach vorhergehender Stimulation mit IL-6 über gp130 koimmunpräzipitiert werden. Ebenfalls zeigte sich bei nativer Gelelektrophorese erst nach Ligandenbindung ein höher molekularer Komplex der Rezeptoren. Ein gleichartiges Ergebnis zeigte sich auch für den LIF-Rezeptorkomplex in den nativen Gelen. Wurde vor der Lyse der Zellen aber der *crosslinker* BS³ zugegeben, konnte gezeigt werden, dass sowohl vor wie nach Stimulation gp130 in höheren Komplexen auf der Plasmamembran vorhanden ist. Diese Ergebnisse legen nahe, dass gp130 bereits vor Stimulation labile Interaktionen eingeht.

Im zweiten Teil der Arbeit wurden **Methoden ohne Zellyse** verwandt, um schwächere Wechselwirkungen besser nachzuweisen. BiFC-Experimente zeigten für die Rezeptorkombination gp130 – gp80 gleiche hohe Werte vor wie nach IL-6 Stimulation. Für das Paar gp130 - LIFR konnte dagegen erst nach Stimulation mit LIF eine Erhöhung der Fluoreszenz nachgewiesen werden. Die Homodimerisierung von gp130 – gp130 konnte unstimuliert festgestellt werden, war aber mit Stimulation deutlich ausgeprägter. Daraus ergibt sich, dass gp130 zu ligandenunabhängiger Homodimerisierung neigt, mit gp80 präassoziiert ist, nicht aber mit dem LIFR. Daraufhin wurde die Interaktion von gp130 mit gp80 tiefergehend untersucht. Bei einer Vernetzung von gp130 an der Plasmamembran durch Antikörper konnte eine zytoplasmatische Verkürzung von gp130 bis vor die Box1 Region eine Koimmobilisation von gp80 nicht aufheben. Der Austausch der Transmembrandomäne von gp80 gegen die des LIFR zeigte ebenfalls keinen Effekt

darauf. Weiterhin ergab die extrazelluläre Deletion von gp80 um Domäne D2 und D3 auch keine Veränderung. Die Präassoziation der beiden Rezeptoren wurde zusätzlich durch FRET-Experimente bestätigt: Hier fand keine signifikante Steigerung der FRET-Effizienz durch IL-6 Stimulation statt. Die Deletion des gesamten zytoplasmatischen Anteils oder der Austausch der Transmembrandomäne von gp80 gegen die des EpoR führten ebenfalls zu keiner signifikanten Veränderung der FRET-Effizienz. Mutierte Rezeptoren, bei denen der komplette Extrazellulärteil von gp80 fehlte oder der Austausch aller extrazellulären Domänen des gp130 gegen die des EpoR erfolgte, wurden nicht auf der Plasmamembran exprimiert. Dadurch war die nähere Prüfung der Region in dieser Arbeit leider nicht möglich.

Weiterhin wurde die **Stöchiometrie des IL-6 Rezeptorkomplexes** untersucht: Ein Fluorophoraustausch zwischen gp130 und gp80 bewirkte keine Veränderung der FRET-Effizienz, weder im unstimulierten Zustand noch bei IL-6 Konzentration von 5, 15 oder 25^{ng/ml}. Dadurch konnte gezeigt werden, dass beide Rezeptoren an der Plasmamembran einen Komplex eingehen, in dem sie mit wie ohne IL-6 äquimolar vertreten sind, da sich andernfalls die FRET Effizienz durch ein verändertes YFP zu CFP Verhältnis ebenfalls geändert hätte.

