

Analyse der Dimerisierung des Zytokin-Rezeptors gp130
mit Hilfe von YFP-IL-6, einem funktionellen Fusionsprotein aus Interleukin-6
und dem *yellow fluorescent protein*

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

vorgelegt von

Christoph Roderburg

aus

Eupen (Belgien)

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

Herr Universitätsprofessor
Dr.med. Günther Schmalzing

Tag der mündlichen Prüfung: 31. März 2008

„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*

Weitere Veröffentlichungen

Giese B, Au-Yeung CK, Herrmann A, Diefenbach S, Haan C, Küster A, Wortmann SB, Roderburg C, Heinrich PC, Behrmann I and Müller-Newen G, *Long term association of the cytokine receptor gp130 and the Janus kinase Jak1 revealed by FRAP analysis. J Biol Chem* 278, 39205-13.

Meinen Eltern

2.4 DNS.....	22
2.4.1 Plasmide.....	22
2.4.2 Oligonukleotide.....	23
2.5 Eukaryotische Zelllinien und deren Kultivierung	24
2.5.1 Permanente Zelllinien.....	24
2.5.2 Nährmedien und Lösungen für die Zellkultur	24
2.6 Prokaryontische Zellen und deren Kultivierung	25
2.6.1 Verwendete Stämme und deren Kultivierung.....	25
2.6.2 Herstellung kompetenter Bakterien.....	25
2.6.3 Transformation kompetenter Bakterien.....	26
2.7 Präparation und Analyse von Plasmid-DNS.....	26
2.7.1 Isolierung von Plasmid-DNS	26
2.7.2 Quantitative Nukleinsäurebestimmung	27
2.7.3 DNS-Fällung	27
2.7.4 DNS-Restriktionsverdau.....	27
2.7.5 Dephosphorylierung linearisierter DNS	27
2.7.6 Gelelektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren	27
2.7.7 Isolierung von DNS-Fragmenten aus Agarosegelen.....	28
2.7.8 DNS-Ligation.....	28
2.7.9 Automatische DNS-Sequenzierung.....	29
2.7.10 PCR-Reaktion	29
2.7.11 Herstellung des YFP-IL-6-Plasmids	30
2.8 Expression von Proteinen in eukaryotischen Zellen.....	31
2.8.1 Transfektion von COS7-Zellen.....	31
2.8.2 Transfektion von H5-Zellen.....	32
2.8.3 Expression und Aufreinigung von YFP-IL-6	32
2.9 Nachweis von transfizierten und endogenen Proteinen.....	32
2.9.1 Nachweis von Proteinen in der Western-Blot-Analyse.....	32
2.9.1.1 Herstellung von Zelllysaten aus adhärenenten Zellen	32
2.9.1.2 Herstellung von Zelllysaten aus nicht-adhärenenten Zellen	32
2.9.1.3 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	33

2.9.1.4	Western-Blot-Analyse	34
2.9.2	Nachweis von Proteinen durch die Silberfärbung.....	34
2.9.3	Bestimmung der Proteinkonzentration mittels ELISA.....	35
2.9.4	Paraformaldehydfixierung eukaryotischer Zellen für die mikroskopische Darstellung.....	36
2.9.5	Indirekte Immunfluoreszenz	36
2.10	Nachweis der Aktivierung des IL-6 Signalwegs im Western-Blot	37
2.11	Nachweis der STAT-DNS-Bindung im Elektrophoretischen Mobilitätsshift Assay (EMSA)	37
2.11.1	Herstellung von Kernextrakten	37
2.11.2	Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford.....	38
2.11.3	Radioaktive Markierung doppelsträngiger DNS-Sonden.....	38
2.11.4	Elektrophoretischer Mobilitätsshift Assay (EMSA)	39
2.12	Messung der Zellproliferation	40
2.13	Analyse von fluoreszierenden Proteinen mittels Fluoreszenz- spektroskopie	40
2.14	Konfokale Mikroskopie.....	41
2.14.1	Konfokale Bildaufnahme.....	41
2.14.2	Konfokale Mikroskopie lebender Zellen.....	42
2.14.3	FRAP-Messungen	42
2.14.3.1	Tangenciales Bleichen von YFP	42
2.14.3.2	Tangenciales Bleichen von CFP und YFP	43
2.15	Statistik	44
2.15.1	Standardabweichung	44
3. ERGEBNISSE		45
3.1 Klonierung, Expression, Aufreinigung u. Charakterisierung von YFP-IL-6 ..		45
3.1.1	Klonierung des YFP-IL-6.....	45
3.1.2	Generierung einer Zelllinie zur Expression von YFP-IL-6	45
3.1.3	Expression und Sekretion von YFP-IL-6 durch H5-Zellen	46
3.1.4	Aufreinigung von YFP-IL-6	49

3.1.5	Bioaktivität von aufgereinigtem YFP-IL-6	52
3.1.5.1	Rezeptor Bindungsfähigkeit.....	52
3.1.5.2	Aktivierung der IL-6-Signalkaskade	54
3.1.5.3	Quantifizierung und Spezifität der YFP-IL-6-Aktivität	57
3.1.5.4	Zusammenfassung der Resultate zur biologischen Aktivität von YFP-IL-6	59
3.2	Internalisierung von YFP-IL-6	59
3.3	Analyse der Assoziationszustände von gp130	61
3.3.1	Die IL-6-Bindung an gp130 mit eingeschränkten Bindungsepitopen.....	63
3.3.1.1	Überprüfung der gp130-Deletionsmutanten durch Immunfluoreszenz.....	63
3.3.1.2	YFP-IL-6-Bindung an gp130-Deletionsmutanten.....	65
3.4	Die Ko-Immobilisierung von gp130 und IL-6Rα	68
3.4.1	Die Untersuchung der Diffusionseigenschaften membranständiger, fluoreszierender Moleküle durch <i>fluorescence recovery after photobleaching</i> (FRAP)	68
3.4.2	Der Einfluss der gp130-Immobilisierung auf die IL6R α -Mobilität.....	68
3.5	Untersuchung der Diffusionseigenschaften von membrangebundenem YFP-IL-6 mittels FRAP	71
3.5.1	Das Diffusionsverhalten von YFP-IL-6 bei Stimulation gp130-CFP exprimierenden Zellen.	71
3.5.2	Die Diffusion von membrangebundenem und ungebundenem YFP-IL-6	72
3.5.3	Die quantitative Analyse von FRAP-Messungen	74
3.5.4	Quantitative Analyse der Diffusionseigenschaften von an gp130-CFP gebundenem YFP-IL-6	75
3.5.5	Quantitative Analyse der Diffusionseigenschaften von an IL-6R α -CFP bzw. gp130/F191E/id-CFP gebundenem YFP-IL-6	77
3.5.6	Zusammenfassung der FRAP-Experimente mit YFP-IL-6 nach Bindung an verschiedene Rezeptorproteine.....	79
4.	DISKUSSION	81
4.1.	Klonierung, Expression, Aufreinigung und Charakterisierung von YFP-IL-6	82
4.2.	Analyse der Assoziationszustände von gp130	84

4.3. Die Assoziation zwischen gp130 und IL6R α	86
4.4. Untersuchung der Diffusionseigenschaften von membrangebundenem YFP-IL-6 mittels FRAP	87
5. ZUSAMMENFASSUNG DER ERGEBNISSE.....	90
6. AUSBLICK	92
7. LITERATUR	93
8. DANKSAGUNG	102
9. LEBENS LAUF	103

Die der Arbeit zugrunde liegenden Versuche wurden zwischen Oktober 2001 und Februar 2003 durchgeführt. Die Einordnung der Ergebnisse in den aktuellen Stand der Forschung basiert auf der bis Januar 2007 erschienenen Literatur.

In der vorliegenden Arbeit werden, soweit sinnvoll möglich, *Termini technici* in der deutschen Fassung verwendet. In einigen Bereichen sind allerdings deutsche Bezeichnungen entweder nicht existent oder zumindest ungebräuchlich; in diesen Fällen finden die englischen bzw. lateinischen Entsprechungen Verwendung und werden als solche durch *kursiven* Schriftsatz gekennzeichnet.

Verzeichnis der Abkürzungen

A	Antagonist
AmpR	Ampicillin-Resistenz
AOTF	<i>acousto optical tunable filter</i>
APP	Akutphase-Protein
BiFC	<i>bimolecular fluorescence complementation</i>
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
cDNS	<i>copy</i> -DNS
CFP	<i>cyan fluorescent protein</i>
CLC	<i>cardiotrophin-like cytokine</i>
CNTF	<i>ciliary neurotrophic factor</i>
CT-1	Cardiotrophin-1
D	Domäne
Da	Dalton
DMEM	<i>Dulbecco´s modified eagle medium</i>
DNS	Desoxyribonukleinsäure
E _f	FRET-Effizienz
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
EPO	Erythropoetin
FERM	<i>four-point-one, ezrin, radixin, moesin</i>
FKS	fötales Kälberserum
FN	Fibronektin
FP	fluoreszierendes Protein
FRAP	<i>fluorescence recovery after photobleaching</i>
FRET	Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer
GFP	Grün fluoreszierendes Protein (<i>green fluorescent protein</i>)
GH	<i>growth hormone</i>
Gl.	Gleichung
gp	Glykoprotein

HGF	<i>hepatocyte growth factor</i>
id	Internalisierungs-defizient
IFN- γ	Interferon- γ
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
Jak	Janus Kinase
LB	Luria Bertani
LIF	<i>leukemia inhibitory factor</i>
LSM	<i>laser-scanning</i> Mikroskop
M _f	Mobile Fraktion
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
N	Anzahl
NP	Neuropoetin
OD	optische Dichte
OSM	Oncostatin M
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PDGF	<i>platelet derived growth factor</i>
PE	Phycoerythrin
PGE2	Prostaglandin E2
PMT	<i>photo multiplier tube</i>
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
R	Rezeptor
ROI	<i>region of interest</i>
SOCS	<i>suppressor of cytokine signalling</i>
STAT	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
t _{1/2}	Halbwertszeit
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor- α
U	<i>unit</i>
YFP	<i>yellow fluorescent protein</i>

ZBM	Zytokin-Bindungsmodul
-----	-----------------------

1. Einleitung

1.1 Zytokine

Um die Funktion eines mehrzelligen Organismus zu gewährleisten, bedarf es komplexer interzellulärer Kommunikationsprozesse. Diese werden u.a. durch Mediatoren, wie den Zytokinen und Hormonen sichergestellt.

Es handelt sich bei den Zytokinen um eine Gruppe von löslichen Proteinen und Glykoproteinen, die bereits im nano- und picomolaren Bereich aktiv sind. Während die endokrinen Hormone durch spezialisierte Drüsen gespeichert und sezerniert werden und über den Blutkreislauf auch weit entfernte Organsysteme erreichen, werden Zytokine durch verschiedenste Zelltypen in nahezu allen Geweben gebildet und auf einen lokalen Reiz hin sezerniert. Meist wirken sie auf benachbarte Zellen (parakrin), die den Mediator produzierende Zelle selbst (autokrin) und nur selten, vergleichbar den Hormonen, auf weit entfernte Zellen [1].

Zytokine sind an zahlreichen Prozessen, wie etwa der Embryogenese, der Hämatopoese, der Entzündungsreaktion, der angeborenen (unspezifischen) und adaptiven Immunantwort sowie an systemischen Reaktionen auf Infektionen und Gewebeverletzungen beteiligt.

Auf den Zielzellen binden sie an spezifische Oberflächenrezeptoren und nehmen durch die Regulation der Expression bestimmter Gene Einfluss auf das Wachstum, die Differenzierung oder die Aktivierung der Zielzellen. Ein Zytokin kann dabei auf unterschiedliche Zellen einwirken und unterschiedliche biologische Effekte hervorrufen. Dies wird als Pleiotropie der Wirkung bezeichnet. Unterschiedliche Zytokine können darüber hinaus in demselben Zelltyp ähnliche Antworten hervorrufen. Dabei kann die Wirkung eines Zytokins die eines anderen additiv, synergistisch oder antagonistisch beeinflussen. Dies wird als Redundanz der Wirkung bezeichnet [1, 2].

Neben einer Einteilung nach ihren biologischen Funktionen oder den bindenden Oberflächenrezeptoren lassen sich Zytokine anhand von Strukturähnlichkeiten in vier Gruppen einteilen [2, 3]:

1. Zytokine mit 4 α -Helixbündel-Struktur [4]: Diese Gruppe wird weiter in Zytokine mit langen oder kurzen α -Helices unterteilt. Über lange α -Helices verfügen u.a. die IL-6-

Typ-Zytokine, während z.B. das Interferon- γ (IFN- γ) oder Interleukin-2 (IL-2) kurze α -Helices aufweisen.

2. Zytokine mit antiparalleler β -Faltblatt-Grundstruktur: Der Tumor-Nekrose-Factor- α (TNF- α) und Interleukin-1 (IL-1) gehören dieser Gruppe an.
3. Zytokine, die aus mindestens zwei antiparallelen β -Faltblättern und einem C-terminalen α -helikalen Segment bestehen z.B. der *epidermal growth factor* (EGF).
4. Zytokine mit Mosaik-Struktur wie z.B. der *hepatocyte growth factor* (HGF).

1.1.1 Interleukin-6-Typ-Zytokine

Allen Interleukin-6-Typ-Zytokinen gemeinsam ist die Beteiligung der signaltransduzierenden Rezeptoruntereinheit gp130 am Rezeptorkomplex [5]. Zu den Interleukin-6-Typ-Zytokinen gehört das Interleukin-6 (IL-6), das Interleukin-11 (IL-11), der *leukemia inhibitory factor* (LIF), das Onkostatin M (OSM), der *ciliary neurotrophic factor* (CNTF) und das *cardiotrophin-1* (CT-1) [5, 6] sowie das Interleukin-27 (IL-27) und das Neuropoetin (NP) [6-8]. Zu dieser Familie gehört außerdem das *cardiotrophin-like cytokine* (CLC/NNT-1/BSF3), für dessen Sezernierung die Expression des *cytokine-like factor-1* (CLF) [9, 10] erforderlich ist (Abb. 1).

Alle diese Zytokine haben eine vorhergesagte oder bereits nachgewiesene 4 α -Helixbündel-Struktur. Sie bestehen aus 178 (IL-11) bis 201 (CT-1) Aminosäuren und weisen, abhängig von ihrem Glykosylierungszustand, eine Molmasse von ca. 25 kDa (IL-6) bzw. ca. 45 kDa (LIF) auf. Bei einigen dieser Zytokine sind 4-6 Cysteine an der Aufrechterhaltung der Struktur und der biologischen Aktivität durch die Ausbildung von Disulfidbrücken beteiligt.

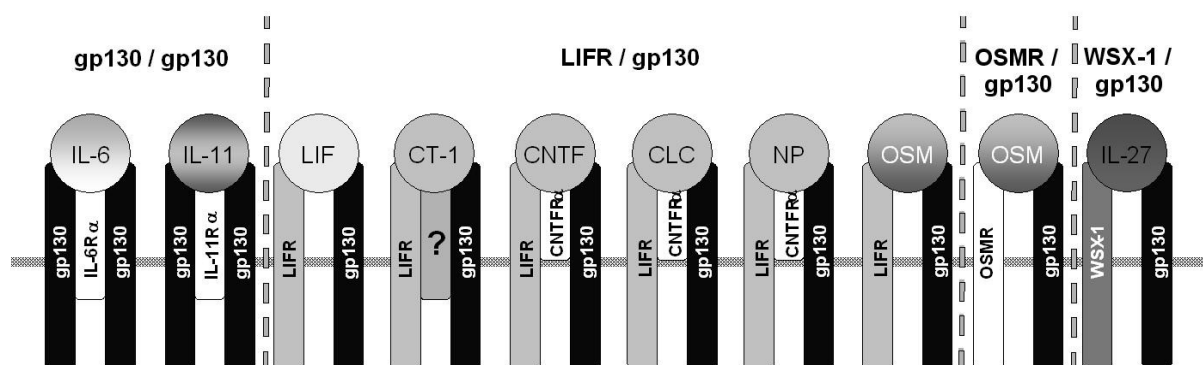


Abb. 1: Schematische Darstellung der IL-6-Typ-Zytokinrezeptor-Komplexe

IL-6 und IL-11 binden zunächst an ihre spezifischen α -Rezeptoren (IL-6R α , IL-11R α). Der IL-6/IL-

6R α -Komplex bzw. der IL-11/IL-11R α -Komplex signalisiert nachfolgend über ein gp130-Homodimer. CNTF, CT-1 und CLC/CLF binden erst an ihre α -Rezeptoren und heterodimerisieren dann mit gp130 und dem LIFR. Sowohl LIF als auch OSM induzieren eine Heterodimerisierung von LIFR und gp130. OSM bindet außerdem an ein Heterodimer aus gp130 und dem spezifischen OSMR. IL-27 signalisiert über ein Heterodimer bestehend aus gp130 und WSX-1.

Nach bisher allgemein akzeptierter Vorstellung beginnt die Aktivierung der zytoplasmatischen Signaltransduktion durch IL-6-Typ-Zytokine mit der Liganden-induzierten Homo- oder Heterodimerisierung von signaltransduzierenden Rezeptoruntereinheiten (gp130, LIFR und OSMR). Untersuchungen zeigten, dass dabei der Ligand zunächst an den spezifischen α -Rezeptor bindet [11]. Durch zufällige diffusionsbedingte Kollision signaltransduzierender Transmembranrezeptoren mit dem durch die Ligandenbindung aktivierten α -Rezeptor kommt es dann zur Ausbildung des kompletten Rezeptorkomplexes. Diese Vorstellung wurde jedoch in den letzten Jahren im Sinne einer Präformierung der Rezeptoren korrigiert. So zeigte sich der lösliche Rezeptor des hämatopoetischen Zytokins Epo in Kristallisationsstudien auch ohne den Liganden als Dimer [12]. Ebenso wird für die IL-2-Rezeptoren eine Liganden-unabhängige Assoziation diskutiert [13]. Auch für die Rezeptoren der IL-6-Typ-Zytokine gibt es Hinweise für eine Liganden-unabhängige Assoziation des α -Rezeptors mit gp130 [14].

In solchen Fällen der Prädimerisierung oder Präoligomerisierung von Rezeptoren muss davon ausgegangen werden, dass der Ligand nicht mehr aktiv zur Rezeptor-Dimerisierung beiträgt, sondern vielmehr die präformierten Komplexe stabilisiert und durch einen Konformationswechsel aktiviert. Wenn mindestens zwei Rezeptoren, wie im Fall des IL-6R α beim hexameren IL-6-Rezeptorkomplex [15, 16], zu einem Komplex gehören, dann stellt die Präassoziation eine Vereinfachung der Komplexentstehung dar, weil der relativ langsame Prozess der diffusionsabhängigen Akkumulation der Bestandteile eines Rezeptorkomplexes am Liganden zumindest teilweise entfällt.

1.1.2 Das Interleukin-6

1.1.2.1 Die Struktur des IL-6

Die cDNS für IL-6 wurde von Hirano *et al.* kloniert [17]. Aus dem 1,3 kB großen *mRNA*-Transkript des IL-6-Gens wird zunächst ein Vorläuferprotein des IL-6 mit einem aus 28 Aminosäuren bestehenden N-terminalen Signalpeptid translatiert. Das reife Protein besteht schließlich aus 184 Aminosäuren und besitzt eine Masse von 24 kDa. Seine Struktur wurde

1997 durch die Arbeitsgruppen von Somers und Xu beschrieben [18, 19]. Wie erwartet gehört es zu den 4 α -Helixbündel-Zytokinen mit der charakteristischen *up-up-down-down* Topologie der Helices (Abb. 2). Die Helices sind so organisiert, dass die Helices A bzw. B in die gleiche Richtung und die Helices C bzw. D in die gegensätzliche Richtung verlaufen. Verbunden sind sie durch einen langen „loop“ zwischen A und B, einen kurzen „loop“ zwischen B und C und schließlich wieder einem langen Verbindungsstück zwischen C und D.

Durch Mutagenese innerhalb des Moleküls wurden drei Rezeptor-Bindungssepitope (*sites*) nachgewiesen. Sie werden als Bindungssepitop I, Bindungssepitop II und Bindungssepitop III bezeichnet. Bindungssepitop I ist für die Bindung an den IL-6R α von Bedeutung, während Bindungssepitop II und Bindungssepitop III die gp130-Bindung und damit die Signaltransduktion vermitteln [20].

IL-6 wird N- und O-glykosyliert. Glykosyliertes IL-6 weist im Vergleich zu unglykosyliertem IL-6 eine drei- bis vierfach höhere spezifische Aktivität auf. Das Molekül enthält vier Cysteinreste, von denen zwei für die Aufrechterhaltung der Struktur und der biologischen Funktion wichtig sind [18, 21].

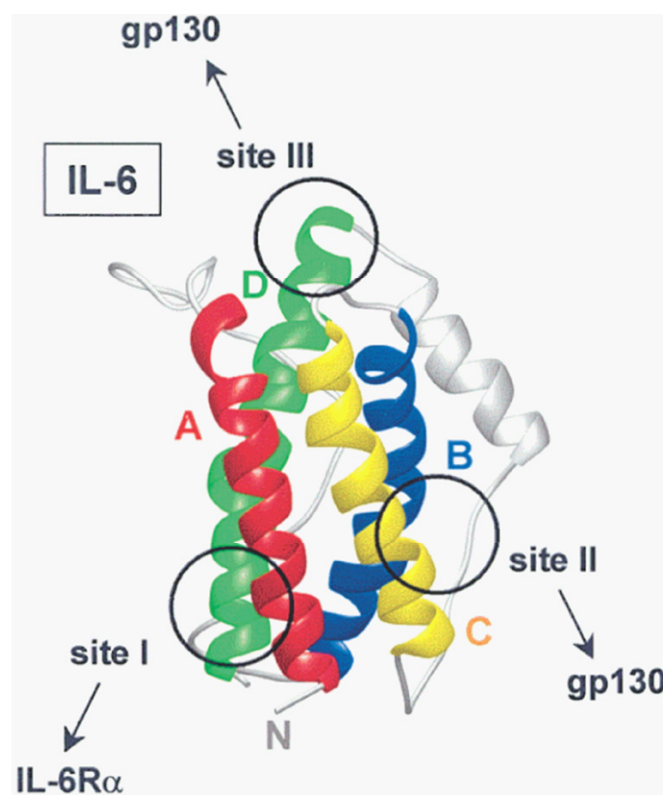


Abb. 2: 4 α -Helix-Bündel-Struktur des IL-6 mit Bindungssepitopen für den IL-6R α und gp130

Das Bindungssepitop I (*site I*) ist verantwortlich für die Bindung des IL-6R α , die Bindungssepitope II und III (*site II* und *site III*) bilden die Kontaktstellen zu dem ersten und zweiten gp130-Molekül.

1.1.2.2 Die physiologischen Wirkungen von IL-6

IL-6 ist ein pleiotropes Zytokin mit einer Vielzahl biologischer Effekte. Von Bedeutung ist es insbesondere bei Verletzungen, inflammatorischen Prozessen, der Immunregulation und der Onkogenese. Erstmals beschrieben wurde es als durch T-Zellen sezernierter Faktor, der die Differenzierung von B-Zellen zu Antikörper-produzierenden Plasmazellen induziert [22]. Neuere Untersuchungen haben gezeigt, dass IL-6 eher ein Wachstums- als ein Differenzierungsfaktor für B-Zellen ist [23].

Eine Übersicht über die physiologischen Effekte des IL-6 ist im Folgenden dargestellt:

IL-6 wird von zahlreichen Zellen, wie etwa Monozyten und Makrophagen, von Kupffer-Zellen, Neutrophilen, Mastzellen, B-Zellen, Endothelzellen, Fibroblasten, vaskulären glatten Muskelzellen, Osteoblasten und intestinalen Epithelzellen sezerniert. Dabei wirkt es sowohl pro- als auch anti-inflammatorisch. In Hepatozyten induziert IL-6 die Expression von Akut-Phase-Proteinen, die bei der Regulierung von Entzündungsprozessen bedeutsam sind [23-29]. IL-6 stimuliert die Osteoklastenbildung und spielt bei der Osteoporose und osteolytischen Prozessen, wie sie z.B. beim Multiplen Myelom auftreten, eine Rolle [30, 31].

IL-6 ist ebenfalls bei der Regulation der Proliferation von Keratinozyten und Mesangialzellen beteiligt. Auch bei der Ausdifferenzierung von Neuronen greift das Zytokin regulierend ein. IL-6 ist darüber hinaus an der Auslösung von Fieber beteiligt, indem es die Prostaglandin-E2-Synthese induziert [28]. Die Induktion der Glukokortikoidausschüttung durch IL-6, die zu einer Inhibierung der Zytokin-Genexpression führt, ist ein wichtiger anti-inflammatorischer Effekt [30, 31]. IL-6 stimuliert die Proliferation der glatten Gefäßmuskulatur durch Induktion der PDGF-Produktion. Am Herzmuskel wirkt IL-6 negativ inotrop. Auch einen Effekt auf die Plazenta ist nachgewiesen worden. Hier wird durch IL-6 die Sekretion von Choriongonadotropin aus Trophoblasten induziert [30, 31].

1.1.2.3 Interleukin-6 und pathogene Prozesse

IL-6 ist bei verschiedenen pathogenen Prozessen von Bedeutung. Diese können u.a in chronisch-entzündliche Erkrankungen (z.B. die Multiplen Sklerose, die mesangiale proliferative Glomerulonephritis und die rheumatoide Arthritis), benigne Tumorerkrankungen wie der Castleman Krankheit [32] und maligne Erkrankungen (z.B. das Karposi Sarkom, das Multiple Myelom, das Prostata-Karzinom) unterteilt werden. Des weiteren ist IL-6 bei der Alzheimerschen Erkrankung und bei der Osteoporose involviert [30].

Im Folgenden soll exemplarisch die Rolle des Interleukin-6 beim Multiplen Myelom näher

beschrieben werden. Das Multiple Myelom gehört zu den B-Zell-Neoplasien und betrifft differenzierte B-Zellen. Die maligne Myelomzelle entspricht einer langlebigen Plasmazelle, die zunächst im Knochenmark lokalisiert ist. Die Pathogenese des Multiplen Myeloms hängt von Faktoren ab, die Proliferation, Differenzierung und Funktion der lymphohämatopoetischen Zellen im Knochenmark regulieren. Dabei durchläuft der pathogene Prozess mehrere Stufen: eine inaktive Phase, in der die Zellen nicht proliferierende reife Plasma-Zellen sind, eine aktive Phase mit einem geringen Anteil (<1%) an proliferierenden Plasmazellblasten und eine fulminante Phase, bei der es häufig zu einer extramedullären Proliferation und einem Anstieg der plasmablastischen Zellen kommt. Während dieses Prozesses sind zunehmend chromosomalen Aberrationen, bei denen es zu Mutationen von Ras, p53 oder Bcl-2 kommen kann, zu beobachten. Dadurch werden die Zellen Wachstumsfaktor-unabhängig und vor Apoptose geschützt [33]. Als wichtigster Wachstumsfaktor für das Multiple Myelom konnte IL-6 identifiziert werden. Es wurde gezeigt, dass aus dem Peripherblut isolierte Myelomzellen in Abwesenheit von IL-6 nicht mehr proliferieren. Ein anti-IL-6-Antikörper, sowie ein IL-6R-Antagonist wirkten *in vivo* und *in vitro* antiproliferativ [34-36]. Der Zusatz von IL-6 blockiert *in vitro* die Apoptose der Myelomzellen [37-41]. Ein weiterer Hinweis für die Bedeutung des IL-6 beim Multiplen Myelom ist die Korrelation von hohen IL-6-Serumspiegeln mit einer hohen Tumormasse und einer schlechten Prognose für die Patienten [42, 43]. Ähnliche Ergebnisse lieferte die Korrelation der Serumspiegel des sIL-6R α mit der Prognose eines Multiplen Myeloms [44].

Die Induktion der Bcl-x_L-Expression durch den Jak-STAT-Signalweg scheint eine wichtige Rolle bei der Apoptoseinhibition zu spielen [45, 46], während der *MAP-Kinase*-Signalweg für die Steigerung der Proliferationsrate zuständig ist [47, 48]. IL-6 aktiviert darüber hinaus den Phosphatidylinositol-3-Kinase/Akt-Signalweg in Myelomzellen. Die Aktivierung dieses Signalwegs fördert das Wachstum, schützt vor Apoptose und stimuliert die Migration der Myelomzellen. Die Aktivierung des Signalwegs nach IL-6-Stimulation geschieht über mindestens zwei Wege. Die PI3K kann über die Aktivierung von RAS unabhängig von p85 (regulatorische Untereinheit der PI3K) aktiviert werden. Dabei kommt es zu einer direkten Stimulierung von p110, der katalytischen Untereinheit der PI3K. Ein zweiter Weg bezieht einen Komplex aus p85 und STAT3 ein [49].

Den Einfluss von IL-6 auf die Genexpression beim Multiplen Myelom wurde u.a. durch Brocke-Heidrich [50] an der Myelom-Zelllinie INA-6 untersucht. Von 12000 untersuchten Genen (Affymetrix U95A *oligonucleotide microarray*) waren in Folge der Stimulation mit IL-6 150 Gene differentiell exprimiert. Unter den induzierten Genen befanden sich u.a. junB,

SOCS3, HB-EGF, Pim-1, Bcl-3, SGK, DEC1, DEPP. STAT3 reguliert die meisten dieser Gene.

Die Quelle des IL-6 beim Multiplen Myelom kann zum einen der Tumor selber oder die Tumorumgebung im Knochenmark sein [33, 38]. Dies erklärt zumindest zum Teil die hochkomplexen Interaktionen zwischen den Zellen des Multiplen Myeloms und ihrer zellulären Mikroumgebung in der Knochenmark-„Nische“ [51].

Vor diesem Hintergrund stellt IL-6 ein interessantes Zielmolekül für eine Therapie des Multiplen Myeloms dar [52]. Darüber hinaus könnten bereits etablierte Therapien ebenfalls über einen IL-6-abhängigen Weg wirken. So führte die Behandlung mit Thalidomid in Studien zu einer Reduktion von IL-6-Serumspiegeln und der IL-6R α -Expression durch die Zellen des Multiplen Myeloms [53, 54].

1.1.3 Die Rezeptoren der IL-6-Typ-Zytokine

Hämatopoetische helikale Zytokine, wie das IL-6, signalisieren über sogenannte Klasse-I-Zytokinrezeptoren. Solche Rezeptoren, die auch als Hämatopoetinrezeptoren bezeichnet werden, wurden aufgrund ihrer Strukturhomologie als Gruppe definiert. Sie gehören zu den Typ-1-Transmembranproteinen [2]. Eine Ausnahme bildet lediglich der auf Chromosom 9 kodierte *ciliary neurotrophic factor receptor* (CNTFR) [55]. Er besitzt anstelle der Transmembranregion einen Glykosyl-Phosphatidyl-Inositol-Anker [56]. Extrazellulär weisen die Klasse-I-Zytokinrezeptoren mindestens ein „Zytokin-Bindungs-Modul“ (ZBM) auf, das aus zwei je aus etwa 90 Aminosäuren bestehenden Fibronektin-Typ-III-ähnlichen (FNIII)-Domänen aufgebaut ist (Abb. 3). FNIII-Domänen bestehen aus sieben antiparallelen β -Strängen (A bis G), die sich zu zwei β -sheets, bestehend aus drei bzw. vier β -Strängen, zusammenlagern [57]. Charakteristisch für Zytokinbindungsmodule sind vier konservierte Cysteinreste in der amino-terminalen und ein WSXWS (W: Tryptophan, S: Serin, X: beliebig)-Motiv in der carboxy-terminalen FNIII-Domäne.

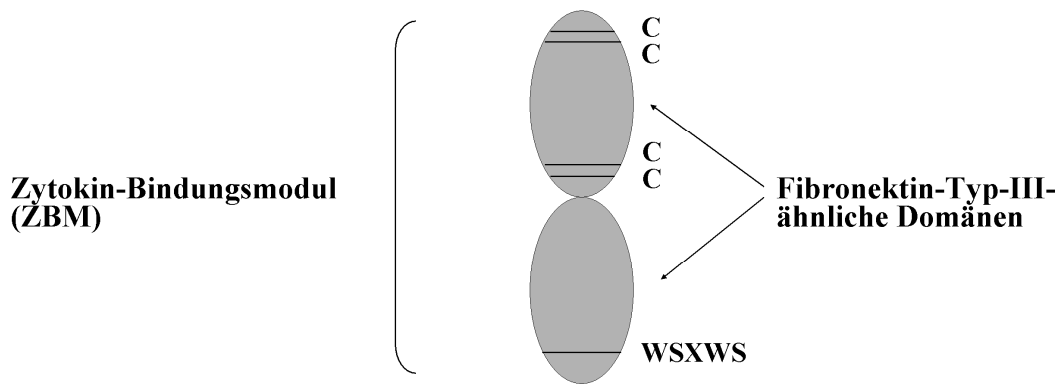


Abb. 3: Das Zytokin-Bindungs-Modul (ZBM) nach Kishimoto et al. [31]

Dargestellt ist das Zytokinbindungsmodul des gp130 mit den FNIII-Domänen D2 und D3.

Nach ihrem Dimerisierungspartner werden die Klasse I-Zytokinrezeptoren in vier Subfamilien unterteilt. Die Rezeptoren der IL-6R-Subfamilie bilden Heteromere mit gp130 aus, die der IL-2R-Subfamilie Heteromere mit IL-2R γ (common gamma chain, γ c), die der IL-3R-Subfamilie Heteromere mit der *common beta chain* (β c), während die *growth-hormone-receptor*-Subfamilie Homodimere ausbildet.

Allen Klasse-I-Zytokinrezeptoren ist gemeinsam, dass sie anders als die Rezeptor-Tyrosinkinasen über keine intrinsische Kinaseaktivität in der zytoplasmatischen Region verfügen. Klasse-I-Zytokinrezeptoren sind mit ihrem membranproximalen zytoplasmatischen Teil mit Tyrosinkinasen der Jak (Janus Kinase)-Familie assoziiert (Abb. 4).

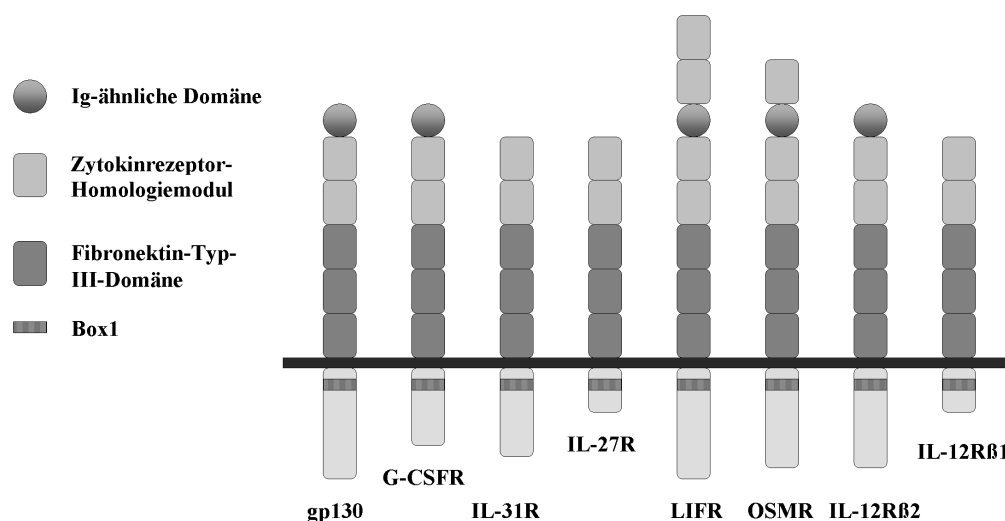


Abb. 4: Schematischer Domänen-Aufbau der Rezeptoren der IL-6/IL-12-Typ-Zytokine

Dargestellt sind die vorhergesagten oder bereits identifizierten Strukturen der einzelnen Domänen der

verschiedenen Rezeptoren. Extrazellulär enthalten die Rezeptoren zwei, das Zytokinrezeptor-Homologiemodul bildende, Domänen. Das Zytokinrezeptor-Homologiemodul wird durch vier konservierte Cysteine in der N-terminalen Domäne und ein WSXWS-Motiv in der C-terminalen Domäne definiert. Außerdem enthält der Rezeptor extrazellulär drei membranproximale FNIII-Domänen und einige Rezeptoren eine Immunglobulin-ähnliche Domäne. Die intrazellulär gelegene Box 1 dient der Assoziation mit Jaks [14].

1.1.3.1 IL-6R α

Der humane IL-6R α (gp80, CD126) existiert sowohl in einer membranständigen (IL-6R α) als auch in einer löslichen Form (sIL-6R α). Diese kann entweder durch alternatives Spleißen der IL-6R-mRNS oder durch limitierte Proteolyse (*shedding*) des Membran-ständigen Rezeptors unmittelbar vor der Transmembran-Domäne entstehen [58-61]. Als Transmembranprotein hat er eine Molmasse von 80 kDa und besteht aus 468 Aminosäuren [62]. Von drei der fünf im Molekül enthaltenen potentiellen Glykosylierungsstellen ist bekannt, dass sie genutzt werden. Der lösliche IL-6R α ist im Komplex mit IL-6 ein agonistisches Molekül, das die IL-6-Aktivität auf responsiven Zellen erhöht und nicht responsive Zellen mit IL-6 stimulierbar macht [63].

Die Bindung von IL-6 an das ZBM des IL-6R α stellt den ersten Schritt der Ausbildung des hexameren signalisierenden IL-6-Rezeptorkomplexes dar. Für den zytoplasmatischen Teil konnte in Bezug auf die Signaltransduktion und Internalisierung keine Aktivität nachgewiesen werden [64, 65]. In polarisierten Zellen wird der IL-6R α an der basolateralen Seite der Zelle exprimiert [66].

1.1.3.2 Gp130

Im IL-6-Rezeptorkomplex ist gp130 für die Signaltransduktion zuständig. Gp130 ist ein Glykoprotein mit einer Masse von 130 kDa und umfasst im reifen Zustand 896 Aminosäuren [67].

Der Extrazelluläranteil besteht aus 597 Aminosäuren und umfasst sechs Domänen, die mit D1 bis D6 bezeichnet werden (Abb. 5). Die N-terminale Domäne D1 entspricht dabei der Immunglobulin-ähnlichen Domäne. Ihr folgt das durch die Domänen D2 und D3 gebildete ZBM. Es zeichnet sich durch vier konservierte Cysteine in der D2 und ein WSXWS-Motiv in der D3 aus. Es folgen die drei Fibronectin-Typ-III-ähnlichen Domänen D4-D6. Von elf im Extrazellulärteil befindlichen potentiellen N-Glykosylierungsstellen werden neun genutzt [68].

Auf den Extrazellulärteil folgt die aus 22 Aminosäuren bestehende Transmembranregion.

Der Intrazellulärteil besteht aus 277 Aminosäuren. Er enthält membranproximal die konservierte Box1/2-Region, die für die Assoziation der Janus-Kinasen essentiell ist [69]. Distal dieser Region befinden sich sechs Tyrosinmotive. Das Tyrosin 759 bindet dabei im aktivierten Zustand die SHP2 [70, 71]. Ebenfalls assoziiert dieses Tyrosin mit SOCS3 [72], eine Mutation führt daher zu verstärkter und verlängerter Phosphorylierung von gp130, Jak und STAT. An den vier membrandistalen Tyrosinen (Y767, Y814, Y905 und Y915) kann STAT1 und STAT3 aktiviert werden (s. Kapitel 1.1.5).

Im zytoplasmatischen Teil des gp130 befindet sich auch ein für die *clathrin coated pits* vermittelte Endozytose zuständiges Di-Leucin-Motiv (Leu786, Leu787). Mutationen in diesem Bereich nehmen dem Rezeptor die Fähigkeit zur Endozytose [73].

