

***Die Regulation der Expression
des humanen Oncostatin M Rezeptors
durch Januskinasen***

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

vorgelegt von
Diplom-Biologin
Simone Radtke
Aus Minden, Westfalen

Berichter: Universitätsprofessor Peter C. Heinrich
Privatdozent Dr. Jörg Mey

Tag der mündlichen Prüfung: 4. Februar 2003

Diese Dissertation ist auf den Internetseiten der Hochschulbibliothek online verfügbar

Veröffentlichungen:

Wesentliche Teile der vorliegenden Arbeit wurden veröffentlicht:

S. Radtke, H.M. Hermanns, C. Haan, H. Schmitz-Van De Leur, H. Gascan, P.C. Heinrich and I. Behrmann, I. (2002) „Novel role of Janus kinase 1 in the regulation of oncostatin M receptor surface expression.“ *J Biol Chem*, **277**, 11297-305.

Weitere Veröffentlichungen:

H.M. Hermanns*, S. Radtke*, C. Haan, H. Schmitz-Van de Leur, J. Tavernier, P.C. Heinrich and I. Behrmann, I. (1999) „Contributions of leukemia inhibitory factor receptor and oncostatin M receptor to signal transduction in heterodimeric complexes with glycoprotein 130.“ *J Immunol*, **163**, 6651-8.

H.M. Hermanns, S. Radtke, F. Schaper, P.C. Heinrich and I. Behrmann. (2000) „Non-redundant signal transduction of interleukin-6-type cytokines. The adapter protein Shc is specifically recruited to the oncostatin M receptor.“ *J Biol Chem*, **275**, 40742-8.

D. Anhuf, M. Weissenbach, J. Schmitz, R. Sobota, H.M. Hermanns, S. Radtke, S. Linnemann, I. Behrmann, P.C. Heinrich and F. Schaper, F. (2000) „Signal transduction of IL-6, leukemia-inhibitory factor, and oncostatin M: structural receptor requirements for signal attenuation.“ *J Immunol*, **165**, 2535-43.

L. Terstegen, B.G. Maassen, S. Radtke, I. Behrmann, F. Schaper, P.C. Heinrich, L. Graeve and P. Gatsios. (2000) „Differential inhibition of IL-6-type cytokine-induced STAT activation by PMA.“ *FEBS Lett*, **478**, 100-4.

* gleichberechtigte Erstautoren

Inhaltsverzeichnis

<i>Inhaltsverzeichnis.....</i>	<i>i</i>
<i>Verzeichnis der Abkürzungen.....</i>	<i>iv</i>
1 Einleitung	1
1.1 Die Familie der IL-6-Typ-Zytokine und ihre Rezeptoren	1
1.2 Die Familie der Januskinasen.....	4
1.3 Der Jak/STAT-Signaltransduktionsweg	5
1.3.1 Die Regulation des Jak/STAT-Signaltransduktionsweges.....	6
1.3.2 Die Aktivierung von MAP-Kinasen.....	7
1.4 Oncostatin M.....	7
1.5 Der Oncostatin M-Rezeptorkomplex.....	9
1.6 Regulation der Oberflächenexpression von Zytokinrezeptoren	10
1.7 Die Expression funktionaler Rezeptor/Jak-Komplexe.....	13
1.8 Aufgabenstellung	14
2 Material und Methoden.....	15
2.1 Verwendete Materialien.....	15
2.1.1 Chemikalien	15
2.1.2 Puffer und Medien.....	15
2.1.3 Verbrauchsmaterialien.....	15
2.1.4 Enzyme.....	15
2.1.5 Bakterienstamm.....	15
2.1.6 Eukaryontische Zelllinien	16
2.1.7 Lösungen für die Zellkultur.....	16
2.1.8 Zytokine.....	16
2.1.9 Antikörper	16
2.1.10 Vektoren und rekombinante Plasmide	17
2.2 Molekularbiologische Methoden.....	19
2.2.1 Anzucht und Lagerung von Bakterienkulturen	19
2.2.2 Isolierung von Plasmid-DNA im großen Maßstab.....	19
2.2.3 Quantitative Bestimmung von Nukleinsäuren	19
2.2.4 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonucleasen.....	19
2.2.5 Dephosphorylierung linearisierter DNA	19
2.2.6 Auftrennung von Nukleinsäuren durch Agarose-Gelelektrophorese	20
2.2.7 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	20
2.2.8 Ligation von DNA.....	20
2.2.9 Transformation kompetenter E. coli.....	20
2.2.10 Isolierung von Plasmid-DNA im kleinen Maßstab	21
2.2.11 Automatische DNA-Sequenzierung.....	21
2.2.12 Herstellung von pSVL-Expressionsplasmiden für Jak2 und Jak3	21
2.2.13 Herstellung von pSVL bzw. pCAGGS-Expressionsplasmiden für den humanen bzw. murinen OSMR	21
2.2.14 Herstellung von chimären Rezeptorkonstrukten.....	22

2.3 Kultivierung und Transfektion von Zellen	24
2.3.1 Kultivierung eukaryontischer Zellen.....	24
2.3.2 Transfektion von COS-7-Zellen.....	24
2.3.3 Transfektion von HeLa-, 3T3- und U4A/U4C-Zellen.....	25
2.4 Proteinchemische Methoden.....	25
2.4.1 Nachweis der Oberflächenexpression von Transmembranproteinen mittels Durchflusszytometrie	25
2.4.2 Nachweis der zellulären Lokalisation von Proteinen über Immunfluoreszenz	26
2.4.3 Nachweis von Proteinen im Zellysate.....	26
2.4.4 Nachweis der Assoziation von Janus-Kinasen an die IL-5R β -Chimären mittels Koimmunpräzipitationen.....	28
2.4.5 Nachweis des Glykosylierungsstatus von Rezeptorchimären mittels Endoglykosidase H-Verdau	28
3 Ergebnisse	29
3.1 Die Regulation der OSMR-Oberflächenexpression durch Januskinasen	29
3.1.1 Die Koexpression von Jak1 erhöht die Oberflächenexpression des humanen Oncostatin M-Rezeptors.....	29
3.1.2 Chimäre Rezeptoren verhalten sich bezüglich der Hochregulation durch Jak1 wie die jeweiligen Wildtyp-Rezeptoren.....	31
3.1.3 Die Koexpression von Jak1 führt zu einem Anstieg von Endo H-resistenten, vollständig prozessierten Rezeptoren	33
3.1.4 Die Rezeptorbindung von Jak1 ist für die Jak1-vermittelte Erhöhung der OSMR-Oberflächenexpression unbedingt erforderlich	34
3.1.5 Die Kinaseaktivität von Jak1 ist für die verstärkte Plasmamembran-Lokalisation des OSMR unerheblich	36
3.1.6 Die membranproximale Region des OSMR verhindert dessen effiziente Oberflächenexpression	37
3.1.7 Das negativ-regulatorische Signal des OSMR ist auf andere Rezeptoren übertragbar	39
3.1.8 In Jak1-defizienten Zellen ist die Oberflächenexpression des endogenen OSMR gegenüber Parentalzellen reduziert.....	42
3.1.9 Auch Jak2 und Tyk2, nicht aber Jak3, führen zu einer erhöhten Oberflächenexpression des OSMR	43
3.1.10 Der OSMR ist auch in Jak1-defizienten Zellen zu Signaltransduktion in der Lage.....	45
3.2 Eingrenzung des negativ regulatorischen Signals in der Box1/2-Region des OSMR.....	46
3.2.1 Durch sukzessive Deletion der Box2 und des Interbox1/2-Bereichs lässt sich die Oberflächenexpression von OSMR-Chimären deutlich erhöhen47	
3.2.2 Ein negativ-regulatorisches Signal lässt sich auf den Interbox1/2-Bereich des OSMR eingrenzen.....	48
3.2.3 Die Deletion des Interbox1/2-Bereiches führt auch beim Wildtyp-OSMR zu einer signifikant erhöhten Oberflächenexpression	50
3.2.4 Mutation eines oder mehrerer Dileucin-Signale innerhalb des Interbox1/2-Bereichs führt zu Konstrukten, die wesentlich besser an der Oberfläche exprimiert werden.....	52
3.2.5 Die Oberflächenexpression von Konstrukten mit mutiertem Dileucin-Motiv wird durch Jak1 kaum noch beeinflusst	56

3.2.6	Eine Kolokalisation des OSMR mit dem Lysosom lässt sich nicht nachweisen	58
3.3	Die Expression des murinen OSMR	60
3.3.1	Die Expression des murinen OSMR wird durch Jak1-Koexpression nicht beeinflusst	60
3.3.2	Der membranproximale Bereich des murinen OSMR enthält kein negativ-regulatorisches Signal	62
3.3.3	Der Interbox1/2-Bereich des murinen OSMR ist für dessen bessere Expression verantwortlich	63
3.3.4	Das LII-Motiv in der Interbox1/2-Region ist für dessen inhibitorische Funktion bei der Regulation der Oberflächenexpression des humanen OSMR von essentieller Bedeutung	65
4	Diskussion.....	67
4.1	Die Regulation der OSMR-Oberflächenexpression durch Januskinasen.....	67
4.1.1	Die Jak1-vermittelte Hochregulation der OSMR-Oberflächenexpression.....	67
4.1.2	Auch Jak2 und Tyk2 beeinflussen die Oberflächenexpression des OSMR....	68
4.1.3	Jaks unterscheiden sich bezüglich ihrer Fähigkeit, spezifische Signalwege zu aktivieren	69
4.2	Maskierung eines negativ-regulatorischen Signals in der OSMR-Box1/2-Region durch Jak1.....	70
4.2.1	Der Interbox1/2-Bereich des OSMR enthält ein transferierbares, negativ-regulatorisches Signal, welches durch Jak1 maskierbar ist	70
4.2.2	Ein Jak-vermittelter Maskierungsmechanismus als Qualitätskontrolle für Zytokinrezeptoren	71
4.3	Drei Dileucin-ähnliche Motive im Interbox1/2-Bereich des OSMR wirken sehr wahrscheinlich als ER-Retentions-/Retrieval-Signal	72
4.3.1	Drei Dileucin-Motive im Interbox1/2-Bereich des OSMR wirken als negativ-regulatorisches Signal	72
4.3.2	Lysosomales Targeting des OSMR ist nicht nachweisbar	73
4.3.3	Das Expressionsmuster des chimären OSMR deutet auf eine ER-Retention dieses Rezeptors hin	74
4.3.4	Bei dem distalen negativ-regulatorischen Motiv handelt es sich um kein Dileucin- sondern um ein Trileucin-ähnliches Motiv	75
4.3.5	Die Prozessierung von Rezeptor/Jak-Komplexen.....	77
4.4	Die unterschiedliche Regulation des humanen und des murinen OSMR	77
4.5	Die Relevanz der Rezeptoroberflächenexpression für die Signaltransduktion von Zytokinrezeptoren	78
5	Ausblick	81
5.1	Die Regulation der Oberflächenexpression von gp130, LIFR und OSMR durch Jak1.....	81
5.1.1	Effekt von Jak1-Koexpression auf gp130 und LIFR.....	81
5.1.2	Untersuchung der Expression endogener Rezeptoren in U4C-Zellen.....	81
5.1.3	Der Einfluss der Januskinasen Jak2 und Tyk2 auf die Oberflächenexpression von IL-6-Typ-Zytokinrezeptoren	82
5.1.4	Der Einfluss der verschiedenen Jaks auf die OSM-vermittelte Signaltransduktion.....	83

5.1.5	Untersuchung der für die OSMR-Hochregulation wichtigen Domänen von Jak1.....	83
5.2	Charakterisierung des negativ-regulatorischen Signals im OSMR.....	84
5.2.1	Nachweis der ER-Retention	84
5.2.2	Molekularbiologische Analyse des negativ-regulatorischen Signals.....	85
5.3	Die Regulation der Expression des murinen OSMR.....	86
5.3.1	Mutagenesestudie am murinen OSMR	86
5.3.2	Regulation des endogenen murinen OSMR	86
5.3.3	Einfluss der differentiellen Qualitätskontrolle auf die Signaltransduktion des murinen sowie des humanen OSMR	87
6	<i>Zusammenfassung</i>.....	88
7	<i>Literatur</i>.....	90

Verzeichnis der Abkürzungen

Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
APP	Akutphase-Protein
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
CBM	<i>cytokine binding module</i>
CLC	<i>cardiotrophin-like cytokine</i>
CLF	<i>cytokine-like factor</i>
CNTF	<i>ciliary neurotrophic factor</i>
COP	<i>coatamer protein</i>
CT-1	<i>cardiotrophin-1</i>
DEAE	Diethylaminoethyl
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Serum
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i>
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
ECL	<i>enhanced chemoluminescence</i>
EDTA	<i>ethylenediamine-tetraacetic acid</i>
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
Endo H	Endoglykosidase H
Epo	Erythropoetin
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERAD	<i>ER associated degradation</i>
ERK	<i>extracellular signal regulated kinase</i>
FACS	<i>fluorescence-activated cell sorting</i>
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FKS	fötales Kälberserum
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
Grb	<i>growth factor receptor bound protein</i>
gp	Glykoprotein
h	Stunde
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
hu	human
IFN	Interferon
IFNAR	Interferon alpha Rezeptor
IL	Interleukin
Jak	Janus-Kinase
JH	<i>Jak homology</i>
kD	Kilodalton
LB	Luria-Bertani-Medium
LIF	<i>leukemia inhibitory factor</i>
MAPK	<i>mitogen activated kinase</i>
min	Minute
mu	murin

NP40	Nonidet-P40
OSM	<i>oncostatin M</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PE	Phycoerythrin
PIAS	<i>protein inhibitor of activated STAT</i>
PI3K	Phosphatidylinositol 3 Kinase
PKC	Proteinkinase C
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVDF	Polyvinylidendifluorid
R	Rezeptor
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
RT	Raumtemperatur
SDS	<i>sodium-dodecylsulfate</i>
SH	<i>src homology</i>
SHP	<i>SH2-domain-containing tyrosine phosphatase</i>
SOCS	<i>suppressor of cytokine signalling</i>
STAT	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
TGN	Trans-Golgi Netzwerk
TRITC	TetramethylrhodaminB isothiocyanat
Tris	Tris(hydroxy)aminomethan
U	<i>unit</i>
upm	Umdrehungen pro Minute
Yp	Phosphotyrosin
WT	Wildtyp

Mutierte Proteine werden im Folgenden Text auch als Mutanten bezeichnet.
Fremdsprachliche Fachausdrücke sind kursiv gedruckt.

1 Einleitung

1.1 Die Familie der IL-6-Typ-Zytokine und ihre Rezeptoren

Die Proliferation und Differenzierung verschiedenster Zellen wie hämatopoetischer Zellen und Immunzellen wird durch Zytokine und Wachstumsfaktoren reguliert. Während Wachstumsfaktoren wie EGF an Rezeptortyrosinkinasen binden, also Rezeptoren mit einer intrinsischen Kinaseaktivität, erfolgt die Signaltransduktion der meisten Zytokine über Rezeptoren der Zytokinrezeptor-Superfamilie, die über keine katalytische Domäne verfügen [1, 2]. Zur Weiterleitung des Signals sind diese Zytokinrezeptoren auf eine besondere Klasse zytoplasmatischer Tyrosinkinasen, die Januskinasen (Jaks), angewiesen. In Säugetierzellen kommen vier Januskinasen vor. Während Jak1, Jak2 und Tyk2 ubiquitär exprimiert werden, findet sich Jak3 vorwiegend in hämatopoetischen Zellen [3].