6 *Literaturverzeichnis*

1. Nicola, N.A., in Guidebook to cytokines and their receptors. 1994, A Sambrook and Tooze Publication at Oxford University Press.
2. Sprang, R.F., Bazan, J. F, Cytokine structural taxonomy and mechanism of receptor engagement. *Current Opinion in Structural Biology*, 1993. 3: p. 815-827.
3. Heinrich, P.C., et al., Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. *Biochem J*, 1998. 334 (Pt 2): p. 297-314.
4. Muller-Newen, G., The cytokine receptor gp130: faithfully promiscuous. *Sci STKE*, 2003. 2003(201): p. PE40.
5. Davis, S., et al., The receptor for ciliary neurotrophic factor. *Science*, 1991. 253(5015): p. 59-63.
6. Heinrich, P.C., et al., Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem J*, 2003. 374(Pt 1): p. 1-20.
7. Pflanz, S., et al., IL-27, a heterodimeric cytokine composed of EBI3 and p28 protein, induces proliferation of naive CD4(+) T cells. *Immunity*, 2002. 16(6): p. 779-90.
8. Derouet, D., et al., Neuropoietin, a new IL-6-related cytokine signaling through the ciliary neurotrophic factor receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. 101(14): p. 4827-32.
9. Senaldi, G., et al., Novel neurotrophin-1/B cell-stimulating factor-3: a cytokine of the IL-6 family. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999. 96(20): p. 11458-63.
10. Elson, G.C., et al., CLF associates with CLC to form a functional heteromeric ligand for the CNTF receptor complex. *Nat Neurosci*, 2000. 3(9): p. 867-72.
11. Deller, M.C., et al., Crystal structure and functional dissection of the cytostatic cytokine oncostatin M. *Structure*, 2000. 8(8): p. 863-74.
12. McDonald, N.Q., N. Panayotatos, and W.A. Hendrickson, Crystal structure of dimeric human ciliary neurotrophic factor determined by MAD phasing. *EMBO J*, 1995. 14(12): p. 2689-99.
13. Robinson, R.C., et al., The crystal structure and biological function of leukemia inhibitory factor: implications for receptor binding. *Cell*, 1994. 77(7): p. 1101-16.
14. Xu, G.Y., et al., Solution structure of recombinant human interleukin-6. *J Mol Biol*, 1997. 268(2): p. 468-81.
15. Gross, V., et al., O- and N-glycosylation lead to different molecular mass forms of human monocyte interleukin-6. *FEBS Lett*, 1989. 247(2): p. 323-6.

16. Rock, F.L., et al., Roles of disulfide bonds in recombinant human interleukin 6 conformation. *Biochemistry*, 1994. 33(17): p. 5146-54.
17. Somers, W., M. Stahl, and J.S. Seehra, 1.9 A crystal structure of interleukin 6: implications for a novel mode of receptor dimerization and signaling. *EMBO J*, 1997. 16(5): p. 989-97.
18. Paonessa, G., et al., Two distinct and independent sites on IL-6 trigger gp 130 dimer formation and signalling. *EMBO J*, 1995. 14(9): p. 1942-51.
19. Boulanger, M.J., et al., Hexameric structure and assembly of the interleukin-6/IL-6 alpha-receptor/gp130 complex. *Science*, 2003. 300(5628): p. 2101-4.
20. Nowell, M.A., et al., Soluble IL-6 receptor governs IL-6 activity in experimental arthritis: blockade of arthritis severity by soluble glycoprotein 130. *J Immunol*, 2003. 171(6): p. 3202-9.
21. Perry, M.G., et al., Overnight variations in cortisol, interleukin 6, tumour necrosis factor alpha and other cytokines in people with rheumatoid arthritis. *Ann Rheum Dis*, 2009. 68(1): p. 63-8.
22. Klover, P.J., et al., Chronic exposure to interleukin-6 causes hepatic insulin resistance in mice. *Diabetes*, 2003. 52(11): p. 2784-9.
23. Jilka, R.L., et al., Increased osteoclast development after estrogen loss: mediation by interleukin-6. *Science*, 1992. 257(5066): p. 88-91.
24. Kiecolt-Glaser, J.K., et al., Chronic stress and age-related increases in the proinflammatory cytokine IL-6. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. 100(15): p. 9090-5.
25. Loffler, D., et al., Interleukin-6 dependent survival of multiple myeloma cells involves the Stat3-mediated induction of microRNA-21 through a highly conserved enhancer. *Blood*, 2007. 110(4): p. 1330-3.
26. Rebouissou, S., et al., Frequent in-frame somatic deletions activate gp130 in inflammatory hepatocellular tumours. *Nature*, 2009. 457(7226): p. 200-4.
27. Rahaman, S.O., et al., Inhibition of constitutively active Stat3 suppresses proliferation and induces apoptosis in glioblastoma multiforme cells. *Oncogene*, 2002. 21(55): p. 8404-13.
28. Cesari, M., et al., Inflammatory markers and onset of cardiovascular events: results from the Health ABC study. *Circulation*, 2003. 108(19): p. 2317-22.
29. Vasan, R.S., et al., Inflammatory markers and risk of heart failure in elderly subjects without prior myocardial infarction: the Framingham Heart Study. *Circulation*, 2003. 107(11): p. 1486-91.
30. Fraser, A., et al., Interleukin-6 and incident coronary heart disease: results from the