Die physiologische Bedeutung von gp130 wird durch Beobachtungen an *knock-out* Mäusen deutlich. Die gp130-*knock-out* Maus ist nicht lebensfähig. Die Embryonen sterben ab Tag 12,5 *post coitum*. Sie weisen Abnormalitäten u.a. in der Hämatopoese und in der Herzentwicklung auf [74].

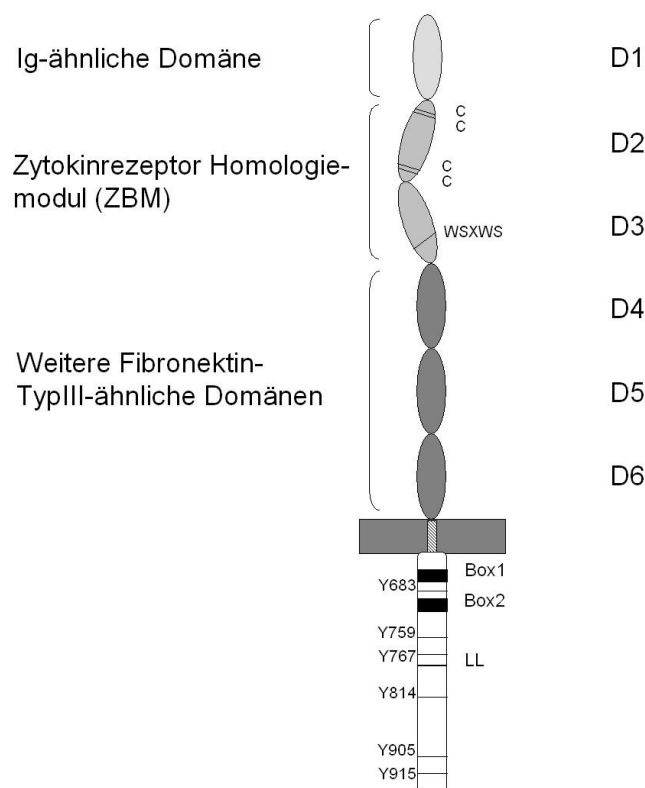


Abb. 5: Schematische Darstellung der signaltransduzierenden Rezeptoruntereinheit gp130

Der Extrazellulärteil des gp130 umfasst die Domänen D1-D6. N-terminal befindet sich mit D1 eine Ig-

ähnliche Domäne. Es folgen die fünf Fibronectin-TypIII-ähnlichen Domänen D2-D6, wovon die zweite und dritte Domäne zu einem Zytokinrezeptor-Homologiemodul (ZBM) zusammengefasst werden. Im zytoplasmatischen Teil befinden sich die für die Assoziation der Janus-Kinasen verantwortlichen Box1 und 2 sowie sechs Tyrosine (Y). Die fünf C-terminalen Tyrosine dienen der Bindung SH2-Domänen-beinhalten der Effektorproteine. Ein Di-Leucin-Motiv (LL) im Intrazellulärteil ist für die Internalisierung essentiell.

1.1.4 Der IL-6-Rezeptorkomplex

Der Interleukin-6-Rezeptorkomplex ist ein hexameres Gebilde, das aus zwei signalkompetenten gp130-, zwei nicht signalkompetenten IL-6R α -, und zwei IL-6-Molekülen besteht. Der erste Schritt in der Ausbildung des aktivierten Rezeptorkomplexes besteht aus der Interaktion des Epitops I von IL-6 mit dem ZBM des IL-6R α . Durch diese Verbindung ist das Bindungsepitop II, ein Komposit-Epitop des binären Komplexes aus IL-6 und IL-6R α , voll ausgebildet. Gleiches gilt für das Bindungsepitop III. Die Reihenfolge der nächsten Schritte ist noch nicht abschließend geklärt.

Nach dem Modell von Pflanz *et al.* bindet IL-6 zunächst über sein Bindungsepitop III an die Ig-ähnliche Domäne D1 eines gp130 Proteins. Anschließend bindet ein zweites gp130-Protein über sein ZBM das Bindungsepitop II des IL-6, so dass ein tetramerer Komplex entsteht [75].

Nach Auffassung von Boulanger *et al.* assoziiert das Bindungsepitop II von IL-6 zuerst mit dem ZBM eines gp130 (Abb. 6 A), bevor die Assoziation des Epitops III von IL-6 an die D1 des gp130 eines zweiten trimeren Komplexes zur Entstehung des hexameren Rezeptorkomplexes führt (Abb. 6 B) [15].

Beide Modelle schlagen einen dreistufigen Prozess vor, in dem es zu einer schrittweisen Ausbildung des endgültigen Rezeptorkomplexes kommt. Die benötigten Komponenten sollen dabei durch Diffusion zusammenfinden. Deutlich beschleunigt und vereinfacht werden könnte die Ausbildung von Rezeptorkomplexen durch das Vorliegen von Homodimeren aus gp130 oder Heterodimeren aus gp130 und IL-6R α . Dann wäre nicht mehr jeder Schritt der Komplexbildung vom diffusionsbedingten Zusammentreffen der Komponenten abhängig.

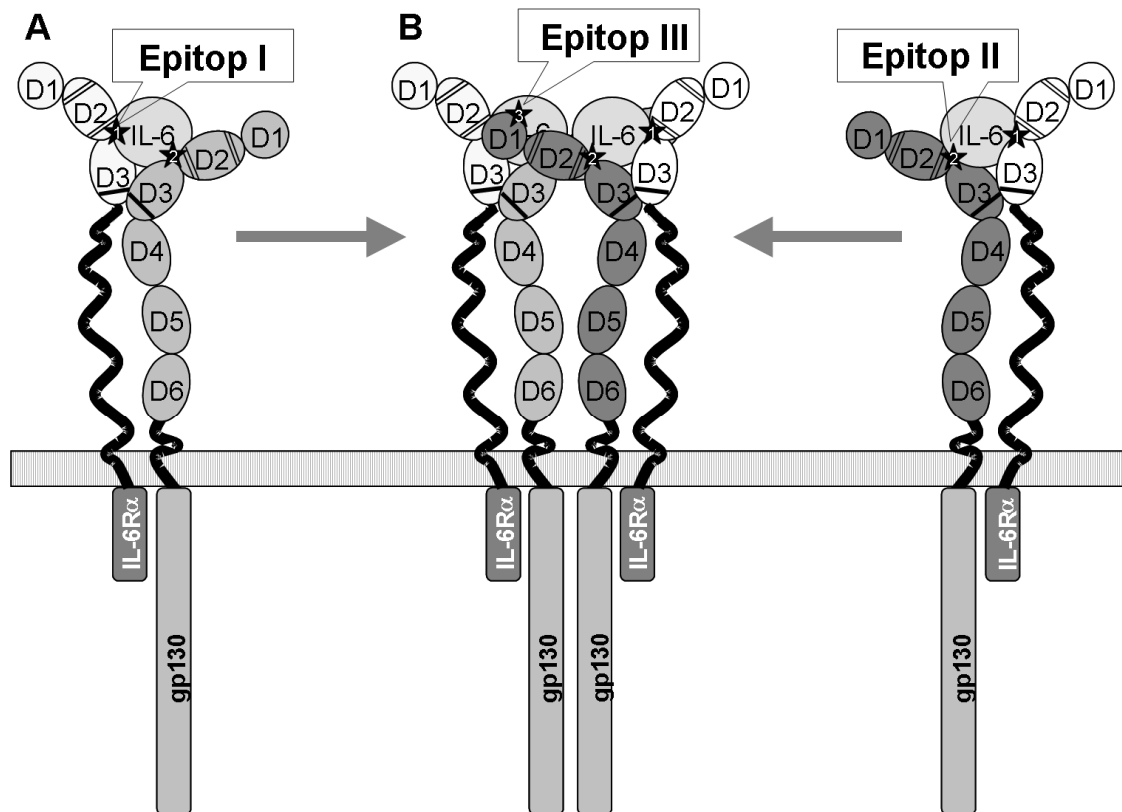


Abb. 6: Der hexamere IL-6-Rezeptorkomplex

Dargestellt ist das Modell der Rezeptorassoziation nach Boulanger et al. (2003). Die nummerierten Sterne markieren die Bindungsepitope des IL-6 [15].

1.1.5 Die Signaltransduktion der IL-6-Typ-Zytokine am Beispiel des IL-6

1.1.5.1 Der Jak-STAT-Signaltransduktionsweg

Nach Ausbildung des hexameren IL-6-Rezeptorkomplexes beginnt die intrazelluläre Signaltransduktionskaskade mit der Phosphorylierung der rezeptorassoziierten Janus-Kinasen (Jak1, Jak2 oder Tyk2) [6]. Die aktivierten Jaks phosphorylieren Tyrosine in der zytoplasmatischen Region von gp130, die in phosphoryliertem Zustand Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren der STAT (*signal transducer and activator of transcription*)-Familie darstellen [6]. Diese werden durch Janus-Kinasen phosphoryliert und translozieren nach Bildung von Homo- oder Heterodimeren in den Zellkern, wo sie sich in punktförmigen Strukturen anreichern [76]. Dort transaktivieren sie im Verbund mit anderen Faktoren Zytokin-responsive Zielgene und regulieren so deren Transkription [6].

1.1.5.2 Der Ras-Raf-MAP-Kinase-Weg

Ebenfalls in die IL-6-Signaltransduktionskaskade eingebunden ist der Ras-Raf-MAPK-

Signalweg. Hierbei wird das Membran-gebundene kleine G-Protein Ras in seine aktive Form überführt. Dies führt zur Phosphorylierung und Aktivierung der Serin/Threoninkinase Raf-1. Über eine weitere Serin/Threoninkinase (MAP-[*mitogen activated protein kinase*] Kinase-Kinase; MAPKK) kommt es zur Aktivierung einer Serin/Threoninkinase, die als MAP-Kinase (MAPK) bezeichnet wird. Diese phosphoryliert eine Reihe von Transkriptionsfaktoren, wie z.B. c-jun, c-myc, c-fos und NF-IL-6, welche die Expression von Ras-induzierten Genen vermitteln [77].

1.1.5.3 Weitere Signaltransduktionswege, die durch Interleukin-6 angeschaltet werden

Neben den Jak/STAT- und Ras-Raf-MAP-Kaskaden werden, abhängig vom jeweiligen Zelltyp, weitere Signalmoleküle durch IL-6 aktiviert. Hierzu gehören PLC γ [78, 79], sowie PI3K und PKB/Akt [80, 81].

1.1.5.4 Inhibitoren des IL-6-Signalweges

Die IL-6-induzierte Signaltransduktion ist in vielen Zellen transient. Der Mechanismus, der zur Abschaltung des Signals führt, ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Verschiedene Möglichkeiten werden in diesem Zusammenhang diskutiert: Kürzlich wurde eine Proteinfamilie beschrieben, die den Jak-STAT-Signalweg inhibieren kann. Zu dieser Familie der SOCS-Proteine (*suppressors of cytokine signalling*) gehören acht Mitglieder (SOCS1 - SOCS7 und CIS-1 (*cytokine inducible SH2-containing protein*)). Sie fungieren als klassische *Feedback*-Inhibitoren, da sie durch Zytokine induziert werden [82-84]. IL-6 induziert die Expression von SOCS3, welches an das Tyrosin 759 des gp130 bindet und dadurch eine Inhibition der Jaks bewirkt (s. Seite 10).

Ein weiterer Inhibitor ist das PIAS-Protein (*protein inhibitor of activated STAT*). Es bindet direkt an phosphoryliertes STAT und verhindert so die STAT-vermittelte Genaktivierung [85].

Die Endozytose oder Degradation der am Signalweg beteiligten Proteine ist für die Signalabschaltung von untergeordneter Bedeutung [5, 6].

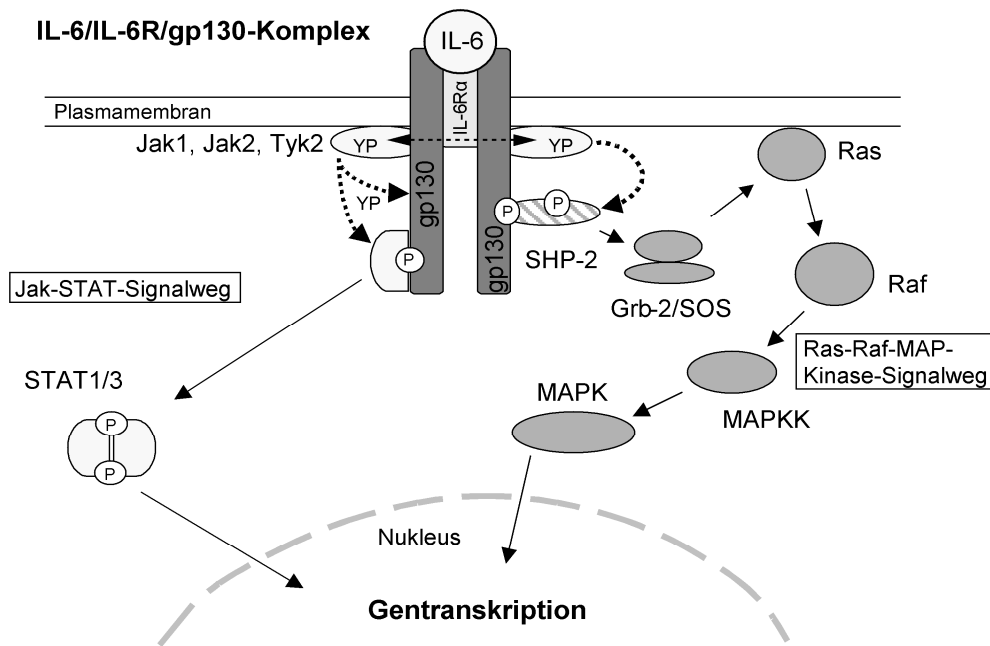


Abb. 7: Darstellung des IL-6 induzierten Signaltransduktionsweges

Die Aktivierung des IL-6/IL-6Rα/gp130-Komplexes führt zur Aktivierung der Jak's, welche zunächst gp130 und dann die STATs (gestrichelte Pfeile) an Tyrosinseitenketten phosphorylieren (Jak-STAT-Signalweg). Der MAP-Kinase-Signalweg wird ebenfalls angeschaltet. Die Aktivierung erfolgt wahrscheinlich über SHP2, welche ebenfalls durch die Jak's phosphoryliert wird (gestrichelter Pfeil).

1.2 Die Aufreinigung von Proteinen

Die Affinitätschromatographie beruht auf der Eigenschaft von biologischen Makromolekülen spezifisch und reversibel an andere Substanzen (Liganden) zu binden. Derartige Interaktionen, die man sich bei der Proteinreinigung durch die Affinitätschromatographie zunutze macht, existieren z.B. zwischen Enzym und Substrat, Antigen und Antikörper und auch zwischen Rezeptor und dem entsprechenden Liganden. Erster Schritt bei der Affinitätschromatographie (Abb. 8) ist die kovalente, irreversible Bindung des Liganden an eine wasserunlösliche polymere Matrix. Idealerweise sollte eine solche Matrix über geeignete chemische Gruppen verfügen, an die der Ligand in ausreichender Menge gekoppelt werden kann. Die mit Ligand gekoppelte Matrix wird nun üblicherweise in eine Säule gefüllt, auf die im nächsten Schritt ein Substanzgemisch gegeben wird, das die zu isolierende Substanz enthält. Diese Komponente bindet mit hoher Spezifität an den immobilisierten Liganden, während alle anderen Bestandteile des Substanzgemisches die Säule ungebunden passieren.

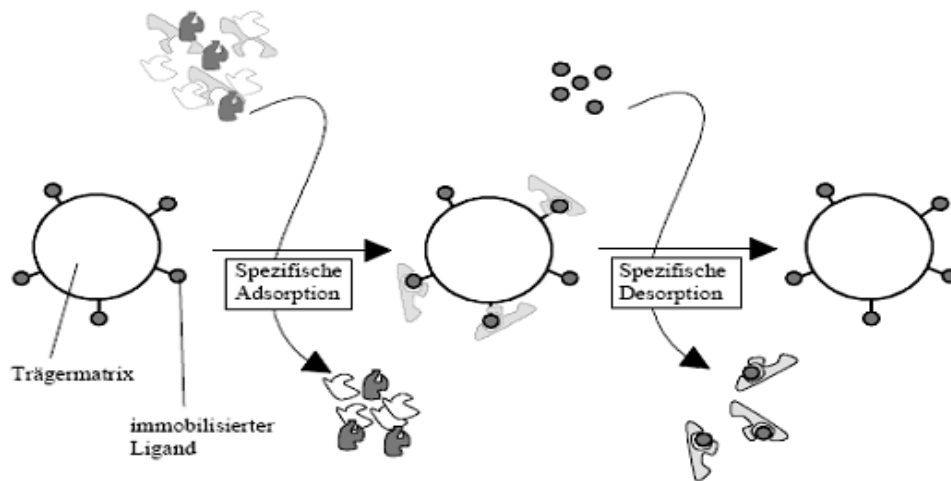


Abb. 8: Schematische Darstellung der Affinitätschromatographie

Schematische Darstellung der Aufreinigung eines Proteins mittels Affinitätschromatographie. Gezeigt ist die Adsorption und die Elution des Proteins (nach [86]).

Wesentlich für den Trennprozess ist die nachfolgende Elution. Die Dissoziation der Komponente aus der Bindung an „Affinitätsmatrix“ kann dabei durch einen Überschuss an Ligand oder durch eine starke Veränderung des pH-Wertes oder der Ionenstärke erfolgen [87, 88].

1.3 Das Grün fluoreszierende Protein

Das Grün fluoreszierende Protein (GFP) wurde von Shimomura *et al.* aus der im Pazifischen Ozean lebenden Qualle *Aequorea victoria* isoliert [89]. Das GFP ermöglicht diesem Meeresorganismus Biolumineszenz mit hoher Energieausbeute, indem es die Anregungsenergie aus der Chemilumineszenz-Reaktion des Photoproteins Aequorin, das im Komplex mit GFP vorliegt, strahlungsfrei absorbiert (FRET, s. Kapitel 1.4) und mit hoher Quantenausbeute als grünes Licht abstrahlt. Das durch Aequorin-Chemilumineszenz entstandene blaue Licht wird so in einen langwelligeren Wellenlängenbereich verschoben. Die GFP-Tertiärstruktur besteht aus einer als β -barrel bezeichneten, zylinderförmigen Anordnung von elf β -Strängen. Diese wird von einer zentralen, mit dem Chromophor verbundenen, α -Helix durchzogen. Das Molekül erinnert so an eine Laterne mit einem leuchtenden Docht im Inneren. Oben und unten ist der Zylinder durch weitere Strukturelemente geschlossen. Das eigentliche Fluorophor des GFP bildet sich dabei offenbar

autokatalytisch aus der Tripeptidsequenz Ser65-Tyr66-Gly67 innerhalb der 238 Aminosäuren umfassenden Polypeptidkette (Abb. 9) [90-92].

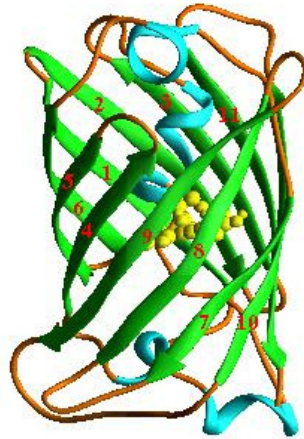


Abb. 9: Struktur des Grün fluoreszierenden Proteins (GFP)

Schematische Ansicht des GFP. Es handelt sich um ein barrel aus 11 β -Strängen (grün), in das eine α -Helix hineinragt (hellblau). Das mit der α -Helix verbundene Chromophor (gelb) liegt vollkommen abgeschirmt im Inneren des β -barrels [93].

Nach der Klonierung des Proteins durch Prasher *et al.* [91] fanden zahlreiche Versuche statt, durch gezielte Mutationen seine Eigenschaften den experimentellen Erfordernissen noch besser anzupassen. Diese Varianten des GFP weisen veränderte spektrale Eigenschaften, eine höhere Quantenausbeute oder eine erhöhte Photostabilität auf [92].

Name	Mutationen gegenüber GFP	Maximum des Anregungsspektrums in nm	Maximum des Emissionsspektrums in nm
CFP	F64L, S65T, Y66W, N146I, M153T, V163A	434, 452	476, 505
YFP	S65G, V68L, S72A, T203Y	514	527

Tab. 1: Varianten des Grün fluoreszierenden Proteins (nach Tsien (1998) [92])

1.4 Die konfokale *laser-scanning* Mikroskopie als Mittel zur Klärung funktioneller Eigenschaften von Proteinen

Nach der kompletten Sequenzierung der Genome vieler Organismen hat sich der Schwerpunkt der molekularbiologischen Forschung unter dem Schlagwort „*from Genomics to Proteomics*“ wieder hin zu den Proteinfunktionen verschoben. Diese Funktionen zu untersuchen, bleibt mit den bisher verwendeten molekularbiologischen Methoden jedoch schwierig, weil Proteine innerhalb von Zellen oftmals in verschiedenen Kompartimenten lokalisiert sind, Bewegungsprozessen, wie Diffusion oder gerichteter Bewegung, unterliegen und mit anderen Molekülen interagieren.

Um zu klären in welchen Kompartimenten der Zelle sich Proteine befinden, mussten diese bislang durch chemische oder physikalische Behandlung aufgeschlossen und Zentrifugationsprozessen unterworfen werden. Auch die Klärung von Interaktionsprozessen durch die häufig verwendete Ko-Immunpräzipitation erforderte das Aufschließen der Zellen. Sie ermöglicht die Analyse insbesondere fester Assoziationen zwischen zellulären Proteinen. Alle Aufschlussmethoden stören aber die in intakten Zellen vorhandenen Interaktionen zwischen Proteinen und die Analyse der ursprünglichen Lokalisation der Zielproteine.

Für die im Mittelpunkt dieser Arbeit stehenden Untersuchungen der Assoziationen zwischen Bestandteilen des IL-6-Rezeptorkomplexes sollten solche Fehlerquellen durch die Verwendung schonenderer Technologien vermieden werden. Eine Untersuchung der intakten Zelle, die allenfalls minimale Zellschäden hinterlässt, ermöglicht die konfokale *laser-scanning* Mikroskopie.

Basierend auf den Prinzipien der Lichtmikroskopie können Farbstoffe, die vorher an Proteine gekoppelt wurden, sichtbar gemacht werden. Die Verwendung einer konfokalen Optik in Verbindung mit der Fluoreszenzmikroskopie erlaubt es zudem, die Verteilung der Fluoreszenzsignale in optischen Schnitten zu untersuchen.

Die Aufnahme zeitaufgelöster konfokaler Bildfolgen bzw. dreidimensionaler Datensätze ermöglicht die Verfolgung dynamischer Veränderungen, die gerade auch bei der Untersuchung lebender Zellen eine große Rolle spielt.

Genau ansteuerbare Laser erlauben die Anwendung spezieller Techniken, wie etwa des *fluorescence recovery after photobleaching* (FRAP). Es wird dabei die diffusionsbedingte Fluoreszenzwiederkehr nach dem Ausbleichen eines bestimmten Areals in lebenden Zellen untersucht. Mit diesen Daten können die Diffusionskonstanten von Proteinen bestimmt

werden.

Besonders geeignet um die Interaktion von Proteinen darzustellen, erscheint darüber hinaus der Nachweis des *fluorescence resonance energy transfer* (FRET), auch als Förster-Transfer bezeichnet, und die *bimolecular fluorescence complementation* (BiFC). FRET bezeichnet den strahlungslosen Energietransfer eines angeregten Donorfluorophors auf einen Akzeptorfluorophor. Dieser emittiert die übertragene Energie in Form von Fluoreszenz. Voraussetzung für das Auftreten von FRET ist eine enge räumliche Nähe der Fluorophore und die Überlappung des Emissionsspektrums des Donors mit dem Anregungsspektrum des Akzeptors. Bei Verwendung gebräuchlicher Fluoreszenzfarbstoffe, wie z.B. GFP, erlaubt FRET die Detektion von Molekülannäherungen im Bereich von 0-10 nm [94, 95]. Bei der BiFC wird die Eigenschaft bestimmter GFP-Fragmente genutzt, bei relativ langfristiger Zusammenlagerung ($t_{1/2} \approx 1$ min [96]) einen fluoreszierenden Komplex auszubilden. Die BiFC-Technologie gibt außerdem Hinweise auf die Interaktionsdauer und Lokalisation der mit den GFP-Fragmenten verbundenen Proteine.

Diese Methoden erweitern den Anwendungsbereich der konfokalen Mikroskopie weit über die reine Bildanalyse hinaus und ermöglichen Aussagen über Assoziation und Bewegung von Molekülen in lebenden Zellen, wie sie mit konventionellen molekularbiologischen Methoden bislang nicht möglich waren.

1.5 Ziel der Arbeit

Der aktivierte hexamere Rezeptorkomplex des Interleukin-6 besteht aus dem IL-6, dem nicht signalkompetenten Zytokinrezeptor IL-6R α , sowie dem signalkompetenten Zytokinrezeptor gp130. Bisherige Modelle schlagen eine schrittweise, diffusionsabhängige Assoziation der beteiligten Rezeptorkomponenten nach IL-6-Stimulation vor.

Bereits vor dem Eintreffen des Liganden in der Plasmamembran existierende Homodimere aus gp130 oder Heterodimere aus gp130 und dem IL-6R α würden die Empfindlichkeit des Rezeptors gegenüber dem Liganden verbessern und die Entstehung des Rezeptorkomplexes entscheidend vereinfachen und beschleunigen, da nicht mehr jeder Schritt der Komplexbildung vom zufälligen Zusammentreffen der Komponenten durch Diffusion abhängen würde. Ein solches Modell wurde beispielsweise für den EpoR und den IL-2R bereits nachgewiesen. Endgültige Aussagen über die Prädimerisierungsverhältnisse beim

gp130-Homodimer bzw. gp130-IL-6R α -Heterodimer konnten hingegen noch nicht getroffen werden, nicht zuletzt da niedrig-affine Wechselwirkungen, welche solche transienten Assoziationen ermöglichen würden, durch herkömmliche molekularbiologische Untersuchungsmethoden nur schwer nachzuweisen sind.

In dieser Arbeit wurde als Untersuchungsmethode deshalb die konfokale *laser-scanning* Mikroskopie in Verbindung mit fluoreszierenden Rezeptorproteinen gewählt, da so die Darstellung auch schwacher Wechselwirkungen zwischen Proteinen an lebenden Zellen möglich wird.

Zunächst sollte ein Fusionsprotein zwischen einer Variante des Grün fluoreszierenden Proteins (YFP) und dem Liganden des Rezeptorsystems, IL-6, kloniert, exprimiert und aufgereinigt werden. Eine Grundvoraussetzung für die Arbeit mit fluoreszierenden Proteinen ist deren genaue Charakterisierung. Hierzu wurde YFP-IL-6 hinsichtlich seiner Bioaktivität sowohl mit molekularbiologischen Methoden als auch fluoreszenzspektrometrisch vergleichend zum unmarkierten IL-6 untersucht.

Zur Klärung der stimulationsunabhängigen Aggregationszustände der Bestandteile des IL-6-Rezeptorkomplexes sollte YFP-IL-6 in Bindungsstudien mit im extrazellulären Teil verkürzten Varianten des gp130 für die Analyse am konfokalen *laser-scanning* Mikroskop eingesetzt werden. Dazu waren die entsprechenden Mutanten als Fusionsproteine mit GFP kloniert worden.

Die vorliegende Arbeit kann als Basis für weitere Studien zur Rezeptordimerisierung mit Hilfe der konfokalen *laser-scanning* Mikroskopie dienen.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien, Enzyme und Lösungen

Die verwendeten Chemikalien wurden in der Regel in *pro analysis* Qualität eingesetzt. Soweit im Text nicht anders angegeben, wurden Enzyme der Firmen Roche Diagnostics GmbH, Deutschland und New England Biolabs, USA verwendet. Alle Puffer und Medien für die Bakterienkulturen wurden in wässriger Lösung (Qualität: Millipore; Millipore, Deutschland) angesetzt.

2.2 Zytokine und lösliche Rezeptoren

Es wurden folgende Zytokine im Rahmen dieser Arbeit verwendet:

IL-6	Rekombinantes humanes IL-6 wurde nach der Methode von Arcone <i>et al.</i> [97] hergestellt. Die spezifische Aktivität betrug 2×10^6 BSF2 (B-cell stimulatory factor 2) U/mg.
sIL-6R	Die lösliche Form des IL-6R wurde rekombinant im Baculovirus-Expressionssystem hergestellt [98].
Trx-IL-11	Rekombinantes Fusionsprotein aus Thioredoxin (N-terminal) und humanem Interleukin-11. Trx-IL-11 wurde wie von Dahmen <i>et al.</i> [99] beschrieben in <i>E. coli</i> exprimiert.
YFP-IL-6	Rekombinantes Fusionsprotein aus YFP (N-terminal) und IL-6 (C-terminal), s. insbesondere Kapitel 2.4.1, 2.4.2, 2.5, 2.8.2, 2.8.3 und Kapitel 3.1.

2.3 Antikörper

Es wurden folgende Antikörper im Rahmen dieser Arbeit verwendet:

B-T2	Monoklonaler Antikörper gegen die erste Domäne von humanem gp130; freundlicherweise von Dr. J. Wijdenes (Diaclone, Besançon, Frankreich) zur Verfügung gestellt [100].
B-P8	Monoklonaler synergistischer Antikörper gegen das ZBM von humanem gp130; freundlicherweise von Dr. J. Wijdenes zur Verfügung gestellt [100].
B-S12/G7	Monoklonaler agonistischer Antikörper gegen das ZBM von humanem gp130; freundlicherweise von Dr. J. Wijdenes zur Verfügung gestellt [100, 101].
B-P4	Monoklonaler Antikörper gegen die vierte Domäne von humanem gp130; freundlicherweise von Dr. J. Wijdenes zur Verfügung gestellt [100].
IL-6-Antikörper (mAb16)	Monoklonaler Maus-Antikörper gegen IL-6.
IL-6-Antikörper (ELISA)	Polyklonaler biotinylierter IL-6-Antikörper.
GFP-Antikörper	Polyklonaler Ziege-Antikörper, gegen das <i>green fluorescent protein</i> (Rockland, USA). Der Antikörper erkennt auch die <i>cyan</i> (CFP) und <i>yellow</i> (YFP) Varianten des Proteins.
STAT3-Antikörper	Polyklonaler Antikörper (Santa Cruz, CA, USA).
STAT3-P-Antikörper	Polyklonaler Antikörper, spezifisch gegen tyrosinphosphoryliertes STAT3 (New England Biolabs, Frankfurt, Germany).
p38-Antikörper	Polyklonaler Antikörper (Santa Cruz, CA, USA).
p38-P-Antikörper	Polyklonaler Antikörper, spezifisch gegen phosphoryliertes p38 (Promega, Madison, USA).
ERK 1,2-Antikörper	Polyklonaler Kaninchen-Antikörper (Cell Signalling Technology Inc., Beverly, USA).

ERK 1,2-P-Antikörper	Polyklonaler Kaninchen-Antikörper spezifisch gegen (pThr202/pTyr204)-p44/42 (Cell Signalling Technology Inc., Beverly, USA).
----------------------	--

2.4 DNS

2.4.1 Plasmide

Es wurden folgende Plasmide im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendet:

pSVLΔEcoRIgp130-CFP	Enthält cDNS für das Fusionsprotein aus humanem gp130 und CFP (CFP am C-Terminus von gp130).
pSVLΔEcoRIgp130-YFP	Enthält cDNS für das Fusionsprotein aus humanem gp130 und YFP (YFP am C-Terminus von gp130).
pSVLΔEcoRIgp130/id-CFP	Enthält cDNS für ein verkürztes Fusionsprotein aus humanem gp130 und CFP, in welchem Val1 von CFP direkt auf Pro668 von gp130 folgt.
pSVLΔEcoRIgp130/id-YFP	Enthält cDNS für ein verkürztes Fusionsprotein aus humanem gp130 und YFP, in welchem Val1 von YFP direkt auf Pro668 von gp130 folgt.
pSVLΔEcoRIgp130/ΔD1id-CFP	Enthält cDNS für ein verkürztes Fusionsprotein aus humanem gp130 und CFP, in welchem Val1 von CFP direkt auf Pro668 von gp130 folgt; gp130 fehlt die erste Extrazellulärdomäne (D1) und beginnt erst bei Ala 96.
pSVLΔEcoRIgp130/ΔD2,3id-CFP	Enthält cDNS für ein verkürztes Fusionsprotein aus humanem gp130 und CFP, in welchem Val1 von CFP direkt auf Pro668 von gp130 folgt; gp130 fehlte die zweite und dritte Extrazellulärdomäne (D2 und D3), d.h. auf Leu 124 der ersten Domäne folgt nach einem 6-Aminosäurelinker Tyr 322 der vierten Domäne.
pSVLΔEcoRIIL-6Rα-YFP	Enthält cDNS für ein verkürztes Fusionsprotein aus humanem IL-6Rα und YFP, in dem nach Ser 443 des IL6Rα zuerst Arg

	als zusätzliche Aminosäure und dann Val1 von YFP folgt.
pSBCLIFR/id-CFP	Enthält cDNS für ein verkürztes Fusionsprotein aus humanem LIFR und N-terminaler Hälfte von CFP, in dem nach Leu 882 des LIFR ein Verbindungsstück aus Ser-Arg und anschließend CFP, beginnend mit Val1 folgt; das Plasmid wurde freundlicherweise von Dr. A. Timmermann (Institut für Biochemie, RWTH Aachen) zur Verfügung gestellt.
pIB/v5-his	Vektor zur Expression von Proteinen in Insektenzellen (Invitrogen).
pRset5d-IL-6	Enthält die cDNS für humanes IL-6.
puc13 IL-6	Enthält die cDNS für humanes IL-6, diente zur Amplifikation der Signalsequenz für IL-6.
PCR 2.1-TOPO	Vektor des TOPO TA Cloning-Kits (Invitrogen, USA).
pIB/v5-his-YFP-IL-6	Vektor zur Expression von YFP-IL-6 in H5-Zellen.

2.4.2 Oligonukleotide

Alle verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma MWG bezogen. Die folgenden Oligonukleotide dienen der Expression von Konstrukten in eukaryotischen Zellen:

- #1) BspE1sense: 5'-GGT AGT ACA TCC GGA TCA TAT GAA GAT AGA CCA TCT AAA GC-3'
- #2) BGBstE2as: 5'-GGA GGA GTG TGA GGT GAC C-3'
- #3) D1pSVLsense: 5'-GGA TCG ATC CCT CGA GTC-3'
- #4) BspE1as: 5'-TGA TCC GGA TGT ACT ACC CAA GCC TGA AAT TAT TGT GAT TC-3'
- #5) sense 5'-AGA TAT GAA TTC GCC CCA-3'
- #6) as 5'-GTG GCA GCA GCC AAC TCA-3'
- #7) sense 5'-TAA GCA GAG CTG GTT TAG-3'
- #8) as 5'-TGC GGC CGA ATT CCT TGT A-3'
- #9) sense 5'-GAA TTC TCG AGA ACG AAA G-3'
- #10) as 5'-TGA GGG TAC CAT GGC AGG GAA G-3'.

Die Oligonukleotide #1- #4 wurden zur Klonierung der Deletionsmutante gp130/ΔD2,3-CFP

benutzt.

Die Oligonukleotide #5- #10 wurden zur Klonierung des YFP-IL-6-Fusionsproteins benutzt (s. Kapitel 2.7.11).

2.5 Eukaryotische Zelllinien und deren Kultivierung

2.5.1 Permanente Zelllinien

Es wurden folgende Zelllinien im Rahmen dieser Arbeit verwendet:

COS7	Adhärenz wachsende Affennierenzellen; zur Verfügung gestellt von Dr. I. Kerr (London, England)
HepG2	Adhärenz wachsende humane Hepatomzellen (ATCC, Manassas VA, USA)
Ba/F3-gp130-IL-6R α ; -gp130-IL-11R	Ba/F3-Zellen, die stabil gp130 und den IL-6R α bzw. gp130 und den IL-11R α exprimieren; G418-resistent; von Dr. U. Horsten (Horsten <i>et al.</i> , 1997) zur Verfügung gestellt.
H5-Zellen	Adhärenz wachsende Insektenzellen (Invitrogen). Die Zellen wurden aus der <i>Trichopulsia ni</i> -Zelllinie gewonnen und für die Expression rekombinanter Proteine in serumfreier Kultur optimiert.

2.5.2 Nährmedien und Lösungen für die Zellkultur

Es wurden folgende Zellkulturmedien bzw. Zusätze im Rahmen dieser Arbeit verwendet:

DMEM-Flüssigmedium mit 4,5 g/l Glukose	(Invitrogen, USA)
DMEM/F12-Flüssigmedium mit 4,5 g/l Glukose	(Life Technologies, Karlsruhe)
Sf-900II-Medium	(Invitrogen, Paisley, Scotland)
FKS, mycoplasmenfreies fötales Kälberserum	(CytoGen GmbH, Sinn)
Penicillin (10.000 U) /Streptomycin (10 mg)	(Cambrex BioScience, Belgien)
Blastizidin	(Cambrex BioScience, Belgien)
Trypsin (0,05%)/EDTA (0,02%)-Lösung	(Cambrex BioScience, Belgien)
PBS	0,2 M NaCl

2,5 mM KCl
8 mM Na₂PO₄
1,5 mM KH₂PO₄
pH 7,4

Die Zellen wurden in DMEM/F12- (HepG2) oder DMEM- (COS7, Ba/F3) oder Sf-900II-Medium (H5-Zellen) kultiviert. Den Medien wurden 10% Hitze-inaktiviertes FKS (außer im Fall der H5-Zellen) sowie 60 mg/l Penicillin und 100 mg/l Streptomycin zugesetzt (außer im Fall der H5-Zellen). Dem Medium für Ba/F3-Zellen wurde außerdem 5% konditionierter, mIL-3 enthaltender Kulturüberstand von X63Ag8-653BPV-mIL-3-Zellen zugegeben. Dem Medium für H5-Zellen wurde 2 µg/ml Blastizidin zugesetzt.

Die Kultivierung der Zellen erfolgte bei 37°C bzw. 28°C (H5-Zellen) in wassergesättigter Luft mit 5% CO₂. Zur Weiterkultivierung wurden konfluente Zellen nach Abspülen des Mediums mittels PBS durch Behandlung mit Trypsin-Lösung bei 37°C von der Platte gelöst und mit Kulturmedium von der Platte gespült. Anschließend wurden die Zellen bei 130 g zentrifugiert und in Verdünnungen von 1:2 bis 1:10 in neuem Medium aufgenommen.

Die Langzeitlagerung der Zellen erfolgte nach Zugabe von 10% DMSO und 10% FKS in Kulturmedium in flüssigem Stickstoff.

2.6 Prokaryontische Zellen und deren Kultivierung

2.6.1 Verwendete Stämme 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, Karlsruhe).

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, Karlsruhe).