Interleukin-6 (IL-6) ist ein pleiotropes Zytokin, d. h., es übt verschiedene biologische Funktionen aus. So spielt es nicht nur bei der Immunregulation, wo es als stimulierender Faktor von B-Zellen zuerst entdeckt wurde, und bei der Hämatopoese eine Rolle, sondern wirkt auch als Hepatozyten-stimulierender Faktor (Synthese von Akutphase-Proteinen) und ist im Nervensystem an der Differenzierung von Neuronen beteiligt [4]. Mit den Zytokinen IL-11, OSM (Oncostatin M), CNTF (*ciliary neurotrophic factor*), CT-1 (Cardiotrophin-1), CLC (*cardiotrophin-like cytokine*) und LIF (*leukemia inhibitory factor*) ist es strukturell und auch funktionell verwandt [4-7]. So üben die genannten Zytokine teilweise überlappende biologische Funktionen aus [4]. Diese redundante Wirkungsweise ergibt sich daraus, dass alle oben genannten Zytokine zur Signaltransduktion die Rezeptorkette gp130 benutzen. Die durch die verschiedenen IL-6-Typ-Zytokine benutzten Rezeptorkomplexe sind in Abbildung 1 schematisch dargestellt. Während IL-6 und IL-11 nach Bindung an ihren spezifischen α -Rezeptor eine Homodimerisierung von gp130 auslösen, signalisieren alle anderen IL-6-Typ-Zytokine über ein LIFR-gp130-Heterodimer, wobei die Zytokine CNTF und CLC zur Bindung an das LIFR/gp130-Heterodimer jeweils noch eine weitere Rezeptorkette, den CNTFR α benötigen [4, 6]. Das Zytokin CLC unterscheidet sich insofern von den anderen Zytokinen, dass es nur im Komplex mit dem löslichen Rezeptor CLF (*cytokine-like factor-1*) sezerniert wird und wirksam ist [6]. Die Nutzung eines zusätzlichen α -Rezeptors ist auch für das Zytokin CT-1 postuliert worden [8], der zugehörige α -Rezeptor konnte aber

bisher nicht kloniert werden. Oncostatin M nimmt insofern unter den IL-6-Typ-Zytokinen eine Sonderstellung ein, als dass dieses Zytokin zusätzlich noch über einen zweiten Rezeptorkomplex signalisieren kann, welcher aus gp130 und dem spezifischen OSM-Rezeptor besteht [9].

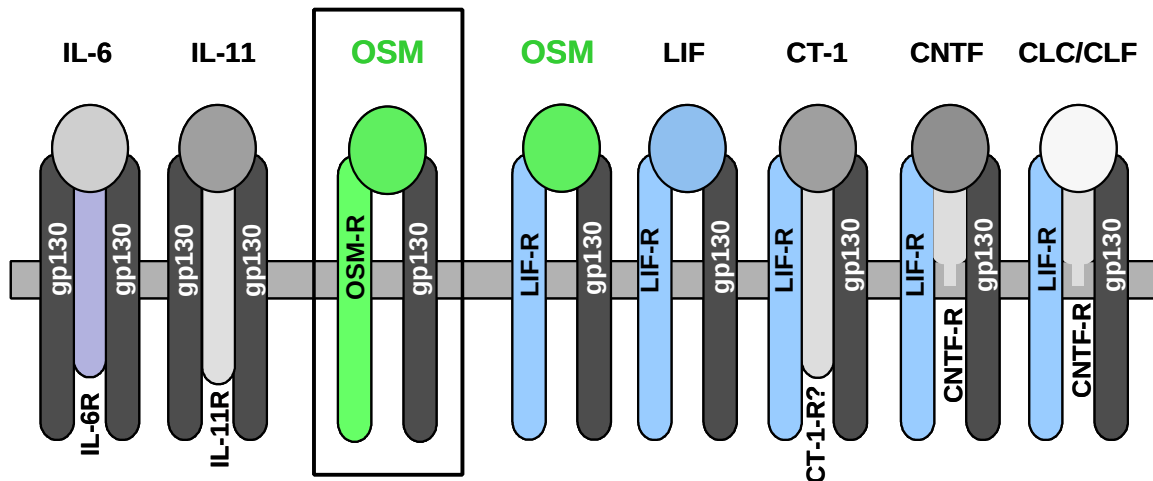


Abbildung 1: Schema der von den IL-6-Typ-Zytokinen verwendeten Rezeptorkomplexe. Die signaltransduzierenden Rezeptoruntereinheiten gp130, LIFR und OSMR sind in Dunkelgrau, in Blau bzw. in Grün dargestellt. Zytokine sind durch Kreise symbolisiert. (Nach [4]).

Abbildung 2 stellt alle Rezeptorketten der IL-6-Familie in größerem Detail dar. Diese Rezeptorfamilie gehört zu den Klasse I-Zytokinrezeptoren, die sich strukturell durch das *cytokine binding module* (CBM) auszeichnen: Dieses enthält C-terminal das konservierte WSXWS-Motiv sowie vier konservierte Cysteine in der dazu N-terminalen Domäne [1] und ist für die Ligandenbindung von Bedeutung. Der Extrazellulärbereich der IL-6R α -, der IL-11R α - und der CNTFR α -Kette besteht jeweils aus einer N-terminalen Immunglobulin-ähnlichen Domäne sowie dem CBM. Die signaltransduzierenden Untereinheiten gp130, LIFR und OSMR verfügen über größere extrazelluläre Domänen, da diese Rezeptorketten membranproximal zusätzlich drei Fibronectin-Typ-III-Domänen enthalten [4]. Alle α -Rezeptoren verfügen nur über eine recht kurze (im Fall des CNTFR gar keine) zytoplasmatische Region [4]. Da neben den membranständigen auch lösliche Formen dieser Rezeptoren vorkommen, die eine agonistische Wirkung auf die Signaltransduktion haben [10, 11], scheint die zytoplasmatische Region der α -Rezeptoren für die Signaltransduktion bedeutungslos zu sein. Allerdings enthält dieser Bereich im Fall des IL-6R α Informationen, welche für die Lokalisation dieses Rezeptors in polarisierten Zellen von Bedeutung ist [12].

Die signaltransduzierenden Rezeptorketten gp130, LIFR und OSMR besitzen sehr viel längere zytoplasmatische Regionen, die verschiedene für die Signaltransduktion wichtige

Bereiche enthalten. Wie die anderen Rezeptoren der Zytokinrezeptor-Superfamilie verfügen die IL-6-Typ-Rezeptoren über keine intrinsische Kinaseaktivität, sondern sind zur Signalweiterleitung auf die konstitutiv mit ihnen assoziierten Januskinasen angewiesen. Die membranproximal liegenden, konservierten Box1- und Box2-Bereiche sind für die Bindung der Januskinasen verantwortlich [13-16]. Während die Box1 eine prolinreiche Region darstellt, ist die Box2 schlechter charakterisiert; hier finden sich oftmals positiv-geladene sowie hydrophobe Aminosäuren [4], neben diesen Bereichen, spielt aber auch der Interbox1/2-Bereich bei der Bindung von Jak1 eine Rolle [17].

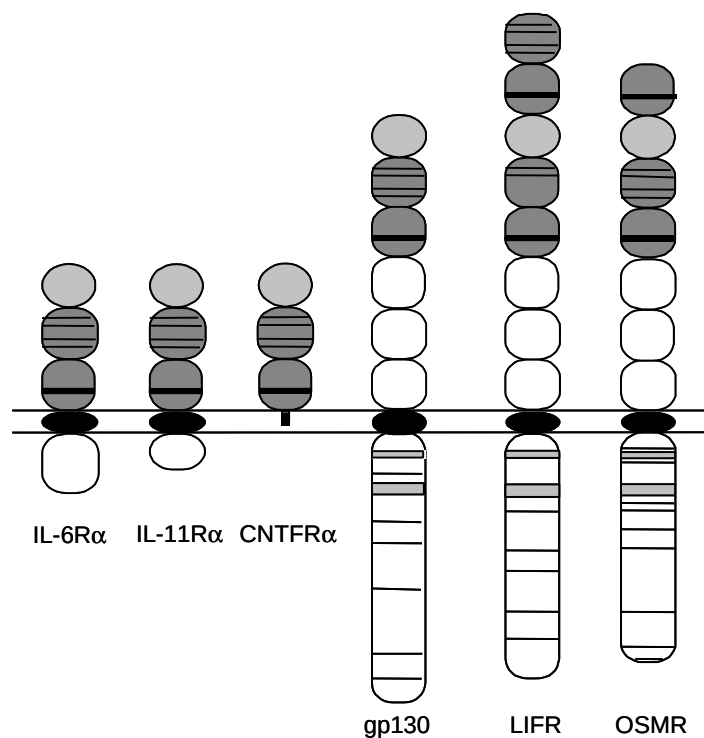


Abb. 2: Schema der Rezeptoren für IL-6-Typ-Zytokine (nach [4]). Hellgraue Kreise entsprechen Immunglobulin-ähnlichen Domänen, dunkelgraue Ovale stellen CBMs dar. Fibronectin-TypIII-ähnliche Domänen der Extrazellulärregion sind weiß dargestellt. Schwarze Balken repräsentieren das konservierte WSXWS-Motiv, schwarze Striche stellen konservierte Cysteine dar. Die Intrazellulärregion ist als weißes Oval dargestellt. Die Box1- und die Box2-Region sind durch schraffierte Bereiche, intrazelluläre Tyrosinreste sind durch schwarze Linien symbolisiert.

Für gp130 und den LIFR konnte die Assoziation von Jak1, Jak2 und Tyk2 gezeigt werden [18-20], an den OSMR binden zumindest Jak1 und Jak2 [20]. Spezifische, distal von der Box1/2-Region liegende Tyrosinmotive in den signaltransduzierenden Rezeptoruntereinheiten können von den assoziierten Jaks phosphoryliert werden [4, 21]. Die weitere Signaltransduktion wird dann über die Rekrutierung verschiedener zytoplasmatischer Proteine an spezifische Phospho-Tyrosinmotive eingeleitet.

1.2 Die Familie der Januskinasen

Im Gegensatz zu anderen Zytokinrezeptoren, wie z.B. dem Erythropoetin-Rezeptor (EpoR) oder dem Leptin-Rezeptor, die nur eine spezifische Januskinase, nämlich Jak2, rekrutieren, bedienen sich die IL-6-Typ-Zytokine zur Signalweiterleitung der drei Januskinasen Jak1, Jak2 und Tyk2 [3, 4]. Allerdings konnte mit Hilfe mehrerer Jak1-defizienter Zelllinien gezeigt werden, dass der Kinase Jak1 eine herausragende Rolle zukommt [22, 23]. In Abbildung 3 ist der Aufbau dieser Januskinase schematisch wiedergegeben.

Jak1

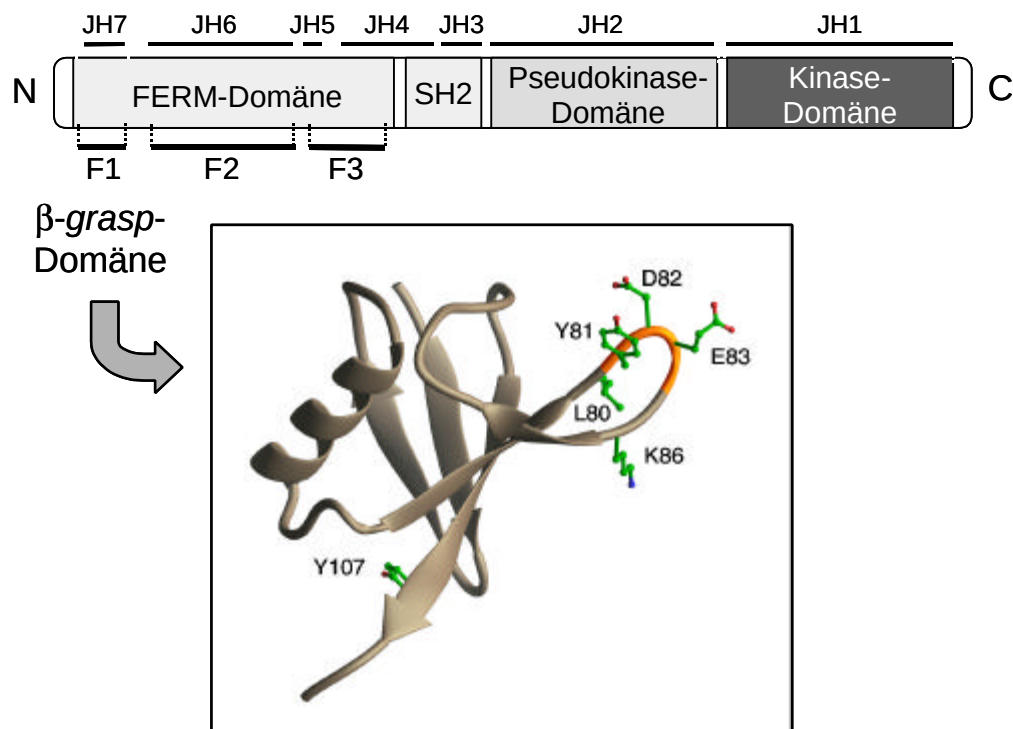


Abbildung 3: Schematischer Aufbau von Jak1. Die Jak-Homologiedomänen JH1 bis JH7 sind dargestellt. Im N-terminalen Bereich sind die putative FERM- bzw. die putative SH2-Domäne eingezeichnet. Unterhalb der FERM-Domäne sind die Grenzen der Subdomänen F1, F2 und F3 angegeben. Das Strukturmodell der potentiellen Jak1- β -grasp-Domäne (F1) ist dargestellt. In diesem Modell ist der für die Bindung an gp130 essentielle *Loop 4* mit wichtigen Aminosäuren hervorgehoben (Modell nach [24]).

Alle Januskinasen sind sich strukturell sehr ähnlich und enthalten sieben relativ konservierte Bereiche, die Jak-Homologie-Regionen JH1-JH7. Die C-terminale JH1-Region stellt die Jak-Kinasedomäne dar, während die benachbarte JH2-Region der sogenannten Pseudo-Kinase-Domäne entspricht. Diese weist zwar sehr hohe Ähnlichkeit mit einer Kinase-Domäne auf, besitzt aber aufgrund des Fehlens mehrerer essentieller Aminosäuren keine Kinaseaktivität. Einige Untersuchungen weisen dieser Domäne eine regulatorische Funktion zu [3].

Der N-terminale Bereich der Januskinasen, bestehend aus den Domänen JH3 bis JH7, ist für die Rezeptor-Interaktion von Bedeutung [3, 4]. Neuere Strukturvorhersagungen legen nahe, dass sich im N-terminalen Bereich eine SH2- sowie eine sogenannte FERM-Domäne befindet, wie sie z.B. in den Proteinen Ezrin, Radixin und Moesin vorkommt. FERM-Domänen bestehen aus den drei Subdomänen F1, F2 und F3, wobei F1 eine β -*grasp*-Domäne darstellt [3, 24, 25]. Kürzlich konnte aufgrund gelöster Strukturen ein Modell der Jak1-JH7-Domäne erstellt werden. Interessanterweise liegen mehrere Aminosäuren, welche für die Bindung von Jak1 an gp130 wichtig sind, in diesem Modell auf einer exponierten Schleife (*Loop 4*). Dieser *Loop* könnte also Teil der gp130/Jak1-Interaktionsfläche sein [24].

Um katalytisch aktiv zu werden, müssen die Jaks zunächst selbst phosphoryliert werden. Dies geschieht, wenn es aufgrund der Bindung eines Liganden an den Rezeptor zu einer Hetero- oder Homodimerisierung von zwei signaltransduzierenden Untereinheiten kommt, und sich die assoziierten Jaks daraufhin auto- bzw. transphosphorylieren. Der Mechanismus dieser Phosphorylierung ist derzeit unbekannt. Sie kann zwischen zwei gleichen oder zwei unterschiedlichen Jaks erfolgen, je nachdem, welche Kinase mit der jeweils beteiligten Rezeptoruntereinheit assoziiert ist [3, 4]. Neben der Tyrosinphosphorylierung von Januskinasen ist auch eine Serin- bzw. Threoninphosphorylierung von Jaks beschrieben worden [26]. Zudem können Jaks mit verschiedenen regulatorischen Proteinen interagieren; so führt z. B. die Interaktion von Jak2 und SH2B β zu einer gesteigerten Kinaseaktivität dieser Januskinase [27, 28].

1.3 Der Jak/STAT-Signaltransduktionsweg

Zur Weiterleitung des Signals vom Rezeptor zum Zellkern bedienen sich alle Zytokinrezeptoren der Zytokinrezeptor-Superfamilie der sogenannten STAT-Faktoren (= *signal transducers and activators of transcription*) [4, 29]. Von diesen Transkriptionsfaktoren, die zunächst bei der Untersuchung der Interferonrezeptoren entdeckt wurden, sind mittlerweile die Vertreter STAT1 bis STAT6 bekannt, die mit Ausnahme von STAT4 ubiquitär vorkommen. Die STAT-Faktoren besitzen eine SH2-Domäne, mit welcher sie an die phosphorylierten Tyrosinreste der aktivierten Rezeptoruntereinheiten binden können, um daraufhin selbst phosphoryliert zu werden [4, 29]. Dabei erkennen die einzelnen STAT-Faktoren bestimmte Tyrosinmotive. Am gp130 z.B. erfolgt die Rekrutierung von STAT1 und STAT3 an den Motiven YXPQ bzw. YXXQ [30, 31].