- British Women's Heart and Health Study. *Atherosclerosis*, 2009. 202(2): p. 567-72.
31. Smith, C.J., et al., Peak plasma interleukin-6 and other peripheral markers of inflammation in the first week of ischaemic stroke correlate with brain infarct volume, stroke severity and long-term outcome. *BMC Neurol*, 2004. 4: p. 2.
 32. Wells, J.A. and A.M. de Vos, Hematopoietic receptor complexes. *Annu Rev Biochem*, 1996. 65: p. 609-34.
 33. Kishimoto, T., et al., Interleukin-6 family of cytokines and gp130. *Blood*, 1995. 86(4): p. 1243-54.
 34. Brown, R.J., et al., Model for growth hormone receptor activation based on subunit rotation within a receptor dimer. *Nat Struct Mol Biol*, 2005. 12(9): p. 814-21.
 35. Gent, J., et al., Ligand-independent growth hormone receptor dimerization occurs in the endoplasmic reticulum and is required for ubiquitin system-dependent endocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. 99(15): p. 9858-63.
 36. Yang, N., et al., Role of the growth hormone (GH) receptor transmembrane domain in receptor predimerization and GH-induced activation. *Mol Endocrinol*, 2007. 21(7): p. 1642-55.
 37. Damjanovich, S., et al., Preassembly of interleukin 2 (IL-2) receptor subunits on resting Kit 225 K6 T cells and their modulation by IL-2, IL-7, and IL-15: a fluorescence resonance energy transfer study. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. 94(24): p. 13134-9.
 38. Livnah, O., et al., Crystallographic evidence for preformed dimers of erythropoietin receptor before ligand activation. *Science*, 1999. 283(5404): p. 987-90.
 39. Seubert, N., et al., Active and inactive orientations of the transmembrane and cytosolic domains of the erythropoietin receptor dimer. *Mol Cell*, 2003. 12(5): p. 1239-50.
 40. Remy, I., I.A. Wilson, and S.W. Michnick, Erythropoietin receptor activation by a ligand-induced conformation change. *Science*, 1999. 283(5404): p. 990-3.
 41. Schuster, B., et al., The human interleukin-6 (IL-6) receptor exists as a preformed dimer in the plasma membrane. *FEBS Lett*, 2003. 538(1-3): p. 113-6.
 42. Greiser, J.S., et al., Orientational constraints of the gp130 intracellular juxtamembrane domain for signaling. *J Biol Chem*, 2002. 277(30): p. 26959-65.
 43. Yamasaki, K., et al., Cloning and expression of the human interleukin-6 (BSF-2/IFN beta 2) receptor. *Science*, 1988. 241(4867): p. 825-8.
 44. Cole, A.R., et al., Disulfide bond structure and N-glycosylation sites of the extracellular domain of the human interleukin-6 receptor. *J Biol Chem*, 1999.