LB-Medium

10 g/l Bactotrypton

5 g/l Hefe-Extrakt (Difco)

5 g/l NaCl

2.6.2 Herstellung kompetenter Bakterien

500 ml LB-Medium wurden mit der Vorkultur angeimpft, bis eine optische Dichte (OD_{600}) von 0,01 erreicht war. Die Bakterien wurden bis zum Erreichen einer OD_{600} von 0,3 bis 0,6 bei 37°C in einem thermostatisierten Schüttelinkubator kultiviert. Nach Überführung der Bakteriensuspension in 50 ml Falcon-Gefäße wurden Bakterien durch Zentrifugation bei 4°C und 3.000 g sedimentiert. Die Bakterien wurden mit 4°C kaltem TSB-Puffer resuspendiert und im Anschluss bei 4°C für 10 min inkubiert. Nach Aliquotieren wurde die Suspension in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

TSB-Puffer: LB-Medium (vgl. Kapitel 2.6.1)
 + 10% PEG (w/v)
 + 5% DMSO
 + 10 mM $MgSO_4$
 + 10 mM $MgCl_2$

2.6.3 Transformation kompetenter Bakterien

Zur Transformation von Bakterien wurden 1 ng DNS bzw. 10 µl des Ligationsansatzes mit 100 µl der kompetenten Zellen in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß gemischt und für 20 min auf Eis gestellt. Anschließend wurden die Zellen für 90 s bei 42°C inkubiert und für 2 min auf Eis abgekühlt. Im nächsten Schritt wurden 500 µl LB-Medium zugegeben und die Zellen zur Expression des Resistenzgens für 30 min bei 37°C inkubiert [102]. Danach wurde die Suspension auf LB-Platten mit geeignetem Antibiotikum ausplattiert. Die so behandelten Agarplatten wurden über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Ausgewählte Bakterienkolonien wurden mittels DNS-Präparation und DNS-Restriktion weiter analysiert.

2.7 Präparation und Analyse von Plasmid-DNS

2.7.1 Isolierung von Plasmid-DNS

Die Präparation von Plasmid-DNS im kleinen Maßstab diente der Charakterisierung rekombinanter Plasmide. Der Zellaufschluss und die Gewinnung der Plasmid-DNS erfolgte

mit Hilfe des QIAprep Spin-Miniprep Kits (Qiagen, Hilden) nach den Angaben des Herstellers. Die Überprüfung der DNS erfolgte durch Verdau mit geeigneten Restriktionsenzymen und Darstellung der Fragmente in der Agarose-Gelelektrophorese. Die DNS wurde in doppelt destilliertem Wasser (Qualität: Millipore, Millipore, Eschborn) aufgenommen und bei -20°C gelagert. Zur Plasmidpräparation in präparativem Maßstab (50-500 μg) wurden Übernachtskulturen von 50-500 ml mit Hilfe des QIAGEN Plasmid Maxi bzw. Midi Kits (Qiagen, Hilden) nach Herstelleranleitung aufgearbeitet. Die DNS wurde in Wasser aufgenommen. Zur Bestimmung der Menge und Qualität der Plasmid-DNS wurde im Anschluss an die Präparation eine photometrische Messung (vgl. Kapitel 2.7.2) durchgeführt.

2.7.2 Quantitative Nukleinsäurebestimmung

Die Quantifizierung der DNS erfolgte absorptionsphotometrisch in einem UV-Photometer (Pharmacia). Zur Messung wurde die DNS-Lösung 1:400 oder 1:200 verdünnt und die Absorption bei 260 nm (A_{260}) und 280 nm (A_{280}) in einer 1 ml Quarzküvette gemessen. Eine Absorption $A_{260}=1,0$ entspricht 50 μg doppelsträngiger DNS. Die Reinheit der Nukleinsäurepräparationen wurde mit Hilfe der A_{280} ermittelt, der Quotient $A_{260}:A_{280}$ sollte bei 1,7-2,0 liegen. Zur Konzentrationsabschätzung geringerer Mengen DNS ($<0,5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) wurde eine Agarose-Gelelektrophorese (vgl. Kapitel 2.7.6) durchgeführt und die Menge aufgrund der Leuchtintensität und Dicke der Bande im Vergleich zu einem definierten Marker abgeschätzt.

2.7.3 DNS-Fällung

DNS wurde durch Zugabe von 1/10 Volumen einer 3 M Natriumacetatlösung (pH 5,2) und 2 Volumen 100%-igem Ethanol und 30-minütiger Inkubation auf Eis aus einer wässrigen Lösung gefällt [102].

2.7.4 DNS-Restriktionsverdau

Die enzymatische Restriktion von DNS erfolgte nach Standardvorschriften [102], unter Berücksichtigung der Empfehlungen der Enzymhersteller. Zur Analyse von Plasmid-DNS durch Restriktionsschnitte wurden 0,5-1 μg DNS pro Restriktion eingesetzt. Zu präparativen Zwecken wurden 1-5 μg DNS geschnitten. Die Restriktionszeiten lagen bei 60 bis 180 min.

2.7.5 Dephosphorylierung linearisierter DNS

Ein mögliches Problem bei der Ligation von durch Restriktionsenzyme verdauter DNS ist die

Religation von linearisierter DNS. Um dies weitgehend zu vermeiden und so die Effizienz der Insertion einer Fremd-DNS zu erhöhen, wurde die endständige 5'-Phosphatgruppe entfernt [102]. 100-200 ng DNS wurden mit 1 U alkalischer Phosphatase 30 min bei 37°C inkubiert. Das linearisierte Plasmid wurde anschließend über eine Agarose-Gelelektrophorese aufgereinigt und isoliert.

2.7.6 Gelelektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren

DNS-Fragmentgemische wurden nach Zusatz von 1/10 Volumen 10x-DNS-Probenpuffer in einem elektrischen Feld von 5 V/cm in einem 1% TAE-Agarosegel aufgetrennt (SeaKem-LE-Agarose, Biozym) [102]. Um die DNS sichtbar zu machen, wurde dem Agarosegel Ethidiumbromid (0,1 µg/ml) beigelegt. Die DNS-Banden ließen sich durch Belichtung mit UV-Licht darstellen. Als Größenmarker wurde die 1 Kb *DNS-Extension-Ladder* (LifeTechnologies, Karlsruhe) benutzt.

10x-DNS-Probenpuffer:	0,4% Xylencyanol 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 Agarose (FMC, Rockland, ME, USA)

2.7.7 Isolierung von DNS-Fragmenten aus Agarosegelen

Aus DNS-Restriktionen oder PCR gewonnene DNS-Fragmente wurden im Agarosegel aufgetrennt und mit Hilfe des *QIAquick Gel Extraction Kit* (Qiagen, Hilden) aus der Gelmatrix isoliert und in Wasser aufgenommen

2.7.8 DNS-Ligation

Zur Ligation wurden linearisierter Vektor und einzufügende DNS in einem Verhältnis von 1:2 bis 1:10 in Endkonzentrationen von 0,5-5 ng/µl eingesetzt und für 2-16 h bei 14°C mit der T4-DNS-Ligase (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) und geeigneten Puffern inkubiert. 10 µl des Ansatzes wurden jeweils für eine Transformation von *E. coli* eingesetzt.

10x Ligationspuffer:	440 mM	TrisHCL, pH 8,0
	220 mM	TrisHCL, pH 7,4
	100 mM	DTT
	100 mM	MgCl ₂
	5 µg/ml	BSA
	10 mM	ATP

2.7.9 Automatische DNS-Sequenzierung

Das Prinzip der automatischen DNS-Sequenzierung beruht auf der Anregung und Detektion fluoreszenzmarkierter Didesoxynukleotide, die in einer vorgeschalteten PCR entstandene DNS-Stränge terminieren und gleichzeitig markieren. Zur Verwendung kam in unserer Arbeitsgruppe ein ABIprism Modell 310 Sequenzierer (PE Biosystems, Weiterstadt). Zur Präparation der DNS-Proben wurde das ABIprism *Ready Reaction DyeDeoxy Terminator Cycle Sequencing Kit* (PE Biosystems, Weiterstadt) verwendet. Dazu wurden alle benötigten Lösungen mit LiChrosolv Wasser (Merck, Darmstadt) angesetzt.

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

Die DNS wurde in 25 Reaktionszyklen in einem *Thermocycler* amplifiziert. Ein Reaktionszyklus bestand aus der Denaturierung der DNS (96°C, 20 s), der Hybridisierung der Oligonukleotide an die homologe Zielsequenz (20 s) bei einer Temperatur, die 8°C unter dem errechneten Schmelzpunkt lag und der DNS-Elongation, bei der die Verlängerung des freien 3'-OH-Endes der Oligonukleotide durch die *AmpliTaq*-Polymerase erfolgte (4 min, 60°C). Zur Errechnung des Schmelzpunktes der an die DNS zu hybridisierenden Oligonukleotide wurden je G/C-Paar 4°C und A/T-Paar 2°C eingesetzt.

Nach der Amplifikation wurde die DNS gefällt. Dazu wurde der Lösung 80 µl Wasser, 10 µl 3 M Na-Acetat (pH 5,2) und 200 µl 100%-iges Ethanol zugegeben. Das DNS-Präzipitat wurde in einem nächsten Schritt mit kaltem, 70%-igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in *Template Suppression Reagent* (PE Biosystems, Weiterstadt) wie vom Hersteller beschrieben aufgenommen. Die Proben wurden 2 min bei 90°C denaturiert. Die Auftrennung und Detektion der DNS-Fragmente erfolgte mittels Kapillarelektrophorese.

2.7.10 PCR-Reaktion

PCR-Reaktionen wurden wie folgt angesetzt:

1-10 ng DNS-Matrize
0,1-0,5 nmol *Primer*
0,5 µl dNTPs (je 250 µM dATP, dGTP, dCTP, dTTP)
0,5 U Taq-Polymerase
ad 50 µl Wasser

Es wurden folgende Schritte im *Thermocycler* durchgeführt:

Erste Denaturierung:	2 min	94°C
35 Zyklen:		
<i>Primer</i> -Bindung	2 min	*
Extension:	2 min	72°C
Denaturierung:	1 min	94°C
Letzte Extension:	5 min	72°C

*Die Temperatur ist abhängig vom jeweiligen A/T- und G/C-Gehalt der bindenden Sequenzen. Zur Errechnung des Schmelzpunktes der an die DNS zu hybridisierenden Oligonukleotide wurden je G/C-Paar 4°C und je A/T-Paar 2°C eingesetzt. Als Bindungstemperatur wurde eine gegenüber der errechneten Schmelztemperatur um 8°C erniedrigte Temperatur gewählt.

2.7.11 Herstellung des YFP-IL-6-Plasmids

Für die Klonierung von YFP-IL-6 wurden Standardklonierungstechniken eingesetzt. Der pRset5d-Vektor, der die cDNS von humanem IL-6 enthält, wurde als Template für die PCR genutzt. (Sense Oligonukleotid: 5'- AGA TAT GAA TTC GCC CCA -3'; Anti-sense Oligonukleotid: 5'- GTG GCA GCA GCC AAC TCA -3'). Die cDNS für YFP wurde aus dem peYFP C1-Vektor (Invitrogen, Groningen, Niederlande) amplifiziert (Sense Oligonukleotid: 5'- TAA GCA GAG CTG GTT TAG -3'; Anti-sense Oligonukleotid: 5'- TGC GGC CGA ATT CCT TGT A -3'). Die PCR Produkte wurden in den pRset 5d Vektor, der mit den Restriktionsenzymen NcoI und HindIII geschnitten war, eingefügt (pRset YFP-IL-6). Die cDNS für die Signalsequenz von humanem IL-6 wurde aus dem puc13 IL-6-

Plasmid amplifiziert (Sense Oligonukleotid: 5'- GAA TTC TCG AGA ACG AAA G- 3'; Anti-sense Oligonukleotid: 5'- TGA GGG TAC CAT GGC AGG GAA G -3'). Das so gewonnene PCR-Produkt wurde in den TOPO TA Cloning Vektor (Invitrogen), der nachfolgend mit MamI und NcoI geschnitten wurde, eingefügt. Das Fragment für die IL-6-Signalsequenz wurde daraufhin in den pRset YFP-IL-6 Vektor eingefügt. Der pRset 5d-sig-YFP-IL-6 Vektor wurde dann mit HindIII geschnitten und es wurden mittels einer Auffüllreaktion geglättete Enden geschaffen und das so gewonnene Produkt mit Xho geschnitten. Das aus diesem Restriktionsverdau gewonnene Fragment wurde in den pIB/v5-his-Vektor (Invitrogen), der vorher mit BamHI geschnitten wurde und bei dem danach mittels einer Auffüllreaktion geglättete Enden geschaffen worden waren und der nachfolgend mit Xho geschnitten war, eingefügt. Die Integrität des so gewonnenen Konstrukts wurde mittels DNS-Sequenzierung gesichert.

2.8 Expression von Proteinen in eukaryotischen Zellen

2.8.1 Transfektion von COS7-Zellen

Zur Transfektion von COS7-Zellen wurde eine modifizierte Variante der DEAE-Dextran-Transfektion angewendet. Dazu wurden COS7-Zellen auf einer 78 cm² Zellkulturschale ausgesät und zu 70-90%-iger Konfluenz gezüchtet. Die Zellen wurden dann durch zweimaliges Waschen mit PBS von Mediumsrückständen gereinigt. Anschließend wurde ein vorbereitetes Transfektionsgemisch auf die Platten getropft.

Transfektionsgemisch:	7,5 ml FKS-freies Medium
	60 µl DEAE-Dextran (50 mg/ml) (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden)
	1-20 µg DNS
	6 µl Chloroquin (100 mM) (Sigma, Taufkirchen)

Die Zellkulturschalen wurden nach Zugabe des Transfektionsgemisches durch Umwickeln mit Parafilm (Pechiney Plastic Packaging, USA) versiegelt, um den Gasaustausch mit der Umgebung zu vermeiden und für 80 min im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Im Anschluss daran wurden die Zellen mit PBS gewaschen und danach einem DMSO-Schock ausgesetzt, indem sie mit 6 ml 10% DMSO in PBS für 1 min inkubiert wurden. Anschließend wurden die

Zellen erneut mit PBS gewaschen und bis zum nächsten Tag in DMEM^{+/+} inkubiert.

Sollten die Zellen mit der konfokalen Fluoreszenzmikroskopie analysiert werden, wurden am ersten Tag nach der Transfektion der Zellen die transfizierten Zellen auf Deckgläschen mit 18 mm Durchmesser (Marienfeld, Lauda), die in die Vertiefungen von 12-fach Zellkulturplatten (Nalge Nunc, USA) eingelegt waren, ausgesät. Die geringe Dicke der Deckgläschen (0,16 mm) ermöglichte die mikroskopische Analyse der ausgesäten Zellen.

2.8.2 Transfektion von H5-Zellen

Um eine YFP-IL-6 produzierende Zelllinie zu generieren wurde die CellFECTIN Methode (Invitrogen) nach den Instruktionen des Herstellers angewendet. Die Expression von YFP-IL-6 wurde sowohl fluoreszenzmikroskopisch und fluoreszenzspektrometrisch als auch durch Western-Blot nachgewiesen.

2.8.3 Expression und Aufreinigung von YFP-IL-6

Der Überstand YFP-IL-6 exprimierender H5-Zellen wurde jeweils 72 h nach dem Aussäen der Zellen gesammelt und durch Abzentrifugation und Sterilfiltration von unlöslichen Bestandteilen gereinigt. Nicht zum unmittelbaren Gebrauch vorgesehene Überstände wurden bei -20°C gelagert. Die YFP-IL-6-Lösung wurde bei konstanter Flussrate auf eine vorher hergestellte sIL-6R-Sepharosesäule gegeben und nach Waschen der Säule mit 5-fachem Säulenvolumen PBS²⁺ wurde gebundenes YFP-IL-6 mit 2 M MgCl₂ in 6 Fraktionen von je 2 ml Volumen von der Säule eluiert. Es folgte ü.N. ein Dialyseschritt bei 4°C gegen PBS. Die einzelnen Fraktionen wurden auf ihren Gehalt an YFP-IL-6 fluoreszenzspektrometrisch, mittels Silbergel und Western-Blot-Analyse sowie mittels ELISA untersucht.

2.9 Nachweis von transfizierten und endogenen Proteinen

2.9.1 Nachweis von Proteinen in der Western-Blot-Analyse

2.9.1.1 Herstellung von Zelllysaten aus adhärenenten Zellen

YFP-IL-6 exprimierende H5-Zellen wurden in einer Zellkulturflasche ausgesät. 72 h später wurden die Zellen zweimalig mit eiskaltem PBS gewaschen und 1 ml Brij-Lysispuffer zugegeben. Die Zellen wurden mit einem Gummispatel von der Zellkulturschale gelöst und in

ein 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Nach 30 min Inkubation wurde das Lysat bei 3000 rpm zentrifugiert und der Überstand in ein neues 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt.

2.9.1.2 Herstellung von Zelllysaten aus nicht-adhärenenten Zellen

Nicht-adhärenente Zellen wurden durch zweimalige je fünf minütige Zentrifugation bei 3.000 rpm und folgender Resuspension des Pellets in PBS gewaschen. Anschließend erfolgte eine 30 minütige Inkubation mit 1 ml Brij-Lysispuffer. Das Lysat wurde bei 3.000 rpm zentrifugiert und der Überstand in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt.

Brij-Lysispuffer:	10 % Glycerol
	0,25 % Brij-96
	50 mM Tris/HCL, pH 8,0
	50 μ M Na ₃ VO ₄
	100 μ M EDTA
	1 mM PMSF
	1 mg/l Aprotinin
	1 mg/l Leupeptin

2.9.1.3 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur elektrophoretischen Auftrennung von Proteinen unter denaturierenden Bedingungen wurde die Methode der diskontinuierlichen Elektrophorese nach Laemmli (1970) angewendet. Die Elektrophorese wurde in einer vertikalen Flachgelkammer durchgeführt. In der Regel wurden 7,5%-ige Trenngele mit 3%-igen Sammelgelen eingesetzt. Die zu analysierenden Proben wurden mit reduzierendem 4x Laemmli-Probenpuffer versetzt und durch Erhitzen auf 95°C für 5 min denaturiert. Die Elektrophorese erfolgte mit 35 mA bei RT.

Als Größenstandard wurde der *Rainbow*-Marker (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) verwendet.

Acrylamidlösung:	30% Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1)
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

Zum Starten der Polymerisation wurden 0,1% APS und 0,1% TEMED zugesetzt.

4x Probenpuffer:	40% Glycerin
	8% SDS
	250 mM Tris/HCl, pH 6,8
	0,4% Bromphenolblau
	(20% 2-Mercaptoethanol bei reduzierendem Puffer)
SDS-Laufpuffer (5x):	125 mM Tris
	1 M Glycin
	0,5% SDS

2.9.1.4 Western-Blot-Analyse

Die mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine wurden mit Hilfe der *Semi-Dry-Western-Blot*-Methode auf eine PVDF-Membran (Gelman Sciences, Roßdorf) transferiert [103]. Freie Bindungsvalenzen konnten durch eine 10%-ige BSA-Lösung in TBS-N-Lösung abgesättigt werden. Die Membran wurde unter Schütteln mit der jeweiligen Antikörperlösung (1 µg/ml bzw. einer der unten angegebenen Verdünnungen) 1 h bei RT inkubiert, mit TBS-N gewaschen und mit der entsprechenden Lösung eines HRP-konjugierten Antikörpers behandelt. Die zu analysierenden Immunkomplexe konnten mit Hilfe des ECL-Detektionssystems (ECL = *enhanced chemiluminescence*, Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Schweden) sichtbar gemacht werden. Falls eine Gegenfärbung des Western-Blots durch einen anderen Antikörper stattfinden sollte, wurden die gebundenen Immunkomplexe mit Hilfe eines *stripping*-Puffers von der Membran gelöst und eine zweite Western-Blot-Analyse im Anschluss daran durchgeführt.

Kathodenpuffer:	0,04 M β -Aminocapronsäure
	0,01% SDS
	25 mM Tris-Base pH 9,4
Anodenpuffer I:	0,3 M Tris/HCl, pH 10,4
Anodenpuffer II:	25 mM Tris/HCl, pH 10,4
TBS-N:	20 mM Tris/HCl, pH 7,6
	140 mM NaCl
	0,1% Nonidet-P40
<i>Stripping</i> -Puffer	62,5 mM Tris, pH 6,7

2% SDS

100 mM β -Mercaptoethanol

2.9.2 Nachweis von Proteinen durch die Silberfärbung

Zunächst wurde vorgegangen wie unter 2.9.1.3 beschrieben. Das Polyacrylamidgel wurde anschließend 30 min bis 3 h in einer wässrigen Lösung von 30% Ethanol mit 10% Essigsäure fixiert, eine Minute mit Fixierlösung vorbehandelt, dreimal mit Wasser gewaschen, mit Silbernitratlösung 20 min imprägniert, wiederum gewaschen und anschließend in Entwicklerlösung gegeben. Bei ausreichender Intensität der Proteinbanden erfolgte die Zugabe der Stopplösung.

Fixierlösung:	30 vol-% Ethanol
	0,5 M Natriumacetat
	0,5 % Glutaraldehyd
	0,2 % $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$
	0,5 vol-% Essigsäure
Silbernitratlösung	0,1 % AgNO_3
	0,01 % Formaldehyd
Entwicklerlösung	2,5 % Na_2CO_3
	0,01 % Formaldehyd
	4 mg $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$
Stopplösung	0,01 M EDTA

2.9.3 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels ELISA

96-Loch Mikrotiterplatten (F96 Maxisorp immunoplate, Nunc, Naperville, IL) wurden ü.N. bei Raumtemperatur mit einem monoklonalen IL-6-Antikörper beschichtet. Ungebundener Antikörper wurde durch drei Waschschrte mit PBS 0,05% Tween-20 entfernt. Unspezifische Bindungsstellen wurden für eine Stunde mit 1% BSA in PBS blockiert. Alle Proben wurden in PBS mit 0,05% Tween-20 versetzt mit 0,02% Gelatine aufgenommen und gleichzeitig mit einer 1:4000 Verdünnung des polyklonalen biotinylierten IL-6-Zweitantikörpers für 2 h bei 37°C inkubiert. Als Standardkurve wurde eine kontinuierliche zweifache Verdünnung einer IL-6-Standardlösung (1062,5 pg/ml in der ersten Verdünnung) aufgetragen. Anschließend wurden die Platten erneut gewaschen und es wurde eine Peroxidase-Lösung für 45 min bei Raumtemperatur zugegeben. Nach einem letzten Waschschrte wurde die Entwicklerlösung

zugegeben. Nach 20 min Inkubation unter Lichtausschluss wurde die Farbreaktion mit 2 M H_2SO_4 gestoppt. Die Absorption bei 450 nm wurde mit einem ELISA-reader (Molecular Device) bestimmt.

Peroxidaselösung	Streptavidin-konjugierte Peroxidase 1:50.000, versetzt mit 0,2% BSA
Entwicklerlösung	100 g/ml Tetramethylbenzidin in 0.1 M Natriumacetat, pH 5,5 und 0,003% H_2O_2)

2.9.4 Paraformaldehydfixierung eukaryotischer Zellen für die mikroskopische Darstellung

Zur mikroskopischen Untersuchung vorgesehene Zellen wurden zunächst transient transfiziert und anschließend auf 18 mm Deckgläschen ausgesät. Zum Fixieren der Zellen wurden diese zweimal mit PBS^{2+} gewaschen und 20 min mit Paraformaldehydlösung fixiert. Daran schloss sich ein weiterer Waschschriff mit PBS^{2+} an und eine 5 minütige Inkubation mit Ammoniumchloridlösung zur Verminderung der Eigenfluoreszenz des Paraformaldehyds. Nach einer abschließenden Spülung der Zellen mit PBS^{2+} wurden die Deckgläschen kurz in destilliertes Wasser getaucht, auf einem Zellstofftuch abgetupft und mit der Zellseite nach unten auf einen mit einem 12 μl -Mowioltropfen (MowiolTM4-88, Calbiochem, USA) versehenen Objektträger gelegt und für 4 h bei Raumtemperatur getrocknet. Abschließend wurden die Deckgläschen mit handelsüblichem, farblosen, Nagellack (Interco, Wiesbaden) versiegelt.

PBS^{2+}	1 mM MgCl_2 0,1 mM CaCl_2 gelöst in PBS
Paraformaldehydlösung	3 g Paraformaldehyd <i>ad</i> 100 ml PBS^{2+} , pH 7,4
Ammoniumchloridlösung	50 mM NH_4CL

2.9.5 Indirekte Immunfluoreszenz

Zum immunologischen Nachweis der Extrazellulärdomänen von gp130 wurden COS7-Zellen mit gp130-Konstrukten transient transfiziert. Die Zellen wurden im nächsten Schritt, wie in 2.9.4 beschrieben, mit Paraformaldehyd inkubiert und anschließend mit PBS^{2+} und Ammoniumchloridlösung behandelt. Unspezifische Antikörper-Bindungsstellen wurden durch Inkubation mit BSA-Lösung für 30 min abgesättigt und die Zellen wurden für 1 h in

einer Lösung von monoklonalen Antikörpern gegen gp130-Extrazellulärdomänen (10 µg/ml) (vgl. Kapitel 2.3) in der BSA-Waschlösung inkubiert. Nach zweimaligem je 5 minütigen Waschen der Zellen mit einer BSA-Waschlösung wurden die Zellen mit dem in Waschlösung 1:100 verdünnten, mit R-Phycoerythrin konjugierten anti-Maus-Zweitantikörper (Dianova, Hamburg) eine Stunde inkubiert. Dann erfolgte eine erneute 5 min dauernde Inkubation mit BSA-Waschlösung und eine Waschung mit PBS²⁺. Im Weiteren wurde, wie in Kapitel 2.9.4 ab dem Eintauchen der Deckgläschen in destilliertes Wasser beschrieben, fortgefahren.

BSA-Lösung	1% BSA gelöst in PBS ²⁺
BSA-Waschlösung	0,1% BSA gelöst in PBS ²⁺

2.10 Nachweis der Aktivierung des IL-6 Signalwegs im Western-Blot

Zum Nachweis der STAT-Aktivierung wurden Ba/F3-Zellen, die stabil mit den Expressionsvektoren für gp130 und dem IL-6R α transfiziert waren mit den jeweils im Ergebnisteil angegebenen Konzentrationen an Zytokin 15 min bei 37°C stimuliert. Danach wurden die Zellen zweimal mit kaltem PBS/Vanadat gewaschen, die Zellen durch Zugabe von 600 µl Brij-Lysispuffer aufgeschlossen. Nach 30 min Inkubation wurde das Lysat bei 3.000 rpm zentrifugiert und der Überstand in ein neues 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Für die nächsten Schritte wurde wie unter Kapitel 2.9.1.3 beschrieben, verfahren. Zum Nachweis der Aktivierung von STAT3 und von aktivierten MAPK sowie zum Nachweis gleicher Proteinbeladung dienten die im Kapitel 2.3 beschriebenen Antikörper.

2.11 Nachweis der STAT-DNS-Bindung im Elektrophoretischen Mobilitätsshift Assay (EMSA)

2.11.1 Herstellung von Kernextrakten

Zum Nachweis der STAT-Aktivierung wurden HepG2-Zellen mit den jeweils im Ergebnisteil angegebenen Konzentrationen IL-6 oder YFP-IL-6 für 15 min bei 37°C stimuliert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit auf 4°C gekühltem PBS/Vanadat gewaschen

und mit einem Gummischaber von der Platte gelöst. Die Kernextraktion erfolgte nach der von Andrews und Faller im Jahre 1991 beschriebenen Methode [104]. Die Zellen wurden in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß durch Zentrifugation (5 min, 220 g) sedimentiert und in 400 µl Puffer A resuspendiert. Nach 10 minütiger Inkubation auf Eis wurden die Zellen mechanisch durch *Vortexen* (10 s) aufgebrochen und erneut zentrifugiert. Das Sediment wurde in 100 µl Puffer C aufgenommen und 20 min auf Eis inkubiert. Die kernproteinhaltige Fraktion konnte nach Zentrifugation (2 min, 10.000 g) mit dem Überstand abgenommen werden. Der Proteingehalt in den Kernextrakten wurde nachfolgend mit Hilfe der Bradford-Proteinkonzentrationsbestimmung ermittelt.

PBS/Vanadat: PBS+100 µM Na₃VO₄

Puffer A: 10 mM HEPES-KOH pH 7,8

1,5 mM MgCl₂

10 mM KCl

0,5 mM DTT

0,2 mM PMSF

1 mM Na₃VO₄

Puffer C: 20 mM HEPES-KOH, pH 7,8

1,5 mM MgCl₂

420 mM NaCl

0,2 mM EDTA

25% (v/v) Glycerin

0,5 mM DTT

0,2 mM PMSF

2.11.2 Proteinkonzentrationsbestimmung nach Bradford

Die quantitative Bestimmung gelöster Proteine erfolgte photometrisch mit Hilfe des *Kits Protein Assay* der Firma Biorad (München) entsprechend der Methode nach Bradford *et al.* (1976). Eine Eichgerade wurde mit 0-12 µg/ml BSA in einer Mischung aus 800 µl Wasser und 200 µl Biorad-Gebrauchslösung bei einer Wellenlänge von 595 nm erstellt. Zur Proteinbestimmung wurden 3 µl oder 5 µl der jeweiligen Proben eingesetzt.

2.11.3 Radioaktive Markierung doppelsträngiger DNS-Sonden

Zur Bestimmung der STAT1- und STAT3-Aktivierung in Kernextrakten wurde eine radioaktiv markierte, doppelsträngige m67SIE-DNS-Sonde verwendet. Diese synthetische DNS-Sequenz enthält das *sis*-induzierbare Element (SIE) des humanen *c-fos*-Promotors. Die Einführung einer Mutation (m67) bewirkt, dass STAT1 und STAT3 mit gleich hoher Affinität binden können [105]. Die radioaktive Markierung doppelsträngiger DNS erfolgte durch Auffüllen 5'-überhängender Enden mit dem Klenow-Enzym (1 U) (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) unter Verwendung von [³²P]α-dATP. Der Reaktionsansatz wurde 30 min bei 37°C inkubiert. Die freien Nukleotide wurden mit Hilfe des *Qiaquick Nucleotide Removal Kits* der Firma Qiagen (Hilden) abgetrennt. Die eingebaute Radioaktivität wurde im β-Zähler bestimmt.

m67SIE: 5'-GATTGACGGGAACTG-3'

(die STAT-Bindungsregion ist unterstrichen)

2.11.4 Elektrophoretischer Mobilitätsshift Assay (EMSA)

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

Reaktionsgemisch:	4 µl 5x Gelshift-Puffer
	0,1 µl 1 M DTT
	0,2 µl 200 mM PMSF
	1 µl Poly(dI-dC)-Poly(dI-dC) (1 mg/ml)
	2 µl BSA (1 mg/ml)
	2,2 µl H ₂ O
	1 µl m67SIE-DNS-Sonde

5x Gelshift-Puffer:	50 mM Hepes-KOH, pH 7,8 5 mM EDTA 25 mM MgCl ₂ 50% Glycerin
Gellösung:	75 ml 40% Acrylamidlösung 4,5 g Glycerin 3 ml 5x TBE 45 ml H ₂ O 400 µl APS (10%) 40 µl TEMED
5x TBE:	1 M Tris pH 8,3 830 mM Borsäure 10 mM EDTA

2.12 Messung der Zellproliferation

Ba/F3-*wt*-Zellen oder mit den entsprechenden Expressionsvektoren transfizierte Ba/F3-Zellen wurden zweimal mit IL-3-freiem-Medium gewaschen und in einer Dichte von 2×10^4 Zellen/Vertiefung auf 96-Loch-Platten ausplattiert. Anschließend wurde mit den im Ergebnisteil angegebenen Konzentrationen YFP-IL-6, IL-6, IL-11 und ggf. löslichem Rezeptor stimuliert. Nach 60-stündiger Inkubation wurden die lebenden und metabolisch aktiven Zellen quantifiziert. Die Quantifizierung erfolgte mit Hilfe des Cell Proliferation Kit II (XTT) (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim) nach Angaben des Herstellers. Die photometrische Messung wurde mit einem SpektraMax 340 PC (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA, USA) durchgeführt.

2.13 Analyse von fluoreszierenden Proteinen mittels Fluoreszenzspektroskopie

Zur Messung von YFP-Fluoreszenz wurden die entsprechenden Proben in eine Quarzküvette überführt und die Fluoreszenz im Spektrofluorophotometer (Shimadzu RF-5001PC, Langenfeld) gemessen. Es wurde eine Anregungswellenlänge von 514 nm gewählt und ein

Emissionsspektrum mit einer Bandbreite von 520-600 nm aufgenommen. Als Scangeschwindigkeit wurde der „*fast-modus*“ gewählt und das Spektrum einmal aufgezeichnet. Ebenfalls wurde die Hintergrundfluoreszenz des Lösungsmittels registriert und in der späteren Auswertung berücksichtigt.

Die gewonnenen Daten wurden mit Hilfe des Microsoft Programms Excel ausgewertet.

2.14 Konfokale Mikroskopie

2.14.1 Konfokale Bildaufnahme

Die mikroskopische Analyse der fluoreszierenden Proteine in Zellen erfolgte an einem konfokalen *laser-scanning* Mikroskop des Typs Zeiss LSM510 (Zeiss, Jena). Das Mikroskop war mit einem Argon-Ionen Laser und einen Helium-Neon Laser ausgestattet. Der Argon-Ionen 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, Jena) verwendet, es sei denn es ist anders im Text vermerkt.

Für die Anregung von CFP wurden 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 Emission von YFP, das auch mit 458 nm angeregt werden kann, vermieden.

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, Jena). Das resultierende Zweikanalbild ist eine Überlagerung der Einzelbilder der CFP- und der YFP-Fluoreszenz.

Für die Anregung von Phycoerithrin (PE) wurde auf die 543 nm Linie des Helium-Neon Lasers und einen 543 nm Hauptfarbteiler zurückgegriffen. Die Detektion der PE-Emission

erfolgte im Detektionsbereich 563-638 nm des Meta-Detektors (Zeiss, Meta-System). Bei der Aufnahme von CFP- und PE-Fluoreszenz in derselben Probe wurde ebenfalls die sogenannte *multi-track* Funktion verwendet. Da PE nicht im Bereich von 470-490 nm emittiert und CFP nicht bei 543 nm angeregt werden kann, war auch in diesem Fall eine saubere Kanaltrennung gewährleistet.

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 .

2.14.2 Konfokale Mikroskopie lebender Zellen

Transient transfizierte Zellen wurden 24 h nach der Transfektion in 12-fach 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 DMEM^{+/+} gefüllt und durch eine elektrische Heizmatte auf 37°C erwärmt. 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.

Sollten die Zellen stimuliert werden, konnte die vorher hergestellte Stimulationslösung über eine Schlauchverbindung in die Perfusionskammer gespritzt werden.

2.14.3 FRAP-Messungen

Zur Messung der Fluoreszenzwiederkehr nach dem Ausbleichen einer fluoreszierenden Region (*fluorescence recovery after photobleaching* - FRAP) an lebenden Zellen wurden zwei Methoden angewendet:

2.14.3.1 Tangentiales Bleichen von YFP

Tangentiales Bleichen einer seitlichen Plasmamembranregion kennzeichnet die zur Ermittlung der Halbwertszeit der Fluoreszenzwiederkehr von fluoreszierenden Membranproteinen angewandte FRAP-Methode. Die Halbwertszeit wurde als Indikator für die Diffusionsgeschwindigkeit beim Vergleich der Fusionsproteine YFP-IL-6, gp130-YFP, IL-6 α -CFP bzw. einigen gp130-Mutanten verwendet. Der Durchmesser der konfokalen

Blende in diesem Strahlengang war so gewählt, dass sich eine Schichtdicke von 2 µm ergab. Nach 10 Aufnahmen einer kreisförmigen Region (*region of interest* - ROI) von 1,3 µm Durchmesser an der Plasmamembran in einer Zeitserie mit einer Aufnahme pro Sekunde, wurde diese ROI (ROI 1) gebleicht. Diese Form des Bleichens kann als tangential 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 70 weiteren Messungen aufgezeichnet. Eine zweite ROI an der Plasmamembran (ROI 2) wurde in gleicher Weise wie die ROI 1 behandelt, aber nicht gebleicht. Diese zweite ROI diente der Registrierung bleichunabhängiger zellulärer Bewegungen und Fluoreszenzfluktuationen während der insgesamt 80 Bilder umfassenden Zeitserie. Zur Bestimmung der Hintergrundfluoreszenz wurde eine dritte ROI (ROI 3) auf eine Fläche außerhalb der Zellen platziert. ROI 2 und ROI 3 besaßen den gleichen Durchmesser wie ROI 1. Für das Bleichen wurden 100% der verfügbaren Laserleistung von 25 mW genutzt. Eine AOTF-Transmissionseinstellung von 0,1% verminderte die Anregungsleistung des Laserlichtes zur Bildaufnahme. Für das Bleichen nach dem 10. Bild der Zeitserie wurde die AOTF-Transmission der 514 nm Laserwellenlänge auf 100% geöffnet. Zum Bleichen der ROI 1 wurden 200 Iterationen der Laserabtastung durchgeführt. Die gesamte Bleichdauer der ROI 1 betrug 3,7-3,8 s. Bei der Bildaufnahme und beim Bleichen war die Abtastgeschwindigkeit auf eine Pixelzeit von 1,8 µs eingestellt. Der elektronische Vergrößerungsfaktor von 3,5 bedingte einen Pixeldurchmesser von 224 nm innerhalb der ROIs. Aufgrund der geringen Laserleistung und der kurzen Pixelzeit während der Bildaufnahme blieb der Bleicheffekt durch die Bildaufnahme während der 80 Aufnahmen der Zeitserie vernachlässigbar klein. Am Sekundärelektronenvervielfacher (*Photo Multiplier Tube* - PMT) lag während der Bildaufnahme eine Spannung von 730 V 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. Unter Verwendung eines mathematischen Modells der Fluoreszenzwiederkehr durch Diffusion nach Axelrod *et al.* [106] wurde eine Regression der in den FRAP-Experimenten ermittelten Daten aus der ROI 1 durchgeführt und die Halbwertszeit der Fluoreszenzwiederkehr ($t_{1/2}$) ermittelt. Die mobile Fraktion (Mf) der fluoreszierenden Moleküle wurde mit der Gleichung 1 (Gl. 1) aus den FRAP-Daten bestimmt.

$$Mf = (F_{\infty} - F_0)/(F - F_0) \quad \text{Gl. 1}$$

F_{∞} ist die mittlere Fluoreszenz in der ROI 1 nach der Fluoreszenzwiederkehr, F_0 ist die Fluoreszenzintensität im ersten, nach dem Bleichen aufgenommenen Bild der ROI 1 und F -

gibt die mittlere Fluoreszenzintensität in der ROI 1 vor dem Bleichen an.

2.14.3.2 Tangentiales Bleichen von CFP und YFP

Die FRAP-Messungen zur Mobilitätsbestimmung während der Immobilisierung durch Antikörper stellen eine etwas abgewandelte Form der oben beschriebenen Vorgehensweise zur Bestimmung der $t_{1/2}$ der Fluoreszenzwiederkehr dar. Im Folgenden werden die Veränderungen im Vergleich zum oben beschriebenen Verfahren aufgeführt:

Es wurden in der FRAP-Zeitserie CFP und YFP registriert. Beide Fluoreszenzkanäle wurden in jedem Bild mit Hilfe der *multi-tracking* Funktion des Mikroskops konsekutiv aufgenommen. Um ein gleichzeitiges Bleichen beider Fluorophortypen zu ermöglichen, wurde der doppelte Hauptfarbteiler 458/514 nm verwendet und die Laserwellenlängen 458 und 514 nm gleichzeitig mit 100% der 25 mW Gesamtleistung sowie 100% Transmission eingesetzt. Die Zeitserie bestand aus 50 Aufnahmen, von denen 40 nach dem Bleichen aufgenommen wurden. Jede 2,2 Sekunden wurde ein Zweikanalbild aufgenommen. 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 in einer Konzentration von jeweils 10 µg/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.

Für die qualitative, bildgebende Analyse der Immobilisierungsexperimente wurde während der Zeitserie die gesamte Zelle aufgenommen. Das Bleichen blieb dabei jedoch auf die ROI 1 beschränkt.

2.15 Statistik

2.15.1 Standardabweichung

Die Standardabweichung der Messwertgruppen wurde als Standardabweichung einer Stichprobe aus einer Grundgesamtheit im Programm Microsoft Excel (Microsoft, USA) berechnet.