STAT5 kann sowohl an bestimmte Rezeptor-Tyrosinmotive rekrutiert werden, als auch direkt mit Januskinasen interagieren [32, 33].

Nach Phosphorylierung der STATs an einem spezifischen Tyrosinrest dissoziieren diese von den Rezeptoren ab und bilden nun - wiederum über ihre SH2-Domänen - Homo- oder Heterodimere aus. Die STAT-Dimere gelangen in den Nukleus, wo sie mit ihrer DNA-Bindedomäne an bestimmte DNA-Sequenzen (TTN₅GAA) binden und damit die Transkription spezifischer Gene induzieren können [4, 29].

Neben der Tyrosinphosphorylierung ist auch die Serinphosphorylierung der STATs von Wichtigkeit; diese scheint eine Rolle bei der Transaktivierung durch die STATs zu spielen [34]. Sie kann sowohl MAPK-unabhängig als auch MAPK-abhängig erfolgen [35-37], z.B. wurde die Proteinkinase PKC δ als eine Kinase identifiziert, welche nach IL-6-Stimulation zur STAT3-Serinphosphorylierung führt [38].

1.3.1 Die Regulation des Jak/STAT-Signaltransduktionsweges

Verschiedene inhibitorische Mechanismen sind beschrieben worden, welche den Jak/STAT-Signaltransduktionsweg regulieren. So existieren für STAT1, sowie STAT3 spezifische Inhibitoren, die sogenannten PIAS-Proteine (= *protein inhibitors of activated STATs*). Diese binden an phosphorylierte STAT-Faktoren und können so offenbar die DNA-Bindung der STATs verhindern [39, 40]. In diesem Zusammenhang wurde kürzlich demonstriert, dass die PIAS1-Bindung an phosphoryliertes STAT1 durch die Methylierung eines konservierten Argininrests innerhalb des STAT1-Proteins unterbunden werden kann [41]. Weitere Komplexität erfährt das System dadurch, dass den PIAS-Proteinen mittlerweile auch eine Rolle bei der Sumoylierung von Transkriptionsfaktoren zugewiesen wird [42-44]

Neben den PIAS-Proteinen sorgt die Klasse der SOCS-Proteine (*supressors of cytokine signalling*) für eine Inhibition des Jak/STAT-Signalwegs. Bei diesen Proteinen handelt es sich um klassische *Feedback*-Inhibitoren, denn ihre Expression wird durch Zytokine selbst induziert. Bei der Negativ-Regulation von IL-6-Typ-Zytokinen spielen die SOCS-Proteine SOCS1 und SOCS3 eine Rolle [4, 45-50]. Während SOCS1 wahrscheinlich direkt mit den Januskinasen interagiert und diese so inhibiert [51], ist für die inhibitorische Wirkung von SOCS3 dessen Bindung an das Tyr 759 von gp130 nötig [47]. Die Assoziation eines SOCS-Proteins an den OSMR oder den LIFR ist bisher noch nicht nachgewiesen worden.

Des Weiteren kann die Jak/STAT-Signaltransduktion durch Phosphatasen reguliert werden. Eingehend untersucht wurde in diesem Zusammenhang die ubiquitär vorkommende Tyrosin-

phosphatase SHP-2, welche über ihre zwei SH2-Domänen an Phosphotyrosinmotive aktivierter Rezeptoren binden kann [4]. Im Falle des gp130 konnte die Bindung von SHP-2 an das Tyrosin 759 gezeigt werden [30, 52]. Da an dieses Tyrosin auch SOCS-3 bindet, ist davon auszugehen, dass sowohl SOCS-3 als auch SHP-2 einen Beitrag an der Negativ-Regulation von gp130-vermittelten Signaltransduktionswegen haben [53].

1.3.2 Die Aktivierung von MAP-Kinasen

Neben den STAT-Faktoren werden auch MAP-Kinasen von IL-6-Typ-Zytokinen aktiviert. Je nach Zelltyp können die IL-6-Typ-Zytokine zur Aktivierung der MAPK Erk1/2 sowie der Stress-aktivierten Kinasen p38 und JNK führen [54-58]. Bei der Aktivierung von MAP-Kinasen über gp130 kommt der Tyrosinphosphatase SHP-2 eine bedeutende Rolle zu. Dieses Protein kann den Jak/STAT-Weg nicht nur negativ regulieren, sondern zusätzlich auch als Adapterprotein wirken. So kann SHP-2 von verschiedenen Kinasen, u.a. Januskinasen, an einem spezifischen Tyrosin phosphoryliert werden und im Folgenden über die Rekrutierung von Grb2 als Bindeglied zum Ras/Raf/MAPK-Weg dienen [59, 60]. Wir konnten zeigen, dass der OSMR unabhängig von gp130 zu einer starken Aktivierung von ERK1/2 in der Lage ist [56]. Da aber SHP-2 nicht an den OSMR rekrutiert wird, erfolgt diese MAPK-Aktivierung über einen anderen Adapter. Tatsächlich wird das Adapterprotein Shc an das Tyr 861 des OSMR rekrutiert und stellt somit einen exzellenten Kandidaten für die OSM-vermittelte MAP-Kinasen-Aktivierung dar [56].

1.4 Oncostatin M

Oncostatin M ist ein 28 kD großes Glykoprotein, welches von aktivierten T-Lymphozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen sezerniert wird [61-63]. Mit den anderen Zytokinen der IL-6-Familie weist es große Ähnlichkeit auf. LIF und OSM besitzen mit etwa 30 % Homologie die größte Übereinstimmung. Für die enge Verwandtschaft dieser Zytokine spricht ferner die Tatsache, dass die Gene für LIF und OSM beim Menschen auf demselben Chromosom lokalisiert sind [64, 65]. Zudem können sowohl OSM als auch LIF beim Menschen – nicht aber im murinen System [66] – über den gp130/LIFR-Komplex signalisieren [67, 68]. Bisher ist OSM das einzig bekannte Zytokin, welches über den gp130/OSMR-Komplex signalisieren kann. Bemerkenswert ist auch, dass OSM als einziges Zytokin der IL-6-Familie zunächst - mit geringer Affinität - an gp130 bindet [67]. Der LIFR

bzw. der OSMR führen dann zur Affinitätskonversion und Ausbildung des hochaffinen Rezeptorkomplexes [68].

Wie die anderen Zytokine der IL-6-Familie ist OSM als pleiotropes Zytokin an zahlreichen biologischen Prozessen beteiligt (siehe Abbildung 4). Dabei übt OSM redundante, aber auch spezifische Funktionen aus. So kann OSM beispielsweise wie IL-6 in Leberzellen eine Akutphase-Proteinsynthese (APP) auslösen [69] und M1-myeloide Leukämiezellen zur Differenzierung anregen [70]. Dahingegen wird die von OSM ausgehende Tumorphibierende Wirkung im gleichen Ausmaß von den anderen Zytokinen nicht erreicht [71, 72]

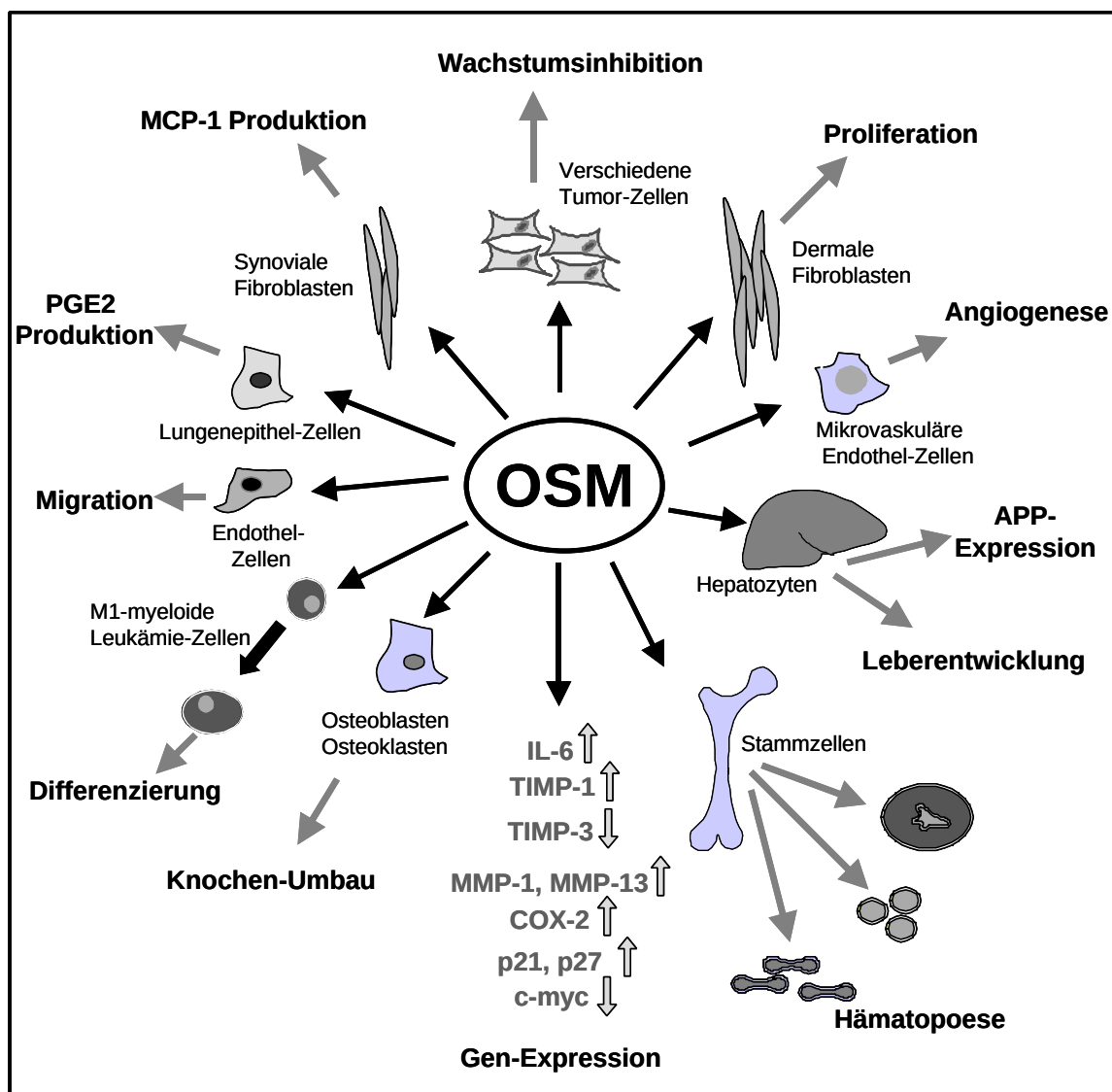


Abbildung 4: Biologische Wirkungen des Zytokins Oncostatin M. Verschiedene Zelltypen, auf die eine Wirkung von OSM beschrieben ist, sind dargestellt. Zusätzlich ist eine Reihe wichtiger Gene angegeben, welche durch OSM in verschiedenen Zellen reguliert werden können. TIMP: *tissue inhibitor of metallo-proteinases*, MMP: *Matrix-Metalloproteinase*, COX: *Cyclooxygenase*, PGE2: *Prostaglandin E2*; MCP: *monocyte chemoattractant protein*. (Zusammenfassung von [61, 69-71, 73-94]).

1.5 Der Oncostatin M-Rezeptorkomplex

gp130

OSM

OSMR

Jak1/Jak2/Tyk2

Jak1/Jak2/Tyk2

Box1

Box1

Box2

Box2

SHP-2/SOCS3 ➔ YSTV

STAT3 ➔ YRHQ

STAT3 ➔ YFKQ

STAT1/3 ➔ YLPQ

STAT1/3 ➔ YMPQ

YLYLLP

FENFTY ← Shc

YMNS

YKMQ ← STAT3

YVSQ ← STAT3

STAT1/3/5

ERK1/2, JNK, P38

PI3K/AKT

Abb. 5: Schema des Oncostatin M-Rezeptorkomplexes und der an einer OSM-induzierten Signaltransduktion beteiligten Proteine. In der Intrazellulärregion der Rezeptoren sind die Box1- und Box2-Regionen als weiße Balken dargestellt, schwarze Linien symbolisieren intrazelluläre Tyrosinreste. Die Aminosäuresequenzen der flankierenden Bereiche von Tyrosinresten und die Proteine, die an die phosphorylierten Tyrosine rekrutiert werden können, sind jeweils angegeben [20, 30, 31, 47, 56, 98].

Nach OSM-Stimulation kommt es in OSMR-exprimierenden Zellen zu einer Heterodimerisierung von OSMR und gp130 und damit zur Aktivierung der Rezeptor-assoziierten Januskinasen sowie zur Tyrosinphosphorylierung beider Rezeptorketten [87, 99]. Abbildung 5 zeigt ein Schema des OSM-Rezeptorkomplexes aus gp130 und OSMR. Membranproximal enthält der OSMR - wie gp130 - eine Box1- und eine Box2-Region. Alle zytoplasmatischen Tyrosine innerhalb von gp130 und des OSMR sind eingezeichnet. Während gp130 Bindestellen für STAT1, STAT3, SHP-2 und SOCS-3 enthält [30, 31, 47], konnten im OSMR bisher nur Bindestellen für STAT3 sowie für das Adapterprotein Shc identifiziert werden [20, 56, 98]. Der Mechanismus der OSM-vermittelten STAT5-Aktivierung sowie der Aktivierung des PI3K-Weges konnte bisher noch nicht geklärt werden.

1.6 Regulation der Oberflächenexpression von Zytokinrezeptoren

Die Signaltransduktion über Zytokinrezeptoren wird letztendlich nicht nur über die beteiligten Signalmoleküle reguliert, sondern ist in entscheidendem Maße auch davon abhängig, wie viele Zytokinrezeptoren in einer betreffenden Zelle an der Zelloberfläche exprimiert werden. Wie bei anderen Transmembranproteinen hängt die Oberflächenexpression der Zytokinrezeptoren zunächst von einer effizienten Prozessierung und einem erfolgreichen Transport zur Plasmamembran ab. Die Zahl der Rezeptoren an der Zellmembran kann desweiteren durch Internalisierung und darauffolgende Degradationsprozesse reguliert werden. In Abbildung 6 ist schematisch dargestellt, welche Vorgänge während der Rezeptorprozessierung und im Verlauf des anschließenden *Targetings* Einfluss auf die Expression von Rezeptoren an der Zelloberfläche haben; in diesem Schema sind zudem eine Reihe bekannter Signale zusammengefasst, welche die Prozessierung und Sortierung von Transmembranproteinen beeinflussen können. Zunächst müssen die neu-exprimierten Rezeptoren im ER korrekt gefaltet werden, dies geschieht unter Zuhilfenahme verschiedener ER-Chaperone, die im ER-Lumen oder auf der zytosolischen Seite des ER lokalisiert sind [100]. Für einige Transmembranproteine ist dies der zeitlich limitierende Schritt während der Prozessierung. Beispielsweise weist der humane δ Opioid Rezeptor, der zur Klasse der G-Protein gekoppelten Rezeptoren gehört, eine relativ lange Veweildauer im ER auf, da er nur sehr ineffizient gefaltet wird [101]. Ähnliche Befunde existieren für den EpoR [102, 103]. Gelingt es den ER-Chaperonen innerhalb einer bestimmten Zeit nicht, die richtige Faltung herbeizuführen, so werden die fehlerhaften Proteine degradiert. Hierzu werden sie zunächst aus dem ER heraustransportiert und dann über das Proteasom, welches mit dem ER eng

assoziiert ist, abgebaut. Bei diesem Vorgang spricht man deshalb von ER-assoziiierter Degradation (ERAD) [100]. Bis zu 70% aller Epo-Rezeptoren beispielsweise sollen über diesen Mechanismus abgebaut werden [102].