- 274(11): p. 7207-15.
45. Varghese, J.N., et al., Structure of the extracellular domains of the human interleukin-6 receptor alpha -chain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2002. 99(25): p. 15959-64.
 46. Dittrich, E., et al., Identification of a region within the cytoplasmic domain of the interleukin-6 (IL-6) signal transducer gp130 important for ligand-induced endocytosis of the IL-6 receptor. *J Biol Chem*, 1994. 269(29): p. 19014-20.
 47. Martens, A.S., et al., The cytoplasmic domain of the interleukin-6 receptor gp80 mediates its basolateral sorting in polarized madin-darby canine kidney cells. *J Cell Sci*, 2000. 113 (Pt 20): p. 3593-602.
 48. Mullberg, J., et al., The soluble interleukin-6 receptor is generated by shedding. *Eur J Immunol*, 1993. 23(2): p. 473-80.
 49. Muller-Newen, G., et al., Purification and characterization of the soluble interleukin-6 receptor from human plasma and identification of an isoform generated through alternative splicing. *Eur J Biochem*, 1996. 236(3): p. 837-42.
 50. Jones, S.A., et al., IL-6 transsignaling: the in vivo consequences. *J Interferon Cytokine Res*, 2005. 25(5): p. 241-53.
 51. Waetzig, G.H., et al., N-linked glycosylation is essential for the stability, but not the signaling function of the interleukin-6 signal transducer gp130. *J Biol Chem*, 2009.
 52. Skiniotis, G., et al., Signaling conformations of the tall cytokine receptor gp130 when in complex with IL-6 and IL-6 receptor. *Nat Struct Mol Biol*, 2005. 12(6): p. 545-51.
 53. Skiniotis, G., et al., Structural organization of a full-length gp130/LIF-R cytokine receptor transmembrane complex. *Mol Cell*, 2008. 31(5): p. 737-48.
 54. Tanner, J.W., et al., The conserved box 1 motif of cytokine receptors is required for association with JAK kinases. *J Biol Chem*, 1995. 270(12): p. 6523-30.
 55. Murakami, M., et al., Critical cytoplasmic region of the interleukin 6 signal transducer gp130 is conserved in the cytokine receptor family. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1991. 88(24): p. 11349-53.
 56. Dittrich, E., et al., A di-leucine motif and an upstream serine in the interleukin-6 (IL-6) signal transducer gp130 mediate ligand-induced endocytosis and down-regulation of the IL-6 receptor. *J Biol Chem*, 1996. 271(10): p. 5487-94.
 57. Pflanz, S., et al., Two different epitopes of the signal transducer gp130 sequentially cooperate on IL-6-induced receptor activation. *J Immunol*, 2000. 165(12): p. 7042-9.
 58. Schroers, A., et al., Dynamics of the gp130 cytokine complex: a model for assembly

- on the cellular membrane. *Protein Sci*, 2005. 14(3): p. 783-90.
59. Gearing, D.P., et al., Leukemia inhibitory factor receptor is structurally related to the IL-6 signal transducer, gp130. *EMBO J*, 1991. 10(10): p. 2839-48.
 60. Liu, H., et al., Involving of the cytoplasmic region of leukemia inhibitory factor receptor alpha subunit, IL-6 related signal transducer-gp130 or fas death domain for MAPK p42/44 activation in HL-60 cell with LIF or anti-Fas IgG. *Mol Cell Biochem*, 2001. 217(1-2): p. 113-20.
 61. Owczarek, C.M., et al., The unusual species cross-reactivity of the leukemia inhibitory factor receptor alpha-chain is determined primarily by the immunoglobulin-like domain. *J Biol Chem*, 1997. 272(38): p. 23976-85.
 62. Gearing, D.P., et al., The IL-6 signal transducer, gp130: an oncostatin M receptor and affinity converter for the LIF receptor. *Science*, 1992. 255(5050): p. 1434-7.
 63. Boulanger, M.J., et al., Convergent mechanisms for recognition of divergent cytokines by the shared signaling receptor gp130. *Mol Cell*, 2003. 12(3): p. 577-89.
 64. Huyton, T., et al., An unusual cytokine:Ig-domain interaction revealed in the crystal structure of leukemia inhibitory factor (LIF) in complex with the LIF receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007. 104(31): p. 12737-42.
 65. Shimomura, O., F.H. Johnson, and Y. Saiga, Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*. *J Cell Comp Physiol*, 1962. 59: p. 223-39.
 66. Prasher, D.C., et al., Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene*, 1992. 111(2): p. 229-33.
 67. Yang, F., L.G. Moss, and G.N. Phillips, Jr., The molecular structure of green fluorescent protein. *Nat Biotechnol*, 1996. 14(10): p. 1246-51.
 68. Ward, W.W. and S.H. Bokman, Reversible denaturation of *Aequorea* green-fluorescent protein: physical separation and characterization of the renatured protein. *Biochemistry*, 1982. 21(19): p. 4535-40.
 69. Tsien, R.Y., The green fluorescent protein. *Annu Rev Biochem*, 1998. 67: p. 509-44.
 70. Cole, N.B., et al., Diffusional mobility of Golgi proteins in membranes of living cells. *Science*, 1996. 273(5276): p. 797-801.
 71. Giese, B., et al., Long term association of the cytokine receptor gp130 and the Janus kinase Jak1 revealed by FRAP analysis. *J Biol Chem*, 2003. 278(40): p. 39205-13.
 72. Miyawaki, A. and R.Y. Tsien, Monitoring protein conformations and interactions by fluorescence resonance energy transfer between mutants of green fluorescent