3. Ergebnisse

3.1 Klonierung, Expression, Aufreinigung und Charakterisierung von YFP-IL-6

3.1.1 Klonierung des YFP-IL-6

YFP-IL-6 wurde kloniert um das Interleukin-6 durch die Verbindung mit YFP, einer Variante des Grün fluoreszierenden Proteins (GFP), fluoreszenzmikroskopisch darstellen zu können. Aus vorausgegangenen Arbeiten war bekannt, dass der C-terminale Anteil des IL-6 entscheidend für die Bindung von IL-6 an seinen Rezeptor ist, während der N-Terminus nicht an der Rezeptorbindung beteiligt ist. Deshalb wurde YFP mit dem N-Terminus von IL-6 verbunden.

Das Fusionsprotein besteht, wie in Abb. 10 gezeigt, aus der für die Sekretion notwendigen Signalsequenz von humanem IL-6, gefolgt von YFP und humanem IL-6.



Abb. 10: Schematische Darstellung des YFP-IL-6 Fusionsproteins

YFP-IL-6 besteht aus einer Signalsequenz für die Sekretion des Proteins (schwarz, 29 As), dem YFP-Anteil (dunkelgrau, 238 As) und menschlichem IL-6 (hellgrau, 184 As). Aufgeführt sind die fünf N- und C-terminalen Aminosäuren eines jeden Anteils.

3.1.2 Generierung einer Zelllinie zur Expression von YFP-IL-6

Um die dauerhafte Verfügbarkeit von YFP-IL-6 zu sichern, wurde eine stabil YFP-IL-6 exprimierende Insekten-Zelllinie hergestellt. Nach dem Selektieren eines positiven Zellklones, wurden aus dieser Linie stammende Zellen fixiert und auf die Präsenz von YFP sowie, mittels einem IL-6-Antikörper und einem an Phycoerythrin gekoppelten Zweitantikörper, fluoreszenzmikroskopisch auf das Vorhandensein von IL-6 untersucht.

In allen durchlichtmikroskopisch sichtbaren Zellen konnte sowohl YFP als auch IL-6 nachgewiesen werden (Abb. 11 A-C). Als Kontrolle wurden stabil mit dem Leervektor

transfizierte H5-Zellen gleichermaßen untersucht. In diesen Aufnahmen zeigte sich keine Fluoreszenz (Abb. 11 E-F).

Es kann insofern davon ausgegangen werden, dass die generierte Zelllinie YFP-IL-6 „stabil“ exprimiert. Die Fluoreszenz des YFP weist darüber hinaus auf eine korrekte Konformation des Proteins hin, da diese unabdingbar für die Funktionsfähigkeit des YFP ist.

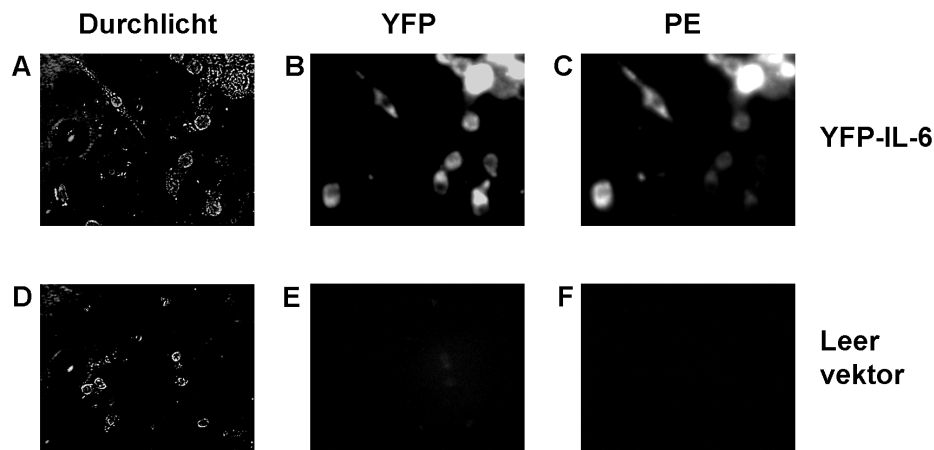


Abb. 11: Mikroskopischer Nachweis von YFP-IL-6 in stabil transfizierten Insekten-Zellen

Mit YFP-IL-6 bzw. dem Leervektor stabil transfizierte H5-Zellen wurden fixiert, permeabilisiert und mit einem IL-6-Antikörper behandelt. Gebundene Antikörper wurden mit einem PE-konjugierten Zweitantikörper nachgewiesen. Die Zellen wurden fluoreszenzmikroskopisch unter Zuhilfenahme einer CCD-Kamera dargestellt.

(obere Reihe) H5-Zellen, die YFP-IL-6 exprimieren, beobachtet in der Durchlichtmikroskopie (A); YFP-Fluoreszenz (B); PE-Fluoreszenz (C).

(untere Reihe) H5-Zellen, die den Leervektor exprimieren. Durchlichtmikroskopie (D); YFP-Fluoreszenz (E); PE-Fluoreszenz (F)

3.1.3 Expression und Sekretion von YFP-IL-6 durch H5-Zellen

Um die Expression von YFP-IL-6 durch die generierte Zelllinie zu kontrollieren, wurden 72 Stunden nach dem Aussäen der Zellen Zelllysate hergestellt. Zur Kontrolle der Sekretion von YFP-IL-6 wurden zum gleichen Zeitpunkt konditionierte Zellüberstände gewonnen.

Zunächst wurden die Zellüberstände fluoreszenzspektrometrisch untersucht (Abb. 12 A). Bei einer Anregungswellenlänge von 514 nm zeigte sich, nach Abzug der Eigenfluoreszenz des Zellmediums, ein für YFP typischer Kurvenverlauf mit einem Fluoreszenzmaximum bei einer Detektionswellenlänge von 530 nm. Überstände von den Leervektor exprimierenden H5-Zellen wurden als Kontrolle gleichermaßen untersucht. Es zeigte sich keine wesentliche Fluoreszenz.

YFP-IL-6 konnte darüber hinaus mit proteinchemischen und immunologischen Methoden in Zelllysaten und Überständen nachgewiesen werden. Dazu wurden die gewonnenen Zelllysate gelelektrophoretisch aufgetrennt und nach Transfer der Proteine auf eine PVDF-Membran eine Detektion mit gegen IL-6 und YFP gerichteten Antikörpern vorgenommen. Es zeigte sich sowohl bei der YFP- als auch bei der IL-6-Detektion eine Bande bei 46 kDa, was dem erwarteten Molekulargewicht des YFP-IL-6 entspricht (Abb. 12 B jeweils Spur 1).

Die Überstände von YFP-IL-6 exprimierenden H5-Zellen wurden gleichermaßen untersucht. Es zeigte sich erneut jeweils eine deutliche Bande bei 46 kDa (Abb. 12 B jeweils Spur 2).

Eine Entsprechung für die im Western-Blot gefundenen Banden fand sich in der Silberfärbung nicht (Abb. 12 C).

Um den optimalen Zeitpunkt zum Sammeln der Zellüberstände zu bestimmen, wurden Zellüberständen zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach dem Aussäen der Zellen durch Western-Blotting untersucht. Es zeigte sich, dass 72 Stunden nach dem Aussäen der Zellen die YFP-IL-6-Konzentration nicht weiter ansteigt (Abb. 12 D). Die Zellüberstände wurden deshalb im Folgenden immer zu diesem Zeitpunkt gewonnen.

Die Konzentration von YFP-IL-6 in den zur Weiterverarbeitung bestimmten Zellüberständen wurde durch ELISA gemessen und betrug in verschiedenen Überständen zwischen 1,4 und 2,2 µg/ml.

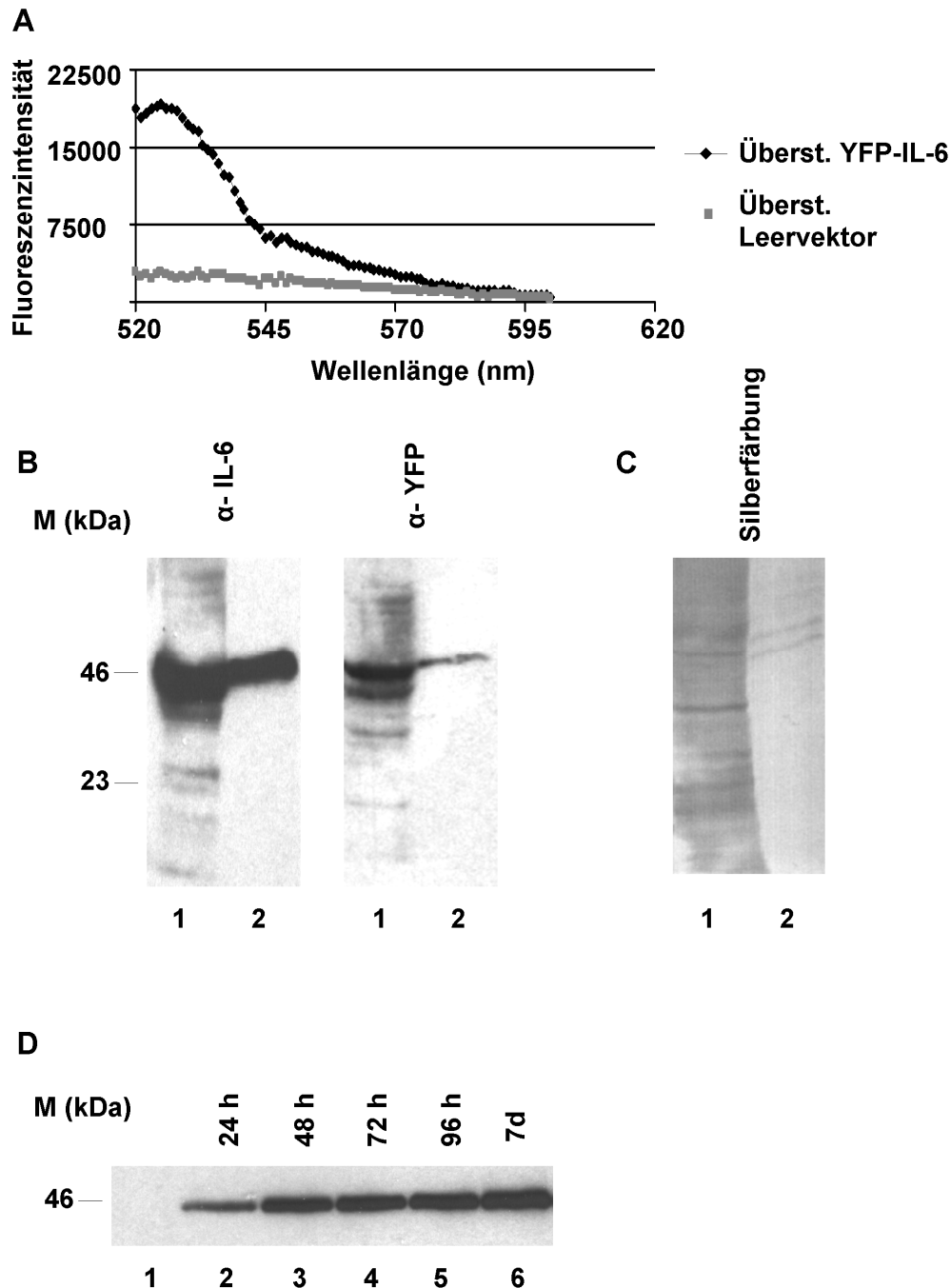


Abb. 12. Nachweis von YFP-IL-6 in Zelllysaten und Überständen

72 h nach dem Aussäen der stabil mit YFP-IL-6 transfizierten Zellen und stabil mit dem Leervektor transfizierten Kontrollzellen wurden Zelllysate angefertigt und Zellüberstände gewonnen. Die Zellüberstände wurden durch Zentrifugation und Sterilfiltration von unlöslichen Rückständen gereinigt.

(A) YFP-IL-6 wurde in den Überständen fluoreszenzspektrometrisch nachgewiesen. Die Anregung erfolgte mit Licht der Wellenlänge 514. Das emittierte Licht wurde zwischen 520 und 600 nm detektiert.

(B) Zelllysate (1. Spur) und Überstände (2. Spur) wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt. Nach dem Transfer der Proteine auf eine PVDF-Membran erfolgte eine Inkubation mit IL-6- oder GFP-

Antikörper. Der Nachweis der gebundenen Antikörper geschah durch Chemolumineszenz (ECL-System).

(C) Zelllysate (1. Spur) und Überstände (2. Spur) wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt. Proteine wurden durch Silberfärbung dargestellt.

(D) Zeitablauf der YFP-IL-6 Sekretion durch H5-Zellen. Von Überständen YFP-IL-6 exprimierender Zellen wurden alle 24 h nach dem Aussäen der Zellen Proben genommen. Es erfolgte eine Analyse mittels Western-Blotting wie oben beschrieben.

3.1.4 Aufreinigung von YFP-IL-6

Die relativ niedrige YFP-IL-6-Konzentration in den Überständen und die Heterogenität der Proteinzusammensetzung (Abb. 12 C) machten eine weitere Aufreinigung und Konzentrierung der Überstände erforderlich. Als Konzentrations- und Aufreinigungsmethode wurde die Affinitätschromatographie mit einer IL-6R α -Sephrose-Säule gewählt, wobei die Affinität des IL-6-Anteils des YFP-IL-6 zum IL-6R α genutzt wurde.

Eine repräsentative Aufreinigungsprozedur ist in Abb. 13 gezeigt: 80 ml der YFP-IL-6 enthaltenden Zellüberstände wurden einer ersten Reinigung durch Abzentrifugation ungelöster Bestandteile und durch Sterilfiltration unterzogen. Das dadurch gewonnene Material wurde anschließend auf die IL-6R α -Säule gegeben. Nach dem Waschen der Säule mit PBS²⁺ wurde an die Säule gebundenes YFP-IL-6 durch 2 M MgCl₂ in Fraktionen von je 2 ml eluiert. Die Eluate wurden über Nacht bei 4°C gegen PBS²⁺ dialysiert. Die Präsenz von YFP-IL-6 wurde durch Western-Blotting (Abb. 13 A), Silberfärbung (Abb. 13 B) und Fluoreszenzspektrometrie (Abb. 13 C) untersucht. Die YFP-IL-6-Konzentrationen wurden durch ELISA quantifiziert und korrelierten weitgehend mit den Bandenstärken im Western-Blot.

Sowohl in der Silberfärbung als auch im Western-Blot (Detektion mittels IL-6-Antikörper) zeigte sich eine deutliche Anreicherung von YFP-IL-6 in den Eluaten. Die höchste YFP-IL-6-Konzentration wurde in der dritten Aufreinigungsfraktion (5-6 ml MgCl₂) gemessen (27,4 μ g/ml). Dies entspricht einer ca. 20-fachen Anreicherung im Vergleich zu den unbehandelten Zellüberständen (1,4 μ g/ml) und korreliert gut mit der in der Fluoreszenzspektrometrie gemessenen Fluoreszenzintensitätszunahme nach der Aufreinigung um den Faktor 22,5 (vgl. Abb. 12 A und Abb. 13 C). Aufgrund der hohen Konzentration des Fusionsproteins in der dritten Aufreinigungsfraktion wurde im Folgenden ausschließlich diese Fraktion weiterverarbeitet.

In der Silberfärbung stellten sich neben der YFP-IL-6-Bande in der dritten Aufreinigungsfraction keine weiteren Banden dar. Die Affinitätschromatographie führte somit zu einer weitgehend homogenen YFP-IL-6-Lösung.

Überstände von den Leervektor exprimierenden H5-Zellen wurden einer gleichen Aufreinigungsprozedur unterzogen. Die dabei gewonnen Eluate dienten als Kontrollen in den weiteren Experimenten.

Eine Quantifizierung des dargestellten, repräsentativen Aufreinigungsprozesses ergibt Folgendes: Die Überstände weisen eine YFP-IL-6-Konzentration von 1,4 µg/ml bei einer mittels *BIORAD* gemessenen Gesamtproteinkonzentration von 143 µg/ml auf. Dies entspricht einem Anteil von 0,98%. In der dritten Aufreinigungsfraction findet sich eine YFP-IL-6-Konzentration von 27,4 µg/ml bei einer Gesamtproteinkonzentration von 50 µg/ml was einem Anteil von 55% entspricht. Die Aufreinigung führte somit zu einer Konzentrierung um den Faktor 20 bei einer Zunahme des YFP-IL-6-Anteils am Gesamtprotein um den Faktor 56.

In den auf die Säule gegebenen Überständen waren 112 µg YFP-IL-6 enthalten. In der dritten Fraction waren 54,8 µg, in allen Fractionen insgesamt 65,2 µg enthalten. Dies entspricht einem Verlust von 57,2 µg (51%) bzw. 46,8 µg (42%). Dieser Proteinverlust erklärt die Diskrepanz zwischen der Reduktion des Lösungsvolumen (von 80 ml auf 2 ml der Fraction drei; d.h. Faktor 40) und der Konzentrierung (Faktor 20) des Proteins.

Insgesamt erschien der Aufreinigungsprozess im Hinblick auf die weitere Gewinnung und Charakterisierung von YFP-IL-6 als ausreichend effektiv, so dass auf weitere Aufreinigungs-, oder Konzentrierungsschritte verzichtet wurde.

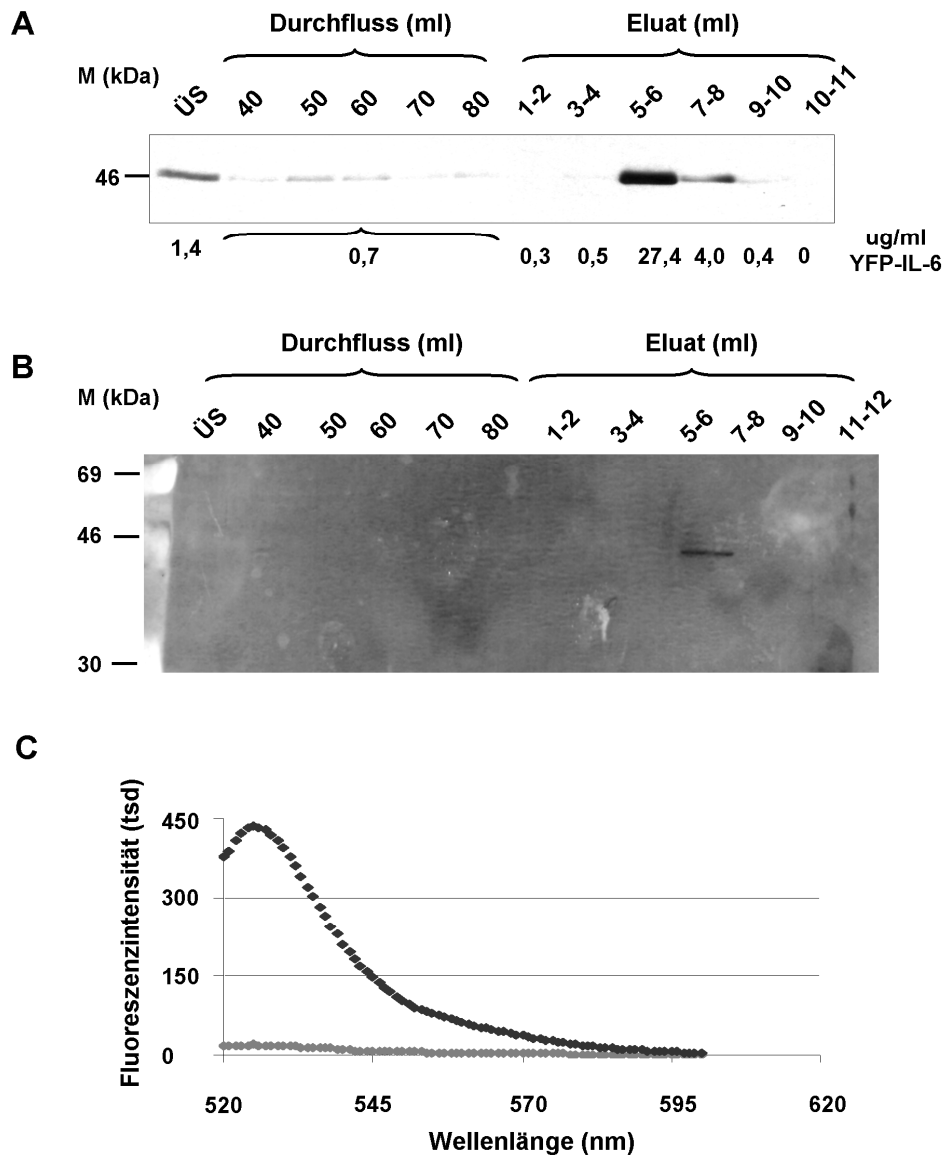


Abb. 13: Aufreinigung von YFP-IL-6

Die Aufreinigung von YFP-IL-6 erfolgte in einem Schritt durch Affinitätschromatographie. 80 ml der Zellüberstände (ÜS) von YFP-IL-6 exprimierenden H5-Zellen wurden auf eine 4 ml sIL-6 α -Sephrose-Säule gegeben. Nach 40, 50, 60, 70 und 80 ml wurden Proben gesammelt. Nach dem Auswaschen von nicht- oder nur schwach gebundenen Proteinen wurden spezifisch an die Säule gebundene Proteine durch Spülen der Säule mit 12 ml 2 M MgCl₂ eluiert. Fraktionen von je 2 ml wurden gesammelt.

Die Analyse der Proben erfolgte durch (A) Western-Blotting und die Detektion mittels IL-6-Antikörper und durch (B) Silberfärbung. Die angegebenen YFP-IL-6-Konzentrationen wurden durch ELISA ermittelt.

(C) Die dritte Aufreinigungsfraktion (dunkle Linie) und unaufgereinigter Überstand der YFP-IL-6 exprimierenden H5-Zellen (helle Linie) wurden fluoreszenzspektrometrisch untersucht. Die Anregung erfolgte mit Licht der Wellenlänge 514 nm, emittiertes Licht wurde in einem Wellenlängenbereich von 520-600 nm detektiert. Die Hintergrundfluoreszenz des Lösungsmittels (PBS²⁺) wurde abgezogen.

3.1.5 Bioaktivität von aufgereinigtem YFP-IL-6

Nach der Aufreinigung wurden die funktionellen Eigenschaften von YFP-IL-6 geprüft. Diese Eigenschaften können in die Fluoreszenzfähigkeit des YFP und die biologischen Eigenschaften des IL-6-Anteils unterteilt werden. Der Nachweis der Funktionsfähigkeit des YFP-Anteils konnte bereits bei der Aufreinigung fluoreszenzspektrometrisch geführt werden. Im Folgenden soll auf den IL-6-Anteil eingegangen werden. Zunächst wurde die Bindungsfähigkeit des Proteins an den IL-6-Rezeptorkomplex untersucht. Ausserdem wurde durch den Nachweis einer Phosphorylierung von bestimmten, in den IL-6-Signalweg eingeschalteten Proteinen, sowie durch die Bestimmung des Zellwachstums von Ba/F3-Zellen die biologische Aktivität von YFP-IL-6 geprüft.

3.1.5.1 Rezeptor Bindungsfähigkeit

Der Nachweis der Bindung von YFP-IL-6 an den IL-6R α konnte *de facto* bereits durch die Aufreinigungsmethode geführt werden, erfordert die hier gewählte Form der Affinitätschromatographie doch eine Bindung des Proteins an den α -Rezeptor.

Die Bindung von YFP-IL-6 an den kompletten IL-6-Rezeptor, d.h. sowohl gp130 und IL-6R α , sollte darüber hinaus unter Ausnutzung der konfokalen *laser-scanning* Mikroskopie gezeigt werden. Diese Methode erlaubt die Durchführung von Bindungsstudien an lebenden Zellen. Dazu wurden COS7-Zellen mit einem Expressionsvektor für gp130-CFP transient transfiziert und mit YFP-IL-6/sIL-6R α -Komplexen in einer dauerhaft auf 37°C temperierten Perfusionskammer am konfokalen Mikroskop stimuliert. Eine Ko-Stimulation mit sIL-6R α war erforderlich, da COS7-Zellen den IL-6R α nur in sehr geringem Maße endogen exprimieren. Vor, während und nach der Stimulation mit YFP-IL-6/sIL-6R α -Komplexen wurden konfokale Bildaufnahmen angefertigt. Vor der Stimulation (Abb. 14 A) zeigte sich das typische gp130-Expressionsmuster (CFP wird in der Abbildung cyan dargestellt). Gp130-CFP ist als membrangebundenes Protein erkennbar, das sich auch intrazellulär in Membranen und Vesikeln anreichert [107]. Erwartungsgemäß war kein YFP-IL-6 (YFP wird in der Abbildung gelb dargestellt) nachweisbar. Bereits zwei Minuten nach Stimulation hatte sich eine deutliche, plasmamembranbetonte Bindung von YFP-IL-6 an die untersuchte Zelle ausgebildet (Abb. 14 B). Während nicht an die Zelle gebundenes YFP-IL-6 durch Spülen mit PBS entfernt werden konnte, blieb einmal an die Plasmamembran gebundenes YFP-IL-6 membranassoziiert (Abb. 14 C). Um eine unspezifische Bindung von YFP-IL-6 an die Zellmembran auszuschließen, wurde in einem Kontrollexperiment nur mit YFP-IL-6 (also ohne löslichen IL-6R α -Rezeptor) stimuliert. Die Stimulation führte in dieser Konstellation

nicht zu der in den Vorexperimenten beobachteten Anreicherung von YFP-IL-6 an der Zellmembran (Bild E, F), so dass von einer spezifischen Bindung von YFP-IL-6 an den IL-6-Rezeptorkomplex ausgegangen werden muss.

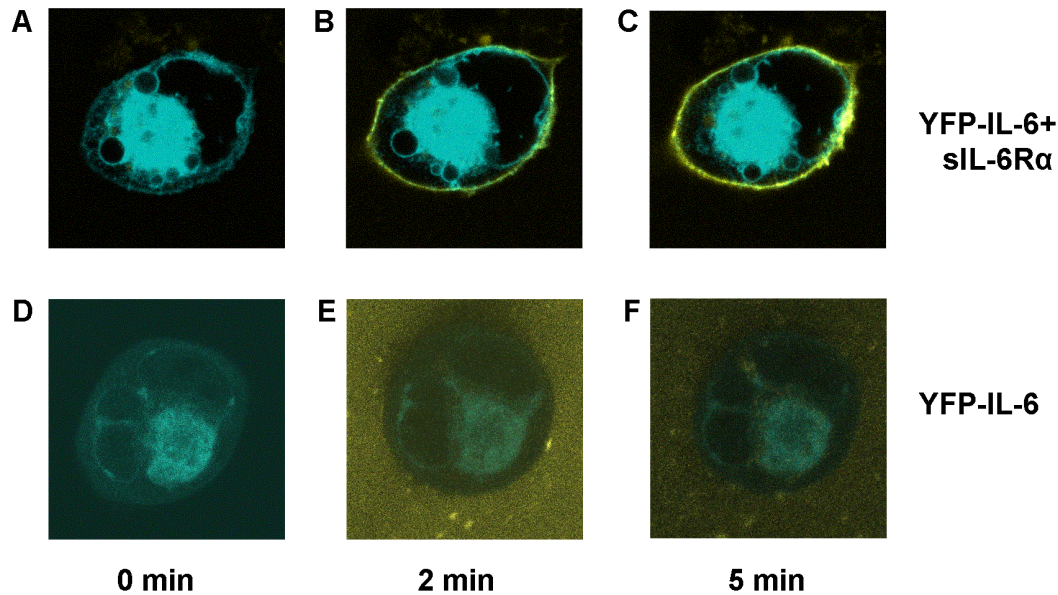


Abb. 14: Bindung von YFP-IL-6 an membranständiges gp130

COS7-Zellen wurden mit dem Expressionsvektor für gp130-CFP transfiziert. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen in eine auf 37°C temperierte Perfusionskammer eingebracht. Es erfolgte eine Stimulation mit 40 ng/ml YFP-IL-6 und 1 µg/ml sIL-6Rα (B, C) oder 40 ng/ml YFP-IL-6 (E, F). Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden konfokale Aufnahmen der Zellen angefertigt. Die multi-track Funktion des LSM und geeignete Anregungswellenlängen ermöglichten eine Differenzierung der CFP- (cyan dargestellt) und der YFP-Fluoreszenz (gelb dargestellt) der Zellen.

Die *time-series* Funktion des verwendeten *laser-scanning* Mikroskops erlaubt es, Zellen über einen längeren Zeitraum zu beobachten. In Abb. 15 ist eine Sequenz von Aufnahmen dargestellt, die im Rahmen einer solchen Beobachtung einer mit gp130-CFP transient transfizierten und mit YFP-IL-6/sIL-6Rα stimulierten COS7-Zelle entstanden ist.

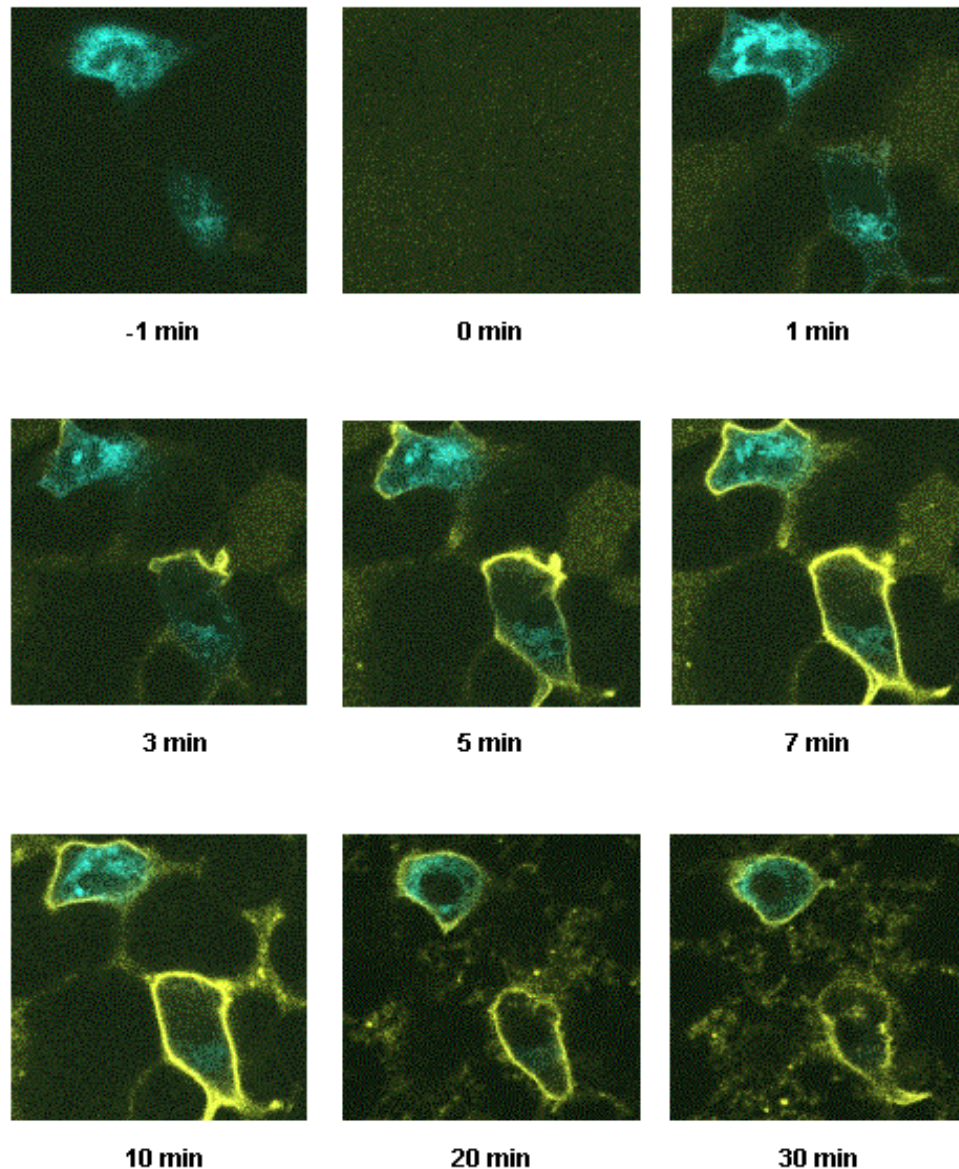


Abb. 15: Bindung von YFP-IL-6 an den IL-6-Rezeptorkomplex

COS7-Zellen wurden mit einem Expressionsvektor für gp130-CFP transient transfiziert. Nach 48 h wurden die Zellen mit 40 ng/ml YFP-IL-6 und 1 µg/ml sIL-6Ra stimuliert und es wurden konfokale Bildaufnahmen zu den angegebenen Zeitpunkten erstellt. CFP-Fluoreszenz ist in der Abbildung cyan dargestellt, YFP-Fluoreszenz ist gelb dargestellt.

3.1.5.2 Aktivierung der IL-6-Signalkaskade

Die intrazelluläre Signaltransduktionskaskade der IL-6-Typ-Zytokine beginnt mit der Phosphorylierung und Aktivierung Rezeptor-assoziiierter Janus-Kinasen. Die Janus-Kinasen phosphorylieren daraufhin Tyrosinreste in der zytoplasmatischen Region der Zytokinrezeptoren, an die Transkriptionsfaktoren der STAT (*signal transducer and activator of transcription*)-Familie gebunden und ebenfalls durch Jaks phosphoryliert werden. Darüber

hinaus erfolgt über die Tyrosinphosphatase SHP2 die Aktivierung einer weiteren Signaltransduktionskaskade in deren Folge auch MAPK (*mitogen activated protein kinase*) phosphoryliert und aktiviert werden [5].

Zum Nachweis der biologischen Aktivität von YFP-IL-6 wurden zunächst Ba/F3-Zellen, die stabil sowohl die gp130-Rezeptorkomponente als auch den IL-6R α exprimierten (Ba/F3-gp130-IL6R-Zellen), mit gleichen molaren Mengen IL-6 oder YFP-IL-6 stimuliert. Zelllysate wurden auf die Aktivierung der für IL-6 typischen Signalwege untersucht. Sowohl die Stimulation mit IL-6- (Abb. 16 A Spur 2) als auch mit YFP-IL-6 (Abb. 16 A Spur 3) führte zur Phosphorylierung von STAT3, p38 und ERK1,2. Ein Vergleich der Bandenstärke für phosphoryliertes STAT3 nach IL-6- bzw. YFP-IL-6-Stimulation zeigte darüber hinaus, dass die Stimulationseffekte zumindest vergleichbar sind. In unstimulierten Zellen war keine Aktivierung nachweisbar (Abb. 16 A Spur 1).

In Abb. 16 B ist eine Stimulation der Zellen mit ansteigenden Konzentrationen von IL-6 bzw. YFP-IL-6 dargestellt. Es zeigte sich eine konzentrationsabhängig stärker werdende Phosphorylierung von STAT3.

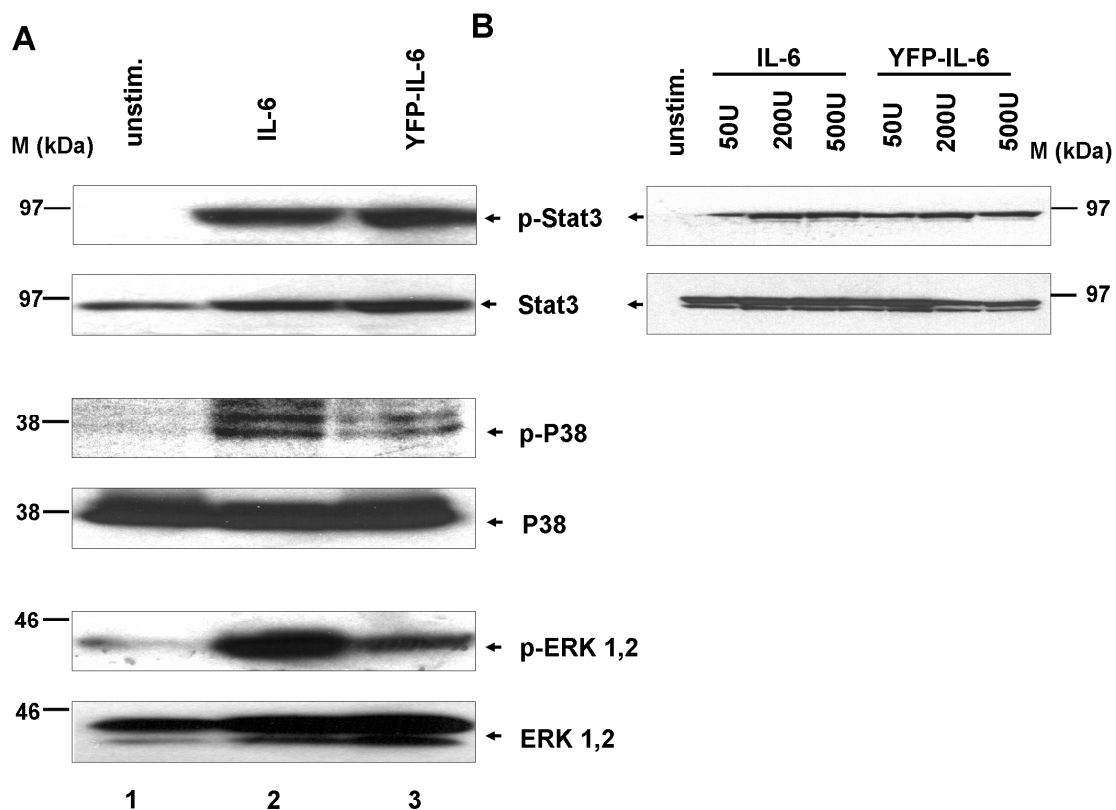


Abb. 16: Phosphorylierung von STAT3 und MAPK nach Stimulation mit YFP-IL-6

(A) Ba/F3-gp130-IL6R-Zellen wurden für 15 min mit 20 ng/ml IL-6 oder 40 ng/ml aufgereinigtem YFP-IL-6 stimuliert oder als Kontrolle unstimuliert belassen.

(B) Es wurden ansteigende Konzentrationen IL-6 bzw. YFP-IL-6 verwendet. Als Kontrolle wurden Zellen unstimuliert belassen.

Von den so behandelten Zellen wurden jeweils Zelllysate hergestellt und diese gelelektrophoretisch aufgetrennt. Nach Transfer der Proteine auf eine PVDF Membran erfolgte die Detektion mit Antikörpern gegen phosphoryliertes STAT3, p38 und ERK 1,2. Die gebundenen Antikörper wurden durch Chemolumineszenz nachgewiesen (ECL). Zur Kontrolle gleicher Ladung wurde die Membran mit Antikörpern gegen STAT3, p38 und ERK 1,2 neu eingefärbt.

In Folge der Phosphorylierung bilden STAT-Proteine Homo- oder Heterodimere aus und translozieren in den Zellkern. Dort transaktivieren sie im Verbund mit anderen Faktoren Zytokin-responsive Zielgene.

Eine elegante Methode zur Untersuchung der Kerntranslokation von STAT3, bietet die konfokale *laser-scanning* Mikroskopie mit der Möglichkeit, lebende Zellen unter Echtzeit-Bedingungen zu untersuchen. In dieser Versuchsanordnung wurden COS7-Zellen mit gp130-CFP und STAT3-YFP transient transfiziert und mit YFP-IL-6/sIL-6R α stimuliert. Vor, während und nach der Stimulation wurden konfokale Bilder mit dem *laser-scanning* Mikroskop in halbminütigem Intervall aufgenommen (Abb. 17 A). Die Trennung der beiden gelb fluoreszierenden Proteine bereitete in diesem Fall keinerlei Probleme, da STAT3-YFP im unstimuliertem Zustand im Zellinneren zu finden war, während gelb dargestelltes YFP-IL-6 zumindest zunächst, extrazellulär zu erwarten war.