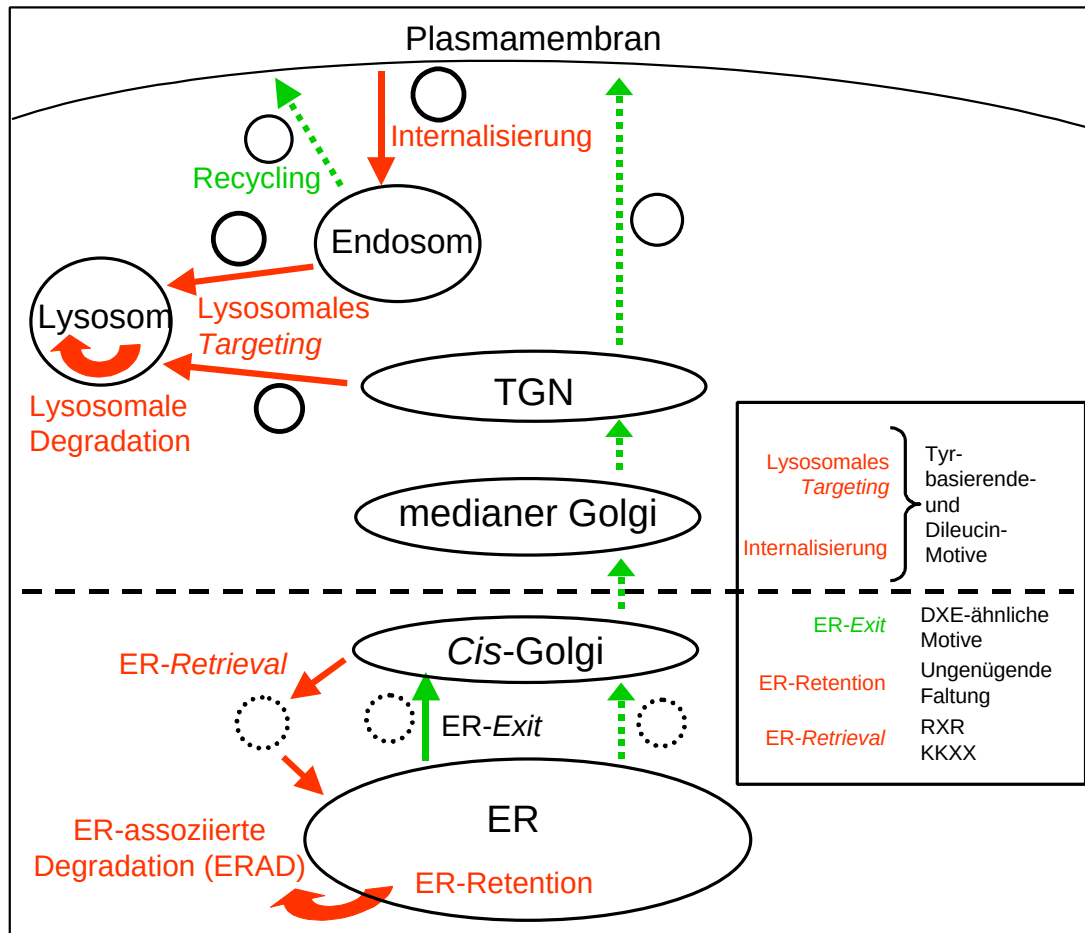


Abbildung 6: Schema der Prozessierung und der zellulären Translokation von Transmembranproteinen. Die verschiedenen zellulären Kompartimente sind dargestellt. Prozesse, die sich positiv auf die Oberflächenexpression von Transmembranproteinen auswirken, sind in grüner Farbe, Prozesse, die sich negativ auswirken, in roter Farbe gekennzeichnet. Gestrichelte Pfeile repräsentieren den sogenannten *default pathway*. Geschwungene Blockpfeile symbolisieren Degradationsprozesse. COP-haltige Vesikel sind gepunktet dargestellt, Clathrin-haltige Vesikel mit fester, durchgezogener Linie. Die gestrichelte Linie trennt Zellkompartimente, in denen Endo H-sensitive Proteine vorliegen, von solchen, in denen Endo H-resistente Proteine lokalisiert sind. In dem Kasten sind Signale zusammengefasst, welche die Lokalisation von Transmembranproteinen beeinflussen können. Bei allen Signalen handelt es sich um Sequenzen/Determinanten aus der zytoplasmatischen Region von Transmembranproteinen. ER: Endoplasmatisches Retikulum, TGN: Trans-Golgi-Netzwerk. Modell erstellt nach [100, 104-106].

Vom ER aus gelangen die Proteine über COPII-haltige Transportvesikel zunächst in das *cis*-Golgi-Kompartiment. Während manche Studien davon ausgehen, dass alle Transmembranproteine, sofern sie nicht über spezifische Signale im ER zurückgehalten werden, automatisch, und zwar über den sogenannten *default pathway*, vom ER zum Golgi-Kompartiment weitertransportiert werden, mehren sich die Anzeichen dafür, dass bestimmte ER-Exit-Signale für einen effizienten ER-Golgi-Transport sorgen [104, 105]. Hierbei handelt es sich beispielsweise um DXE-ähnliche Signale in den zytoplasmatischen Bereichen der zu trans-

portierenden Proteine [107-109]. Besitzen Proteine ein ER-*Retrieval*-Signal, so werden sie vom *cis*-Golgi aus zurück zum ER transportiert, diesen Prozess bezeichnet man auch als retrograden Transport [100].

Nachdem die Transmembranproteine den gesamten Golgi-Apparat durchschritten haben, werden sie schließlich vom Trans-Golgi-Netzwerk (TGN) aus zu den jeweiligen Zielorten, z.B. zur Zellmembran oder zum Lysosom transportiert. Während der Transport zwischen ER und Golgi in COP-ummantelten Vesikeln erfolgt, findet der Transport zwischen dem TGN und Lysosom in Clathrin-haltigen Vesikeln statt. Transportprozesse in COP- oder Clathrin-haltigen Vesikeln können über spezifische kurze, lineare Aminosäuremotive, z.B. Dilysin- bzw. Dileucin-Signale, reguliert werden [104, 105].

Die Anzahl der Proteine an der Zellmembran kann auch durch Endozytoseprozesse reguliert werden. Der EGFR beispielsweise wird stimulationsabhängig internalisiert. Internalisierte Rezeptoren können zum Lysosom transportiert und dort degradiert oder zurück zur Zellmembran transportiert werden, im letzteren Fall spricht man von „*Rezeptor-Recycling*“ [106, 110]. Neben der Liganden-abhängigen Internalisierung wurde auch die konstitutive Rezeptorinternalisierung beschrieben. Beispiele hierfür sind der LIFR und gp130. Beide besitzen in ihren jeweiligen zytoplasmatischen Rezeptorbereichen Dileucin-Motive, welche die konstitutive Internalisierung vermitteln [111-114]; die Wirksamkeit des Internalisierungssignals kann jedoch durch die induzierbare Serinphosphorylierung dieser Rezeptoren beeinflusst werden [115, 116]. Im OSMR konnte bislang noch kein funktionales Internalisierungssignal identifiziert werden.

Neben den bekannten Internalisierungssequenzen kann auch die Mono-Ubiquitylierung von Rezeptorketten eine effiziente Internalisierung einleiten, oftmals gefolgt von lysosomaler Degradation [117]. Somit spielt die Ubiquitylierung von Proteinen nicht nur beim proteasomalen Abbau, sondern auch beim lysosomalen Abbau von Proteinen eine Rolle. Tatsächlich weisen eine Anzahl von Proteinen, welche an Internalisierung und lysosomalem *Targeting* beteiligt sind, ein sogenanntes UIM-Motiv (*ubiquitin interacting motif*) auf, über das sie mit Monoubiquitylierten-Proteinen interagieren können [118-120].

Transmembranproteine werden im Laufe der Prozessierung sowohl im ER als auch im Golgi-Apparat durch Anhängen spezifischer Zuckerreste modifiziert. Im ER erfolgt zunächst die Übertragung eines Oligosaccharids, welches aus N-Acetylglukosamin, Glukose und Mannose besteht, auf die Amino-Seitengruppe spezifischer Asparaginreste (innerhalb des sog. „Sequons“ Asn-X-Ser/Thr) durch Knüpfen einer N-glykosidischen Bindung. Noch im ER

erfolgt durch spezifische Enzyme das Entfernen terminaler Mannose- und Glukose-Ketten [121]. Manche Studien gehen davon aus, dass dieses „Trimmen“ bei ungenügend gefalteten Proteinen ein Signal für ER-assoziierte Degradation darstellen könnte [121, 122]. Im Golgi-Apparat werden weitere Mannose-Zucker entfernt und stattdessen andere Zuckerreste, z.B. Galaktose und Sialinsäure übertragen. Somit lassen sich Glykoproteine aufgrund ihrer Glykosylierung in unvollständig prozessierte (= Mannose-reiche Glykosylierung) und vollständig prozessierte (komplexe Glykosylierung) Glykoproteine einteilen [121]. Die Tatsache, dass Proteine mit Mannose-reicher Glykosylierung sensitiv für, Proteine mit komplexer Glykosylierung aber resistent gegen einen Verdau mit dem Enzym Endoglykosidase H sind, macht man sich zunutze, um den Prozessierungsgrad von Transmembranproteinen biochemisch nachzuweisen.

1.7 Die Expression funktionaler Rezeptor/Jak-Komplexe

Um signalisieren zu können, müssen Zytokinrezeptoren nicht nur effizient an der Zelloberfläche exprimiert werden, sondern zusätzlich noch über eine assoziierte Januskinase verfügen. Darüber, wie und ob dieser Vorgang innerhalb der Zelle reguliert wird, ist bisher relativ wenig bekannt. Die Tatsache, dass eine ER-Lokalisation der Januskinase Jak2 beschrieben wurde [123], könnte darauf hindeuten dass die Assoziation von EpoR und Jak2 schon relativ früh während der Rezeptorprozessierung stattfinden könnte. Zum anderen gibt es interessante Befunde, die darauf hindeuten, dass der Januskinase Tyk2 eine Rolle bei der Regulation der Expression der Interferon- α -Rezeptorkette1 (IFNAR1) zukommt. So ist die Gesamtexpression der endogenen IFNAR1-Kette in Tyk2-defizienten Fibrosarkomzellen gegenüber den Parentalzellen deutlich reduziert - ein Effekt, der durch Expression von Tyk2 in diesen Zellen rückgängig gemacht werden konnte [124]. Wie genau Tyk2 die Expression des IFNAR1 reguliert, wurde bisher jedoch noch nicht geklärt. Da in Zellen von Tyk2-defizienten Mäusen ein ähnlicher Effekt nicht beobachtet werden konnte [125, 126], besteht zudem die Möglichkeit, dass es sich hier um einen Spezies-spezifischen Mechanismus handelt.

1.8 Aufgabenstellung

In eigenen früheren Untersuchungen wurde mit Hilfe chimärer Rezeptoren die Signaltransduktion über den humanen OSMR eingehend analysiert. Im Laufe dieser Untersuchungen stellte sich heraus, dass der humane OSMR gegenüber dem LIFR und gp130 nicht nur bezüglich der Signaltransduktion einige Besonderheiten aufweist [56]. Die OSMR-Chimäre wurde auch sehr viel schlechter exprimiert als die analoge gp130- oder LIFR-Chimäre [127], was mit einer deutlich schlechteren Oberflächenexpression dieses Konstrukts korrelierte. Mehrere C-terminal deletierten OSMR-Konstrukte wiesen zwar eine deutlich erhöhte Gesamtexpression auf, unterschieden sich aber in Bezug auf ihre Oberflächenexpression kaum von dem schlechter exprimierten Ausgangskonstrukt voller Länge [127]. Demgegenüber deuteten einzelne Versuche überraschenderweise darauf hin, dass sich die Oberflächenexpression des OSMR steigern ließ, wenn zusätzlich die Januskinase Jak1 koexprimiert wurde. Diese beiden Befunde könnten darauf hindeuten, dass die Expression des OSMR - ähnlich wie dies für die IFNAR1-Kette vermutet wird - evtl. durch die assoziierte Januskinase Jak1 reguliert wird. Ziel dieser Arbeit war es deshalb, zunächst die ersten Befunde durch eingehendere Versuche zu verifizieren und gegebenenfalls im Weiteren zu klären, welche Mechanismen dieser Regulation zugrunde liegen könnten.

2 Material und Methoden

2.1 Verwendete Materialien

2.1.1 Chemikalien

Alle Chemikalien wurden in p.A.-Qualität eingesetzt und von den Firmen AGS, BioRad, Boehringer Mannheim bzw. Roche, Fluka, Merck, New England Biolabs, Pharmacia, Qiagen, Sigma und Whatman bezogen. In der Methodenbeschreibung wird näher auf die verwendeten Chemikalien eingegangen.

2.1.2 Puffer und Medien

Alle Puffer und Medien wurden in wässriger Lösung (Qualität: Millipore) angesetzt. Die Zusammensetzung der verwendeten Puffer und Medien wird in der Methodenbeschreibung näher erläutert.

2.1.3 Verbrauchsmaterialien

Die eingesetzten Verbrauchsmaterialien stammten von den Firmen DuPont, Eppendorf, Millipore, Sartorius, Serva, Sigma und Whatman.

2.1.4 Enzyme

Folgende Enzyme wurden gemäß Herstellerangaben eingesetzt:

T4-DNA-Ligase (Boehringer)
Taq DNA-Polymerase (Hybaid)
Alkalische Phosphatase (Boehringer)
Endoglykosidase H (Boehringer)

Restriktionsendonucleasen wurden von den Firmen AGS, Boehringer Mannheim und New England Biolabs bezogen und nach Herstelleranleitung verwendet.

2.1.5 Bakterienstamm

JM83

zur Klonierung verwendeter *E. coli*-Stamm

2.1.6 Eukaryontische Zelllinien

COS-7	adhärent wachsende Nierenzellen der grünen Meerkatze
3T3	adhärent wachsende murine Fibroblastenzelllinie
HeLa	Humane Zervix-Karzinomzellen
2fTGH, U4A, 2C4, U4C	humane Fibrosarkomzelllinien, freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. I. M. Kerr, London

2.1.7 Lösungen für die Zellkultur

DMEM-Flüssigmedium mit 4,5 g Glukose/l (Gibco)

FKS; mycoplasmenfreies fötales Kälberserum (Seromed)

Penicillin / Streptomycin (Gibco)

Trypsin (0,05%) / EDTA (0,02%) –Lösung (Biochrom)

2.1.8 Zytokine

IL-6	rekombinantes humanes IL-6 wurde nach der Methode von Arcone <i>et al.</i> (1991) [128] hergestellt und freundlicherweise von A. Küster und B. Scherag zur Verfügung gestellt. Die spezifische Aktivität betrug 2×10^6 BSF2 (<i>B-cell stimulatory factor-2</i>) U/mg Protein.
sIL-6R	löslicher humaner IL-6-Rezeptor wurde wie beschrieben präpariert [129] und von A. Küster und W. Frisch freundlicherweise zur Verfügung gestellt.
OSM	humanes OSM wurden von der Firma Cell Concepts bezogen.

2.1.9 Antikörper

Die Sekundärantikörper wurden von den Firmen Dianova und DAKO bezogen. Die eingesetzten Erstantikörper stammen von den Firmen Santa Cruz Biotechnology, Sigma, MoBiTec, Upstate, Transduction Laboratories und Cell Signaling (siehe Liste).