- protein. *Methods Enzymol*, 2000. 327: p. 472-500.
73. Karpova, T.S., et al., Fluorescence resonance energy transfer from cyan to yellow fluorescent protein detected by acceptor photobleaching using confocal microscopy and a single laser. *J Microsc*, 2003. 209(Pt 1): p. 56-70.
74. Lippincott-Schwartz, J., E. Snapp, and A. Kenworthy, Studying protein dynamics in living cells. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2001. 2(6): p. 444-56.
75. Hu, C.D., Y. Chinenov, and T.K. Kerppola, Visualization of interactions among bZIP and Rel family proteins in living cells using bimolecular fluorescence complementation. *Mol Cell*, 2002. 9(4): p. 789-98.
76. Grinberg, A.V., C.D. Hu, and T.K. Kerppola, Visualization of Myc/Max/Mad family dimers and the competition for dimerization in living cells. *Mol Cell Biol*, 2004. 24(10): p. 4294-308.
77. Hu, C.D. and T.K. Kerppola, Simultaneous visualization of multiple protein interactions in living cells using multicolor fluorescence complementation analysis. *Nat Biotechnol*, 2003. 21(5): p. 539-45.
78. Arcone, R., et al., Single-step purification and structural characterization of human interleukin-6 produced in *Escherichia coli* from a T7 RNA polymerase expression vector. *Eur J Biochem*, 1991. 198(3): p. 541-7.
79. Weiergraber, O., et al., Soluble human interleukin-6 receptor. Expression in insect cells, purification and characterization. *Eur J Biochem*, 1995. 234(2): p. 661-9.
80. Wijdenes, J., et al., Interleukin-6 signal transducer gp130 has specific binding sites for different cytokines as determined by antagonistic and agonistic anti-gp130 monoclonal antibodies. *Eur J Immunol*, 1995. 25(12): p. 3474-81.
81. Muller-Newen, G., et al., Studies on the interleukin-6-type cytokine signal transducer gp130 reveal a novel mechanism of receptor activation by monoclonal antibodies. *J Biol Chem*, 2000. 275(7): p. 4579-86.
82. Schagger, H. and G. von Jagow, Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal Biochem*, 1991. 199(2): p. 223-31.
83. Nicke, A., J. Rettinger, and G. Schmalzing, Monomeric and dimeric byproducts are the principal functional elements of higher order P2X1 concatamers. *Mol Pharmacol*, 2003. 63(1): p. 243-52.
84. Bastiaens, P.I., et al., Imaging the intracellular trafficking and state of the AB5 quaternary structure of cholera toxin. *EMBO J*, 1996. 15(16): p. 4246-53.
85. Lakowicz, J.R., Principles of frequency-domain fluorescence spectroscopy and

-
- applications to cell membranes. *Subcell Biochem*, 1988. 13: p. 89-126.
86. Giese, B., et al., Dimerization of the cytokine receptors gp130 and LIFR analysed in single cells. *J Cell Sci*, 2005. 118(Pt 21): p. 5129-40.
87. Herrick-Davis, K., E. Grinde, and J.E. Mazurkiewicz, Biochemical and biophysical characterization of serotonin 5-HT_{2C} receptor homodimers on the plasma membrane of living cells. *Biochemistry*, 2004. 43(44): p. 13963-71.
88. Chan, F.K., et al., A domain in TNF receptors that mediates ligand-independent receptor assembly and signaling. *Science*, 2000. 288(5475): p. 2351-4.
89. Yu, X., et al., Ligand-independent dimer formation of epidermal growth factor receptor (EGFR) is a step separable from ligand-induced EGFR signaling. *Mol Biol Cell*, 2002. 13(7): p. 2547-57.
90. Gaillard, J.P., et al., Interleukin-6 receptor signaling. I. gp80 and gp130 receptor interaction in the absence of interleukin-6. *Eur Cytokine Netw*, 1999. 10(1): p. 43-8.
91. Grotzinger, J., et al., IL-6 type cytokine receptor complexes: hexamer, tetramer or both? *Biol Chem*, 1999. 380(7-8): p. 803-13.