Obwohl nach der Stimulation die YFP-IL-6-Anreicherung an der Zellmembran nur schwach ausgeprägt war, zeigte sich eine STAT3-YFP Kerntranslokation als Ausdruck der Aktivierung des IL-6-typischen Signalwegs (Abb. 17 A).

Die Bindung von STAT3 an DNS kann durch ein *EMSA*-Experiment nachgewiesen werden. Dazu wurden HepG2-Zellen mit vergleichbaren Mengen IL-6 und YFP-IL-6 stimuliert. 15 Minuten nach der Stimulation erfolgte eine Lyse der Zellen und Kernextrakte wurden angefertigt und im *Gelshift* mit Hilfe der radioaktiv markierten *SIE*-Sonde, die STAT1 und STAT3 spezifisch bindet, untersucht. Die Stimulation mit YFP-IL-6 führte zu einer ähnlichen DNS-Bindungsaktivität von STAT3, wie die Stimulation mit IL-6 (Abb. 17 B)

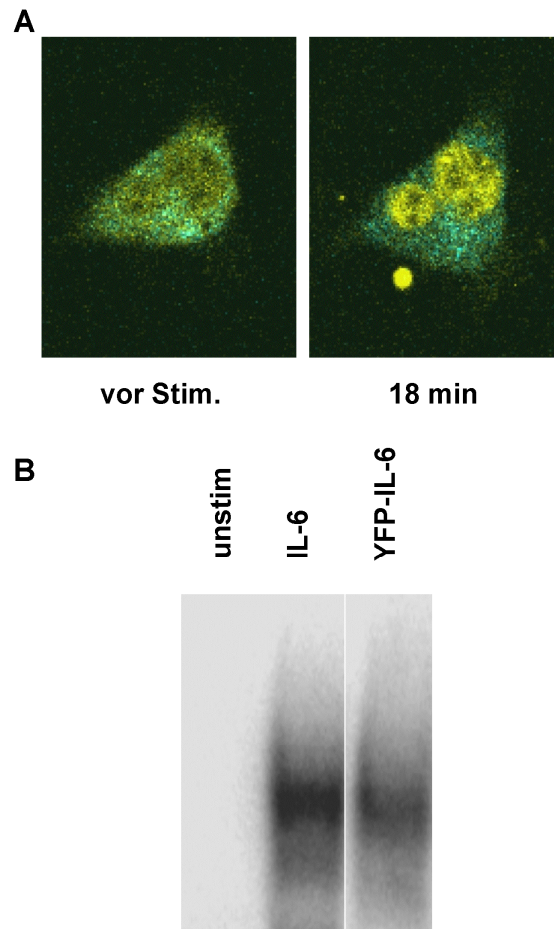


Abb. 17: Kerntranslokation von STAT3 nach YFP-IL-6-Stimulation

(A) COS7-Zellen wurden mit den Expressionsvektoren für gp130-CFP und STAT3-YFP transfiziert. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen in eine auf 37°C temperierte Perfusionskammer eingebracht. Es erfolgte eine Stimulation mit 40 ng/ml YFP-IL-6/sIL-6R α . Zu den angegebenen Zeitpunkten wurden konfokale Aufnahmen der Zellen angefertigt. CFP-Fluoreszenz ist in cyan, YFP-Fluoreszenz in gelb dargestellt.

(B) HepG2-Zellen wurden mit IL-6 oder YFP-IL-6 stimuliert und Kernextrakte wurden hergestellt. Diese wurden mit einer doppelstängigen [32 P]-markierten m67SIE-Sonde inkubiert. Die STAT3-DNA-Komplexe wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und durch Autoradiographie sichtbar gemacht. Der besseren Übersicht wegen sind nur Ausschnitte aus dem ursprünglichen Gel dargestellt.

3.1.5.3 Quantifizierung und Spezifität der YFP-IL-6-Aktivität

Die Wirkung von YFP-IL-6 wurde mit Hilfe von Proliferationsversuchen mit Ba/F3-gp130-IL6R-Zellen quantifiziert. Dazu wurden die Zellen mit annähernd gleichen molaren Mengen IL-6 bzw. YFP-IL-6 für 60 Stunden stimuliert. In der Auswertung zeigte sich ein konzentrationsabhängig gesteigerte Proliferation der Zellen. Der Vergleich mit IL-6 stimulierten Zellen belegte die vergleichbare Wirkung der beiden Zytokine auf die

untersuchten Zellen (Abb. 18 A). Eine Stimulation mit Überständen von den Leervektor exprimierenden H5-Zellen, die derselben Aufreinigungsprozedur unterzogen wurden wie Überstände von YFP-IL-6 produzierenden Zellen, führte zu keinem messbaren Zellwachstum. Um die Spezifität der Wirkung des YFP-IL-6 darzustellen, wurde die Proliferation von Ba/F3-Zellen, die stabil mit gp130 und dem IL-11R α (Ba/F3-gp130-IL11R-Zellen) transfiziert waren, nach der Stimulation mit YFP-IL-6 bzw. Trx-IL-11 verglichen. Trx-IL-11 ist ein Fusionsprotein aus Thioredoxin und IL-11 und weist eine identische Aktivität wie IL-11 auf. Die Stimulation mit Trx-IL-11 führte zu einer dosisabhängigen Erhöhung der Zellproliferation (Abb.18 B). Eine Stimulation mit YFP-IL-6 hatte hingegen keinen vergleichbaren Effekt, so dass eine unspezifische Zellaktivierung, etwa durch den YFP-Anteil des YFP-IL-6, ausgeschlossen werden konnte.

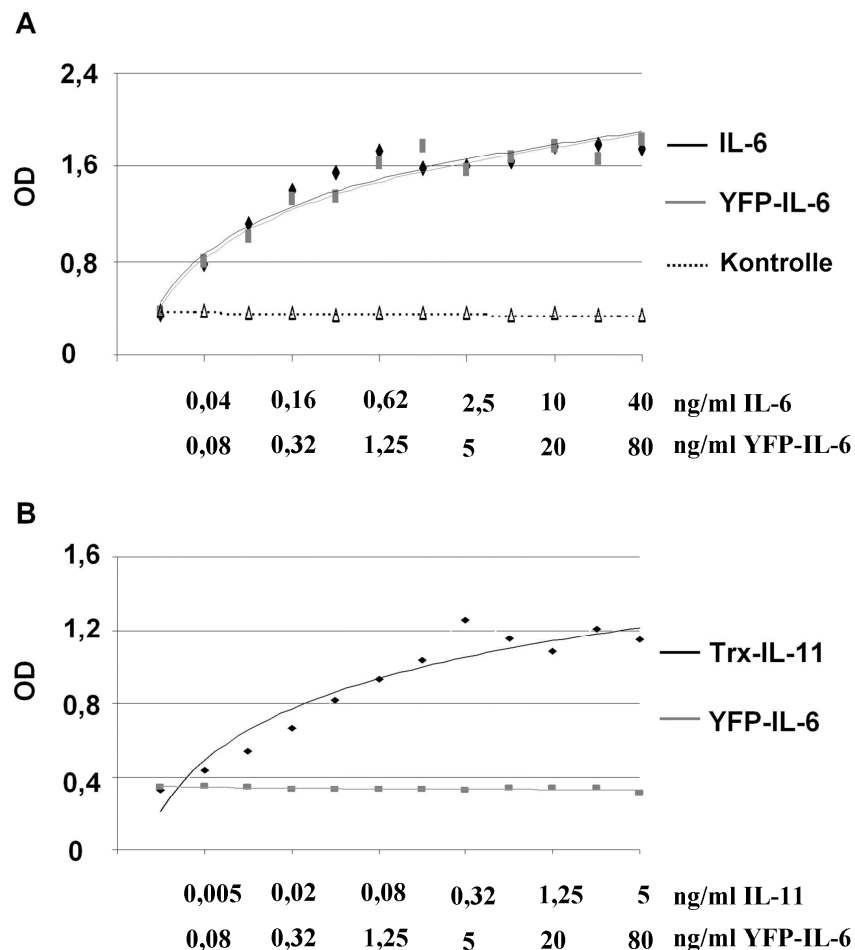


Abb. 18: Proliferation von zytokinabhängigen Ba/F3-Zellen

(A) Ba/F3-gp130-IL6R-Zellen wurden mit steigenden Konzentrationen von IL-6 oder aufgereinigtem YFP-IL-6 behandelt, beginnend mit einer Konzentration von 40 ng/ml IL-6 bzw. 80 ng/ml YFP-IL-6, oder einer gleichen Menge aufgereinigter Überstände von den Leervektor exprimierenden Zellen.

Nach 60 h Inkubation wurden lebende Zellen mit einem kolorimetrischen XTT Reagenz (Roche Diagnostic GmbH) nachgewiesen.

(B) Ba/F3-gp130-IL11R-Zellen wurden mit steigenden zweifachen Konzentrationen von Trx-IL-11 und aufgereinigtem YFP-IL-6 behandelt, beginnend mit einer Konzentration von 5 ng/ml Trx-IL-11 und 80 ng/ml YFP-IL-6. Nach 60 h Inkubation wurden lebende Zellen wie beschrieben nachgewiesen.

3.1.5.4 Zusammenfassung der Resultate zur biologischen Aktivität von YFP-IL-6

Die Fusion von IL-6 und YFP lässt die funktionellen Eigenschaften beider Proteine unbeeinträchtigt. YFP-IL-6 wirkt auf eine von IL-6 nicht zu unterscheidende Weise und fluoreszenzmikroskopisch wie YFP darstellbar: Das Fusionsprotein ermöglicht die Untersuchung zahlreicher IL-6 abhängiger Prozesse.

3.2 Internalisierung von YFP-IL-6

Unter Internalisierung wird die Aufnahme von extrazellulären Molekülen oder von Bestandteilen der Plasmamembran in die Zelle verstanden. Bedeutung hat dieser Prozess insbesondere bei den Rezeptorproteinen, da durch die Entfernung der Rezeptoren von der Plasmamembran die Empfindlichkeit der Zelle dem Liganden gegenüber reguliert werden kann.

Mit YFP-IL-6 stand erstmals eine Möglichkeit zur Verfügung die Internalisierung von IL-6 auf Einzelzellebene darzustellen. Neben YFP-IL-6 kamen bei diesen Experimenten das schon beschriebene gp130-CFP und eine internalisierungsdefizienten Mutante (gp130/id-CFP) zur Anwendung (Abb. 19). Bei gp130/id-CFP handelt es sich um eine verkürzte Variante von gp130 (Aminosäuren 1-668), mit deren C-terminalen Ende CFP verbunden ist. Das Fehlen des für die Internalisierung entscheidenden Dileucinmotivs (Leu⁷⁸⁶-Leu⁷⁸⁷) verhindert die Aufnahme des Rezeptors in die Zelle [73, 108].

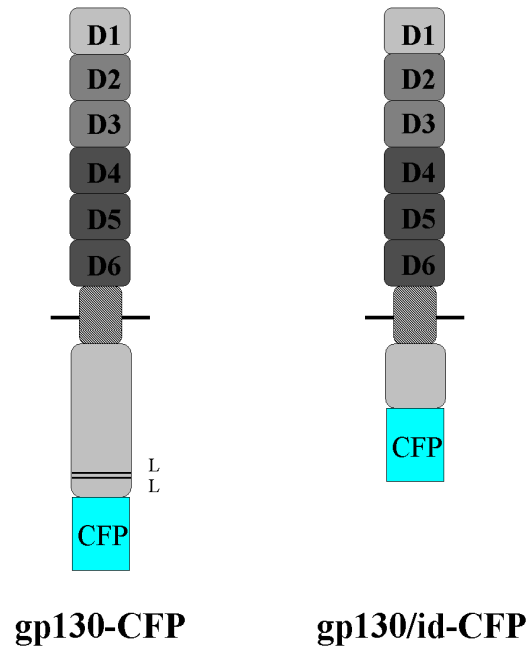


Abb. 19: Schematische Darstellung der eingesetzten gp130-Konstrukte

Das für die Internalisierung entscheidende Dileucinmotiv ist durch zwei Querstriche und LL gekennzeichnet. Das Motiv fehlt im rechten (gp130/id-CFP) Konstrukt.

Es wurden COS7-Zellen, die transient mit dem Expressionsvektor für gp130-CFP transfiziert waren, für 60 Minuten mit YFP-IL-6/sIL-6R α stimuliert oder unstimuliert belassen und anschließend fixiert. Unstimulierte Zellen wiesen in konfokalen Bildaufnahmen lediglich das für gp130 typische Expressionsmuster auf (Abb. 20 A). In den stimulierten Zellen traten hingegen zahlreiche vesikelartige gelbe Anreicherungen auf (Abb. 20 B) und gp130-CFP hatte seine intrazelluläre Verteilung verändert. Es befand sich nunmehr zunehmend, teilweise kolokalisiert mit YFP-IL-6, in vesikulären Einheiten. Eine stärkere Kolokalisierung mit YFP-IL-6 konnte nicht erwartet werden, da gp130 auch konstitutiv, d.h. ohne eine Bindung des Liganden internalisiert wird [109].

Um einen unspezifischen Eintritt von YFP-IL-6 in die Zellen auszuschließen, wurden COS7-Zellen, die transient mit gp130/id-CFP transfiziert waren, gleichermaßen behandelt (Abb. 20 C). In diesen Zellen zeigte sich keine Internalisierung von YFP-IL-6 und YFP-IL-6 blieb an der Plasmamembran konzentriert. Auffällig ist die durch mangelnde Internalisierung verursachte stärkere Membrananreicherung des gp130/id-CFP im Vergleich zu Zellen, die unverändertes gp130-CFP exprimierten.

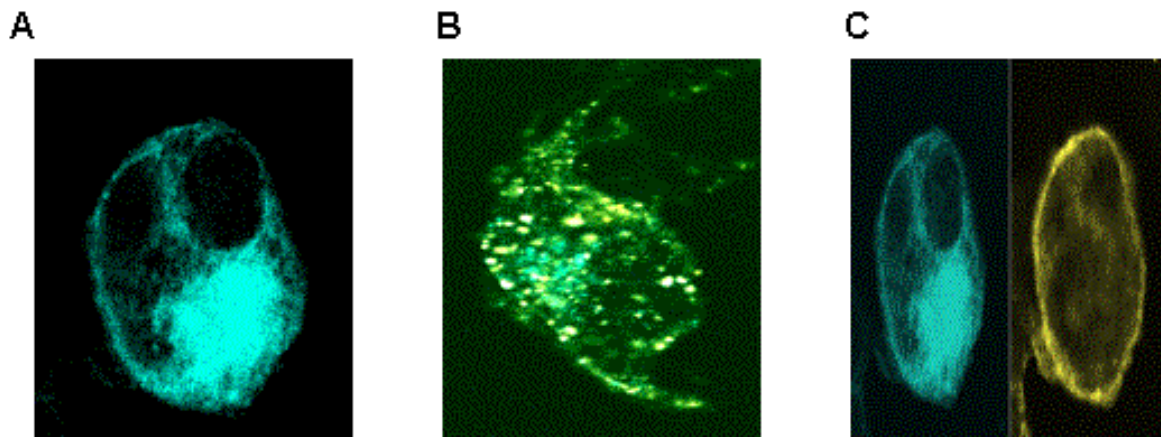


Abb. 20: Internalisierung von YFP-IL-6 in gp130-CFP transfizierten COS7-Zellen

COS7-Zellen wurden mit den Expressionsvektoren für gp130-CFP (A und B) und gp130/id-CFP (C) transfiziert. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen unstimuliert belassen (A) oder mit 40 ng/ml YFP-IL-6 und 1 µg/ml sIL-6Ra stimuliert (B, C) und fixiert. Konfokale Bildaufnahmen wurden mit dem LSM erstellt. YFP-IL-6 ist gelb, gp130/id-CFP ist cyan dargestellt. Durch die multi-track Funktion und geeignete Anregungswellenlängen konnten YFP- und CFP-Fluoreszenzen differenziert werden.

3.3 Analyse der Assoziationszustände von gp130

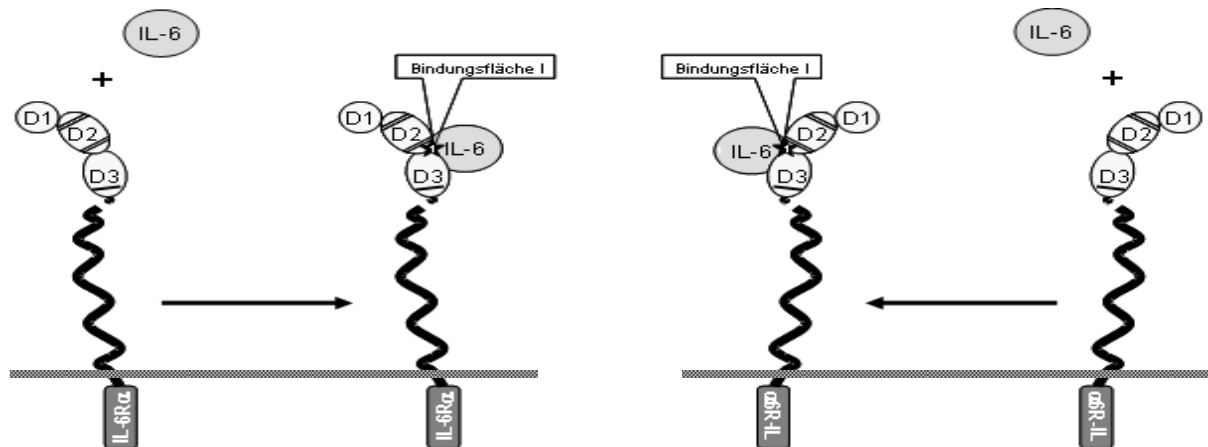
Gemäß dem kürzlich von Boulanger *et al.* vorgeschlagenen Modell, das anhand von löslichen Rezeptorproteinen erstellt wurde, entsteht der komplette hexamere IL-6-Rezeptorkomplex durch eine diffusionsabhängige, schrittweise Assoziation der einzelnen Rezeptorkomponenten [15]. Läge der Rezeptorkomplex aber bereits vor Ligandenbindung präassoziiert an der Zellmembran vor, würde dies den Ablauf der Signalkaskade erheblich beschleunigen, da dann keine Verzögerungen durch den Zeitraum von der Ligandenbindung bis zum diffusionsbedingten Zusammentreffen der im Komplex benötigten Rezeptorkomponenten entstehen. Außerdem würde die Sensitivität des Rezeptors für den Liganden erhöht. Derartiges wurde bereits für andere Klasse-I-Zytokinrezeptoren (z.B. IL-2-Rezeptor und Epo-Rezeptor) nachgewiesen. Dieser Familie gehört auch gp130 an. Innerhalb der Klasse-I-Zytokinrezeptoren nimmt gp130 eine besondere Stellung ein, weil es in den Rezeptorkomplexen von neun verschiedenen Zytokinen enthalten ist. Dort signalisiert es entweder als gp130-Homodimer (IL-6, IL-11) oder als Heterodimer mit dem LIFR (LIF, CNTF), OSMR (OSM) oder dem IL-27R (IL-27). Diese Konstellation macht auch das Problem einer Liganden-unabhängigen Dimerisierung offensichtlich: auch wenn die Di- oder Oligomerisierung von gp130 Vorteile für die Rezeptorkomplexe mit sich bringt, in denen es

als Homodimer auftritt, muss es trotzdem auch für die Interaktion mit anderen Zytokinrezeptoren verfügbar sein, mit denen es Heterodimere ausbildet.

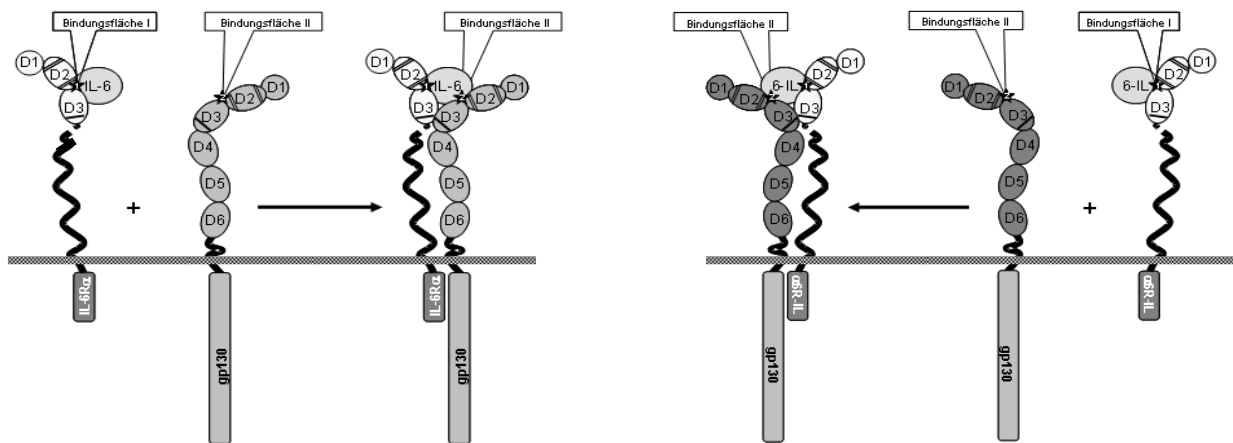
Der signalkompetente, hexamere IL-6-Rezeptorkomplex besteht, wie bereits beschrieben, aus zwei Molekülen IL-6, zwei Molekülen IL-6R α und zwei Molekülen gp130. Aufgrund von mit Hilfe der isothermischen Titrationskalorimetrie an löslichen Rezeptormolekülen gewonnenen Daten, wurde ein Modell der schrittweisen Konstituierung des hexameren IL-6-Signalkomplexes vorgeschlagen (Abb. 21) [15]. Demnach erfolgt in einem ersten Schritt die Interaktion des Bindungsepitops I von IL-6 mit den Domänen D2 und D3 (ZBM) des IL-6R α . Im zweiten Schritt folgt die Assoziation des Bindungsepitops II des IL-6 mit den Domänen D2, D3 (ZBM) von gp130. Ohne die Einbindung der D1 von gp130 ist dieser Komplex jedoch nicht signalkompetent. Ein signalkompetenter Rezeptorkomplex entsteht erst, nachdem in einem dritten Schritt, nach dem Zusammenrücken zweier nicht signalkompetenter Komplexe, IL-6 mit seinem Bindungsepitop III die D1 des gp130 eines zweiten trimeren Komplexes gebunden hat.

Zwingende Voraussetzung für dieses Modell ist, dass sich der Komplex aus IL-6 und IL-6R α an das ZBM des gp130 unabhängig von der Ig-ähnlichen Domäne D1 des gp130 binden kann. Die im Folgenden dargestellten Experimente dienen der Überprüfung dieser Hypothese.

Schritt 1: Bindung von IL-6 an den IL-6R α



Schritt 2: Bindung je eines IL-6/IL-6R α Komplexes an ein gp130



Schritt 3: Bildung des kompletten hexameren Rezeptorkomplexes

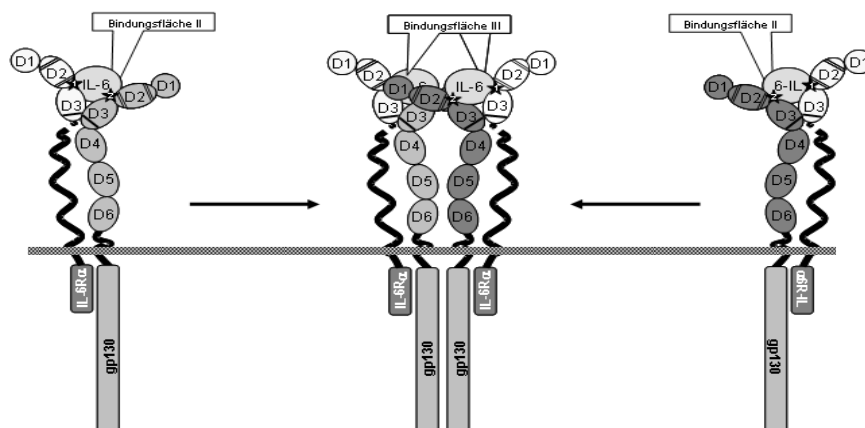


Abb. 21: Schematische Darstellung der schrittweisen Ausbildung des IL-6-Rezeptorkomplexes erstellt nach Boulanger et al. [15], schwarze Sterne symbolisieren die Bindungsflächen des IL-6, weitere Erläuterungen im Text

3.3.1 Die IL-6-Bindung an gp130 mit eingeschränkten Bindungsepitopen

Die in diesem Kapitel dargestellten Versuche wurden in Kooperation mit Dr. Bernd Giese (Institut für Biochemie, RWTH Aachen) durchgeführt.

Bindungsuntersuchungen von IL-6/sIL-6R α -Komplexen an gp130-Proteinen mit nur einem Bindungsepitop ermöglichten die Analyse, ob eine einzelne Kontaktstelle im gp130 die IL-6/sIL-6R α Bindung vermitteln kann, oder ob beide Bindungsepitope gleichzeitig für eine effektive Bindung vorliegen müssen. In letzterem Fall müsste gp130 als präformiertes Dimer vorliegen um IL-6 binden zu können.

Um dies zu untersuchen, wurde YFP-IL-6 in Bindungsstudien mit Deletionsmutanten des internalisierungsdefizienten Fusionsproteins aus gp130 und CFP eingesetzt. Die besonderen Eigenschaften der internalisierungsdefizienten gp130-Proteine wurden bereits im Kapitel 3.2 beschrieben.

Der Deletionsmutante gp130/ Δ D1id-CFP fehlt die Domäne D1 (interagiert mit der Bindungsfläche III des IL-6), während der Deletionsmutante gp130/ Δ D2,3id-CFP die Domänen D2 und D3 (interagieren mit der Bindungsfläche II des IL-6), die das ZBM bilden, fehlen (Abb. 22).

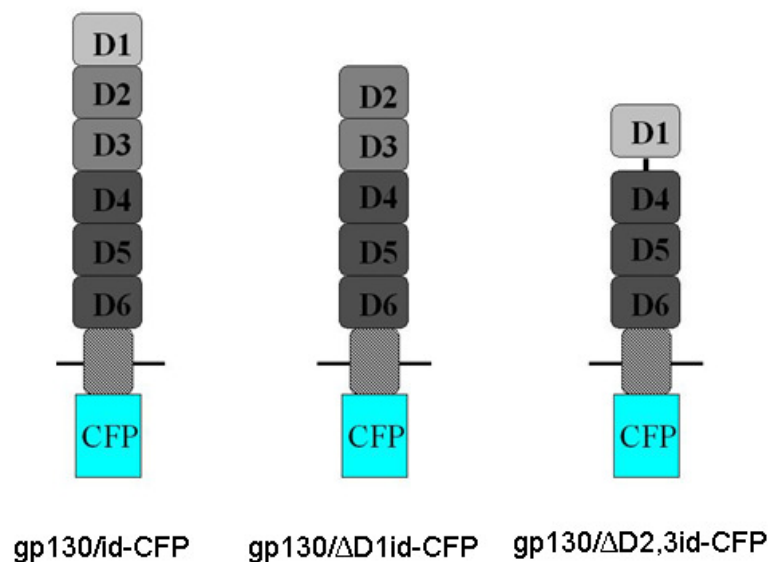


Abb. 22 : Schema der gp130-Deletionsmutanten

Dargestellt sind die in den Bindungsstudien verwendeten fluoreszierenden gp130-Konstrukte und Deletionsmutanten. CFP: cyan fluoreszierendes Protein; D: Domäne.

3.3.1.1 Überprüfung der gp130-Deletionsmutanten durch Immunfluoreszenz

Zur Überprüfung der strukturellen Integrität und der Oberflächenexpression der verwendeten gp130-Deletionsmutanten wurden COS7-Zellen transient mit den Expressionsvektoren für gp130/id-CFP, gp130/ Δ D1id-CFP oder gp130/ Δ D2,3id-CFP transfiziert und mit verschiedenen Antikörpern inkubiert. Der Antikörper B-P4 bindet an die membranproximale Domäne 4 (D4) des gp130. Nach Fixierung der Zellen und der Färbung mit einem PE-konjugierten Zweitantikörper zeigte sich Fluoreszenz an der Plasmamembran aller gp130-Konstrukte. Dies deutet darauf hin, dass durch die Deletion von D1 (gp130/ Δ D1id-CFP) oder dem ZBM (D2 und D3 in gp130/ Δ D2,3id-CFP) die Oberflächenexpression von gp130 nicht beeinträchtigt wird (Abb. 23 untere Reihe).

Die Darstellung des ZBM gelang mit dem Antikörper B-P8. Nach Fixierung der Zellen und Färbung mit einem PE-konjugiertem Zweitantikörper zeigten die gp130/ Δ D2,3id-CFP-exprimierenden Zellen, keine PE-Fluoreszenz (Abb. 23 mittlere Reihe). An der Plasmamembran der mit gp130/id-CFP bzw. gp130/ Δ D1id-CFP transfizierten Zellen war hingegen ein Fluoreszenzsignal als Nachweis der räumlichen Zugänglichkeit des ZBM nachweisbar.

Der Antikörper B-T2 bindet an ein Epitop in der D1 (Abb. 23 oberste Reihe). An gp130/ Δ D1id-CFP exprimierenden Zellen war mit diesem Antikörper keine Fluoreszenz zu beobachten.

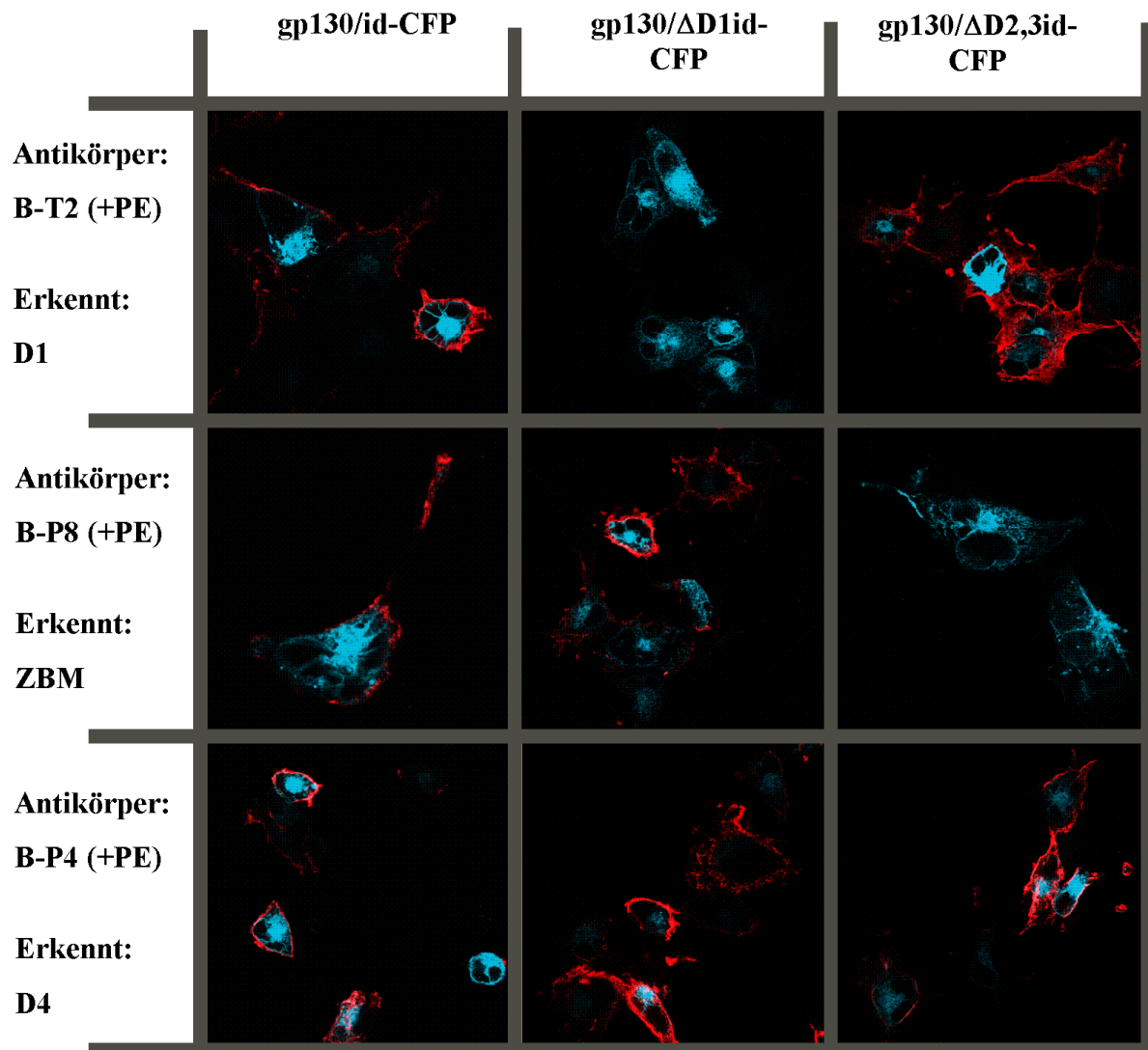


Abb. 23: Gp130-Deletionsmutanten in der Immunfluoreszenz

COS7-Zellen wurden mit den Expressionsvektoren für gp130/id-CFP, gp130/ Δ D1id-CFP oder gp130/ Δ D2,3id-CFP transfiziert und nach 48 h fixiert. Im Anschluss an die Fixierung wurden die Zellen der drei Transfektionsansätze mit Antikörpern gegen verschiedene Extrazellulärdomänen von gp130 behandelt. Die einzelnen Transfektionsansätze wurden jeweils mit B-T2 (gegen D1 gerichtet), B-P8 (gegen das ZBM gerichtet) oder B-P4 (gegen D4 gerichtet) inkubiert. Gebundener Antikörper wurde mit einem PE-gekoppelten Zweitantikörper in konfokalen fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen nachgewiesen. PE-Fluoreszenz ist rot, CFP-Fluoreszenz ist cyan dargestellt.

3.3.1.2 YFP-IL-6-Bindung an gp130-Deletionsmutanten

Diese Versuche wurden in Kooperation mit Dr. Bernd Giese (Institut für Biochemie, RWTH-Aachen) durchgeführt.

Die Untersuchungen zur Bindung von YFP-IL-6 an membranständiges gp130 lebender Zellen

wurden, wie im Kapitel 3.1 beschrieben, am konfokalen *laser-scanning* Mikroskop durchgeführt. Alle Stimulationen erfolgten mit der gleichen Konzentration von YFP-IL-6 unter Zugabe von löslichem IL-6R α . Die in der Abb. 24 dargestellten Aufnahmen wurden mit immer gleichen Mikroskopeinstellungen vorgenommen.

Wurden gp130/id-CFP exprimierende COS7-Zellen stimuliert, so zeigte sich in konfokalen Aufnahmen das in Kapitel 3.1 bereits beschriebene Bild mit deutlich erkennbarer Fluoreszenz des YFP-IL-6 an der Plasmamembran (Abb. 24 A). Wurden hingegen gp130/ Δ D1id-CFP exprimierende COS7-Zellen einer gleichen Behandlung unterzogen, so war in den konfokalen Bildern der Zellen kein membranständiges YFP-IL-6 erkennbar (Abb. 24 B). Das ZBM von gp130 reicht demnach nicht aus, um YFP-IL-6 zu binden.

Untersucht wurde ebenfalls die Bindung von YFP-IL-6 an gp130 ohne ZBM. Zu diesem Zweck wurden gp130/ Δ D2,3id-CFP exprimierende COS7-Zellen mit YFP-IL-6/sIL-6R α stimuliert. Es war in diesem Ansatz ebenfalls keine YFP-IL-6-Bindung nachweisbar (Abb. 24 C). Die alleinige Präsenz der Domäne D1 reicht demnach für die Bindung von IL-6 auch nicht aus.

In einigen Aufnahmen zeigte sich schwache Fluoreszenz im YFP-Kanal außerhalb und z.T. auch innerhalb der Zellen. Solche Signale waren jedoch auch in Aufnahmen unstimulierter Zellen nachweisbar (Abb. 24 D), dabei muss es sich somit um die Eigenfluoreszenz der verwendeten COS7-Zellen handeln.

Die dargestellten Versuche mit den gp130-Mutanten zeigen, dass die Präsenz nur einer der beiden gp130-Bindungsdomänen für eine effektive IL-6-Bindung ungenügend ist. Für eine effektive Bindung ist jeweils die ZBM des ersten gp130 und die D1 des zweiten gp130 (und umgekehrt) notwendig.

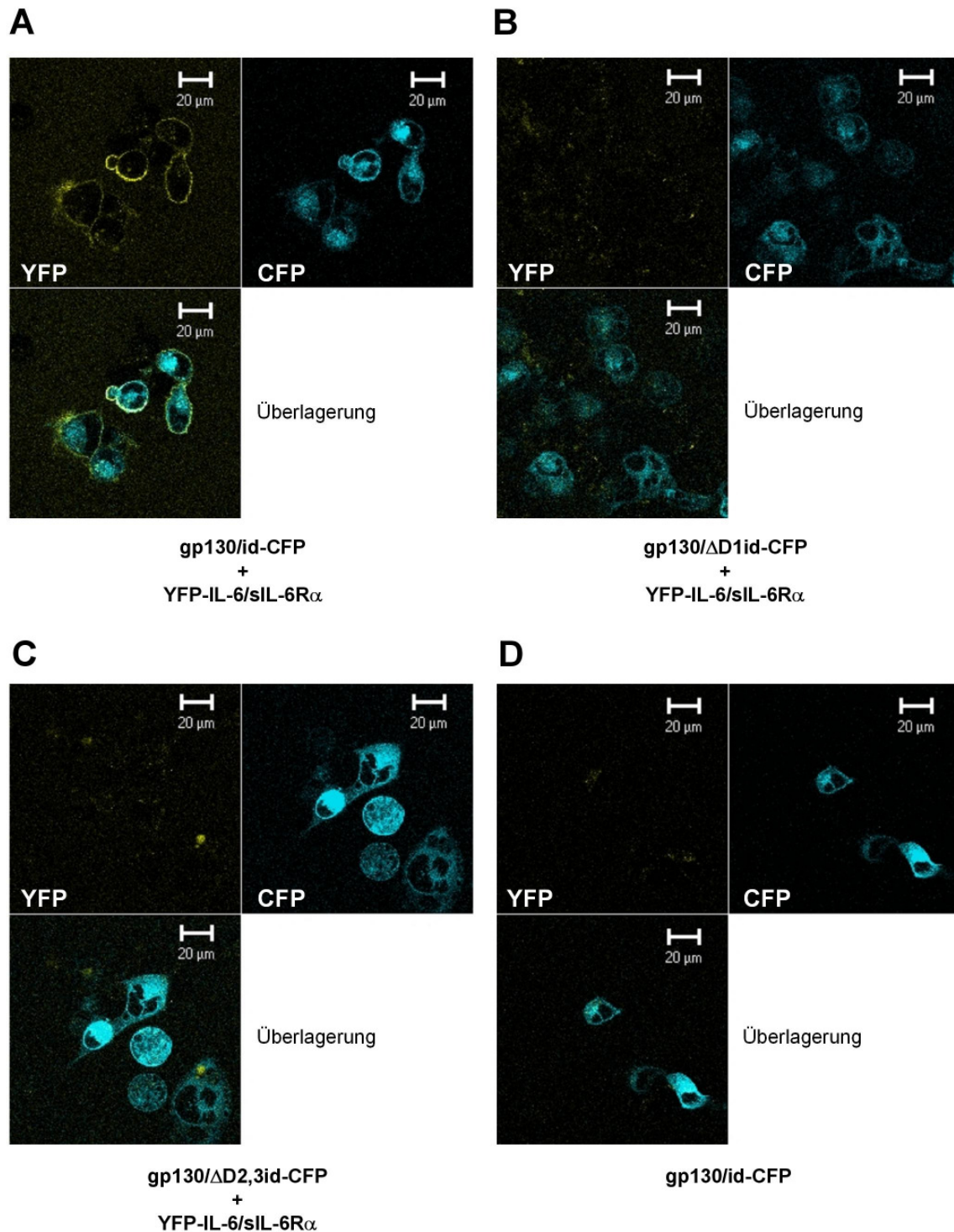


Abb. 24: YFP-IL-6-Bindung an gp130-Deletionsmutanten

COS7-Zellen wurden mit den Expressionsvektoren für gp130/id-CFP (A, D), gp130/ Δ D1id-CFP (B) oder gp130/ Δ D2,3id-CFP (C) transfiziert. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen in eine auf 37°C temperierte Perfusionskammer überführt. 10 min nach der Zugabe von 40 ng/ml YFP-IL-6 und 1 μ g/ml sIL-6R α wurden konfokale Aufnahmen der CFP- und der YFP-Fluoreszenz der Zellen angefertigt.