<u>Antikörper</u>		<u>Hergestellt in</u>	<u>Bezogen von</u>	<u>Eingesetzt für</u>
R-PE-konj. anti-Maus	(Fab') ₂ Fragment	Ziege	Dianova	FACS
R-PE-konj. anti-Ratte	(Fab') ₂ Fragment	Ziege	Dianova	FACS
HRP-konj. anti-Kaninchen	polyklonal	Ziege	DAKO	WB
HRP-konj. anti Maus	polyklonal	Ziege	DAKO	WB
HRP-konj. anti-Ziege	polyklonal	Kaninchen	DAKO	WB
FITC-konj. anti-Maus	polyklonal	Kaninchen	DAKO	IF
TRITC-konj. anti-Maus	polyklonal	Kaninchen	DAKO	IF
FITC-konj. anti-Ziege	polyklonal	Kaninchen	DAKO	IF
anti IL3/IL5/GMCSFRβ (S-16)	monoklonal	Maus	Santa Cruz	FACS, IP; IF
anti OSMR (AN-A2)	monoklonal	Maus	Santa Cruz	FACS
anti LIFR	monoklonal	Maus		FACS
anti gp130 (BP-4)	monoklonal	Maus		FACS, WB
anti HLA I	monoklonal	Maus	Sigma	FACS
anti mur OSMR	monoklonal	Ratte	MBL	FACS
anti mur gp130	monoklonal	Ratte	MBL	FACS
anti LIFR (C-19)	polyklonal	Kaninchen	Santa Cruz	WB
anti IL5Rβ (N-20)	polyklonal	Kaninchen	Santa Cruz	WB
anti JAK1	polyklonal	Kaninchen	A. Ziemecki	WB
anti JAK1 (HR-785)	polyklonal	Kaninchen	Santa Cruz	WB
anti JAK2	polyklonal	Kaninchen	Upstate	WB, IP
anti Jak2 (C-20)	polyklonal	Kaninchen	Santa Cruz	WB
anti Jak3 (C-21)	polyklonal	Kaninchen	Santa Cruz	WB
anti TYK2	monoklonal	Maus	Transduction Laboratories	WB, IP
anti Tec (M-20)	polyklonal	Ziege	Santa Cruz	WB
anti pY99	monoklonal	Maus	Santa Cruz	WB
anti pY-Stat3	polyklonal	Kaninchen	Cell signaling	WB
anti pY-Stat1	polyklonal	Kaninchen	Cell signaling	WB
anti STAT1	monoklonal	Maus	Transduction Laboratories	WB
anti STAT3	monoklonal	Maus	Transduction Laboratories	WB
anti pERK1/2	polyklonal	Kaninchen	Cell signaling	WB
anti ERK1/2	polyklonal	Kaninchen	Cell signaling	WB
anti Shc	polyklonal	Kaninchen	Transduction Laboratories	WB
anti Lamp-1 (C-20)	polyklonal	Ziege	Santa Cruz	IF

2.1.10 Vektoren und rekombinante Plasmide

<u>Vektor</u>		<u>bezogen (erstellt)</u> <u>von</u>
(1) pSVL	transiente Expression von Rezeptoren in COS-7-Zellen (SV-40-Promotor)	Pharmacia
(2) pSVLΔEcoRI	Auf (1) basierendes Konstrukt, in welchem eine <i>EcoRI</i> -Schnittstelle deletiert wurde.	U. Horsten
(3) pCAGGS	transiente Expression von Rezeptoren in 3T3-Fibroblasten, HeLa Zervix-Karzinomzellen (CMV-Promotor)	Pharmacia
(4) pRK5-Jak1	Expressionsvektor für murines Jak1 (CMV-Promotor)	I. Kerr, J. N. Ihle

(5)	pRK5-JAK1-KE	Auf (4) basierendes Konstrukt, indem das Lysin 907 gegen Glutamat ausgetauscht wurde	I. Kerr, J. N. Ihle
(6)	pRK5-JAK2	Expressionsvektor für JAK2 (CMV-Promotor)	I. Kerr, J. N. Ihle
(7)	pSVL-TYK2	Auf (2) basierender Expressionsvektor für TYK2	H. Schmitz-Van de Leur
(8)	pcDNA-Jak3	Expressionsvektor für Jak3 (CMV-Promotor)	I. Kerr
(9)	pSR α Tec	Expressionsplasmid für Tec-Kinase	H. Mano
(10)	pSVL-gp130	Auf (2) basierendes Expressionsplasmid für humanes gp130	I. Behrmann
(11)	pDC LIFR	Expressionsvektor für den humanen LIFR	I. Kerr
(12)	pDC OSMR	Expressionsvektor für den humanen OSMR	H. Gascan
(13)	pSVL-IL5R β /gp130	Auf (10) basierendes Expressionsplasmid für ein chimäres Rezeptorkonstrukt bestehend aus der Extrazellulärregion des IL-5R β und der Transmembran (TM)- und zytoplasmatischen Region (zyt) des gp130	I. Behrmann/ H. Schmitz-Van de Leur
(14)	pSVL-IL5R β /gp130 Δ zyt	Auf (13) basierendes Konstrukt, in dem der zytoplasmatische Bereich des gp130 deletiert wurde	I. Behrmann/ H. Schmitz-Van de Leur
(15)	pSVL-IL5R β /gp130B1/2	Auf (13) basierendes Konstrukt, das nach der Box2-Region von gp130 endet	C. Janzen
(16)	pSVL-IL5R β /gp130 mut <i>BspTI</i>	Auf (13) basierendes Konstrukt, in dem im membranproximalen, intrazellulären Bereich des gp130 eine <i>BspTI</i> -Schnittstelle eingefügt wurde, hierdurch wurde zusätzlich die Aminosäure Isoleucin XXX durch Leucin ersetzt	I. Behrmann/ H. Schmitz-Van de Leur
(17)	pSVL-IL5R β /LIFR	Auf (13) und (11) basierendes Konstrukt, in dem der TM- und Intrazellulärbereich von gp130 durch den entsprechenden Bereich des humanen LIFR ersetzt wurden	I. Behrmann/ H. Schmitz-Van de Leur
(18)	pSVL-IL5R β /OSMR	Auf (13) basierendes Konstrukt, in dem der TM- und Intrazellulärbereich von gp130 durch den entsprechenden Bereich des humanen OSMR ersetzt wurden; dieser Bereich wurde über RT-PCR generiert	Eigene Vorarbeiten
(19)	pSVL-IL5R β /OSMR-Stop1	Auf (18) basierendes Konstrukt, in dem über PCR ein Stopkodon nach der Aminosäure XXX eingefügt wurde	Eigene Vorarbeiten
(20)	pSVL-IL5R β /OSMR-Stop4	Auf (18) basierendes Konstrukt, in dem über PCR ein Stopkodon nach der Aminosäure XXX eingefügt wurde	Eigene Vorarbeiten
(21)	pSVL-Jak1	Auf (4) basierendes pSVL-Konstrukt	Claude Haan
(22)	pSVL-Jak1 Y107A	Auf (21) basierendes Konstrukt, indem das Tyr 107 gegen Alanin ausgetauscht wurde	Claude Haan
(23)	pSVL-Jak1 L80AY81A	Auf (21) basierendes Konstrukt, indem das Leucin 80 und das Tyr 81 gegen Alanin ausgetauscht wurden	Claude Haan
(24)	pER-CFP	Expressionsplasmid für ER-Markerprotein	Clontech
(25)	pGolgi-CFP	Expressionsplasmid für Golgi-Markerprotein	Clontech
(26)	pME18S-mOSMR	Expressionskonstrukt für den murinen OSMR	M. Tanaka

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Anzucht und Lagerung von Bakterienkulturen

Die Kultivierung der Bakterien erfolgte in modifiziertem Luria-Bertani (LB)-Medium mit 1 mM MgSO_4 und 10 mM Tris/HCl (pH 8) in Gegenwart von 100 μg Ampicillin/ml in einem Schüttelinkubator bei 200 upm bzw. auf LB-Agar (1,5%) bei 37°C. Eine dauerhafte Aufbewahrung erfolgte bei -80°C in LB-Medium mit 15% Glycerin.

2.2.2 Isolierung von Plasmid-DNA im großen Maßstab

Plasmid-DNA im präparativen Maßstab (50-500 μg) wurde mit Hilfe des Maxi-Plasmidpräparationskits (Qiagen) nach Herstelleranleitung isoliert.

2.2.3 Quantitative Bestimmung von Nukleinsäuren

Die quantitative Bestimmung der DNA-Menge erfolgte photometrisch in einem UV-Spektrometer (Pharmacia) über die Extinktion bei 260 nm (E_{260}). $E_{260} = 1,0$ entspricht einer DNA-Menge von 50 μg doppelsträngiger DNA. Die Reinheit der Nukleinsäurepräparationen wurde mit Hilfe der Extinktion bei 280 nm (E_{280}) ermittelt; der Quotient $E_{260}:E_{280}$ sollte bei 1,8 - 2,0 liegen.

2.2.4 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonucleasen

Die enzymatische Restriktion von DNA erfolgte nach den Angaben der Enzymhersteller. Die Inkubationszeiten betrugen bei präparativen Ansätzen 3 h. Für einen analytischen Verdau wurden 0,5 bis 1 μg DNA, für eine präparative Restriktion bis zu 3 μg DNA eingesetzt.

2.2.5 Dephosphorylierung linearisierter DNA

Die zur Dephosphorylierung eingesetzte alkalische Phosphatase spaltet in einem pH-Bereich von 9,5 - 10,5 spezifisch die 5'-Phosphatgruppen von DNA ab; Phosphodiesterbindungen innerhalb von Nucleinsäuremolekülen werden nicht hydrolysiert. Somit lässt sich die Religation eines linearisierten Vektors verhindern. 100-200 ng DNA wurden mit 1 U alkalischer Phosphatase (Boehringer Mannheim) 1 Stunde bei 37°C nach Herstellerangaben inkubiert. Die Abtrennung des Enzyms erfolgte anschließend über Phenolextraktion [130].

2.2.6 Auftrennung von Nukleinsäuren durch Agarose-Gelelektrophorese

DNA-Fragmente der hier vorkommenden Längen lassen sich in 1 bis 2 % (w/v) Agarosegelen (SEAKEM LE Agarose, Biozym) der Größe nach auftrennen. Die Elektrophorese erfolgte in Horizontalgelapparaturen bei einer Spannung von 100 V in TAE-Puffer [130]. Als Größenstandard diente die 1Kb-Leiter (Gibco). Zugabe von Ethidiumbromid in das Gel und zum TAE-Puffer ermöglichte das Sichtbarmachen der DNA auf einem UV-Leuchttisch ($\lambda=366\text{nm}$). Zur Dokumentation diente ein *Gel print* 2000i-Gerät (MWG Biotech).

2.2.7 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Nach der Auftrennung durch Gelelektrophorese erfolgte die Isolierung der benötigten DNA-Fragmente aus dem Gel mittels Qiaex (Qiagen). Dazu wurde die gewünschte DNA-Bande aus dem Gel ausgeschnitten, die DNA laut Herstellerangaben isoliert und schließlich in 20 - 50 μl H_2O aufgenommen.

2.2.8 Ligation von DNA

DNA-Fragmente können in Gegenwart von ATP durch die T4-DNA-Ligase (AGS) verknüpft werden. Es wurden 10-50 ng Vektor und ein 2-5-facher molarer Überschuss des in den Vektor zu inserierenden DNA-Fragmentes eingesetzt. Der linearisierte Vektor wurde vor der Ligation dephosphoryliert. Die Ligationen wurden 2 Stunden lang bei 37 °C oder über Nacht bei Raumtemperatur nach Herstellerangaben durchgeführt.

2.2.9 Transformation kompetenter *E. coli*

Die Herstellung kompetenter *E. coli* erfolgte wie beschrieben [130]. Zu den Ligationsansätzen wurden 50 - 80 μl kompetenter *E. coli* pipettiert. Der Ansatz wurde gemischt, 30 min auf Eis und danach 1 - 2 min bei 42°C inkubiert und wiederum für ca. 2 min auf Eis gestellt. Nun wurde 1 ml LB-Medium zugegeben, und die Bakterien wurden 30 - 45 min bei 37°C geschüttelt. Die Bakterien wurden kurz abzentrifugiert und der Großteil des Überstands verworfen. Etwa 80 μl Bakteriensuspension wurden auf LB/Amp-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.2.10 Isolierung von Plasmid-DNA im kleinen Maßstab

2 ml LB/Amp-Medium wurden mit einzeln wachsenden Bakterienkolonien angeimpft und bei 37°C geschüttelt, bis eine erkennbare Trübung eingetreten war. Etwa 1,5 ml der Suspension wurden abgenommen, 10 sec zentrifugiert, und der Überstand wurde verworfen. Aus dem Bakterienpellet wurde die DNA mit dem Miniprep-Kit von Qiagen nach Herstellerangaben isoliert und in 50 µl Merck-H₂O aufgenommen.

2.2.11 Automatische DNA-Sequenzierung

Das Prinzip der automatischen Sequenzierung beruht auf dem Einbau fluoreszenzmarkierter Didesoxynukleotide in ein DNA-Molekül durch Polymerasereaktion und der anschließenden Anregung und Detektion der nach ihrer Größe aufgetrennten 3'-fluoreszenzmarkierten Produkte. Die Sequenzierung erfolgte mit einem ABIprism Sequenzierer Modell 310 (Applied Biosystems). Zur Präparation der DNA-Proben wurde das PRISM Ready Reaction DyeDeoxy Terminator Cycle Sequencing Kit (Perkin Elmer) nach Herstellerangaben verwendet.

2.2.12 Herstellung von pSVL-Expressionsplasmiden für Jak2 und Jak3

Über einen *EcoRI*-Verdau wurde die DNA für Jak2 bzw. für Jak3 aus den Konstrukten pRK5-Jak2 (Vektor (6)) bzw. pcDNA-Jak3 (8) herausgeschnitten, im Fall von Jak2 wurde hierfür ein partieller Verdau durchgeführt. Der Vektor pSVL (2) wurde mit *EcoRI* geöffnet, und das jeweilige *Insert* eingefügt.

2.2.13 Herstellung von pSVL bzw. pCAGGS-Expressionsplasmiden für den humanen bzw. murinen OSMR

- **Insertion der cDNA des humanen OSMR in den pSVL- bzw. pCAGGS-Vektor**

Über einen *XhoI/BglII*-Verdau wurde die DNA des humanen OSMR aus dem Expressionsvektor pDC-OSMR (12) herausgeschnitten. Diese DNA wurde in *XhoI/BamHI*-geschnittenen Leervektor pSVL (2) bzw. in *XhoI/BglII*-geschnittenen Leervektor pCAGGS (3) einligiert.

- **Insertion der cDNA des murinen OSMR in den pSVL-Vektor**

Der Expressionsvektor pME18S-mOSMR wurde mit dem Restriktionsenzym *NotI* geöffnet und die durch den Verdau entstandenen überhängenden Enden aufgefüllt. Durch einen zusätzlichen Restriktionsverdau mit *EcoRI* wurde die DNA des murinen OSMR herausgeschnitten, dieses DNA-Fragment wurde in den mit *EcoRI/SmaI*-geöffneten Vektor pSVL(2) eingefügt.

2.2.14 Herstellung von chimären Rezeptorkonstrukten

Zur Einführung der Punkt- und Deletionsmutationen in den zytoplasmatischen Bereich des OSMR wurden Standard-Klonierungstechniken eingesetzt [130, 131]. Die verschiedenen Konstrukte wurden folgendermaßen hergestellt:

- **Herstellung der verkürzten OSMR-Chimären bOst5, bOst6, bODcyt sowie der Chimären bORmu und bOst4mu**

Um verschiedene C-terminale Deletionsmutanten des OSMR herzustellen, wurden PCR-Reaktionen ausgehend von IL-5R β /OR als Matrizen-DNA durchgeführt. Über den *sense Primer* wurde jeweils eine *EcoRI*-Schnittstelle eingefügt, über die verschiedenen *reverse Primer* jeweils ein Stopcodon sowie eine *BamHI*-Schnittstelle. Somit ließen sich verschieden lange DNA-Fragmente generieren, die jeweils durch *EcoRI/BamHI*-Schnittstellen begrenzt waren. Diese Fragmente konnten in die Expressionsvektoren für IL-5R β -Konstrukte eingefügt werden. Die chimären Konstrukte β ORmu sowie β Ost4mu wurde analog zu den bereits existierenden humanen Konstrukten β OR und β Ost4 hergestellt. Dazu wurde mit Hilfe geeigneter Oligonukleotide die cDNA des Transmembran- sowie des intrazellulären Bereichs des murinen OSMR über PCR amplifiziert, wobei das Plasmid pSVL-OSMRmu als Matrize eingesetzt wurde.

- **Herstellung der Konstrukts b130DcytORBox1/2mu bzw. b130DcytORBox1/2hu**

Aus dem Expressionskonstrukt pSVL-IL-5R β /gp130mutBspTI wurde über einen *BspTI/EcoRI*-Restriktionsverdau die DNA für den intrazellulären Bereich des humanen gp130 entfernt. Über entsprechende *Primer* wurde der Box1/2-Bereich des humanen bzw. des murinen OSMR mittels PCR amplifiziert, wobei die jeweiligen pSVL-Expressionsvektoren als Matrize dienten. Über den *sense Primer* wurde jeweils eine *BspTI*-Schnittstelle, über den *reverse Primer* eine *EcoRI*-Schnittstelle eingefügt. Die PCR-Fragmente wurden mit *BspTI/EcoRI* verdaut und in den Vektor einligiert.

- **Herstellung der Deletionskonstrukte bOst1DBox1, bOst1DI, bOst4DI, der Punktmutanten bOst1mutBox1, bOst1-KKmut, bOR-AA, bOst1-AA, bOst1-3AA, bOR-E-K, bOst4 E-K, bOst4 F-S, bOst4 LII-LI sowie des Fusionskonstruktes bOst4hu-Imur**

Ausgehend von dem Ausgangskonstrukt β OR wurden über Fusions-PCR zunächst chimäre Konstrukte voller Länge mit den jeweiligen Mutationen/Deletionen/Insertionen hergestellt. In einem weiteren PCR-Schritt wurden sodann über geeignete Oligos, wie oben beschrieben, die jeweiligen verkürzten Rezeptorchimären generiert. In allen Fällen wurden über die flankierenden *Primer* jeweils eine *EcoRI* und eine *BamHI*-Schnittstelle in die PCR-Produkte eingefügt, so dass diese in einen entsprechend verdauten pSVL-IL-5R β -Expressionsvektor eingefügt werden konnten.