7 Danksagung

Herrn Prof. Dr. Peter C. Heinrich danke ich herzlich für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und die Möglichkeit, die Arbeit unter bestmöglichen Bedingungen durchführen zu können, sowie für sein stetes Interesse am Fortgang meiner Arbeit und die mir gewährte Unterstützung.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Gerhard Müller Newen. Ihm verdanke ich eine bestmögliche Betreuung meiner Arbeit von der ersten Begrüßung bis zur letzten Korrektur der Entwürfe. Ich bin sehr glücklich, dass sein Optimismus und seine Begeisterung für die Fluoreszenzmikroskopie auf mich abgefärbt haben.

Besonderer Dank gilt ebenfalls Herrn Dr. Bernd Giese, der mir immer äußerst hilfreich zur Seite stand und dessen Expertise und Offenheit diese zu teilen, das Gelingen der Arbeit ermöglicht haben.

Ebenfalls danke ich meinen Kolleginnen und Kollegen aus dem Labor 10: Andreas Herrmann, Gudrun Naeth, Michael Vogt, Monique Wiesinger, Silke Metz und Tobias Recker für die kollegiale und konstruktive Arbeitsatmosphäre.

Ich bedanke mich herzlich bei Hildegard Schmitz-Van-de-Leur für die tatkräftige Unterstützung bei der Entwicklung von Klonierungsstrategien und für die Übernahme einiger Klonierungen, sowie bei Christa Gerlach für die stets punktgenaue Gabe von frischen Zellen.

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

Meinem Vater Dr. Bernd Sommerauer danke ich für seine Hilfe bei der statistischen Auswertung der Ergebnisse.

Auch möchte ich mich bei Christoph Roderburg bedanken, der mir den Weg zur Tür des Instituts gezeigt hat.

8 Erklärung § 5 Abs. 1 zur Datenaufbewahrung

Hiermit erkläre ich, dass die dieser Dissertation zu Grunde liegenden Originaldaten in **dem Institut für Biochemie** des Universitätsklinikums Aachen hinterlegt sind.

9 Lebenslauf

Michael Bernhard Sommerauer

Persönliche Daten

Geburtsdaten	geboren am 23.06.1983 in Bochum
Staatsangehörigkeit	deutsch

Schullaufbahn

06/1993 - 06/1997	Gymnasium Bayreuther Strasse, Wuppertal
06/1997 - 06/1999	Deutsche Schule Paris, Frankreich
06/1999 - 06/2002	Gymnasium Wilhelm Dörpfeld, Wuppertal
06/2002	Abitur (Gesamtnote 1,6)

Studium

10/2002	Beginn des Studium der Humanmedizin an der RWTH Aachen
10/2004	Physikum (Gesamtnote 2,0)
10/2004 - 10/2005	Labortätigkeit im Rahmen einer experimentellen Doktorarbeit
02/2008 - 01/2009	Praktisches Jahr
05/2009	Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung (Gesamtnote 1,5)

Famulaturen

03/2006 - 04/2006	Chirurgie in der Klinik für Allgemein- und Visceralchirurgie, Sanakliniken Lübeck
08/2006 - 09/2006	Chirurgie am Buddhist Tzu Chi Hospital Hualien, Taiwan gefördert durch ein Reisestipendium der Karl-Duisberg-Stiftung
02/2007 - 03/2007	Pathologie am Institut für Pathologie des UK-Aachen
03/2007 - 04/2007	Kardiologie in der Medizinischen Klinik I des UK-Aachen
08/2007 - 09/2007	Innere Medizin am Komfo Anokye Hospital Kumasi, Ghana

Praktisches Jahr

02/2008 - 06/2008	Neurologie, Medizinisches Zentrum Bardenberg, Deutschland
06/2008 - 10/2008	Innere Medizin, Medical University of South Carolina, USA gefördert durch ein Semesterstipendium des DAAD
10/2008 - 01/2009	Chirurgie, Universitätsspital Zürich, Schweiz Notfall, Klinik für Visceralchirurgie, Klinik für Thoraxchirurgie

Facharztausbildung

seit 08/2009	Assistenzarzt in der Neurologischen Klinik des Universitätsspitals Zürich
--------------	---