3.4 Die Ko-Immobilisierung von gp130 und IL-6R α

3.4.1 Die Untersuchung der Diffusionseigenschaften membranständiger, fluoreszierender Moleküle durch fluorescence recovery after photobleaching (FRAP)

Die FRAP-Technologie erlaubt es, die Diffusionseigenschaften membranständiger Proteine zu untersuchen. Es werden bei diesem Verfahren kleine Regionen der Plasmamembran (*regions of interest*, ROIs) lebender Zellen, die fluoreszierende Fusionsproteine exprimieren, mit dem Laser des *laser-scanning* Mikroskops gebleicht. Die durch das Bleichen induzierten Veränderungen der Fluoreszenz und insbesondere der nachfolgende Wiederanstieg der Fluoreszenz (*Recovery*) bedingt durch die Diffusion ungebleichter Moleküle können durch die fortlaufende Messung der mittleren Fluoreszenzintensitäten innerhalb der ROIs quantifiziert werden.

In unserer Arbeitsgruppe wurde diese technisch anspruchsvolle Methode durch Dr. Bernd Giese (Institut für Biochemie, RWTH Aachen) etabliert.

3.4.2 Der Einfluss der gp130-Immobilisierung auf die IL6R α -Mobilität

Die im Kapitel 3.3 gezeigten Daten befassten sich mit der Fragestellung der Liganden-unabhängigen Ausbildung von gp130-Homodimeren. Denkbar ist aber ebenfalls eine Liganden-unabhängige Assoziation von gp130 mit dem IL-6R α . Um dies zu prüfen, wurden Ko-Immobilisierungsstudien mit gp130 und dem IL-6R α durchgeführt.

Aus Vorarbeiten von Dr. Andreas Herrmann (Institut für Biochemie, Aachen) war bekannt, dass gp130 durch Behandlung mit einem geeigneten Antikörperpaar (B-P8, B-S12/G7) in seiner Mobilität nahezu vollkommen eingeschränkt werden kann. Die verwendeten Antikörper B-P8 und B-S12/G7 erkennen Epitope im ZBM von gp130 und führen zu einer Kettenbildung aus gp130 und Antikörpern (Abb. 26) und immobilisieren damit gp130. In FRAP-Experimenten wirkt sich dies durch eine extreme Vergrößerung der immobilen Fraktion aus, d.h. die Kurve der Fluoreszenzwiederkehr erreicht nach dem Bleichen nur noch niedrige Intensitätswerte.

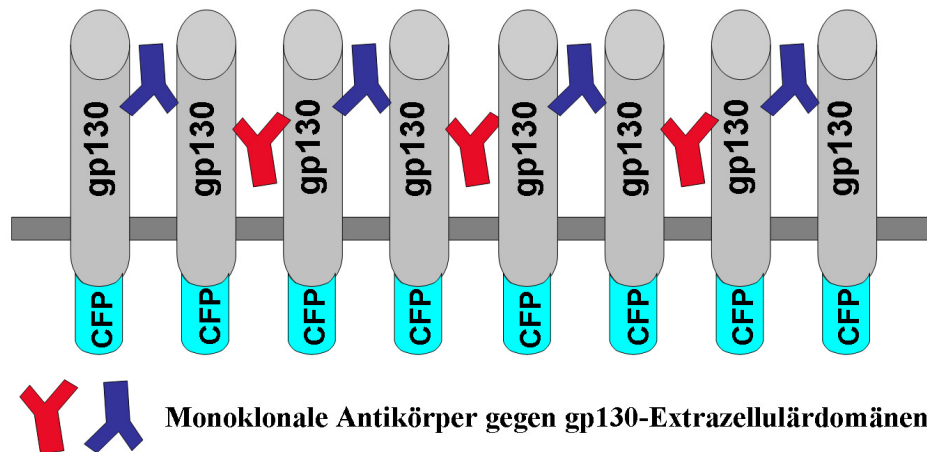


Abb. 26: Schema der gp130-Immobilisierung durch Antikörperpaare

Bei einer Assoziation von gp130 und dem IL-6R α sollten sich induzierte Veränderungen der Diffusion von gp130 gleichsinnig auf den IL-6R α auswirken.

Um die Auswirkung der Immobilisierung von gp130 auf den IL-6R α zu beobachten, wurden diese Moleküle als Fusionsproteine mit zwei verschiedenen fluoreszierenden Molekülen (CFP und YFP) in FRAP-Immobilisierungs-Experimenten eingesetzt. Die Fluoreszenzen von CFP und YFP wurden parallel aufgenommen. Eine Vermischung beider Kanäle wurde durch die in Material und Methoden beschriebene *multi-track*-Funktion des konfokalen Mikroskops vermieden. Im *multi-track*-Modus werden CFP und YFP zu jedem Zeitpunkt der FRAP-Messreihe nacheinander angeregt und detektiert. Die Wahl der geeigneten Laserwellenlängen auf der Anregungsseite bewirkt in Verbindung mit optimierten Bandpassfiltern auf der Detektionsseite eine vollständige Trennung der Fluoreszenzsignale.

COS7-Zellen wurden mit den Expressionsvektoren für gp130/id-CFP und IL-6R α -YFP transient ko-transfiziert. 48 Stunden später wurde gp130/id-CFP durch Zugabe des Antikörperpaares immobilisiert. Die Auswirkungen der Zugabe des Antikörperpaares auf die Diffusion des jeweiligen, ko-transfizierten, Rezeptorproteins sind in der Abb. 27 dargestellt. Ohne Zugabe der Antikörper zeigen gp130/id-CFP und IL-6R α -YFP nach dem Bleichen eine normale Fluoreszenzwiederkehr (Abb. 27 A, linkes Bild). Nach der Behandlung der Zellen mit dem Antikörperpaar zeigte sich eine drastische Verlangsamung der Fluoreszenzrückkehr in beiden detektierten Kanälen, sowie eine Vergrößerung der immobilen Fraktionen (Abb. 27 A, rechtes Bild).

Eine denkbare Erklärung für die Ko-Immobilisierung wäre, dass durch das gebildete „gp130-Netz“ andere Membranproteine und damit auch der IL-6R α unspezifisch gebunden werden.

Dies konnte durch Ko-Transfektion eines anderen Rezeptorpartners für gp130 ausgeschlossen werden. Wie Timmermann *et al.* zeigten, weist der LIF-Rezeptor vor der Stimulation mit LIF keine Assoziation mit gp130 auf [110]. Die im Gegensatz dazu kürzlich von Tenhumberg *et al.* nachgewiesene Liganden-unabhängige Assoziation beider Rezeptoren ist allenfalls sehr schwach und zudem zellspezifisch [111]. An der Plasmamembran von COS7-Zellen, die gp130/id-YFP und ein Fusionsprotein aus einem zytoplasmatisch verkürzten internalisierungs-defizienten LIF-Rezeptor mit CFP (LIFR/id-CFP) exprimierten, konnte nach der Behandlung mit B-S12/G7 und B-P8 keine mit der IL-6R α -Immobilisierung vergleichbare Einschränkung der Diffusion des LIFR-Konstruktes herbeigeführt werden (Abb. 27 B). Somit scheint sich der LIF-Rezeptor in der Plasmamembran unabhängig von gp130 zu bewegen. Im Vergleich dazu deuten die Ergebnisse der IL-6R α -Ko-Immobilisierungsstudien auf eine stimulationsunabhängige Assoziation von gp130 mit dem IL-6R α hin.

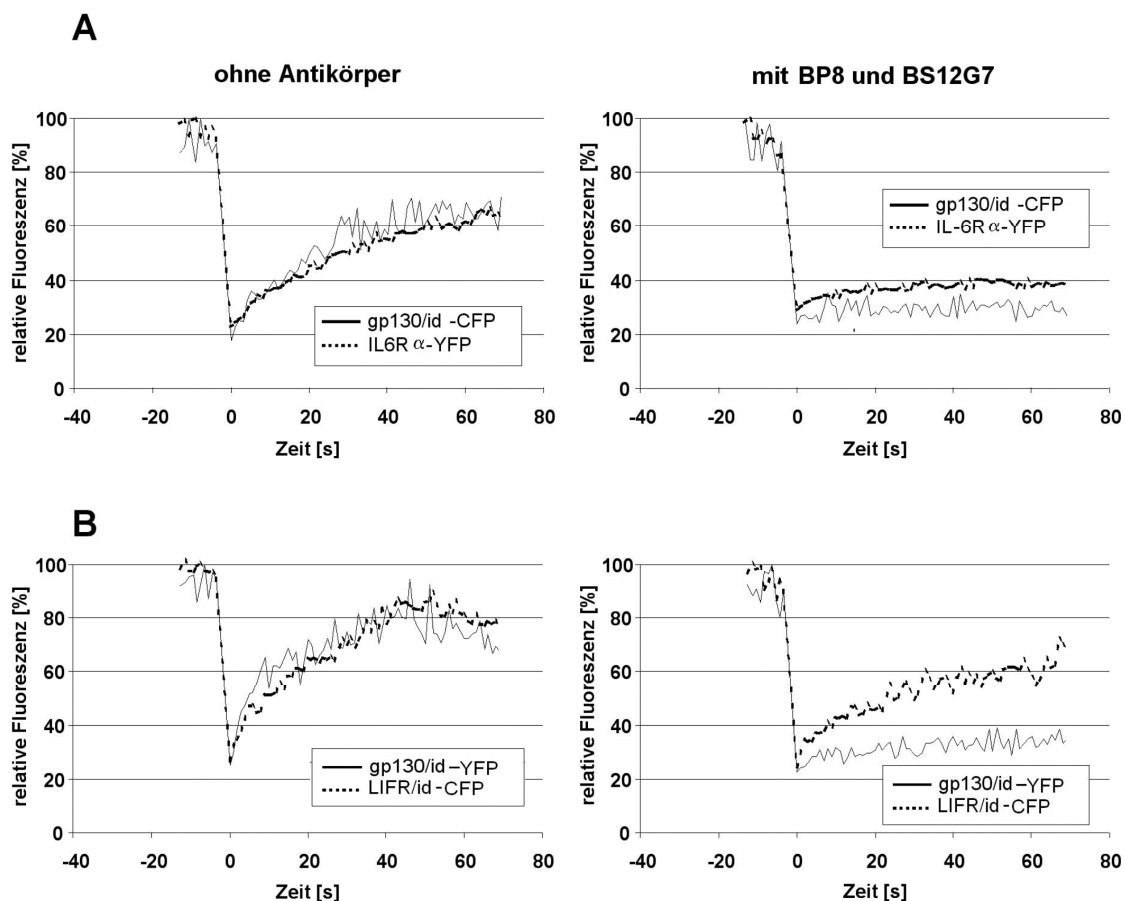


Abb. 27: Ko-Immobilisierung von gp130/id-CFP (YFP) und IL-6R α -YFP bzw. LIFR/id-CFP

(A) COS7-Zellen wurden transient mit den Expressionsvektoren für gp130/id-CFP und IL-6R α -YFP transfiziert. 48 h später wurden die Zellen mit dem Antikörperpaar B-S12/G7 und B-P8 behandelt oder als Kontrolle unbehandelt belassen. Im Rahmen einer FRAP-Messung wurden CFP und YFP

simultan durch die 458 und die 514 nm Wellenlängenlinie des Lasers geblichen. Mittels des multi-track-Modus des konfokalen Mikroskops wurde die Fluoreszenzwiederkehr von CFP und YFP gemessen. Im linken Diagramm ist ohne Zugabe der Antikörper B-S12/G7 und B-P8 eine normale Fluoreszenzwiederkehr beider Proteine erkennbar. Die Fluoreszenzwiederkehr 5 min nach Zugabe des monoklonalen Antikörperpaares ist im rechten Diagramm dargestellt. Die Antikörper bewirkten eine komplette Immobilisierung von gp130/id-CFP (durchgehende Linie) und eine nahezu vollständige Ko-Immobilisierung von IL-6R α -YFP (unterbrochene Linie).

(B) COS7-Zellen wurden transient mit den Expressionsvektoren für gp130/id-YFP und LIFR/id-CFP transfiziert. 48 h später wurde wie oben beschrieben verfahren und FRAP-Experimente wie oben beschrieben durchgeführt. Es zeigte sich eine nahezu komplette Immobilisierung von gp130/id-YFP (durchgehende Linie), bei einer nahezu uneingeschränkten Mobilität von LIFR/id-CFP (unterbrochene Linie).

3.5 Untersuchung der Diffusionseigenschaften von membrangebundenem YFP-IL-6 mittels FRAP

Die Fusion von IL-6 mit YFP als fluoreszierendem Markerprotein bietet die Möglichkeit, die Bindung von YFP-IL-6 an die Zellmembran und damit auch die Diffusionseigenschaften von YFP-IL-6 mittels FRAP zu untersuchen.

Das Diffusionsverhalten des Liganden, YFP-IL-6, sollte sich dabei in Abhängigkeit von seiner Bindung an den Rezeptor verändern, d.h. hochaffin gebundenes YFP-IL-6 mit einer anderen Geschwindigkeit an der Plasmamembran diffundieren als niedrigaffin gebundenes, da in letzterem Fall ein stärkerer Austausch von YFP-IL-6 mit dem Extrazellulärraum und zwischen den Rezeptoren zu einer höheren Diffusionsgeschwindigkeit führen würde.

3.5.1 Das Diffusionsverhalten von YFP-IL-6 bei Stimulation gp130/id-CFP exprimierenden Zellen.

COS7-Zellen wurden transient mit dem Expressionsvektor für gp130/id-CFP transfiziert. Nach 48 Stunden erfolgte eine Stimulation mit YFP-IL-6/sIL-6R α -Komplexen und konfokale Bildaufnahmen wurden erstellt (Abb. 28, linkes Bild). Anschließend wurde an derselben Zelle ein Bleichexperiment durchgeführt (Abb. 28, rechtes Bild). Der Bleichprozess führte zu einer deutlich erkennbaren Abnahme der Fluoreszenz in beiden Kanälen, gefolgt von einer Wiederkehr der Fluoreszenz, bedingt durch die laterale Diffusion an der Plasmamembran.

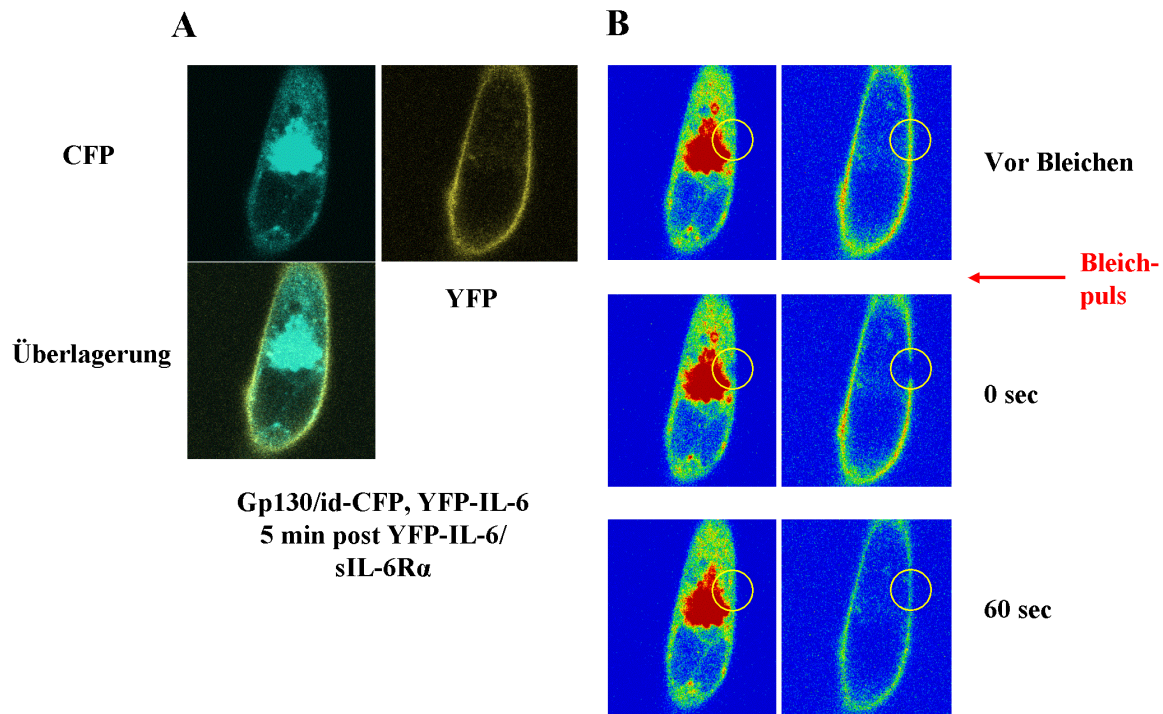


Abb. 28: Verdeutlichung der FRAP-Analyse an der Plasmamembran

(A) 48 h nach der Transfektion von COS7-Zellen mit dem Expressionsvektor für gp130/id-CFP wurden die lebenden Zellen mit YFP-IL-6/sIL-6Rα stimuliert und mit konfokaler Mikroskopie untersucht.

5 min nach der Stimulation wurde eine Bildaufnahme durchgeführt. CFP-Fluoreszenz ist cyan, YFP-Fluoreszenz gelb dargestellt.

(B) Die in der Zeitreihe beispielhaft abgebildete Zelle ist in einer Fehlfarbkodierung wiedergegeben, die hohe Fluoreszenzintensitäten in Rot und niedrige Intensitäten in Blau anzeigt. Zum Zeitpunkt 0 s wurde eine region of interest (ROI) von 1,3 μm Durchmesser an der Plasmamembran mit Laserlicht der Wellenlängen 458 nm und 514 nm simultan gebleicht. Vorher und nachher wurden zu den angegebenen Zeitpunkten Bilder aufgenommen.

3.5.2 Die Diffusion von membrangebundenem und ungebundenem YFP-IL-6

Unmittelbar nach der Stimulation liegt YFP-IL-6 sowohl ungebunden im Extrazellulärraum, als auch, bei Ko-Stimulierung mit sIL-6Rα, an die Plasmamembran gebunden vor. Durch eine geeignete Auswahl des Bleich-ROI kann die Diffusion sowohl für gebundenes als auch für ungebundenes YFP-IL-6 bestimmt werden. Dazu wurden COS7-Zellen transient mit dem Expressionsvektor für gp130/id-CFP transfiziert und mit YFP-IL-6/sIL-6Rα-Komplexen (Abb. 29 A und B) bzw. nur YFP-IL-6 (Abb. 29 C) stimuliert. Das Bleich-ROI wurde auf die Zellmembran (Abb. 29 A und C) oder in den Extrazellulärraum (Abb. 29 B) gelegt. Vor während und nach dem Bleichen wurde innerhalb des ROIs einmal pro Sekunde die mittlere

Fluoreszenzintensität gemessen. Die angegebenen relativen Intensitäten beziehen sich auf die mittlere Intensität in der ROI vor dem Bleichen.

Wurde das Bleich-ROI auf die Zellmembran platziert, kommt es nach dem Bleichen im YFP-Kanal zu einer deutlichen Reduktion der Fluoreszenz, gefolgt von einer Wiederkehr, bedingt durch die laterale Diffusion an der Plasmamembran (Abb. 29 A). Es ergibt sich ein Bild wie es für ein FRAP-Experiment mit einem Transmembranprotein typisch ist.

Im flüssigen Medium des Extrazellulärspaces kann YFP-IL-6 hingegen ungehindert dreidimensional diffundieren, so dass sehr hohe Diffusionsgeschwindigkeiten auftreten, die mit unseren Methoden nicht erfasst werden können (Abb. 29 B). Die starke Fluktuation im YFP-Kanal ist durch die hohe Empfindlichkeitseinstellung des YFP-Kanals bei den Aufnahmen bedingt.

Unterbleibt eine Ko-Stimulierung mit sIL-6R α , so kommt es zu keiner Bindung von YFP-IL-6 an die Zellmembran. Wurde das Bleich-ROI trotzdem auf die Zellmembran gelegt, zeigte sich für den CFP-Kanal das bereits beschriebene Verhalten, YFP-IL-6 aber verhielt sich beim Bleichen wie bei den Experimenten mit dem Bleich-ROI im Extrazellulärraum (Abb. 29 C).

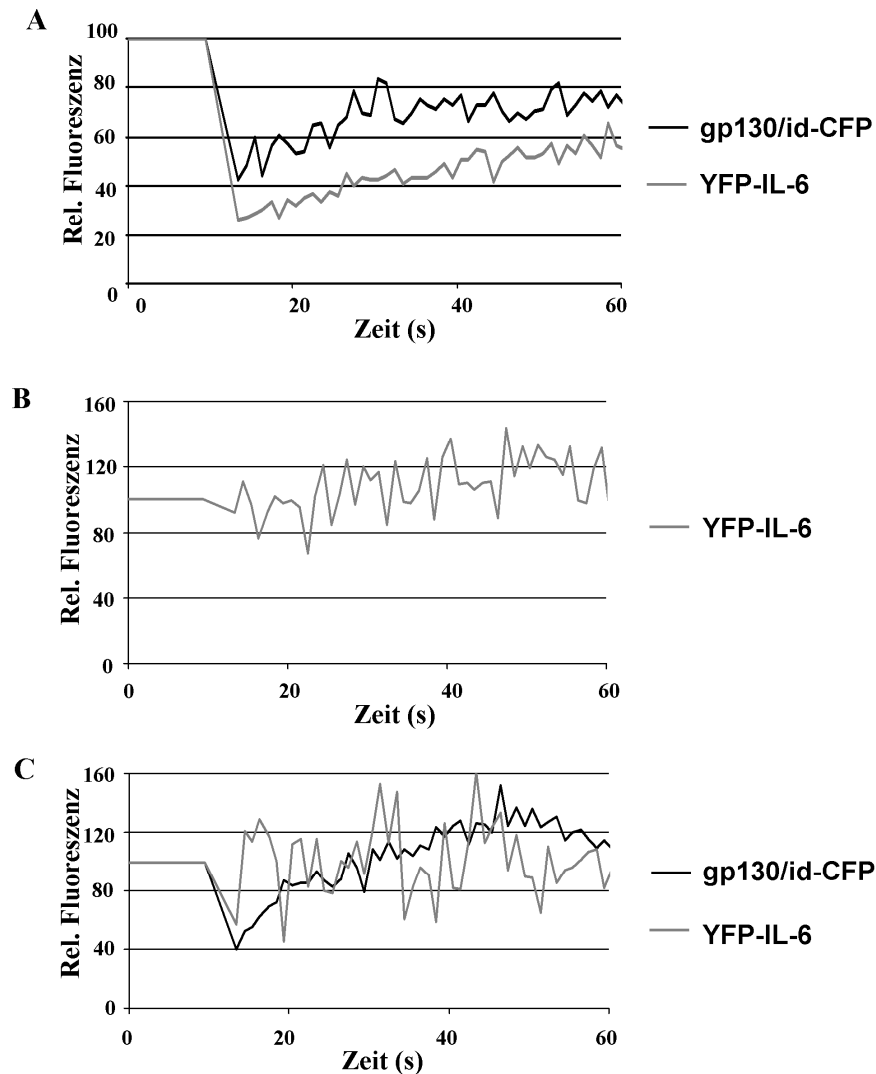


Abb. 29: FRAP-Analyse von YFP-IL-6 und gp130-CFP

COS7-Zellen wurden mit dem Expressionsvektor für gp130/id-CFP transfiziert. 48 h nach der Transfektion erfolgte die Stimulation mit 40 ng/ml YFP-IL-6 und 1 µg/ml sIL-6Ra (A und B) oder nur YFP-IL-6 (C). Anschließend wurden FRAP-Experimente wie oben beschrieben durchgeführt. Das Bleich-ROI wurde auf die Zellmembran (A und C) oder in den Extrazellulärraum (B) gelegt. Die angegebenen relativen Intensitäten beziehen sich auf die mittlere Intensität in der ROI vor dem Bleichen. Abgebildet ist jeweils eine repräsentative Messung.

3.5.3 Die quantitative Analyse von FRAP-Messungen

Um quantitative FRAP-Messungen durchzuführen, wurden zwei verschiedene ROIs mit einem Durchmesser von je 1,3 µm auf der Plasmamembran definiert. Eine dieser beiden ROIs wurde geblichen und in ihr einmal pro Sekunde die Fluoreszenzintensität gemessen. Die andere ROI wurde nicht geblichen. Sie diente der Erkennung von Bewegungen der Plasmamembran. Experimente, die Intensitätsschwankungen in dieser Kontroll-ROI

aufwiesen, wurden verworfen. Aus der Zunahme der Fluoreszenz in der geblichenen ROI wurde die Halbwertszeit der Fluoreszenzwiederkehr mittels einer Regressionskurve berechnet (s. Material und Methoden). Eine dritte ROI in einer zellfreien Fläche der Fokusebene diente der Registrierung der Hintergrundfluoreszenz während der gesamten Messung und wurde ebenfalls nicht geblichen. Die Hintergrundfluoreszenz wurde von den Intensitäten in der geblichenen ROI abgezogen.

3.5.4 Quantitative Analyse der Diffusionseigenschaften von an gp130-CFP gebundenem YFP-IL-6

COS7-Zellen wurden transient mit dem Expressionsvektor für gp130/id-CFP transfiziert. 48 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen mit YFP-IL-6/sIL-6 α -Komplexen stimuliert und quantitative FRAP-Experimente, wie oben beschrieben, durchgeführt.

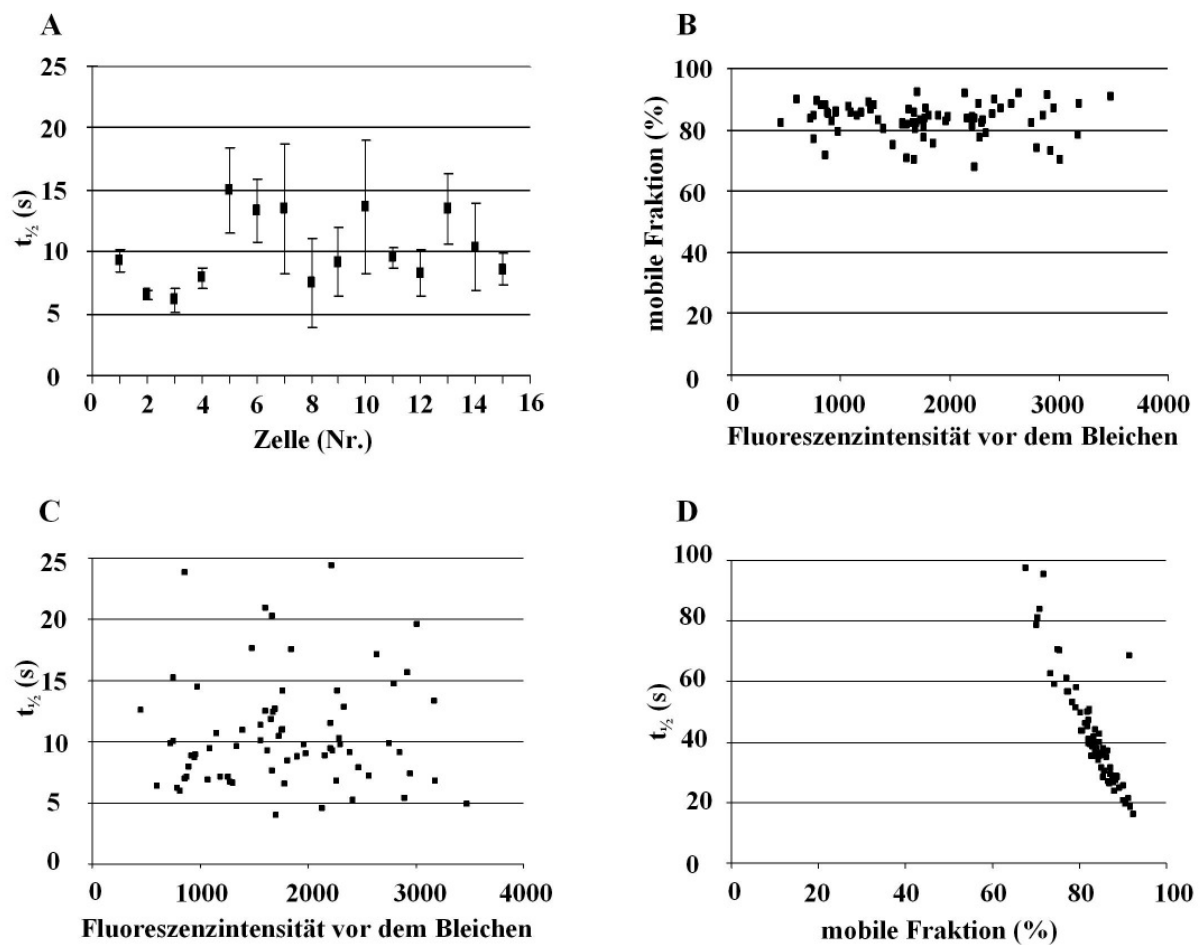


Abb. 30: Quantitative FRAP-Analyse von YFP-IL-6 nach Bindung an gp130/id-CFP exprimierende COS7-Zellen

COS7-Zellen wurden mit den Expressionsvektoren für gp130/id-CFP transfiziert und nach 48 h mit YFP-IL-6/sIL-6 α -Komplexen stimuliert. Es wurde dann eine FRAP-Analyse zur Bestimmung der $t_{1/2}$

der Fluoreszenzwiederkehr von YFP-IL-6 durchgeführt. Je Zelle wurden mehrere Messungen an verschiedenen Stellen der Plasmamembran vorgenommen. In (A) sind die mittleren $t_{1/2}$ der Fluoreszenzwiederkehr für jede der untersuchten Zellen mit der jeweiligen Standardabweichung angegeben. In (B) sind die mobilen Fraktionen aller FRAP-Messungen als Funktion der initialen Fluoreszenzintensität in der Bleich-ROI dargestellt. In (C) sind die $t_{1/2}$ aller Messungen als Funktion der initialen Fluoreszenzintensität in der Bleich-ROI aufgetragen. (D) zeigt die $t_{1/2}$ der Fluoreszenzwiederkehr aller FRAP-Messungen als Funktion der mobilen Fraktion.

An jeder der 15 gemessenen Zellen wurden drei bis sechs FRAP-Messungen durchgeführt und ein Mittelwert der Halbwertszeit der Fluoreszenzwiederkehr berechnet. Der Mittelwert aller untersuchten Zellen lag bei $10,43 \pm 2,43$ Sekunden (s. Tab. 2). Dies entspricht einer Halbwertszeit wie sie eigentlich für Transmembranproteine typisch ist und liegt nahe dem für gp130-YFP bestimmten Wert.

Aufgrund der Verwendung transient transfizierter COS7-Zellen für die FRAP-Experimente variieren die Konzentrationen exprimierter Rezeptorproteine zwischen den untersuchten Zellen. Es ist zu erwarten, dass dies auch die Menge des gebundenen YFP-IL-6 beeinflusst. Da alle Experimente mit identischen Mikroskopeinstellungen durchgeführt wurden, ist die Fluoreszenzintensität zu Beginn einer FRAP-Messung ein guter Indikator für die Menge von gebundenem YFP-IL-6. In Abb. 30 C sind die Halbwertszeiten der Fluoreszenzwiederkehr von YFP-IL-6 aller FRAP-Messungen als eine Funktion der Fluoreszenzintensität vor dem Bleichen in den untersuchten ROIs dargestellt. Es kann keine Abhängigkeit zwischen der Halbwertszeit und der Fluoreszenzintensität festgestellt werden. Dies bedeutet, dass die Mobilität des fluoreszierenden IL-6 nicht von seiner Konzentration an der Membran abhängt. Aus jeder aufgenommenen FRAP-Kurve wurde die mobile und die immobile Fraktion berechnet. Aus der Auftragung der mobilen Fraktion gegen die Fluoreszenzintensität vor dem Bleichen in Abb. 30 B ist ersichtlich, dass auch die mobile Fraktion von der Fluoreszenzintensität in der untersuchten ROI unabhängig ist. Somit ist die immobile Fraktion unabhängig von der Konzentration an YFP-IL-6.

Eine Abhängigkeit tritt erst dann auf, wenn man die Halbwertszeit der Fluoreszenzwiederkehr gegen die mobile Fraktion aufträgt (Abb. 30 D). Eine große mobile Fraktion von YFP-IL-6 geht einher mit einer niedrigen Halbwertszeit der Fluoreszenzwiederkehr. Hohe Diffusionsgeschwindigkeiten von YFP-IL-6 scheinen in den untersuchten Zellen nur möglich zu sein, wenn der Anteil immobiler YFP-IL-6-Moleküle klein ist.

3.5.5 Quantitative Analyse der Diffusionseigenschaften von an IL-6R α -CFP bzw. gp130/F191E/id-CFP gebundenem YFP-IL-6.

In diesen Ansätzen soll das Diffusionsverhalten von YFP-IL-6 untersucht werden, das an Rezeptorproteine gebunden ist, die eine niedrigere Affinität zu YFP-IL-6 aufweisen.

COS7-Zellen wurden transient mit dem Expressionsvektor für den IL-6R α bzw. für gp130/F191E/id-CFP transfiziert. Beim IL-6R α -CFP handelt es sich um ein Konstrukt bei dem das Molekül zytoplasmatisch um CFP verlängert wurde. Gp130/F191E/id-CFP ist eine fluoreszierende Variante eines im ZBM punktmutierten gp130-Moleküls [110]. 48 Stunden nach der Transfektion erfolgte eine Stimulation mit YFP-IL-6 alleine bzw. YFP-IL-6/sIL-6R α -Komplexen. Zur Bestimmung der Diffusionsgeschwindigkeit von YFP-IL-6 wurde wie oben beschrieben verfahren (Abb. 31).

Im Falle einer Bindung von YFP-IL-6 an den IL-6R α bzw. gp130/F191E/id-CFP betrugen der Mittelwert der Halbwertszeiten für die sechs bzw. elf gemessenen Zellen $6,77 \pm 1,12$ Sekunden bzw. $5,83 \pm 1,02$ Sekunden (Tab. 2). Die Diffusionsgeschwindigkeit für YFP-IL-6 ist somit in beiden Fällen deutlich höher als im Falle einer Stimulierung von gp130-CFP transfizierten Zellen. Nach wie vor entspricht dies aber Halbwertszeiten wie sie für Transmembranproteine typisch sind.

Wie für den oben dargestellten Fall der Stimulation von gp130/id-CFP transfizierten Zellen ist die Fluoreszenzwiederkehr von der initialen Fluoreszenzintensität in den untersuchten ROIs unabhängig (Abb. 31 C und D). Die Diffusionsgeschwindigkeit von YFP-IL-6 wird daher nicht von der Intensität der Expression der fluoreszierenden Proteine beeinflusst. Darüber hinaus ist bei der Auftragung der mobilen Fraktion von YFP-IL-6 gegen die Fluoreszenzintensität vor dem Bleichen keine Abhängigkeit erkennbar (Abb. 31 E und F).

YFP-IL-6 gebunden an:

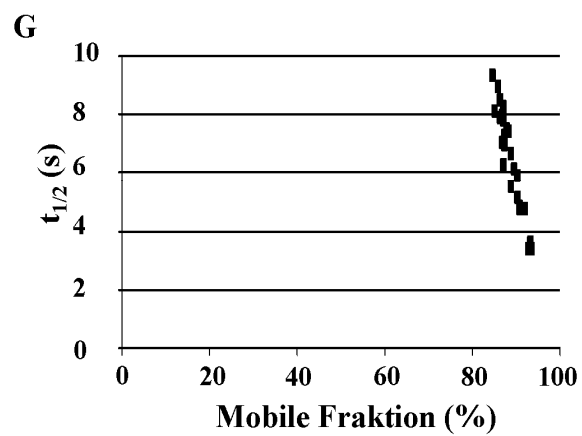
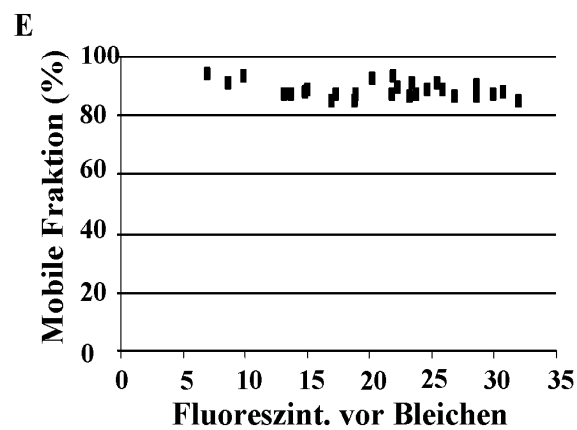
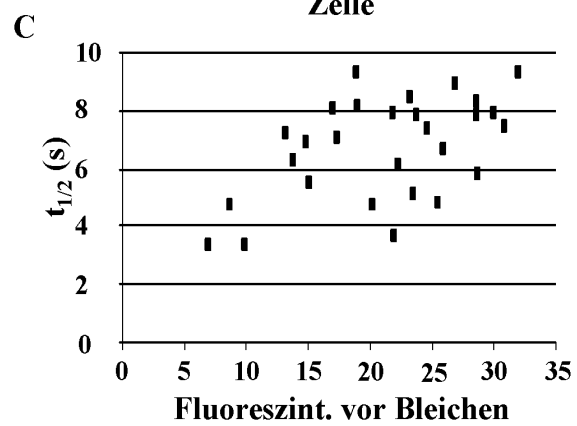
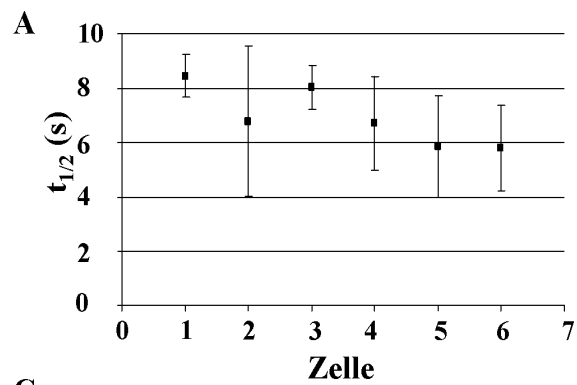
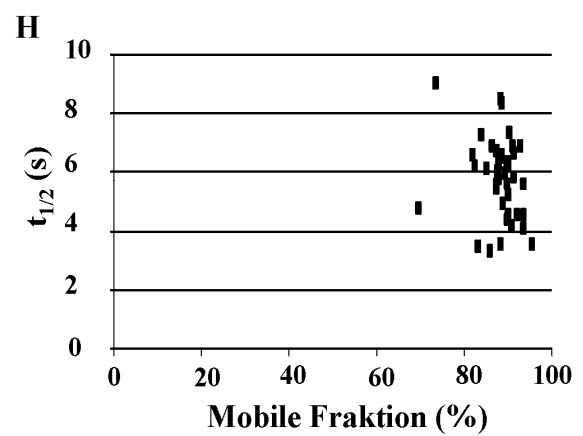
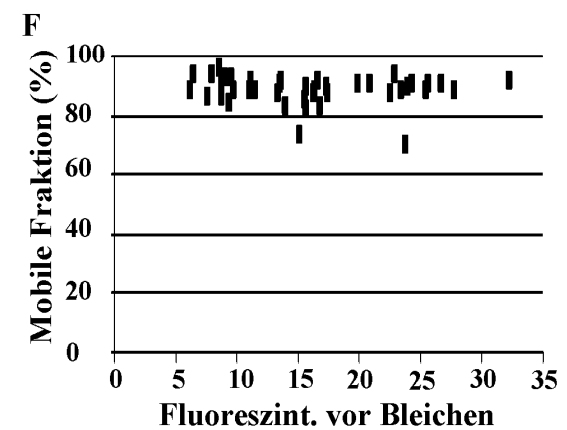
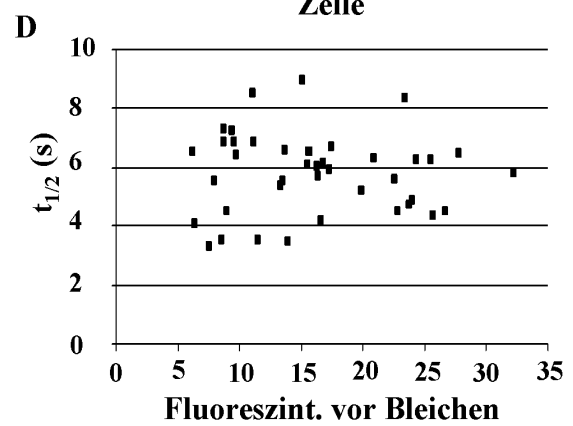
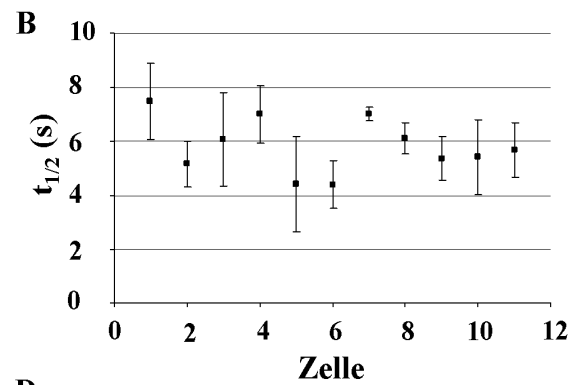
IL-6R α -CFP**gp130/F191E/id-CFP**

Abb. 31: Quantitative FRAP-Analyse

COS7-Zellen wurden mit den Expressionsvektoren für den IL-6R α -CFP bzw. gp130/F191E/id-CFP transfiziert. Nach 48 h erfolgte eine Stimulation mit YFP-IL-6 (A, C, E, G) oder YFP-IL-6/sIL-6R α (B, D, F, H) und FRAP-Analysen wurden zur Bestimmung der $t_{1/2}$ der Fluoreszenzwiederkehr durchgeführt. Je Zelle wurden mehrere Messungen an verschiedenen Stellen der Plasmamembran vorgenommen. In A bzw. B sind die mittleren $t_{1/2}$ der Fluoreszenzwiederkehr für jede der untersuchten Zellen mit der jeweiligen Standardabweichung angegeben. In C und D sind die $t_{1/2}$ -Werte aller Messungen als Funktion der initialen Fluoreszenzintensität im ROI 1 aufgetragen. In E und F sind die mobilen Fraktionen aller FRAP-Messungen aus A und E als Funktion der initialen Fluoreszenzintensität im ROI 1 dargestellt. G bzw. H zeigen die $t_{1/2}$ der Fluoreszenzwiederkehr aller FRAP-Messungen als Funktion der mobilen Fraktion.