- **Herstellung des Konstrukts bOst4DBox1 und bOst4hu-B2mu**

Die Herstellung des Konstruktes β Ost4 Δ Box1 erfolgte in zwei Schritten: Über eine PCR wurde zunächst über einen entsprechenden *reverse Primer* Oligo der Interbox1/2-Bereich des humanen OSMR an das bei der PCR-Reaktion als Matrize dienende Ausgangskonstrukt β O Δ cyt fusioniert. In einer weiteren PCR wurde an dieses Konstrukt die Box2-Region des humanen OSMR angehängt. Das schließlich entstandene PCR-Fragment enthielt analog zu den anderen Konstrukten eine *EcoRI* sowie eine einem Stopcodon folgende *BamHI*-Schnittstelle, über welche die DNA in den entsprechend geschnittenen pSVL-IL5R β -Expressionsvektor einligiert werden konnte. Analog dazu wurde das Konstrukt β Ost4hu-B2mu hergestellt. Hier diente das Konstrukt β Ost4hu als Matrize für die PCR-Reaktion, in diesem Fall wurde über den *reverse Primer* die Box2-Region des murinen OSMR in das PCR-Produkt eingefügt.

- **Herstellung des Konstruktes OSMRDI**

Die DNA für den Extrazellulärbereich des humanen OSMR wurde aus dem pSVL-Expressionsvektor für den humanen OSMR über die Restriktionsenzyme *XhoI* und *Kpn2I* herausgeschnitten und isoliert. Das über Fusions-PCR hergestellte Konstrukt β OR Δ I wurde mit denselben Restriktionsenzymen verdaut, und das Insert einligiert.

- **Herstellung der GFP-markierten Rezeptorkonstrukte OR-GFP, ORD-I-GFP, bOst4-GFP, bOst4-AA-GFP und bOst4-3AA-GFP**

Als Ausgangskonstrukt aller GFP-markierten Konstrukte diente das gp130-Konstrukt pSVL-gp130BstEII-GFP. Aus diesem Konstrukt wurde zunächst über die *EcoRI/BamHI*-Schnittstellen das analoge chimäre Konstrukt pSVL-IL-5R β /gp130BstEII-GFP hergestellt. Über einen Verdau mit den Restriktionsenzymen *EcoRI* und *BstEII* wurde aus diesem Konstrukt die DNA für den TM- und intrazellulären Bereich von gp130 entfernt. Über PCR

wurde die cDNAs des Transmembranbereich sowie des intrazellulären Bereichs des humanen OSMR amplifiziert, wobei das Konstrukt pSVL- β OR als Matrizen-DNA diente. Für die Konstrukte β Ost4-GFP, β Ost4-AA-GFP und β Ost4-3AA-GFP wurde aufgrund des eingesetzten *reverse Primers* nur die dem TM- sowie dem Box1/2-Bereich des OSMR entsprechende c-DNA amplifiziert, hier dienten zusätzlich die Konstrukte pSVL- β OR-AA bzw. pSVL- β OR-3AA als Matrize. Über die verwendeten Oligonukleotide wurden in allen Fällen eine *EcoRI*- sowie eine *BstEII*-Schnittstelle sowie ein Stopcodon in die PCR-Produkte eingefügt. Die *EcoRI/BstEII*-verdauten PCR-Produkte konnten somit in den Vektor eingefügt werden. Das entstandene pSVL-Konstrukt β OR-GFP wurde mit den Restriktionsenzymen *XhoI* und *MscI* verdaut, wodurch die DNA für den IL5R β -Extrazellulärbereich sowie den Box1- und Interbox1/2-Bereich des chimären Konstruktes entfernt wurde. Aus den Vektoren pSVL-OR und pSVL-OR Δ I wurde über einen *XhoI/MscI*-Verdau jeweils die DNA für den OSMR-Extrazellulärbereich sowie für den Box1- und Interbox1/2-Bereich isoliert und in den Vektor einligiert.

2.3 Kultivierung und Transfektion von Zellen

2.3.1 Kultivierung eukaryontischer Zellen

Die Säugerzellen wurden in DMEM kultiviert. Den Medien wurden 10% FKS sowie 60 mg Penicillin/l und 100 mg Streptomycin/l zugesetzt. Die Zellen wurden bei 37°C in einer wassergesättigten Atmosphäre bei 5% CO₂ inkubiert. Zur Subkultivierung wurden adhärent wachsende Zellen nach Waschen mit PBS (200 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 8 mM Na₂HPO₄; 1,5 mM KH₂PO₄) mittels Trypsin/EDTA-Lösung von den Kulturschalen abgelöst. Für die Langzeitlagerung wurden die eukaryontischen Zellen in Kulturmedium nach Zusatz von 10% DMSO bei – 80 °C eingefroren und bei -196°C in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

2.3.2 Transfektion von COS-7-Zellen

Pro Transfektion wurde 1 kleine Zellkulturflasche 80-90% konfluenter Zellen eingesetzt. Jeweils 2-4 μ g DNA wurden in einem Falconröhrchen mit 2,5 ml DMEM-Medium ohne FKS gemischt. Es wurden 20 μ l DEAE/Dextran (50 mg/ml) sowie 2 μ l Chloroquin (100 mM) zugegeben und erneut gut gemischt. Die zu transfizierenden Zellen wurden einmal mit PBS gewaschen und für etwa 70-90 min mit der Transfektionslösung inkubiert, wobei der Deckel

der Zellkulturflaschen fest verschlossen war, um einen Gasaustausch mit der Umgebung zu vermeiden. Im Anschluss wurden die Zellen mit PBS gewaschen, 1 min mit PBS/10% DMSO geschockt, erneut gründlich mit PBS gewaschen und in normalem COS-7-Medium inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Zellen je nach Bedarf passagiert und nach weiteren 24 h geerntet. Alternativ wurden 70-80% konfluente Zellen auf 10 cm-Zellkulturschalen mit Fugene gemäß den Herstellerangaben transfiziert.

2.3.3 Transfektion von HeLa-, 3T3- und U4A/U4C-Zellen

Zu 60-70%iger Konfluenz gewachsene HeLa- bzw. U4A- oder U4C-Zellen wurden auf 6 cm Zellkulturplatten mit Superfekt gemäß den Herstellerangaben transfiziert, wobei 2-4µg DNA eingesetzt wurden. 3T3-Fibroblasten wurden mit Fugene transfiziert. Wenn nicht anders angegeben, wurden pCAGGS-Expressionsvektoren des humanen OSMR und pRK5-Expressions-Vektoren für Januskinasen eingesetzt.

2.4 Proteinchemische Methoden

2.4.1 Nachweis der Oberflächenexpression von Transmembranproteinen mittels Durchflusszytometrie

48 h nach Transfektion der Zellen wurden diese zweimal gewaschen, mit 3 ml PBS/EDTA (10mM) für 10-15 min bei 37°C im Brutschrank inkubiert, durch Pipettieren von den Platten abgelöst und in FACS-Röhrchen aliquotiert. Die Zellen wurden abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Zellpellets wurden in 100 µl Waschpuffer (PBS 5% FKS; 0,1% Na-Azid) mit/ohne Erstantikörper (1:100) resuspendiert und für 20-30 min auf Eis inkubiert. Zellen wurden mit 3 ml Waschpuffer gewaschen, in 100 µl Waschpuffer mit 1:100 verdünntem PE-konjugierten Zweitantikörper resuspendiert und 20 - 30 min in Dunkelheit bei 4°C inkubiert. Nach erneutem Waschen wurden die Zellen in 300 µl Waschpuffer resuspendiert. Die Messung erfolgte am *FACSCalibur* von Becton Dickinson und die Auswertung der Messungen mit der *Cellquest-Software*.

2.4.2 Nachweis der zellulären Lokalisation von Proteinen über Immunfluoreszenz

Auf Deckgläschen passagierte transfizierte COS-7-Zellen wurden zweimal mit PBS++ (1 mM MgCl_2 ; 0,1 mM CaCl_2 in PBS) gewaschen, 20 min in 2-3% Paraformaldehyd bei Raumtemperatur fixiert und 5 min mit 50 mM NH_4Cl behandelt. Zellen wurden 30 min mit Blockingpuffer (PBS++; 1% BSA) und 30 min in Erstantikörperlösung (1:100 in PBS++; 0,2 % BSA) inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in PBS++/ 0,2% BSA wurden Zellen mit FITC- oder TRITC-konjugiertem Zweitantikörper (1:100) für 30 min inkubiert. Nach erneutem Waschen wurde bei Bedarf eine zweite Färbung wie beschrieben durchgeführt. Nach Abschluss aller Antikörperinkubationen wurden die Deckgläschen mit Mowiol auf den Objektträgern fixiert. Zur Kolokalisationsstudie GFP-markierter Rezeptoren wurden Zellen vor der Fixierung in Paraformaldehyd 2h mit Lysotracker TM inkubiert. In diesem Fall unterblieb eine weitere Anfärbung von Proteinen mit Antikörpern. Die Auswertung der Lokalisationsstudien erfolgte am *Laserscanning*-Mikroskop LSM 510 von Zeiss.

2.4.3 Nachweis von Proteinen im Zellysat

Herstellen von Zellysaten

Zellen wurden 24 h nach der letzten Passage zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen und in 500 μl Lysispuffer (20 mM Tris/HCl pH 7,6; 150 mM NaCl; 10 mM NaF; 1% Triton bzw. Brij-Detergenz; 1 mM Na-Vanadat; 1 mM PMSF; 5 mg/ml Aprotinin; 5 mg/ml Leupeptin) von den Zellkulturplatten geschabt. Die Zellen wurden in Eppendorfgefäße überführt, 30 min auf Eis inkubiert, kurz gevortext und bei 13000 upm 10 min abzentrifugiert. Der Überstand (=Lysat) wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt und die Proteinmenge des Lysats nach Bradford bestimmt. Lysate wurden bei -20°C aufbewahrt.

Proteinmengenbestimmung nach Bradford

Vier Teile Wasser und ein Teil Bradfordreagenz wurden gemischt. Pro Probe wurden in 1 ml dieses Ansatzes 5 μl der Proteinlösung gegeben und nach kurzem Vortexen für 5 min bei RT inkubiert. Die Absorption bei 595 nm wurde gemessen und daraus die Proteinkonzentration bestimmt, wobei angenommen wurde, dass eine Absorption von 0,063 einer Proteinmenge von 1 μg entspricht.

SDS Gelelektrophorese

Proteine lassen sich mittels diskontinuierlicher SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli ihrer Größe nach auftrennen. Dabei liegen die Proteine

denaturiert vor, durch das angelagerte SDS besitzen sie eine negative Nettoladung, evtl. vorhandene Disulfidbrücken werden durch das Mercaptoethanol reduziert. Somit ergibt sich als bestimmender Faktor für die elektrophoretische Beweglichkeit der Proteine deren Größe, die sich unter diesen Bedingungen etwa proportional zum Molekulargewicht verhält. Durch Fokussierung der Proteine im Sammelgel erhält man in diesem System relativ scharfe Proteinbanden. Die Elektrophorese erfolgte in einer vertikalen Flachgelkammer von Biometra nach Herstellerangaben. Als Größenstandard diente der *Rainbow*-Marker (Amersham).

Western Blot

Die PVDF-Membran wurde kurz in Methanol, 5 min in H₂O und 15 min in Anodenpuffer II (0,025 M Tris; 20% Methanol) und das Gel 5 min in Kathodenpuffer (0,40 M 6-Aminohexansäure; 20% Methanol) inkubiert. In einer *Blotting*-Kammer wurden fünf in Anodenpuffer I (0,025 M Tris; 20 % Methanol) und zwei in Anodenpuffer II getränkte *Whatman*-Filter in Gelgröße luftblasenfrei übereinander geschichtet, darauf wurden die PVDF-Membran, das Gel und schließlich fünf in Kathodenpuffer getränkte Filter gelegt. Die Kammer wurde mit 1 kg Gewicht beschwert, und das *Blotten* erfolgte für 1 h mit 0,8 mA/cm², wobei der Boden der Kammer die Anode und der Deckel die Kathode bildeten. Nach Beendigung des Blotvorganges wurde die Membran in TBS-N (2,42 g/l Tris-Base; 8 g/l NaCl; 3,8 ml/l 1 M HCl, pH 7,6; 0,1 % (v/v) Nonidet P-40) bei 4°C gelagert, die Detektion erfolgte mit dem ECL-System.

ECL-Detektion

Diese Detektionsmethode beruht auf der Markierung der Zweitantikörper mit dem Enzym Meerrettich-Peroxidase. Die Detektionslösung enthält ein Substrat für das Enzym, während dessen Umsetzung es zu Freisetzung von Licht kommt. Diese Chemilumineszenz kann mit einem Röntgenfilm detektiert werden. Die Membran wurde zunächst mit 10%igem BSA in TBS-N für 10 min auf dem Schüttler inkubiert, um freie Bindungsstellen abzusättigen. Es wurde zweimal mit TBS-N gewaschen, und der Erstantikörper wurde - verdünnt in TBS-N - zugefügt. Nach 1 h Inkubation wurde mehrmals mit TBS-N gewaschen, der HRP-markierte Zweitantikörper zugegeben, und die Blots wurden für 1/2 h inkubiert. Es wurde, wie oben beschrieben, gewaschen, die ECL-Detektionslösungen A und B (Amersham) wurden zu gleichen Teilen gemischt und der Blot für 1 min im Detektionsgemisch inkubiert. Der Blot wurde in Folie gewickelt und mit der Proteinseite nach unten auf einen Röntgenfilm gelegt, der für wenige sec bis zu 20 min exponiert wurde. Vor weiteren Detektionen wurden die Membranen in 2% SDS; 100 mM β -Mercaptoethanol in 62,5 mM Tris-HCl (pH 6,7) „gestrippt“.

2.4.4 Nachweis der Assoziation von Janus-Kinasen an die IL-5R β -Chimären mittels Koimmunpräzipitationen

Durch Koimmunpräzipitationen lässt sich die Assoziation von Proteinen, wie z.B. Janus-Kinasen, an Zytokinrezeptoren nachweisen. Das Prinzip beruht darauf, dass man zunächst das zu untersuchende Protein - hier die IL5R β /OSMR-Chimären - an Sepharose koppelt. Dies geschieht über spezifische Antikörper gegen den Extrazellulärbereich des IL-5R β , welche wiederum durch Protein-A an die Sepharose gebunden werden. Die Rezeptoren lassen sich somit über die Sepharose aus dem Zelllysate aufreinigen. Lagen die Rezeptoren im Lysat wiederum mit anderen Proteinen, z.B. Janus-Kinasen, assoziiert vor, so sollten auch diese noch an die Sepharose gebunden und damit nachweisbar sein. Für die Koimmunpräzipitationen wurden transfizierte COS-Zellen in Brij-Lysispuffer lysiert und Lysate 18 h mit je 1 μ g Antikörper gegen den IL-5R β (S-16) inkubiert. Am nächsten Tag wurden je 5 mg in Lysispuffer gequollene Protein-A-Sepharose zu den Lysaten pipettiert und Lysate für 1-2 h im Überkopfschüttler inkubiert. Die Sepharose wurde abzentrifugiert, zweimal in Brij-Waschpuffer (entspricht Brij-Lysispuffer, enthält aber nur 0,1% Brij) gewaschen, in 2x Laemmli-Puffer aufgenommen und 5 min bei 95° C denaturiert.

2.4.5 Nachweis des Glykosylierungsstatus von Rezeptorchimären mittels Endoglykosidase H-Verdau

Aus Triton-Lysaten von transient transfizierten COS-Zellen wurden die Rezeptoren wie unter 2.4.4 beschrieben präzipitiert. Die Sepharose wurde einmal in Zitratpuffer (200 mM Natriumzitrat, pH 5,5) gewaschen, in 100 μ l Zitratpuffer mit/ohne 5 mU Endoglykosidase H resuspendiert und für 18h – 24h bei 37°C im Schüttler inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Sepharose einmal gewaschen, in 2x Laemmli-puffer aufgenommen und bei 94°C denaturiert. Der Überstand wurde auf ein 7,5%iges SDS-Gel aufgetragen. Nach erfolgter Gel-elektrophorese wurde geblottet und die Membran mit Antikörpern gegen IL-5R β detektiert.