3.5.6 Zusammenfassung der FRAP-Experimente mit YFP-IL-6 nach Bindung an verschiedene Rezeptorproteine

Die Bindung von YFP-IL-6 an Rezeptoren der Zellmembran führte zu einer deutlichen Veränderung der Diffusionseigenschaften gegenüber ungebundenem YFP-IL-6. War die Diffusionsgeschwindigkeit vorher extrem hoch, so entsprach sie nach Membranbindung der eines Transmembranproteins. Die Bindung von YFP-IL-6 an den heteromeren Rezeptorkomplex scheint demnach ausgeprägt und auch dauerhaft zu sein. Zum Vergleich ist in Abb. 32 auch die in Kooperation mit Dr. Bernd Giese (Institut für Biochemie, RWTH Aachen) bestimmte Halbwertszeit von gp130-YFP dargestellt.

Die Diffusionseigenschaften von YFP-IL-6 sind darüber hinaus von der Affinität des Liganden (YFP-IL-6) zum Rezeptorprotein (gp130/id-CFP>IL-6R α -CFP>gp130/F191E/id-CFP) abhängig. Hochaffine Bindung an einen Rezeptor führt zu einer niedrigeren Diffusionsgeschwindigkeit, niedrigaffine Bindung zu erhöhter Diffusionsgeschwindigkeit. Interessant ist auch, dass offenbar nur ein sehr langsamer Austausch von YFP-IL-6 zwischen den Rezeptorproteinen, oder dem Extrazellulärraum (dreidimensionale Diffusion) stattfindet. Ein schnellerer Austausch würde zu höheren Diffusionsgeschwindigkeiten als den Gemessenen führen.

Ebenfalls in Bezug auf die mobilen Fraktionen verhielt sich rezeptorgebundenen YFP-IL-6 wie ein Transmembranprotein. Die Erhöhung der mobilen Fraktion von niedrigaffin gebundenem YFP-IL-6 gegenüber hochaffin Gebundenem war zwar gering, könnte aber durch die schwächere Rezeptorbindung und damit einhergehenden höheren Mobilität von YFP-IL-6 bedingt sein.

Rezeptorprotein	Analysiertes Protein	Anzahl untersuchter Zellen [n]	$t_{1/2}$ [s]	Fluoreszenzintensität [0 - 4096] Helligkeitsstufe des 12-bit D/A-Wandlers	mobile Fraktion [%]
gp130/id-CFP	YFP-IL-6	15	$10,4 \pm 2,4$	$1785,2 \pm 725,4$	$83,2 \pm 5,5$
IL-6R α -CFP	YFP-IL-6	6	$6,77 \pm 1,1$	$2115,8 \pm 689,5$	$88,4 \pm 2,5$
Gp130/F191E/id-CFP	YFP-IL-6	11	$5,8 \pm 1,0$	$1615,5 \pm 677$	$88,1 \pm 4,8$

Mittelwerte $\pm$ Standardabweichungen

Tab. 2 Zusammenfassung der FRAP-Experimente mit YFP-IL-6

näheres s. Text

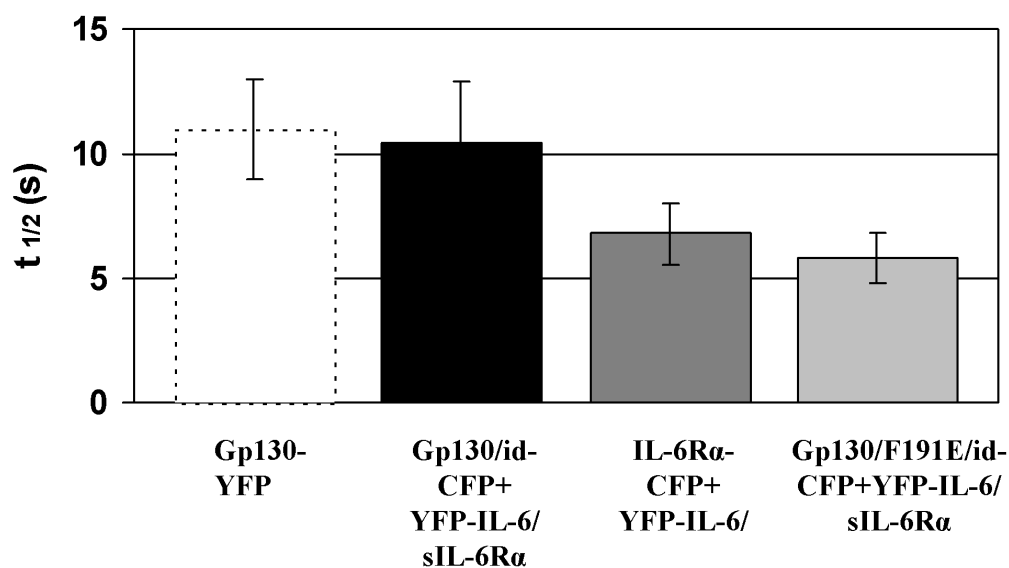


Abb. 32: Vergleich der Halbwertszeit der Fluoreszenzwiederkehr von YFP-IL-6 nach Stimulation unterschiedlich transfizierter Zellen

Im Balkendiagramm sind die Halbwertszeiten der Fluoreszenzwiederkehr von gp130-YFP (nicht durchgehend umrandeter Balken); YFP-IL-6 bei Stimulierung von COS7-Zellen die mit den Expressionsvektor für gp130/id-CFP (schwarz), IL-6R α -CFP (dunkelgrau) und gp130/F191E/id-CFP (hellgrau) transfiziert waren, abgebildet.

4. Diskussion

Gp130 ist die gemeinsame signaltransduzierende Rezeptoruntereinheit der IL-6-Typ-Zytokine. Zu den IL-6-Typ-Zytokinen gehören neben dem IL-6, dem IL-11 und anderen Zytokinen auch der *leukemia inhibitory factor* (LIF).

Die IL-6- und IL-11-Signaltransduktion wird über ein gp130-Homodimer vermittelt, während LIF über einen Komplex aus gp130 und dem LIFR signalisiert.

Über das Dimerisierungsverhalten, und insbesondere über die Frage einer Liganden-unabhängigen Assoziation der genannten Rezeptorkomponenten war bislang nur wenig bekannt. Dies steht im Gegensatz zu anderen Zytokinrezeptoren, wie z.B. TNF-Rezeptoren, IL-2-Rezeptoren und dem Epo-Rezeptor, für die eine Liganden-unabhängige Assoziation der Rezeptorkomponenten gemeinhin akzeptiert wird [12]. Durch die Bindung des Liganden an die präasoziierten Rezeptoren wird eine Konformationsänderung bewirkt, so dass die assoziierten oder intrinsischen Tyrosinkinasen in die für die Initiation der Signalkaskade richtige Position und den richtigen Abstand zueinander geraten [112].

Die Dimerisierung ist somit eine notwendige Bedingung für die Signaltransduktion, jedoch ist erst eine definierte Konformationsänderung für die Aktivierung des Rezeptorkomplexes tatsächlich hinreichend.

Die Präassoziation von Rezeptorkomplexen in der Plasmamembran bringt den Vorteil einer erheblichen Beschleunigung des Ablaufs von Signalkaskaden, da keine Verzögerungen durch den Zeitraum von der Ligandenbindung bis zum diffusionsbedingten Zusammentreffen der im Komplex benötigten Rezeptorkomponenten auftritt [14]. Ein weiterer wichtiger Vorteil ist die Erhöhung der Sensitivität dem Zytokin gegenüber im Falle einer Präassoziation der Rezeptorkomponenten.

Die für andere Rezeptoren vorliegenden Ergebnisse sind auf gp130 aber nur begrenzt übertragbar. So ist das Konzept der Liganden-unabhängigen Ausbildung von gp130-Homodimeren durch die Beteiligung von gp130 an heteromeren Rezeptorkomplexen nicht unproblematisch, da es für solche Interaktionen mit anderen Zytokinrezeptoren (LIFR, OSMR) auch verfügbar sein muss [12, 13, 113].

Bei der Ausbildung des signaltransduzierenden Komplexes interagiert IL-6 in einem ersten Schritt über das Bindungsepitop I mit dem IL-6R α . Der so entstandene IL-6/IL-6R α -Komplex bindet an gp130. Die Bindungsepitope II und III des Zytokins dienen der Interaktion mit

gp130. Die aktive Konformation des gp130-Homodimers wird also über eine zweifache Bindung an den Liganden stabilisiert. Dies erklärt, wieso mindestens zwei verschiedene agonistische Antikörper benötigt werden, um den aktiven Zustand nachzuahmen und so eine Signaltransduktion zu ermöglichen [101]. Des weiteren erklärt sich hieraus auch, wieso nach gp130-Überexpression, im Gegensatz zu den Rezeptortyrosinkinasen, keine Aktivierung in Abwesenheit des Liganden beobachtet wird.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte untersucht werden, ob das gp130-Homodimer präassoziiert in der Zellmembran vorliegt oder erst nach Ligandenbindung ausgebildet wird.

Wertvolle Dienste bei der Aufklärung, der vermutlich sehr schwachen Wechselwirkungen, die eine Präassoziation von gp130 hervorrufen, kann die konfokale *laser-scanning* Mikroskopie mit der Verwendung fluoreszierender Varianten der am Rezeptorkomplex beteiligten Proteine leisten. Im ersten Teil der Arbeit wurde mit YFP-IL-6, einem Fusionsprotein aus YFP und IL-6, eine solche fluoreszierende Variante kloniert, exprimiert und charakterisiert.

4.1. Klonierung, Expression, Aufreinigung und Charakterisierung von YFP-IL-6

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde ein Fusionsprotein bestehend aus Interleukin-6 (IL-6) und dem *Yellow Fluorescent Protein* (YFP), einer Variante des Grün Fluoreszierenden Proteins (GFP), hergestellt. YFP wurde mit dem N-Terminus von IL-6 verbunden, da bekannt war, dass der C-terminale Anteil des IL-6 entscheidend für die Rezeptorbindung und die biologische Aktivität des Moleküls ist [114]. Als Expressionssystem wurde das H5-Insektenzellsystem ausgewählt, nachdem vorausgegangene Studien gezeigt hatten, dass in *E. coli* exprimiertes IL-6 zur Aggregation neigt. Darüber hinaus sind in Insektenzellen exprimierte Proteine glykosyliert und stellen damit ein physiologischeres Modell als in Bakterien exprimierte, also unglykosylierte, Varianten dar. Vorteilhaft für die weitere Arbeit mit dem Fusionsprotein wirkte sich der YFP-Anteil aus, der nicht nur einen einfachen Nachweis des Proteins erlaubt, sondern auch zu einer Stabilisierung von überexprimierten Proteinen [115] führt.

Nachdem die Expression und die Sekretion des Proteins sowohl fluoreszenzspektrometrisch als auch durch molekularbiologische Methoden untersucht worden war, erfolgte die Aufreinigung des Proteins durch Affinitätschromatographie, wobei die hochspezifische

Bindung des IL-6-Anteils des YFP-IL-6 an den löslichen IL-6R α genutzt wurde. Auf diesem Weg konnte YFP-IL-6 bereits durch einen einzigen Schritt weitestgehend aufgereinigt und deutlich konzentriert werden. Nach der Aufreinigung lag YFP-IL-6 sowohl als Monomer als auch als Dimer vor [116]. Der YFP-Anteil des Fusionsproteins erlaubte dabei eine effiziente Evaluierung und Optimierung der Expressions- und Aufreinigungsstrategie. Die mittels ELISA gemessenen Proteinmengen korrelierten dabei stets mit den relativen Fluoreszenzintensitäten, die fluoreszenzspektrometrisch gemessen wurden, so dass in künftigen Experimenten ganz auf eine aufwändige ELISA-Messung zur Konzentrationsbestimmung verzichtet werden könnte.

Voraussetzung für die weitere Verwendung des Fusionsproteins war der Nachweis der biologischen Aktivität des Moleküls. Dazu wurde zunächst die Rezeptorbindung des Fusionsproteins durch die *laser-scanning* Mikroskopie untersucht. In Stimulationsexperimenten mit YFP-IL-6/sIL-6R α -Komplexen stellte sich die Bindung von YFP-IL-6 an gp130-CFP exprimierende Zellen durch eine deutliche Anreicherung des Fusionsproteins an der Membran dar. Die Bindung an die Membran trat nur bei Ko-Stimulation mit dem löslichen IL-6R α auf. Wie Metz et al. zeigten, kann YFP-IL-6 durch die Behandlung mit einem spezifischen IL-6-Antagonisten (IL-6-RFP bestehend aus den Ligandenbindungsdomänen von gp130 und IL-6R α) aus seiner Bindung von der Zellmembran verdrängt werden [117]. Komplektierungsstudien mit YFP-IL-6 und dem spezifischen IL-6-Antagonisten zeigten ausserdem, dass der Komplex aus YFP-IL-6 und IL-6R-RFP analog dem hexameren IL-6-Rezeptorkomplex aufgebaut ist [116].

Nachgewiesen werden konnte ebenfalls die Internalisierung von vorher membrangebundenem YFP-IL-6. Dieser Effekt trat ca. 15 Minuten nach der Stimulation auf, was in guter Übereinstimmung mit bereits vorliegenden Daten zur Internalisierung von IL-6 ist [73, 108]. In Versuchen mit einer internalisierungsdefizienten Mutante von gp130-CFP (gp130/id-CFP) wurde YFP-IL-6 nicht in die Zelle aufgenommen.

Die Stimulation von IL-6-sensitiven Zellen mit IL-6 führt zu einer Reihe von bekannten Effekten, die YFP-IL-6 ebenfalls hervorrufen sollte. Die Stimulation von Ba/F3-gp130-IL-6R α -Zellen mit dem Fusionsprotein führte zur Phosphorylierung und Kerntranslokation von STAT3 und zur Phosphorylierung von MAPK. In Proliferationsversuchen mit IL-6-sensitiven Zellen wirkte YFP-IL-6 auf eine von IL-6 nicht unterscheidbare Weise. In Proliferationsversuchen mit Ba/F3-Zellen die gp130 und den IL-11R α exprimierten, konnte darüber hinaus die Spezifität der Wirkung gezeigt werden. Im Gegensatz zu IL-11 zeigte YFP-IL-6 in diesen Versuchen keinerlei Einfluss auf die Proliferation der Zellen.

Zusammenfassend wurde im ersten Teil dieser Arbeit ein biologisch aktives fluoreszierendes Fusionsprotein aus YFP und IL-6 kloniert, exprimiert und aufgereinigt. Das Protein stellte im weiteren Verlauf der Arbeit ein wertvolles Hilfsmittel für die weitere Untersuchung des IL-6R α /gp130-Rezeptorkomplexes dar.

4.2. Analyse der Assoziationszustände von gp130

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit sollte der Assoziationszustand von membranständigen gp130-Molekülen untersucht werden. Dazu wurden Bindungsstudien mit YFP-IL-6 an gp130 und Deletionsmutanten des gp130 durchgeführt. Diesen Mutanten fehlte entweder die Domäne D1 oder die Domänen D2 und D3 (ZBM) welche für die Ligandenbindung von Bedeutung sind.

In konfokalen Aufnahmen an lebenden Zellen, die mit einer nichtmutierten, fluoreszierenden, Variante des gp130 transfiziert waren, zeigte sich nach entsprechender Stimulation eine deutliche Bindung von Komplexen aus YFP-IL-6/sIL-6R α an die Plasmamembran.

Zellen, die mit gp130/ Δ D1id-CFP transfiziert waren, wiesen hingegen keine vergleichbare Bindung des YFP-IL-6 auf. Diese Beobachtung stimmt mit dem schon von Pflanz *et al.* publizierten Befund, dass das ZBM alleine nicht zur Bindung des Komplexes aus IL-6/sIL-6R α fähig ist, überein [75]. Allerdings steht dieser Befund im Widerspruch zu einem erst kürzlich von Boulanger *et al.* vorgestellten Modell der Konstituierung des IL-6-Rezeptorkomplexes [15]. In diesem Modell findet die erste dauerhafte Interaktion zwischen dem IL-6/IL-6R α -Komplex und gp130 an dem ZBM eines gp130-Monomers statt.

Weitere Bindungsstudien wurden mit der ebenfalls internalisierungsdefizienten Mutante gp130/ Δ D2,3id-CFP durchgeführt. Mit dieser Mutante im Gegensatz zu früheren Arbeiten erstmals ein Konstrukt zur Verfügung, in dem das ZBM durch vollständige Deletion der Domänen zwei (D2) und drei (D3) entfernt war [75, 118, 119].

An Zellen, die dieses Rezeptorprotein transient exprimierten, konnte ebenfalls keine Bindung von YFP-IL-6/sIL-6R α -Komplexen gezeigt werden.

Die weitestgehende Intaktheit und Zugänglichkeit der jeweils verbleibenden Domänen der verwendeten Mutanten wurde durch die Verwendung von spezifischen monoklonalen Antikörpern in Verbindung mit einer Immunfluoreszenz nachgewiesen.

Aus diesen Befunden ergibt sich im Hinblick auf die Konstituierung des signalkompetenten IL-6-Rezeptorkomplexes die Schlussfolgerung, dass der Komplex aus IL-6 und löslichem IL-

6R α nicht erst an eines der beiden Bindungsepitope eines ersten gp130 bindet, bevor in einem nächsten Schritt die Bindung an das entsprechende Epitop eines zweiten gp130 stattfindet. Vielmehr können die vorliegenden Daten am ehesten mit einem Modell erklärt werden, in dem der IL-6/sIL-6R α -Komplex an zwei gp130 Moleküle gleichzeitig bindet und der ternäre Komplex in einem einzigen Schritt entsteht. Die Bindung an eines der beiden Epitope ist wahrscheinlich alleine nicht stabil genug, um die Zeit bis zum diffusionsbedingten Antreffen eines zweiten gp130 zu überdauern. Unbedingte Voraussetzung für eine Bindung des Liganden an den Rezeptor ist in diesem Modell das Vorhandensein prädimerisierter gp130 Proteine (Abb. 32). Es muss somit ein Teil des membranständigen gp130-Pools zumindest transient als Dimer vorliegen. Anderenfalls könnten die IL-6/sIL-6R α -Komplexe an den Rezeptorkomplex nicht binden.

Eine weitere Ausformulierung dieses Modells und die Ausweitung auf den LIFR wurde durch die von Dr. Giese mit der FRET- und BiFC-Technologie gewonnenen Daten hinsichtlich der Assoziation des gp130 und des LIFR möglich [120]. Diese Daten sollen, soweit sie den Gegenstand der vorliegenden Arbeit berühren, im Folgenden kurz vorgestellt werden.

FRET-Messungen an den Plasmamembranen von COS7-Zellen, die mit den Expressionsvektoren für gp130/id-CFP und gp130/id-YFP ko-transfiziert waren, zeigten im unstimulierten Zustand die gleichen FRET-Effizienzen wie IL-6/sIL-6R α -stimulierte Zellen. Die Stimulation mit IL-6/sIL-6R α lässt den Abstand der Rezeptoren offenbar unverändert. Anderes ergab sich für die LIFR/gp130-Heterodimere. Nach Stimulation mit LIF erhöhte sich die FRET-Effizienz deutlich. Der mittlere Abstand von LIFR und gp130 erreicht also erst durch die Stimulation die Werte unstimulierter gp130-Homodimere. Diese Daten legen die Liganden-unabhängige Ausbildung eines gp130-Homodimers an der Plasmamembran nahe, während der LIFR-Komplex sich erst nach Stimulation mit dem Liganden auszubilden scheint.

Im Hinblick auf die oben dargestellte Problematik der Verfügbarkeit einzelner gp130-Moleküle für die Ausbildung von Heteromeren mit anderen Zytokinrezeptoren wurden BiFC-Versuche durchgeführt, um zu unterscheiden, ob gp130 dauerhaft als Dimer an der Plasmamembran vorliegt, oder nur kurzzeitig assoziiert und im Gleichgewicht mit einem monomeren gp130-Anteil existiert. In diesen Versuchen zeigte sich eine deutliche Zunahme der BiFC-Fluoreszenz nach der Stimulation mit IL-6/sIL-6R α . Die Stimulation hat also zu einer BiFC begünstigenden Stabilisierung der gp130-Homodimere geführt. Zu einem vergleichbaren Ergebnis führten die BiFC-Versuche mit LIFR/gp130-Heterodimeren.

Die Zusammenschau der vorliegenden Daten lässt die Schlussfolgerung zu, dass die Modelle

von gp130-Monomeren gegenüber stabil assoziierten gp130-Homodimeren nicht aufrecht erhalten werden können. Vielmehr handelt es sich bei den gp130-Homodimeren um niedrig affine Komplexe, die im Gleichgewicht mit monomerem gp130 stehen (Abb. 32). Stimulation mit IL-6/sIL-6R α stabilisiert die transienten gp130-Homodimere.

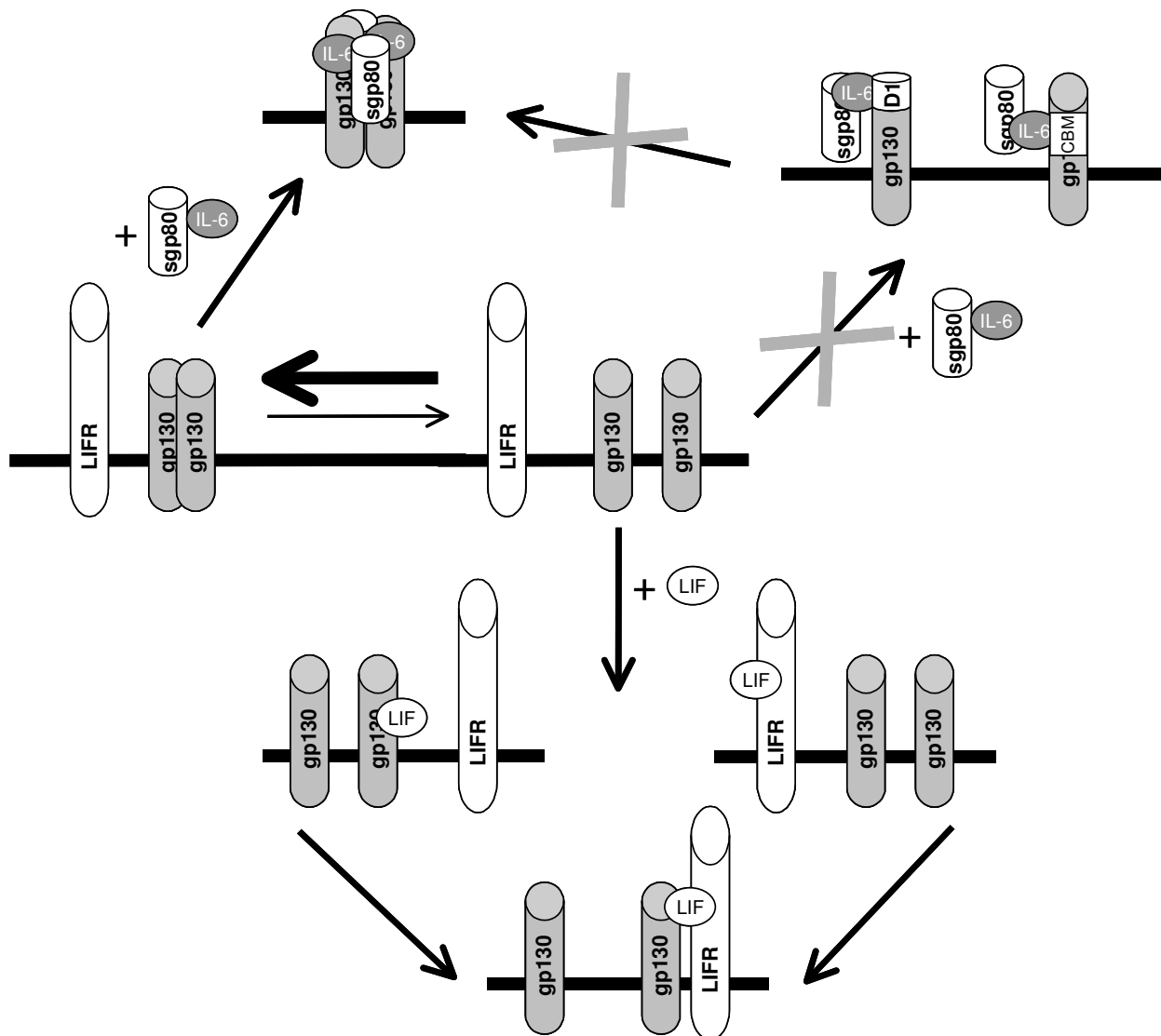


Abb. 32: Modell der Rezeptorassoziation und Komplexbildung im Fall von IL-6 und LIF

Ein großer Teil des gp130 in der Plasmamembran existiert als transientes gp130-Homodimer und ist Voraussetzung für die Ausbildung des Komplexes mit IL-6/sIL-6R α , ein LIFR/gp130-Heterodimer bildet sich erst nach LIF-Stimulation

4.3. Die Assoziation zwischen gp130 und IL6R α

Der IL-6-Rezeptorkomplex setzt sich aus gp130 und dem IL-6R α zusammen. In Anlehnung an durch Dr. Bernd Giese (Institut für Biochemie, RWTH Aachen) gewonnene Daten zur Ko-Immobilisierung von gp130 und Jak1, wurden vergleichbare Versuche mit gp130 und dem IL-6R α durchgeführt. Fluoreszierende gp130-Fusionsproteine können durch die Behandlung mit einem geeigneten Antikörperpaar in ihrer Diffusion an der Zellmembran stark eingeschränkt werden. Auf mit gp130 assoziierte Moleküle sollte sich dies gleichsinnig auswirken. Es zeigte sich, dass ein fluoreszierendes IL-6R α -Fusionsprotein in seiner Diffusion stark eingeschränkt wird, wenn gp130 durch ein Paar monoklonaler Antikörper immobilisiert wird. Ein LIFR-Fusionsprotein konnte im Gegensatz zum IL-6R α nicht ko-immobilisiert werden. Dies weist auf eine Liganden-unabhängige Verbindung zwischen gp130 und dem IL-6R α an der Plasmamembran hin. Ferner werden die durch Dr. Timmermann erhobenen Befunde hinsichtlich der fehlenden Interaktion von gp130 und dem LIFR in Abwesenheit von LIF bestätigt [121]. Dies ist ins Besondere im Hinblick auf die kürzlich durch Tenhumberg *et al.* publizierten Daten, die im Gegensatz dazu eine Liganden-unabhängige Assoziation von gp130 und dem LIFR nahelegen, von Belang [111].

4.4. Untersuchung der Diffusionseigenschaften von membrangebundenem YFP-IL-6 mittels FRAP

Im ersten Teil der Arbeit wurde mit YFP-IL-6 ein Protein geschaffen, das es ermöglicht, die Bindung von IL-6 an den heteromeren IL-6-Rezeptorkomplex fluoreszenzmikroskopisch auf Einzelzellebene darzustellen. Dies erlaubt es, die Interaktion zwischen Rezeptor und Ligand mit Hilfe der FRAP-Technologie zu untersuchen. Dazu wurden mit CFP fusionierte Varianten (i) des gp130, (ii) einer Punktmutante des gp130/id (gp130/idF191E) und (iii) des IL-6R α als Bindungspartner für das YFP-IL-6 eingesetzt.

Zunächst wurde in Vorversuchen die Diffusion von gp130-YFP mittels FRAP untersucht und eine Halbwertszeit der Fluoreszenzwiederkehr von $12,2 \pm 2,4$ s bestimmt. Dieser Wert liegt in einem für Transmembranproteine charakteristischen Bereich. Die mobile Fraktion ist mit $81,0 \pm 2,0\%$ sehr ausgeprägt und liefert somit keinen Anhaltspunkt für eine starke Verankerung von gp130 am Zytoskelett, welche zu einer Immobilisierung des Rezeptors führen würde.

Um bei FRAP-Versuchen am konfokalen Mikroskop verwertbare Kurven der Fluoreszenzwiederkehr zu erhalten, die nicht durch übermäßiges Rauschen oder zu geringe Signalintensitäten unauswertbar werden, musste mit transienter Überexpression der untersuchten Fusionsproteine gearbeitet werden. Die transiente Transfektion von COS7-Zellen führte zu Schwankungen der Expression zwischen den untersuchten Zellen. Es konnte allerdings kein Einfluss der jeweiligen Expressionsstärken der fluoreszierenden Fusionsproteine auf die FRAP-Halbwertszeiten oder die Größe der mobilen Fraktion festgestellt werden. Damit sind keine Anhaltspunkte für artifizielle Aggregationen von Proteinen gegeben, die zu einem Anstieg der FRAP-Halbwertszeit und einer Abnahme der mobilen Fraktion bei steigender Expression führen würden.

Um die Diffusionseigenschaften von IL-6 zu bestimmen, erfolgte die Stimulation von Zellen in einem ersten Schritt mit YFP-IL-6 (d.h. ohne Zugabe von sIL-6R α). In diesen Experimenten war keine Membranbindung von YFP-IL-6 zu beobachten da die verwendeten Zellen keinen IL-6R α exprimieren. YFP-IL-6 lag daher ungebunden im Extrazellulärraum vor. Dort kann es unbegrenzt, dreidimensional, diffundieren. Die in diesem Kompartiment untersuchte Halbwertszeit der Fluoreszenzwiederkehr lag in einem derart niedrigen Bereich, dass sie mit der angewendeten Methode nicht weiter quantifiziert werden konnte. Erfolgte eine Ko-Stimulation mit YFP-IL-6/sIL-6R α war hingegen eine Membranbindung an gp130 beobachtbar. Für rezeptorgebundenen YFP-IL-6 ist zu erwarten, dass andere Verhältnisse als für im Extrazellulärraum lokalisiertes YFP-IL-6 vorliegen. Die Diffusionsgeschwindigkeit sollte sich drastisch reduzieren, da an den Rezeptor gebundenes YFP-IL-6, ähnlich wie der Rezeptor, an der Plasmamembran einer zweidimensionalen Diffusion unterliegt. Die mittlere Diffusionsgeschwindigkeit könnte allerdings durch den Austausch von YFP-IL-6 zwischen den Rezeptoren oder mit im Extrazellulärraum ungebunden vorliegendem YFP-IL-6 erhöht sein. Ein dynamisches Gleichgewicht zwischen rezeptorgebundenem und nicht-rezeptorgebundenem YFP-IL-6 sollte sich deshalb in signifikant kürzeren Halbwertszeiten der Fluoreszenzwiederkehr von YFP-IL-6 verglichen mit denen des Rezeptors niederschlagen. Die Ergebnisse der FRAP-Messungen zeigen aber für beide Moleküle im Mittel annähernd gleiche Diffusionsgeschwindigkeiten. Die Halbwertszeit der Fluoreszenzwiederkehr wurde für an gp130-CFP gebundenes YFP-IL-6 mit $10,4 \pm 2,4$ s, bei einer mobilen Fraktion von $83,2 \pm 5,5\%$ bestimmt. Diese Werte entsprechen denen eines Transmembranproteins.

Geprüft wurde in einem nächsten Schritt die Abhängigkeit der Halbwertszeit der Fluoreszenzwiederkehr von der Affinität zwischen Ligand und Rezeptor. Eine schwächere Affinität zwischen den Bindungspartnern sollte zu einer verstärkten Dissoziation des YFP-IL-

6 vom Rezeptor und damit zu einer messbar höheren Mobilität des YFP-IL-6 führen. Um dies zu prüfen, wurde eine Mutante des gp130 eingesetzt, in der das Phenylalanin an der Position 191 gegen glutaminsäure ausgetauscht wurde. Dies führte zu einer schwächeren, aber nicht gänzlich aufgehobenen Bindung von IL-6 an diese Mutante. Eingesetzt wurde ebenfalls eine fluoreszierende Variante des IL-6R α . Die Bindungsstärke von IL-6 an den nicht im Komplex mit gp130 vorliegenden IL-6R α , sollte schwächer sein, als die Bindung von IL-6 an den kompletten Rezeptorkomplex.

Die Halbwertszeit der Fluoreszenzwiederkehr von YFP-IL-6, das an COS7-Zellen, die transient IL-6R α exprimierten, gebunden hatte, lag bei $6,77 \pm 1,1$ s bei einer mobilen Fraktion von $88,42 \pm 2,5\%$. An gp130/idF191E-CFP exprimierende COS7-Zellen gebundenes YFP-IL-6 wies eine nahezu identische Halbwertszeit von $5,8 \pm 1,0$ s bei einer mobilen Fraktion von $88,1 \pm 4,8\%$ auf. Beide Werte unterscheiden sich deutlich von dem Wert der für YFP-IL-6, das an gp130-CFP gebunden hatte, bestimmt worden war.

In der Zusammenschau deuten diese Befunde auf eine stabile Bindung von YFP-IL-6 an den kompletten heteromeren IL-6-Rezeptorkomplex im Vergleich zur Bindung an IL-6R α alleine hin. Die Minderung der Bindungsaffinität des Liganden drückt sich in einer Erhöhung der Diffusionsgeschwindigkeit aus. Dies deutet auf einen erhöhten Austausch von YFP-IL-6 zwischen den Rezeptoren und mit dem Extrazellulärraum hin, wenn YFP-IL-6 an Rezeptoren mit geringerer Affinität bindet.

5. Zusammenfassung der Ergebnisse

Unter dem Begriff Zytokine wird eine Vielzahl von Proteinen und Glykoproteinen subsumiert, die als Botenstoffe bei der interzellulären Kommunikation bedeutende Aufgaben erfüllen.

Die zur Familie der IL-6-Typ-Zytokine gehörenden Moleküle, wie IL-6, IL-11, IL-27, LIF, CT-1, CNTF, CLC, NP und OSM sind insbesondere bei der Hämatopoese, der Immunantwort, der Embryogenese, der Regulation der Akutphase-Reaktion, der Leber- und der neuronalen Regeneration, sowie der Steuerung der Fertilität von Bedeutung.

Gp130 ist die gemeinsame signaltransduzierende Rezeptoreinheit der IL-6-Typ-Zytokine. Der im Falle des IL-6 für die Einleitung der intrazellulären Signaltransduktion verantwortliche Komplex besteht aus dem Liganden IL-6, dem spezifischen IL-6R α und gp130-Molekülen. Im LIFR-Komplex liegt LIF gebunden an ein Heterodimer von gp130 und dem LIFR vor.

Gegenstand der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung des Assoziationszustandes des IL-6-Rezeptorkomplexes. Hierzu wurde ein fluoreszierendes Fusionsprotein aus IL-6 und YFP eingesetzt.

- In dieser Arbeit wurde ein fluoreszierendes Interleukin-6 Molekül kloniert und mit dem gewonnenen Vektor eine YFP-IL-6 sezernierende Insektenzelllinie generiert.
- Das durch die Zelllinie sezernierte YFP-IL-6 wurde auf seine biologische Aktivität untersucht. Es gelang der Nachweis, dass die Fusion mit YFP die biologische Aktivität von IL-6 nicht beeinträchtigt. Darüber hinaus konnte die Internalisierung von YFP-IL-6 in COS7-Zellen fluoreszenzmikroskopisch nachgewiesen werden.
- Fluoreszenzmarkiertes IL-6 ermöglichte Ligandenbindungsstudien an gp130-Deletionsmutanten: Es zeigte sich, dass nur eines der beiden Bindungs epitope des gp130 zur Bindung des IL-6/IL-6R α -Komplexes nicht ausreicht. Nur gp130-Dimere, die beide Bindungsflächen (d.h. die Domäne D1 und das ZBM) gleichzeitig zur Verfügung stellen, ermöglichten die Bindung des IL-6/IL-6R α -Komplexes. Daraus konnte auf die Liganden-unabhängige Ausbildung von zumindest transient vorliegenden gp130-Dimeren geschlossen werden. Diese Befunde werden darüber hinaus durch mit der FRET- bzw. BiFC-Technik erhobene Daten gestützt.
- Mit der Methode der Immobilisierung von gp130 durch Antikörper konnte eine Ko-

Immobilisierung des IL-6R α hervorgerufen werden. In gleichartigen Experimenten konnte der LIFR hingegen in seiner Beweglichkeit nicht eingeschränkt werden. Dies deutet auf präformierte Komplexe von gp130 und dem IL-6R α hin.

- In FRAP-Experimenten gelang ein Ausbleichen von membrangebundenem YFP-IL-6. Hinsichtlich seiner Diffusion verhielt sich im Ternärkomplex gebundenes YFP-IL-6 wie ein Membranprotein. Die Halbwertszeit der Fluoreszenzrückkehr nach dem Ausbleichen war von der Affinität zum Rezeptorprotein an das YFP-IL-6 gebunden wurde, abhängig.

6. Ausblick

Mit YFP-IL-6 wurde ein bioaktives, fluoreszenzmarkiertes Zytokin erzeugt, das vielfältige Anwendungsmöglichkeiten bei Bindungsstudien mit dem gp130-Rezeptor gefunden hat. Dies ist auch im Zusammenhang mit einem neuartigen IL-6-Rezeptorantagonisten und dessen Charakterisierung von Bedeutung [116]. Diese Technologie könnte auf andere Zytokine, wie z.B. LIF oder OSM übertragen werden. Solche Analysen mit XFP-LIF oder XFP-OSM oder auch anderen fluoreszenzmarkierten Zytokinen könnten wertvolle Daten bei der Aufklärung der Bindungsvoraussetzungen und der Bindungsreihenfolge dieser Proteine an membranständige Rezeptoren lebender Zellen liefern. Bisher wurden bei solchen Versuchen häufig lösliche oder an einen Träger gekoppelte Rezeptoren eingesetzt, die oft lediglich über Extrazellulärdomänen verfügten.

Darüber hinaus stehen mit der bildgebenden Analyse im konfokalen Mikroskop Möglichkeiten zur Quantifizierung der Bindungsaffinität zur Verfügung. Eine in diesem Zusammenhang spannende Entwicklung ist die mit der konfokalen Mikroskopie verknüpfbare Fluoreszenz Korrelations Spektroskopie (*fluorescence correlation spectroscopy*- FCS) [122]. Diese Methode ermöglicht die Untersuchung von Liganden-Rezeptor-Wechselwirkungen mit dem Ziel der Berechnung von Bindungskonstanten.

Nicht endgültig geklärt werden konnte bislang die Frage einer möglichen Stimulations-unabhängigen Komplexbildung zwischen dem IL-6R α und gp130. In Anknüpfung an die durch Dr. Bernd Giese mit der BiFC-Technologie gewonnenen Daten, könnte die zusätzliche Expression eines BiFC-tauglichen IL-6R α -Fusionsproteins als Konkurrent eines Paares BiFC-fähiger gp130-Homodimere Antworten auf diese Frage, sowie die sich daraus ergebende Frage einer etwaigen Bevorzugung eines Interaktionspartners durch gp130 liefern. In diese Studien könnten dann in einem nächsten Schritt auch weitere Zytokinrezeptoren, wie beispielsweise der OSMR oder der LIFR einbezogen werden. Unter der Beibehaltung des in dieser Arbeit vorgestellten Ko-Immobilisierungsansatzes wäre auch die Mutation oder Deletion einzelner Domänen von gp130 oder IL-6R α zur Bestimmung ihrer Interaktionsregion denkbar.

7. Literatur

- 1 Ibelgaufts, H. (1992) Lexikon Zytokine. Medikon Verlag München. 12-13,156-157, 244-251
- 2 Nicola, N. A. (1994) Guidebook to cytokines and their receptors. A Sambrook and Tooze Publication at Oxford University Press
- 3 Sprang, R. F. and Bazan, J. F. (1993) Cytokine structural taxonomy and mechanism of receptor engagement. *Current Opinion in Structural Biology* **3**, 815-827
- 4 Bazan, J. F. (1990) Haemopoietic receptors and helical cytokines. *Immunol Today* **11**, 350-354
- 5 Heinrich, P. C., Behrmann, I., Muller-Newen, G., Schaper, F. and Graeve, L. (1998) Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. *Biochem J* **334 (Pt 2)**, 297-314
- 6 Heinrich, P. C., Behrmann, I., Haan, S., Hermanns, H. M., Muller-Newen, G. and Schaper, F. (2003) Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem J* **374**, 1-20
- 7 Derouet, D., Rousseau, F., Alfonsi, F., Froger, J., Hermann, J., Barbier, F., Perret, D., Diveu, C., Guillet, C., Preisser, L., Dumont, A., Barbado, M., Morel, A., deLapeyriere, O., Gascan, H. and Chevalier, S. (2004) Neuropeitin, a new IL-6-related cytokine signaling through the ciliary neurotrophic factor receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 4827-4832
- 8 Pflanz, S., Timans, J. C., Cheung, J., Rosales, R., Kanzler, H., Gilbert, J., Hibbert, L., Churakova, T., Travis, M., Vaisberg, E., Blumenschein, W. M., Mattson, J. D., Wagner, J. L., To, W., Zurawski, S., McClanahan, T. K., Gorman, D. M., Bazan, J. F., de Waal Malefyt, R., Rennick, D. and Kastelein, R. A. (2002) IL-27, a heterodimeric cytokine composed of EBI3 and p28 protein, induces proliferation of naive CD4(+) T cells. *Immunity* **16**, 779-790
- 9 Elson, G. C., Lelievre, E., Guillet, C., Chevalier, S., Plun-Favreau, H., Froger, J., Suard, I., de Coignac, A. B., Delneste, Y., Bonnefoy, J. Y., Gauchat, J. F. and Gascan, H. (2000) CLF associates with CLC to form a functional heteromeric ligand for the CNTF receptor complex. *Nat Neurosci* **3**, 867-872
- 10 Senaldi, G., Varnum, B. C., Sarmiento, U., Starnes, C., Lile, J., Scully, S., Guo, J., Elliott, G., McNinch, J., Shaklee, C. L., Freeman, D., Manu, F., Simonet, W. S., Boone, T. and Chang, M. S. (1999) Novel neurotrophin-1/B cell-stimulating factor-3: a cytokine of the IL-6 family. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 11458-11463
- 11 Wells, J. A. and de Vos, A. M. (1996) Hematopoietic receptor complexes. *Annu Rev Biochem* **65**, 609-634
- 12 Livnah, O., Stura, E. A., Middleton, S. A., Johnson, D. L., Jolliffe, L. K. and Wilson, I. A. (1999) Crystallographic evidence for preformed dimers of erythropoietin receptor before ligand activation. *Science* **283**, 987-990
- 13 Damjanovich, S., Bene, L., Matko, J., Alileche, A., Goldman, C. K., Sharrow, S. and Waldmann, T. A. (1997) 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* **94**, 13134-13139
- 14 Hermanns, H. M., Muller-Newen, G., Heinrich, P. C. and Haan, S. (2005) Bow to your partner for signaling. *Nat Struct Mol Biol* **12**, 476-478
 - 15 Boulanger, M. J., Chow, D. C., Brevnova, E. E. and Garcia, K. C. (2003) Hexameric structure and assembly of the interleukin-6/IL-6 alpha-receptor/gp130 complex. *Science* **300**, 2101-2104
 - 16 Ward, L. D., Howlett, G. J., Discolo, G., Yasukawa, K., Hammacher, A., Moritz, R. L. and Simpson, R. J. (1994) High affinity interleukin-6 receptor is a hexameric complex consisting of two molecules each of interleukin-6, interleukin-6 receptor, and gp-130. *J Biol Chem* **269**, 23286-23289
 - 17 Hirano, T., Yasukawa, K., Harada, H., Taga, T., Watanabe, Y., Matsuda, T., Kashiwamura, S., Nakajima, K., Koyama, K., Iwamatsu, A. and et al. (1986) Complementary DNA for a novel human interleukin (BSF-2) that induces B lymphocytes to produce immunoglobulin. *Nature* **324**, 73-76
 - 18 Somers, W., Stahl, M. and Seehra, J. S. (1997) 1.9 Å crystal structure of interleukin 6: implications for a novel mode of receptor dimerization and signaling. *Embo J* **16**, 989-997
 - 19 Xu, G. Y., Yu, H. A., Hong, J., Stahl, M., McDonagh, T., Kay, L. E. and Cumming, D. A. (1997) Solution structure of recombinant human interleukin-6. *J Mol Biol* **268**, 468-481
 - 20 Paonessa, G., Graziani, R., De Serio, A., Savino, R., Ciapponi, L., Lahm, A., Salvati, A. L., Toniatti, C. and Ciliberto, G. (1995) Two distinct and independent sites on IL-6 trigger gp 130 dimer formation and signalling. *Embo J* **14**, 1942-1951
 - 21 Rock, F. L., Li, X., Chong, P., Ida, N. and Klein, M. (1994) Roles of disulfide bonds in recombinant human interleukin 6 conformation. *Biochemistry* **33**, 5146-5154
 - 22 Hirano, T., Taga, T., Nakano, N., Yasukawa, K., Kashiwamura, S., Shimizu, K., Nakajima, K., Pyun, K. H. and Kishimoto, T. (1985) Purification to homogeneity and characterization of human B-cell differentiation factor (BCDF or BSFp-2). *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**, 5490-5494
 - 23 Jego, G., Bataille, R. and Pellat-Deceunynck, C. (2001) Interleukin-6 is a growth factor for nonmalignant human plasmablasts. *Blood* **97**, 1817-1822
 - 24 Andus, T., Geiger, T., Hirano, T., Kishimoto, T., Tran-Thi, T. A., Decker, K. and Heinrich, P. C. (1988) Regulation of synthesis and secretion of major rat acute-phase proteins by recombinant human interleukin-6 (BSF-2/IL-6) in hepatocyte primary cultures. *Eur J Biochem* **173**, 287-293
 - 25 Andus, T., Geiger, T., Hirano, T., Northoff, H., Ganter, U., Bauer, J., Kishimoto, T. and Heinrich, P. C. (1987) Recombinant human B cell stimulatory factor 2 (BSF-2/IFN-beta 2) regulates beta-fibrinogen and albumin mRNA levels in Fao-9 cells. *FEBS Lett* **221**, 18-22
 - 26 Castell, J. V., Gomez-Lechon, M. J., David, M., Hirano, T., Kishimoto, T. and Heinrich, P. C. (1988) Recombinant human interleukin-6 (IL-6/BSF-2/HSF) regulates the synthesis of acute phase proteins in human hepatocytes. *FEBS Lett* **232**, 347-350
 - 27 Gauldie, J., Richards, C., Harnish, D., Lansdorp, P. and Baumann, H. (1987) Interferon beta 2/B-cell stimulatory factor type 2 shares identity with monocyte-

- derived hepatocyte-stimulating factor and regulates the major acute phase protein response in liver cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**, 7251-7255
- 28 Heinrich, P. C., Castell, J. V. and Andus, T. (1990) Interleukin-6 and the acute phase response. *Biochem J* **265**, 621-636
- 29 Tilg, H., Dinarello, C. A. and Mier, J. W. (1997) IL-6 and APPs: anti-inflammatory and immunosuppressive mediators. *Immunol Today* **18**, 428-432
- 30 Akira, S., Taga, T. and Kishimoto, T. (1993) Interleukin-6 in biology and medicine. *Adv Immunol* **54**, 1-78
- 31 Kishimoto, T., Akira, S., Narazaki, M. and Taga, T. (1995) Interleukin-6 family of cytokines and gp130. *Blood* **86**, 1243-1254
- 32 Palestro, G., Turrini, F., Pagano, M. and Chiusa, L. (1999) Castleman's disease. *Adv Clin Path* **3**, 11-22
- 33 Hallek, M., Bergsagel, P. L. and Anderson, K. C. (1998) Multiple myeloma: increasing evidence for a multistep transformation process. *Blood* **91**, 3-21
- 34 Bataille, R., Barlogie, B., Lu, Z. Y., Rossi, J. F., Lavabre-Bertrand, T., Beck, T., Wijdenes, J., Brochier, J. and Klein, B. (1995) Biologic effects of anti-interleukin-6 murine monoclonal antibody in advanced multiple myeloma. *Blood* **86**, 685-691
- 35 Sporeno, E., Savino, R., Ciapponi, L., Paonessa, G., Cabibbo, A., Lahm, A., Pulkki, K., Sun, R. X., Toniatti, C., Klein, B. and Ciliberto, G. (1996) Human interleukin-6 receptor super-antagonists with high potency and wide spectrum on multiple myeloma cells. *Blood* **87**, 4510-4519
- 36 Villunger, A., Egle, A., Kos, M., Hittmair, A., Maly, K. and Greil, R. (1996) Constituents of autocrine IL-6 loops in myeloma cell lines and their targeting for suppression of neoplastic growth by antibody strategies. *Int J Cancer* **65**, 498-505
- 37 Chauhan, D., Kharbanda, S., Ogata, A., Urashima, M., Teoh, G., Robertson, M., Kufe, D. W. and Anderson, K. C. (1997) Interleukin-6 inhibits Fas-induced apoptosis and stress-activated protein kinase activation in multiple myeloma cells. *Blood* **89**, 227-234
- 38 Frassanito, M. A., Cusmai, A., Iodice, G. and Dammacco, F. (2001) Autocrine interleukin-6 production and highly malignant multiple myeloma: relation with resistance to drug-induced apoptosis. *Blood* **97**, 483-489
- 39 Lichtenstein, A., Tu, Y., Fady, C., Vescio, R. and Berenson, J. (1995) Interleukin-6 inhibits apoptosis of malignant plasma cells. *Cell Immunol* **162**, 248-255
- 40 Puthier, D., Bataille, R., Barille, S., Mellerin, M. P., Harousseau, J. L., Ponzio, A., Robillard, N., Wijdenes, J. and Amiot, M. (1996) Myeloma cell growth arrest, apoptosis, and interleukin-6 receptor modulation induced by EB1089, a vitamin D3 derivative, alone or in association with dexamethasone. *Blood* **88**, 4659-4666
- 41 Xu, F. H., Sharma, S., Gardner, A., Tu, Y., Raitano, A., Sawyers, C. and Lichtenstein, A. (1998) Interleukin-6-induced inhibition of multiple myeloma cell apoptosis: support for the hypothesis that protection is mediated via inhibition of the JNK/SAPK pathway. *Blood* **92**, 241-251
- 42 Pelliniemi, T. T., Irjala, K., Mattila, K., Pulkki, K., Rajamaki, A., Tienhaara, A., Laakso, M. and Lahtinen, R. (1995) Immunoreactive interleukin-6 and acute phase proteins as prognostic factors in multiple myeloma. Finnish Leukemia Group. *Blood* **85**, 765-771

- 43 Reibnegger, G., Krainer, M., Herold, M., Ludwig, H., Wachter, H. and Huber, H. (1991) Predictive value of interleukin-6 and neopterin in patients with multiple myeloma. *Cancer Res* **51**, 6250-6253
- 44 Pulkki, K., Pelliniemi, T. T., Rajamaki, A., Tienhaara, A., Laakso, M. and Lahtinen, R. (1996) Soluble interleukin-6 receptor as a prognostic factor in multiple myeloma. Finnish Leukaemia Group. *Br J Haematol* **92**, 370-374
- 45 Catlett-Falcone, R., Landowski, T. H., Oshiro, M. M., Turkson, J., Levitzki, A., Savino, R., Ciliberto, G., Moscinski, L., Fernandez-Luna, J. L., Nunez, G., Dalton, W. S. and Jove, R. (1999) Constitutive activation of Stat3 signaling confers resistance to apoptosis in human U266 myeloma cells. *Immunity* **10**, 105-115
- 46 Kawamura, C., Kizaki, M., Yamato, K., Uchida, H., Fukuchi, Y., Hattori, Y., Koseki, T., Nishihara, T. and Ikeda, Y. (2000) Bone morphogenetic protein-2 induces apoptosis in human myeloma cells with modulation of STAT3. *Blood* **96**, 2005-2011
- 47 Ogata, A., Chauhan, D., Teoh, G., Treon, S. P., Urashima, M., Schlossman, R. L. and Anderson, K. C. (1997) IL-6 triggers cell growth via the Ras-dependent mitogen-activated protein kinase cascade. *J Immunol* **159**, 2212-2221
- 48 Ogata, A., Chauhan, D., Urashima, M., Teoh, G., Treon, S. P. and Anderson, K. C. (1997) Blockade of mitogen-activated protein kinase cascade signaling in interleukin 6-independent multiple myeloma cells. *Clin Cancer Res* **3**, 1017-1022
- 49 Hsu, J. H., Shi, Y., Frost, P., Yan, H., Hoang, B., Sharma, S., Gera, J. and Lichtenstein, A. (2004) Interleukin-6 activates phosphoinositol-3' kinase in multiple myeloma tumor cells by signaling through RAS-dependent and, separately, through p85-dependent pathways. *Oncogene* **23**, 3368-3375
- 50 Brocke-Heidrich, K., Kretzschmar, A. K., Pfeifer, G., Henze, C., Loffler, D., Koczan, D., Thiesen, H. J., Burger, R., Gramatzki, M. and Horn, F. (2004) Interleukin-6-dependent gene expression profiles in multiple myeloma INA-6 cells reveal a Bcl-2 family-independent survival pathway closely associated with Stat3 activation. *Blood* **103**, 242-251
- 51 Gunn, W. G., Conley, A., Deininger, L., Olson, S. D., Prockop, D. J. and Gregory, C. A. (2006) A crosstalk between myeloma cells and marrow stromal cells stimulates production of DKK1 and interleukin-6: a potential role in the development of lytic bone disease and tumor progression in multiple myeloma. *Stem Cells* **24**, 986-991
- 52 Tassone, P., Neri, P., Burger, R., Savino, R., Shamma, M., Catley, L., Podar, K., Chauhan, D., Masciari, S., Gozzini, A., Tagliaferri, P., Venuta, S., Munshi, N. C. and Anderson, K. C. (2005) Combination therapy with interleukin-6 receptor superantagonist Sant7 and dexamethasone induces antitumor effects in a novel SCID-hu In vivo model of human multiple myeloma. *Clin Cancer Res* **11**, 4251-4258
- 53 Li, J., Luo, S., Hong, W., Zhou, Z. and Zou, W. (2002) [Influence of thalidomide on interleukin-6 and its transmission in multiple myeloma patients]. *Zhonghua Zhong Liu Za Zhi* **24**, 254-256
- 54 Li, J., Luo, S. K., Hong, W. D. and Huang, J. Q. (2002) [In vitro inhibition and mechanism of multiple myeloma cells growth by thalidomide]. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi* **10**, 70-72
- 55 Donaldson, D. H., Britt, D. E., Jones, C., Jackson, C. L. and Patterson, D. (1993) Localization of the gene for the ciliary neurotrophic factor receptor (CNTFR) to human chromosome 9. *Genomics* **17**, 782-784

- 56 Davis, S., Aldrich, T. H., Valenzuela, D. M., Wong, V. V., Furth, M. E., Squinto, S. P. and Yancopoulos, G. D. (1991) The receptor for ciliary neurotrophic factor. *Science* **253**, 59-63
- 57 Leahy, D. J., Hendrickson, W. A., Aukhil, I. and Erickson, H. P. (1992) Structure of a fibronectin type III domain from tenascin phased by MAD analysis of the selenomethionyl protein. *Science* **258**, 987-991
- 58 Honda, M., Yamamoto, S., Cheng, M., Yasukawa, K., Suzuki, H., Saito, T., Osugi, Y., Tokunaga, T. and Kishimoto, T. (1992) Human soluble IL-6 receptor: its detection and enhanced release by HIV infection. *J Immunol* **148**, 2175-2180
- 59 Horiuchi, S., Koyanagi, Y., Zhou, Y., Miyamoto, H., Tanaka, Y., Waki, M., Matsumoto, A., Yamamoto, M. and Yamamoto, N. (1994) Soluble interleukin-6 receptors released from T cell or granulocyte/macrophage cell lines and human peripheral blood mononuclear cells are generated through an alternative splicing mechanism. *Eur J Immunol* **24**, 1945-1948
- 60 Muller-Newen, G., Kohne, C., Keul, R., Hemmann, U., Muller-Esterl, W., Wijdenes, J., Brakenhoff, J. P., Hart, M. H. and Heinrich, P. C. (1996) Purification and characterization of the soluble interleukin-6 receptor from human plasma and identification of an isoform generated through alternative splicing. *Eur J Biochem* **236**, 837-842
- 61 Rose-John, S. and Heinrich, P. C. (1994) Soluble receptors for cytokines and growth factors: generation and biological function. *Biochem J* **300** (Pt 2), 281-290
- 62 Yamasaki, K., Taga, T., Hirata, Y., Yawata, H., Kawanishi, Y., Seed, B., Taniguchi, T., Hirano, T. and Kishimoto, T. (1988) Cloning and expression of the human interleukin-6 (BSF-2/IFN beta 2) receptor. *Science* **241**, 825-828
- 63 Mackiewicz, A., Schooltink, H., Heinrich, P. C. and Rose-John, S. (1992) Complex of soluble human IL-6-receptor/IL-6 up-regulates expression of acute-phase proteins. *J Immunol* **149**, 2021-2027
- 64 Kalai, M., Montero-Julian, F. A., Grotzinger, J., Wollmer, A., Morelle, D., Brochier, J., Rose-John, S., Heinrich, P. C., Brailly, H. and Content, J. (1996) Participation of two Ser-Ser-Phe-Tyr repeats in interleukin-6 (IL-6)-binding sites of the human IL-6 receptor. *Eur J Biochem* **238**, 714-723
- 65 Yawata, H., Yasukawa, K., Natsuka, S., Murakami, M., Yamasaki, K., Hibi, M., Taga, T. and Kishimoto, T. (1993) Structure-function analysis of human IL-6 receptor: dissociation of amino acid residues required for IL-6-binding and for IL-6 signal transduction through gp130. *Embo J* **12**, 1705-1712
- 66 Martens, A. S., Bode, J. G., Heinrich, P. C. and Graeve, L. (2000) The cytoplasmic domain of the interleukin-6 receptor gp80 mediates its basolateral sorting in polarized madin-darby canine kidney cells. *J Cell Sci* **113** (Pt 20), 3593-3602
- 67 Hibi, M., Murakami, M., Saito, M., Hirano, T., Taga, T. and Kishimoto, T. (1990) Molecular cloning and expression of an IL-6 signal transducer, gp130. *Cell* **63**, 1149-1157
- 68 Cole, A. R., Hall, N. E., Treutlein, H. R., Eddes, J. S., Reid, G. E., Moritz, R. L. and Simpson, R. J. (1999) Disulfide bond structure and N-glycosylation sites of the extracellular domain of the human interleukin-6 receptor. *J Biol Chem* **274**, 7207-7215
- 69 Murakami, M., Narazaki, M., Hibi, M., Yawata, H., Yasukawa, K., Hamaguchi, M., Taga, T. and Kishimoto, T. (1991) Critical cytoplasmic region of the interleukin 6

- signal transducer gp130 is conserved in the cytokine receptor family. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 11349-11353
- 70 Fuhrer, D. K., Feng, G. S. and Yang, Y. C. (1995) Syp associates with gp130 and Janus kinase 2 in response to interleukin-11 in 3T3-L1 mouse preadipocytes. *J Biol Chem* **270**, 24826-24830
- 71 Stahl, N., Farruggella, T. J., Boulton, T. G., Zhong, Z., Darnell, J. E., Jr. and Yancopoulos, G. D. (1995) Choice of STATs and other substrates specified by modular tyrosine-based motifs in cytokine receptors. *Science* **267**, 1349-1353
- 72 Schmitz, J., Weissenbach, M., Haan, S., Heinrich, P. C. and Schaper, F. (2000) SOCS3 exerts its inhibitory function on interleukin-6 signal transduction through the SHP2 recruitment site of gp130. *J Biol Chem* **275**, 12848-12856
- 73 Dittrich, E., Haft, C. R., Muys, L., Heinrich, P. C. and Graeve, L. (1996) A di-leucine motif and an upstream serine in the interleukin-6 (IL-6) signal transducer gp130 mediate ligand-induced endocytosis and down-regulation of the IL-6 receptor. *J Biol Chem* **271**, 5487-5494
- 74 Yoshida, K., Taga, T., Saito, M., Suematsu, S., Kumanogoh, A., Tanaka, T., Fujiwara, H., Hirata, M., Yamagami, T., Nakahata, T., Hirabayashi, T., Yoneda, Y., Tanaka, K., Wang, W. Z., Mori, C., Shiota, K., Yoshida, N. and Kishimoto, T. (1996) Targeted disruption of gp130, a common signal transducer for the interleukin 6 family of cytokines, leads to myocardial and hematological disorders. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**, 407-411
- 75 Pflanz, S., Kurth, I., Grotzinger, J., Heinrich, P. C. and Muller-Newen, G. (2000) Two different epitopes of the signal transducer gp130 sequentially cooperate on IL-6-induced receptor activation. *J Immunol* **165**, 7042-7049
- 76 Herrmann, A., Sommer, U., Pranada, A. L., Giese, B., Kuster, A., Haan, S., Becker, W., Heinrich, P. C. and Muller-Newen, G. (2004) STAT3 is enriched in nuclear bodies. *J Cell Sci* **117**, 339-349
- 77 Kolch, W. (2000) Meaningful relationships: the regulation of the Ras/Raf/MEK/ERK pathway by protein interactions. *Biochem J* **351 Pt 2**, 289-305
- 78 Jain, N., Zhang, T., Kee, W. H., Li, W. and Cao, X. (1999) Protein kinase C delta associates with and phosphorylates Stat3 in an interleukin-6-dependent manner. *J Biol Chem* **274**, 24392-24400
- 79 Lee, Y. H., Bae, S. S., Seo, J. K., Choi, I., Ryu, S. H. and Suh, P. G. (2000) Interleukin-6-induced tyrosine phosphorylation of phospholipase C-gamma1 in PC12 cells. *Mol Cells* **10**, 469-474
- 80 Hong, F., Nguyen, V. A., Shen, X., Kunos, G. and Gao, B. (2000) Rapid activation of protein kinase B/Akt has a key role in antiapoptotic signaling during liver regeneration. *Biochem Biophys Res Commun* **279**, 974-979
- 81 Tu, Y., Gardner, A. and Lichtenstein, A. (2000) The phosphatidylinositol 3-kinase/AKT kinase pathway in multiple myeloma plasma cells: roles in cytokine-dependent survival and proliferative responses. *Cancer Res* **60**, 6763-6770
- 82 Endo, T. A., Masuhara, M., Yokouchi, M., Suzuki, R., Sakamoto, H., Mitsui, K., Matsumoto, A., Tanimura, S., Ohtsubo, M., Misawa, H., Miyazaki, T., Leonor, N., Taniguchi, T., Fujita, T., Kanakura, Y., Komiyama, S. and Yoshimura, A. (1997) A new protein containing an SH2 domain that inhibits JAK kinases. *Nature* **387**, 921-924

- 83 Naka, T., Narazaki, M., Hirata, M., Matsumoto, T., Minamoto, S., Aono, A., Nishimoto, N., Kajita, T., Taga, T., Yoshizaki, K., Akira, S. and Kishimoto, T. (1997) Structure and function of a new STAT-induced STAT inhibitor. *Nature* **387**, 924-929
- 84 Starr, R., Willson, T. A., Viney, E. M., Murray, L. J., Rayner, J. R., Jenkins, B. J., Gonda, T. J., Alexander, W. S., Metcalf, D., Nicola, N. A. and Hilton, D. J. (1997) A family of cytokine-inducible inhibitors of signalling. *Nature* **387**, 917-921
- 85 Liu, B., Liao, J., Rao, X., Kushner, S. A., Chung, C. D., Chang, D. D. and Shuai, K. (1998) Inhibition of Stat1-mediated gene activation by PIAS1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 10626-10631
- 86 www.biologie.uni-konstanz.de/wendel/versuch3.pdf
- 87 Cuatrecasas, P. (1971) Affinity chromatography. *Annu Rev Biochem* **40**, 259-278
- 88 Cuatrecasas, P. (1972) Affinity chromatography of macromolecules. *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol* **36**, 29-89
- 89 Shimomura, O., Johnson, F. H. and Saig, Y. (1992) *J.Cell.Comp.Physiol.* **59**, 223
- 90 Ormo, M., Cubitt, A. B., Kallio, K., Gross, L. A., Tsien, R. Y. and Remington, S. J. (1996) Crystal structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein. *Science* **273**, 1392-1395
- 91 Prasher, D. C., Eckenrode, V. K., Ward, W. W., Prendergast, F. G. and Cormier, M. J. (1992) Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene* **111**, 229-233
- 92 Tsien, R. Y. (1998) The green fluorescent protein. *Annu Rev Biochem* **67**, 509-544
- 93 www_bioc.rice.edu/Bioch/Phillips/Papers/gfpbio.html
- 94 Karpova, T. S., Baumann, C. T., He, L., Wu, X., Grammer, A., Lipsky, P., Hager, G. L. and McNally, J. G. (2003) Fluorescence resonance energy transfer from cyan to yellow fluorescent protein detected by acceptor photobleaching using confocal microscopy and a single laser. *J Microsc* **209**, 56-70
- 95 Miyawaki, A. and Tsien, R. Y. (2000) Monitoring protein conformations and interactions by fluorescence resonance energy transfer between mutants of green fluorescent protein. *Methods Enzymol* **327**, 472-500
- 96 Hu, C. D., Chinenov, Y. and Kerppola, T. K. (2002) Visualization of interactions among bZIP and Rel family proteins in living cells using bimolecular fluorescence complementation. *Mol Cell* **9**, 789-798
- 97 Arcone, R., Pucci, P., Zappacosta, F., Fontaine, V., Malorni, A., Marino, G. and Ciliberto, G. (1991) Single-step purification and structural characterization of human interleukin-6 produced in *Escherichia coli* from a T7 RNA polymerase expression vector. *Eur J Biochem* **198**, 541-547
- 98 Weiergraber, O., Hemmann, U., Kuster, A., Muller-Newen, G., Schneider, J., Rose-John, S., Kurschat, P., Brakenhoff, J. P., Hart, M. H., Stabel, S. and et al. (1995) Soluble human interleukin-6 receptor. Expression in insect cells, purification and characterization. *Eur J Biochem* **234**, 661-669
- 99 Dahmen, H. (1997) Definition der Kontaktstellen der gp130-Extrazellulärregion im Interleukin-11-Rezeptorkomplex. Diplomarbeit, Institut für Biochemie Aachen
- 100 Wijdenes, J., Heinrich, P. C., Muller-Newen, G., Roche, C., Gu, Z. J., Clement, C. and Klein, B. (1995) Interleukin-6 signal transducer gp130 has specific binding sites for

- different cytokines as determined by antagonistic and agonistic anti-gp130 monoclonal antibodies. *Eur J Immunol* **25**, 3474-3481
- 101 Muller-Newen, G., Kuster, A., Wijdenes, J., Schaper, F. and Heinrich, P. C. (2000) Studies on the interleukin-6-type cytokine signal transducer gp130 reveal a novel mechanism of receptor activation by monoclonal antibodies. *J Biol Chem* **275**, 4579-4586
- 102 Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular cloning*. Cold Spring Harbour Laboratory Press, Cold Spring Harbour, NY
- 103 Kyhse-Andersen, J. (1984) Electrophoretic transfer of multiple gels: a simple apparatus without buffer tank for rapid transfer of proteins from polyacrylamide to nitrocellulose. *J Biochem Biophys Methods* **10**, 203-209
- 104 Andrews, N. C. and Faller, D. V. (1991) A rapid micropreparation technique for extraction of DNA-binding proteins from limiting numbers of mammalian cells. *Nucleic Acids Res* **19**, 2499
- 105 Wagner, B. J., Hayes, T. E., Hoban, C. J. and Cochran, B. H. (1990) The SIF binding element confers sis/PDGF inducibility onto the c-fos promoter. *Embo J* **9**, 4477-4484
- 106 Axelrod, D., Koppel, D. E., Schlessinger, J., Elson, E. and Webb, W. W. (1976) Mobility measurement by analysis of fluorescence photobleaching recovery kinetics. *Biophys J* **16**, 1055-1069
- 107 Giese, B., Au-Yeung, C. K., Herrmann, A., Diefenbach, S., Haan, C., Kuster, A., Wortmann, S. B., Roderburg, C., Heinrich, P. C., Behrmann, I. and Muller-Newen, G. (2003) Long term association of the cytokine receptor gp130 and the Janus kinase Jak1 revealed by FRAP analysis. *J Biol Chem* **278**, 39205-39213
- 108 Dittrich, E., Rose-John, S., Gerhartz, C., Mullberg, J., Stoyan, T., Yasukawa, K., Heinrich, P. C. and Graeve, L. (1994) 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* **269**, 19014-19020
- 109 Thiel, S., Sommer, U., Kortylewski, M., Haan, C., Behrmann, I., Heinrich, P. C. and Graeve, L. (2000) Termination of IL-6-induced STAT activation is independent of receptor internalization but requires de novo protein synthesis. *FEBS Lett* **470**, 15-19
- 110 Timmermann, A., Pflanz, S., Grotzinger, J., Kuster, A., Kurth, I., Pitard, V., Heinrich, P. C. and Muller-Newen, G. (2000) Different epitopes are required for gp130 activation by interleukin-6, oncostatin M and leukemia inhibitory factor. *FEBS Lett* **468**, 120-124
- 111 Tenhumberg, S., Schuster, B., Zhu, L., Kovaleva, M., Scheller, J., Kallen, K. J. and Rose-John, S. (2006) gp130 dimerization in the absence of ligand: preformed cytokine receptor complexes. *Biochem Biophys Res Commun* **346**, 649-657
- 112 Remy, I., Wilson, I. A. and Michnick, S. W. (1999) Erythropoietin receptor activation by a ligand-induced conformation change. *Science* **283**, 990-993
- 113 Schuster, B., Meinert, W., Rose-John, S. and Kallen, K. J. (2003) The human interleukin-6 (IL-6) receptor exists as a preformed dimer in the plasma membrane. *FEBS Lett* **538**, 113-116
- 114 Nishimura, C., Watanabe, A., Gouda, H., Shimada, I. and Arata, Y. (1996) Folding topologies of human interleukin-6 and its mutants as studied by NMR spectroscopy. *Biochemistry* **35**, 273-281

- 115 Rucker, E., Schneider, G., Steinhauser, K., Lower, R., Hauber, J. and Stauber, R. H. (2001) Rapid evaluation and optimization of recombinant protein production using GFP tagging. *Protein Expr Purif* **21**, 220-223
- 116 Metz, S., Wiesinger, M., Vogt, M., Lauks, H., Schmalzing, G., Heinrich, P. C. and Muller-Newen, G. (2007) Characterization of the Interleukin (IL)-6 Inhibitor IL-6-RFP: Fused Receptor Domains Act As High Affinity Cytokine-Binding Proteins. *J Biol Chem* **282**, 1238-1248
- 117 Ancey, C., Kuster, A., Haan, S., Herrmann, A., Heinrich, P. C. and Muller-Newen, G. (2003) A fusion protein of the gp130 and interleukin-6Ralpha ligand-binding domains acts as a potent interleukin-6 inhibitor. *J Biol Chem* **278**, 16968-16972
- 118 Horsten, U., Muller-Newen, G., Gerhartz, C., Wollmer, A., Wijdenes, J., Heinrich, P. C. and Grotzinger, J. (1997) Molecular modeling-guided mutagenesis of the extracellular part of gp130 leads to the identification of contact sites in the interleukin-6 (IL-6).IL-6 receptor.gp130 complex. *J Biol Chem* **272**, 23748-23757
- 119 Kurth, I., Horsten, U., Pflanz, S., Dahmen, H., Kuster, A., Grotzinger, J., Heinrich, P. C. and Muller-Newen, G. (1999) Activation of the signal transducer glycoprotein 130 by both IL-6 and IL-11 requires two distinct binding epitopes. *J Immunol* **162**, 1480-1487
- 120 Giese, B., Roderburg, C., Sommerauer, M., Wortmann, S. B., Metz, S., Heinrich, P. C. and Muller-Newen, G. (2005) Dimerization of the cytokine receptors gp130 and LIFR analysed in single cells. *J Cell Sci* **118**, 5129-5140
- 121 Timmermann, A., Kuster, A., Kurth, I., Heinrich, P. C. and Muller-Newen, G. (2002) A functional role of the membrane-proximal extracellular domains of the signal transducer gp130 in heterodimerization with the leukemia inhibitory factor receptor. *Eur J Biochem* **269**, 2716-2726
- 122 Berland, K. M. (2004) Fluorescence correlation spectroscopy: a new tool for quantification of molecular interactions. *Methods Mol Biol* **261**, 383-398

8. 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 optimale Betreuung dieser Arbeit und viele hilfreiche Diskussionen und Ratschläge. Sein besonderes Interesse für die Fluoreszenzmikroskopie hat diese Arbeit erst möglich gemacht.

Besonderer Dank gilt ebenfalls Herrn Dr. Bernd Giese und Frau Dr. Cécile Ancey. Die immer hilfreiche Kooperation mit ihnen hat viele Ergebnisse dieser Arbeit erst möglich gemacht. Die gute Atmosphäre, die diese Zusammenarbeit prägte, trug wesentlich zum Erfolg der Arbeit bei.

Bei Andrea Küster möchte ich mich für stetige Hilfe, insbesondere bei der Durchführung der Experimente, bedanken. Durch ihre sehr herzliche Art hat sie die Arbeit im Labor wesentlich erleichtert.

Ebenfalls danke ich meinen Kolleginnen und Kollegen aus dem Labor 10: Heike Dahmen, Andreas Timmermann, Ingrid Tacken, Andreas Herrmann, Silke Metz, Claudia Niemand, Saskia Wortmann und insbesondere Albert Pranada für die kollegiale und konstruktive Arbeitsatmosphäre.

Angelika Ahles, Hubert Szameit, Marcel Robbertz, Birgit Scherag und insbesondere Christa Gerlach danke ich für die Unterstützung im Laboralltag.

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

Meiner Familie und meinen Freunden möchte ich herzlich für die mir gewährte Unterstützung danken.

Besonderer Dank gilt meinen Großeltern Gerta und Karl Friedrichs, die mich fast über den ganzen Weg der Arbeit begleitet haben. Gerne hätte ich ihnen dieses Buch gezeigt.

9. Lebenslauf

Christoph Roderburg

28.10.1980	Geboren in Eupen/ Belgien
1986-1992	Grundschule in Eupen/ Belgien
1992-1998	Pater-Damian-Sekundarschule in Eupen/ Belgien
1998	Abitur
1998-2005	Studium der Humanmedizin an der medizinischen Fakultät der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen (RWTH Aachen)
09/ 2000	Ärztliche Vorprüfung, Aachen
09/ 2001	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Aachen
10/ 2001- 03/ 2003	Anfertigung der Dissertation mit dem Thema: „Analyse der Dimerisierung des Zytokin-Rezeptors gp130 mit Hilfe von YFP-IL-6, einem funktionellen Fusionsprotein von IL-6 und YFP“ am Institut für Biochemie der Medizinischen Fakultät der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen, Arbeitsgruppe Prof. Dr. P. C. Heinrich.
12/ 2003	Step 1 des <i>United States Medical Licensing Examination</i> (USMLE), Frankfurt
09/ 2004	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Aachen
10/ 2004-	Praktisches Jahr
10/ 2005	Innere Medizin: Maria Hilf Kliniken, Mönchengladbach Chirurgie: Maria Hilf Kliniken, Mönchengladbach Neurologie (Wahlfach): Maria Hilf Kliniken, Mönchengladbach
05/ 2005	Step 2CK des USMLE, Frankfurt
11/ 2005	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Mönchengladbach
11/ 2005	Approbation als Arzt
02/ 2006	Step 2CS des USMLE, Houston/ USA
03/ 2006-	Wissenschaftlicher Mitarbeiter an der Medizinischen Klinik V (Hämatologie, Onkologie, Rheumatologie) der Universitätsklinik Heidelberg (Direktor: Prof. Dr. Ho)
09/06	Verleihung des <i>ECFMG</i> -Zertifikats