3 Ergebnisse

3.1 Die Regulation der OSMR-Oberflächenexpression durch Januskinasen

3.1.1 Die Koexpression von Jak1 erhöht die Oberflächenexpression des humanen Oncostatin M-Rezeptors

COS-7 Zellen wurden transient mit Expressionsplasmiden für den OSMR sowie für die Tyrosinkinase Jak1 oder Tec transfiziert und die Oberflächenexpression des OSMR mittels FACS-Analyse untersucht. Ein Vergleich der transfizierten Zellen ergab, dass immer dann, wenn Jak1 koexprimiert wurde, deutlich mehr Zellen eine hohe Oberflächenexpression des OSMR aufwiesen (siehe Pfeile in Abb. 7A). Dieser Effekt konnte auch statistisch belegt werden: Hierzu wurde zunächst die Population untransfizierter Zellen – offene Histogramme – von der der transfizierten Zellen – graue Histogramme – abgezogen. Betrachtet man nun die mittlere Fluoreszenz (mF), so liegt diese in Jak1-koexprimierenden Zellen deutlich oberhalb der mittleren Fluoreszenz von Tec-koexprimierenden Zellen (Abb. 7, B + C).

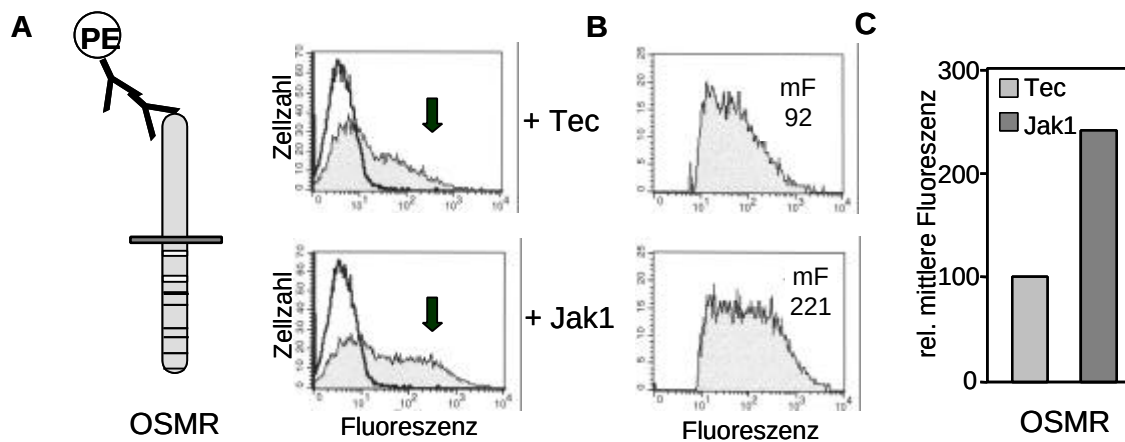


Abbildung 7: Effekt von Jak1 auf die Oberflächenexpression des humanen OSMR. COS-7 Zellen wurden transient mit Expressionsvektoren für den OSMR sowie Tec oder Jak1 transfiziert, nach 24h passagiert und am nächsten Tag geerntet. **A:** Der Nachweis des an der Zellmembran exprimierten OSMR erfolgte, wie im Schema dargestellt, über Antikörperfärbung. Dazu wurden die transfizierten Zellen mit Antikörpern gegen den Extrazellulärbereich des OSMR und dann mit PE-konjugierten Zweitantikörpern inkubiert. Die PE-vermittelte Fluoreszenz der Zellen wurde im Durchflusszytometer gemessen. Mit Erst- und Zweitantikörper inkubierte Zellen sind im grauen Histogramm wiedergegeben, das darüber gelegte offene Histogramm entspricht Zellen, die nur mit Zweitantikörper behandelt wurden. **B:** Um die mittlere Fluoreszenz (mF) transfizierter Zellen zu ermitteln, wurde von den erhaltenen Histogrammen jeweils das Kontrollhistogramm (offen) abgezogen. **C:** Im Weiteren wurde die so ermittelte mittlere Fluoreszenz in Diagrammform dargestellt.

Um auszuschließen, dass es sich hierbei um einen COS-7-Zell-spezifischen Effekt handelte, wurden jetzt auch andere Zelllinien untersucht: tatsächlich führte die Jak1-Koexpression auch in transfizierten humanen HeLa-Zervixkarzinomzellen und in murinen 3T3-Fibroblasten zu einer erhöhten Oberflächenexpression des ektopisch exprimierten OSMR (Abb. 8).

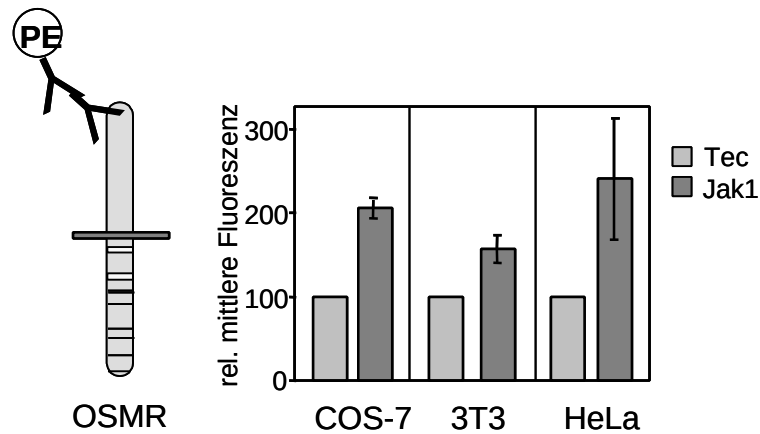


Abbildung 8: Erhöhung der OSMR-Oberflächenexpression durch die Koexpression von Jak1 in mehreren Zelllinien. COS-7-Zellen, murine 3T3-Fibroblasten und humane HeLa-Zervixkarzinomzellen wurden transient mit Expressionsvektoren für den humanen OSMR und Tec oder Jak1 transfiziert. Nach 48h wurde die mittlere Fluoreszenz transfizierter Zellen über Durchflusszytometrie bestimmt, wie in der Legende zu Abb. 7 beschrieben. Für die Auswertung wurden die erhaltenen mittleren Fluoreszenzen auf die Fluoreszenzwerte der Tec-koexprimierenden Zellen normiert. Dargestellt sind die Mittelwerte sowie die Standardabweichungen aus mindestens drei unabhängigen Versuchen.

Diese ersten Befunde warfen die Frage auf, ob sich die Koexpression von Jak1 auch auf die Oberflächenexpression der signaltransduzierenden Rezeptoruntereinheiten der anderen IL-6-Typ-Zytokine positiv auswirkt. Deshalb wurden nun COS-7-Zellen auch mit cDNA für gp130 und LIFR transfiziert. In diesem Fall zeigte sich aber, dass beide Rezeptoren nach Jak1-Koexpression nur in geringem Maße verstärkt an der Zelloberfläche zu finden waren (Abb. 9A). Aus diesem Umstand lässt sich schließen, dass die Jak1-vermittelte Rezeptorhochregulation an der Plasmamembran – zumindest in dieser Größenordnung – spezifisch für den OSMR ist. Erschwert wurde die weitere Analyse dieser Befunde durch die Tatsache, dass sich der OSMR – im Gegensatz zu gp130 und LIFR – bisher mangels eines geeigneten Antikörpers im Westernblot nicht detektieren lässt. Es ließ sich also nicht klären, ob Jak1 eventuell einen positiven Effekt auf die Gesamtexpression des OSMR und damit indirekt auch auf dessen Oberflächenexpression hat. Bei gp130 und dem LIFR war kein Einfluss der Jak1-Koexpression auf die Rezeptorexpression erkennbar (Abb. 9B).

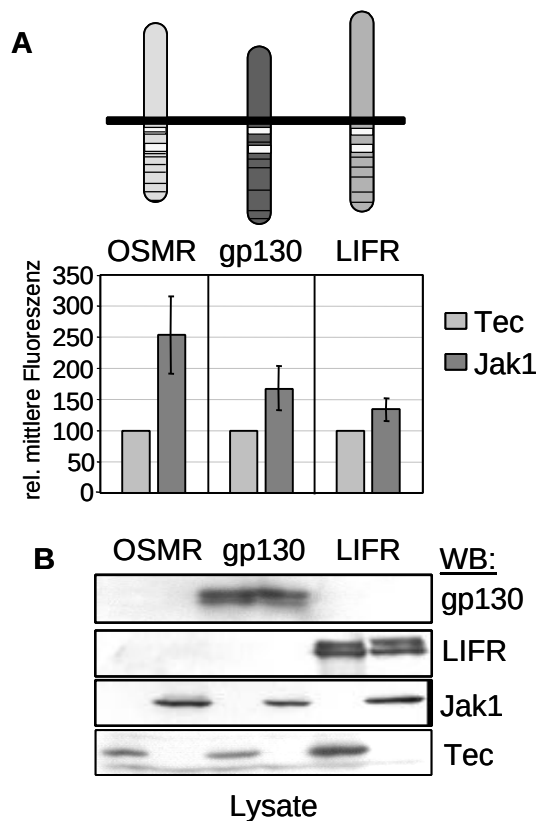


Abbildung 9: Effekt von Jak1 auf die Oberflächenexpression von gp130 und dem LIFR. Der OSMR, gp130 oder der LIFR wurden jeweils transient in COS-7-Zellen mit Tec oder Jak1 koexprimiert. 48h nach Transfektion wurden die Zellen geerntet. **A:** Die Oberflächenexpression der Rezeptoren wurde über Durchflusszytometrie bestimmt. Die Färbung der Rezeptoren erfolgte mit monoklonalen Antikörpern gegen die jeweilige Extrazellulärregion von OSMR, gp130 oder LIFR und einem PE-konjugierten Zweitantikörper. Die erhaltenen Werte wurden jeweils auf die mittlere Fluoreszenz der Tec-exprimierenden Zellen normiert. Mittelwerte und Standardabweichung aus mindestens drei unabhängigen Versuchen sind dargestellt. **B:** Ein Teil der Zellen wurde in Triton-Lysispuffer lysiert, die Proteine über SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) aufgetrennt und auf PVDF-Membranen transferiert. Die Membranen wurden mit Antikörpern gegen die angegebenen Proteine sowie mit den erforderlichen HRP-konjugierten Zweitantikörpern inkubiert und die so angefärbten Proteine mit dem ECL-System detektiert.

3.1.2 Chimäre Rezeptoren verhalten sich bezüglich der Hochregulation durch Jak1 wie die jeweiligen Wildtyp-Rezeptoren

Um vergleichbare, quantitative Aussagen über die Gesamtexpression der verschiedenen IL-6-Typ-Zytokinrezeptoren machen zu können, wurden in weiteren Experimenten bereits existierende Rezeptorchimären eingesetzt, welche sich per Durchflusszytometrie und Westernblot sehr gut nachweisen lassen. Die Konstrukte bestehen jeweils aus dem extrazellulären Bereich der β -Kette des IL-5-Rezeptors, die mit dem Transmembran- und intrazellulären Bereich von gp130, LIFR oder OSMR fusioniert ist. Im Fall des OSMR wurde das C-terminal um 20 AS verkürzte Konstrukt β Ost1 benutzt, da sich in früheren Versuchen schon erwiesen hatte, dass diese Chimäre bedeutend besser exprimiert wird als das unverkürzte Konstrukt β OR [20]. Wie aus Abbildung 10 ersichtlich ist, verhalten sich alle untersuchten Rezeptorchimären bezüglich der Jak1-Koexpression analog zu den jeweiligen Wildtyp-Rezeptoren. So ergab die durchflusszytometrische Untersuchung transfizierter COS-7-Zellen eine signifikant erhöhte Oberflächenexpression der Chimäre β Ost1, wenn Jak1 koexprimiert wurde; die Oberflächenexpression der Chimären β 130 und β LIFR änderte sich hingegen durch Jak1-Koexpression nur unwesentlich (Abb. 9B). Mittels Westernblotanalyse der zellulären Lysate

konnte nun auch die Gesamtexpression der verschiedenen Rezeptoren überprüft werden: diese änderte sich in keinem Fall. Allerdings war bemerkenswert, dass das Konstrukt β Ost1 in der Westernblotanalyse nur als einzelne Bande detektierbar war, wohingegen die Rezeptorchimären β 130 und β LIFR wie schon die jeweiligen Wildtyp-Rezeptoren (Abb. 9B) das für glykosylierte Transmembranproteine typische Erscheinungsbild einer Doppelbande aufwiesen (Abb. 10B). Hierbei entspricht die obere, langsamer migrierende Bande im Allgemeinen vollständig prozessierten, komplex-glykosylierten Rezeptoren, während die untere, schneller migrierende Bande sich aus unreifen Rezeptoren mit Mannose-reicher Glykosylierung zusammensetzt. Nach längeren Expositionszeiten war teilweise auch bei dem im Verhältnis zu β LIFR und β 130 generell sehr schlecht exprimierten Konstrukt β Ost1 eine Doppelbande erkennbar, die jedoch nur in Zelllysaten aus Jak1-koexprimierenden Zellen auftrat. Ein repräsentativer Blot ist in der untersten Reihe in Abbildung 10B abgebildet, der Pfeil markiert die zusätzliche, obere Rezeptorbande. Diese Befunde deuten auf einen grundlegenden Unterschied zwischen dem chimären OSMR auf der einen und den gp130- und LIFR-Chimären auf der anderen Seite hin: während gp130 und LIFR unabhängig von gleichzeitiger Jak1-Koexpression an der Oberfläche exprimiert bzw. vollständig prozessiert werden, scheint dies beim OSMR nicht der Fall zu sein.

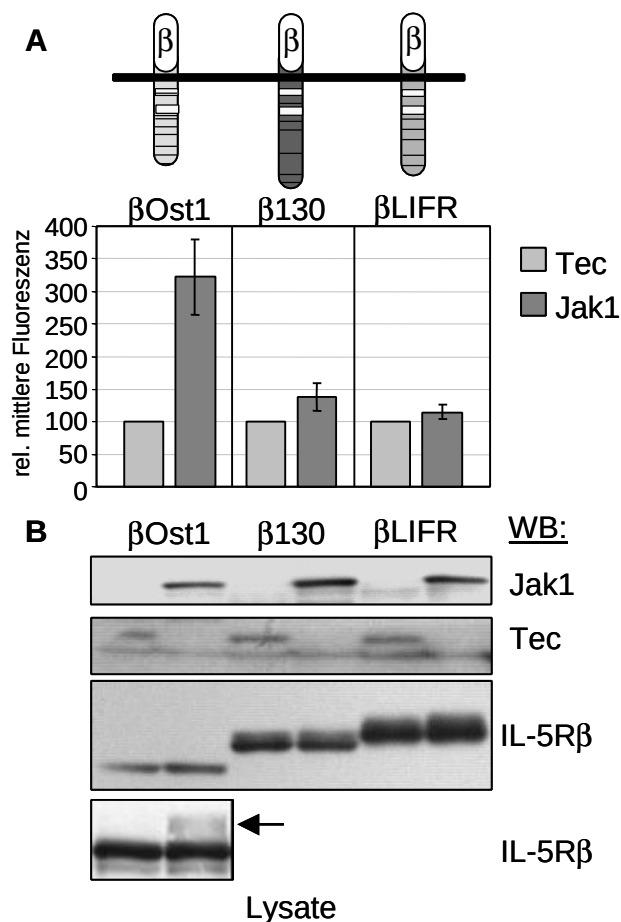


Abbildung 10: Hochregulation chimärer Rezeptoren durch die Koexpression von Jak1. Die jeweiligen Rezeptorchimären sowie Tec oder Jak1 wurden transient in COS-7-Zellen exprimiert und die Zellen 48h nach Transfektion geerntet. **A:** Die Oberflächenexpression der chimären Rezeptoren wurde über Durchflusszytometrie analysiert. Dazu wurden die Zellen mit monoklonalem Antikörper gegen den Extrazellulärbereich des IL-5R β sowie einem PE-konjugierten Zweitantikörper inkubiert. Die über Durchflusszytometrie erhaltenen Fluoreszenzwerte wurden auf Tec-koexprimierende Zellen normiert. Mittelwerte und Standardabweichungen aus mindestens drei Versuchen sind dargestellt. **B:** Ein Teil der Zellen wurde lysiert und die angegebenen Proteine nach gelelektrophoretischer Auftrennung im Westernblot detektiert. Die Resultate sind repräsentativ für drei unabhängige Experimente. Im Fall des chimären OSMR sind die Rezeptorfärbungen aus zwei verschiedenen Lysaten dargestellt.

3.1.3 Die Koexpression von Jak1 führt zu einem Anstieg von Endo H-resistenten, vollständig prozessierten Rezeptoren

Um den Einfluss von Jak1 auf die Prozessierung des chimären OSMR zu überprüfen, wurde im Folgenden zunächst untersucht, ob es sich bei der zusätzlichen, langsamer migrierenden Rezeptorbande tatsächlich um Rezeptoren mit komplexer Glykosylierung handelt. Hierzu wurde die transient in COS-7-Zellen exprimierte Rezeptorchimäre β Ost1 zunächst über Immunpräzipitation aus Zelllysaten angereichert und dann einem Endoglykosidase H (Endo H)-Verdau unterzogen. Mit Hilfe dieser Methode lassen sich vollständig prozessierte, Endo H-resistente-, von unvollständig prozessierten, Endo H-sensitiven Rezeptoren unterscheiden. Tatsächlich bestätigte sich, dass es sich bei der oberen Rezeptorbande um Endo H-resistente Formen des Rezeptors handelt (Abb. 11A, schwarze Pfeilspitze), während sich die schneller migrierende, untere Rezeptorbande als Endo H-sensitiv erwies (Abb. 11A, weiße Pfeilspitzen). Die Breite der oberen Rezeptorbande spricht dafür, dass sich die vollständig prozessierten Rezeptoren durch eine relativ heterogene Glykosylierung auszeichnen, was die große Variabilität bezüglich der elektrophoretischen Mobilität erklärt.

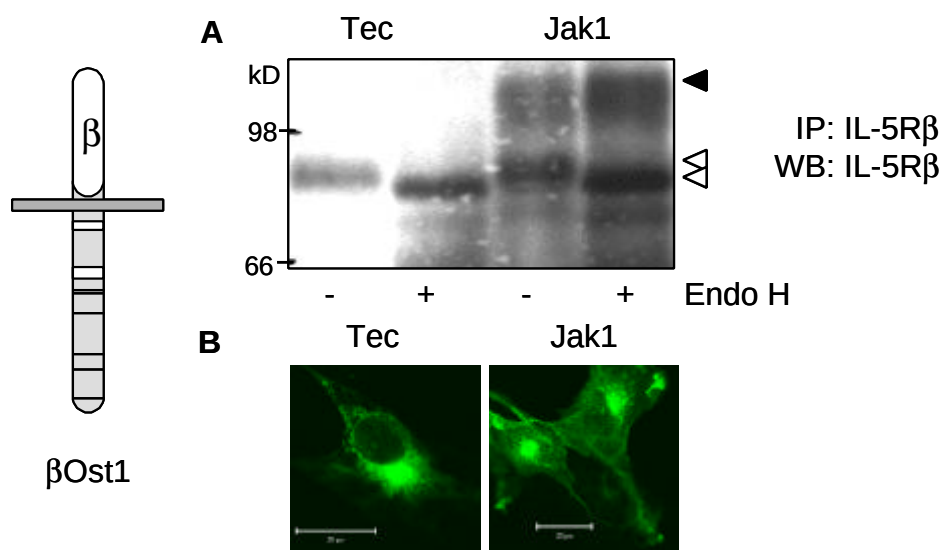


Abbildung 11: Einfluss von Jak1-Koexpression auf die Prozessierung und zelluläre Lokalisation von chimärem OSMR. In COS-7-Zellen wurde die Rezeptorchimäre β Ost1 mit Tec oder Jak1 koexprimiert. 24h nach Transfektion wurden Zellen passagiert und am nächsten Tag die Versuche durchgeführt. **A:** Die β -Chimären wurden aus Triton-Zelllysaten präzipitiert und einem Endo H-Verdau unterzogen. Präzipitate wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und die Westernblots mit Antikörpern gegen die Rezeptoren angefärbt. **B:** Für die Immunfluoreszenz-Untersuchungen wurden die auf Deckgläschen ausgesäten Zellen fixiert, permeabilisiert und die Rezeptoren mit monoklonalen IL-5R β -Antikörpern sowie FITC-konjugierten Zweitantikörpern angefärbt. Die Zellen wurden in Mowiol eingebettet, und am nächsten Tag wurden Aufnahmen der Zellen mit einem ZEISS-Laserscanning-Mikroskop gemacht. Bilder von repräsentativen Zellen sind abgebildet.

Nun lässt das Glykosylierungsmuster von Transmembranproteinen Rückschlüsse auf deren Lokalisation innerhalb der Zelle zu: unreife Proteine mit Mannose-reicher Glykosylierung finden sich normalerweise nur im ER und *cis*-Golgi; während der Passage durch den Golgiapparat erfolgt das „Trimmen“ der Mannosereste und die Anlagerung von anderen Zuckerresten, z.B. Galaktose. Die komplex-glykosylierten Proteine werden dann zur Plasmamembran oder zu anderen Zielorganellen transportiert [121]. Da in Abwesenheit von koexprimiertem Jak1 ein Großteil der Rezeptorchimären eine Mannose-reiche Glykosylierung aufwies, sollte der Hauptanteil der in der Zelle exprimierten Rezeptoren im ER oder *cis*-Golgi zu finden sein. Um dies zu überprüfen, wurde die Lokalisation der Rezeptoren in transfizierten, permeabilisierten COS-7-Zellen nun mittels Immunfluoreszenz untersucht. Dabei zeigte sich, dass in Abwesenheit von Jak1 tatsächlich der überwiegende Teil der Rezeptoren in intrazellulären Kompartimenten vorlag, nur bei zusätzlicher Jak1-Koexpression ließen sich Rezeptoren auch deutlich an der Zelloberfläche nachweisen (Abb. 11B).

3.1.4 Die Rezeptorbindung von Jak1 ist für die Jak1-vermittelte Erhöhung der OSMR-Oberflächenexpression unbedingt erforderlich

Um zu klären, ob Jak1 direkt oder indirekt auf die Prozessierung und Oberflächenlokalisierung des OSMR einwirkt, wurde im Folgenden untersucht, ob die Jak1/OSMR-Interaktion eine Voraussetzung für die Jak1-vermittelten Effekte darstellt. Es ist bekannt, dass für die Jak-Rekrutierung an Zytokinrezeptoren die membranproximale, prolinreiche Box1-Region von besonderer Bedeutung ist [4]. Deshalb wurden zwei Rezeptorchimären hergestellt, in denen die zwei der drei Prolinreste in der OSMR-Box1-Region, P775 und P777, zu Alanin mutiert (β Ost1mutBox1) oder die Box1 vollständig deletiert war (β Ost1 Δ Box1). Diese Konstrukte sollten nicht mehr zu einer Jak1-Bindung in der Lage sein. Tatsächlich bestätigten Bindungsstudien diese Annahme: so konnte Jak1 aus COS-Zelllysaten nur mit dem β Ost1-Konstrukt, nicht aber mit den beiden Box1-Rezeptormutanten kopräzipitiert werden (Abb. 12C). Gleichzeitig zeigten FACS-Analysen, dass sich die Oberflächenlokalisierung dieser zwei Konstrukte in COS-7-Zellen durch Jak1-Koexpression nicht signifikant steigern ließ (Abb. 12B).

In weiteren Versuchen wurden nun zwei Jak1-Konstrukte eingesetzt, welche in der N-terminalen, für die Rezeptorbindung wichtigen, β -*grasp* Domäne mutiert sind. Abb. 12D zeigt ein Modell dieser Domäne, in dem die wichtigen Aminosäuren hervorgehoben sind. Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Aminosäuren L80, Y81 und Y107 für die gp130/Jak1-Interaktion von Bedeutung sind: ihre Mutation zu Alanin führte bei den resultierenden

Konstrukten zum Verlust der Assoziation mit gp130 [24]. Dasselbe Verhalten offenbarten diese Konstrukte auch in Bindungsstudien mit chimärem OSMR: Weder L80AY81A noch Y107A ließ sich, im Gegensatz zu Wildtyp-Jak1, mit β Ost1 kopräzipitieren (Abb. 12F). Wie bereits bei den Box1-Rezeptormutanten beobachtet, korrelierte die fehlende Rezeptorassoziation dieser Jak1-Mutanten mit dem Befund, dass keines dieser Konstrukte die Oberflächenexpression des Konstruktes β Ost1 beeinflussen konnte (Abb. 12E). Somit scheint die Jak1-Bindung an den chimären OSMR für dessen verstärkte Präsenz an der Zelloberfläche eine Grundvoraussetzung zu sein, was für einen direkten Effekt von Jak1 auf die OSMR-Prozessierung spricht.

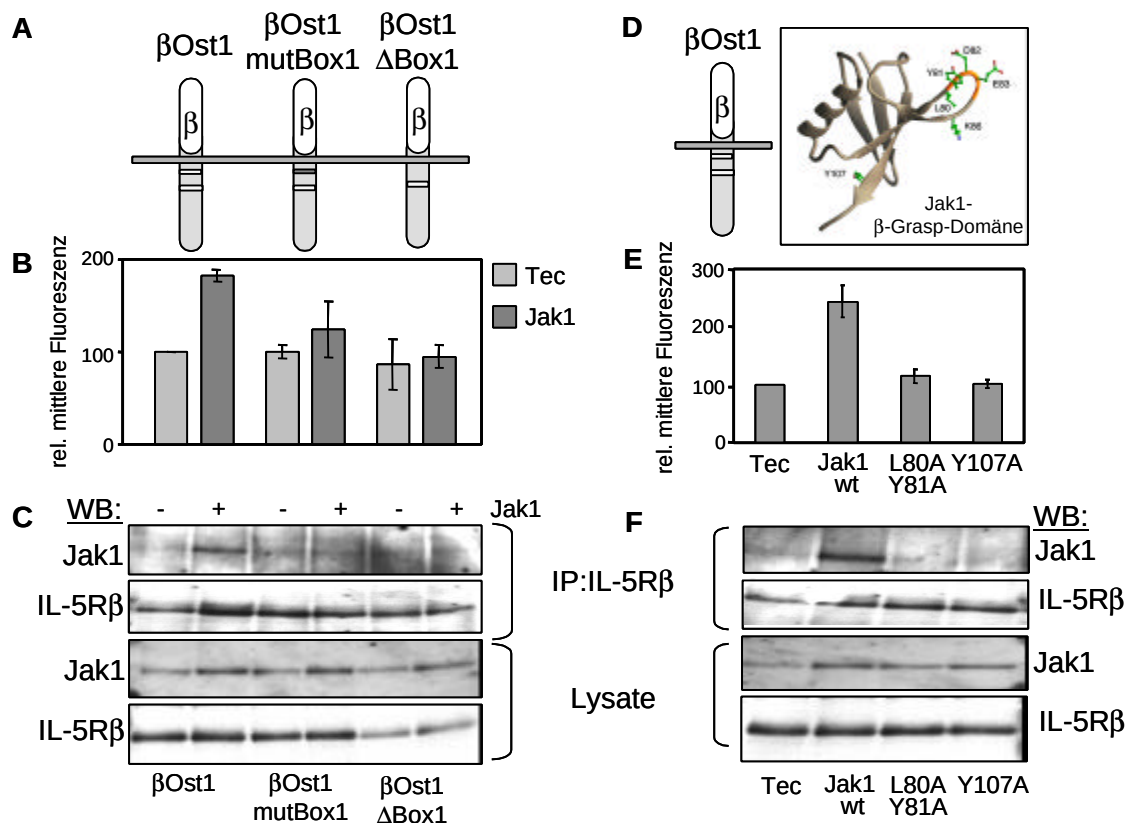


Abbildung 12: Für die Jak1-vermittelte Hochregulation des chimären OSMR an der Zelloberfläche ist die Jak1/Rezeptor-Interaktion erforderlich. COS-7-Zellen wurden mit Expressionsplasmiden für die angegebenen Rezeptorkonstrukte und Tec bzw. Jaks transfiziert. Nach 48h wurden die Zellen geerntet. **A:** Schema der transient exprimierten Rezeptormutanten. **D:** Modell der Jak1- β -grasp-Domäne, wichtige Aminosäuren sind hervorgehoben. **B + E:** Die Oberflächenexpression der Chimären wurde über FACS-Analyse bestimmt. Versuchsdurchführung und Auswertung erfolgte wie in der Legende zu Abb. 10 beschrieben. **C+F:** Für die Bindungsstudien wurden Zelllysate in Brij-Lysispuffer hergestellt. Rezeptorchimären wurden präzipitiert, die Präzipitate gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf PVDF-Membranen transferiert. Die Rezeptoren bzw. die kopräzipitierten Proteine wurden mit den jeweiligen Antikörpern und HRP-konjugierten Zweitantikörpern detektiert.

3.1.5 Die Kinaseaktivität von Jak1 ist für die verstärkte Plasmamembran-Lokalisation des OSMR unerheblich

In früheren Studien konnten wir zeigen, dass die Jak1-Koexpression mit chimärem OSMR zu dessen Tyrosinphosphorylierung führt, woraufhin verschiedene, an der OSM-Signaltransduktion beteiligte Proteine wie STAT3 oder Shc an den phosphorylierten Rezeptor rekrutiert werden können und mit diesem koimmunpräzipitierbar sind [56]. Es wäre daher vorstellbar, dass Signaltransduktionsprozesse für die Hochregulation der OSMR-Chimäre an der Oberfläche verantwortlich sind. Um dies zu klären, wurden im Weiteren Experimente mit einer Kinase-negativen Variante von Jak1 (Jak1-KE) durchgeführt, welche durch Austausch des an der ATP-Bindung beteiligten Lysins im aktiven Zentrum der Kinase generiert wurde [132]. In Koimmunpräzipitations-Experimenten konnte gezeigt werden, dass sowohl Jak1 als auch Jak1-KE an den Rezeptor binden können (Abb. 13B). Im Gegensatz zu Jak1-KE führt die Koexpression von Jak1-wt zur Rezeptorphosphorylierung, welche sich indirekt durch die Kopräzipitation von endogenem STAT3 mit dem Rezeptor nachweisen lässt (Abb. 13B). Wie aus den durchflusszytometrischen Messungen deutlich wird, ist aber eine Rezeptorphosphorylierung für die Jak1-vermittelte Hochregulation des OSMR unerheblich: sowohl Jak1-wt als auch Jak1-KE führen zu einer signifikanten Zunahme der Plasmamembranlokalisation des transient exprimierten β Ost1-Konstrukts (Abb. 13A). Somit lässt sich zusammenfassend sagen, dass die Jak1 Bindung an den Rezeptor, nicht aber die Jak1-Kinaseaktivität für die Erhöhung der OSMR-Oberflächenexpression erforderlich ist.

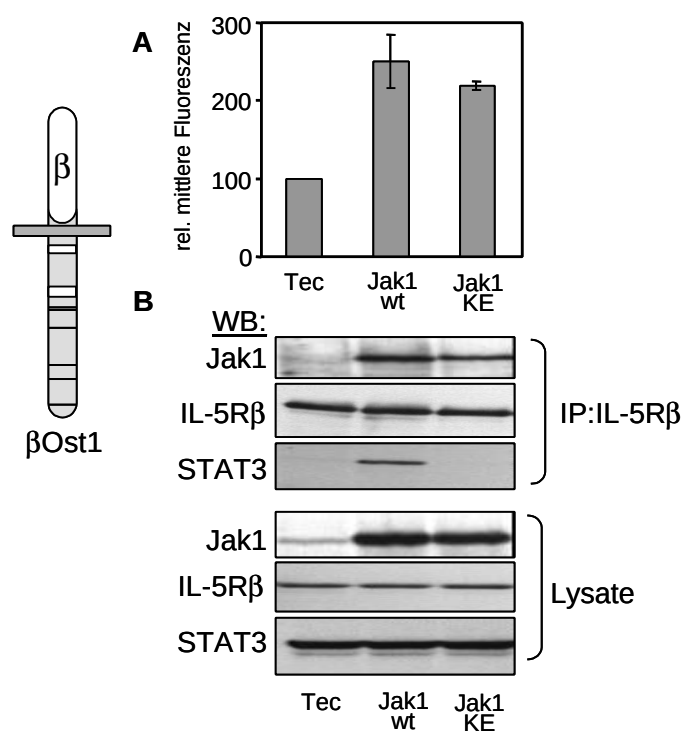


Abbildung 13: Die Kinaseaktivität von Jak1 ist für die Hochregulation des chimären OSMR an der Zelloberfläche unerheblich. COS-7-Zellen wurden mit Expressionsvektoren für den chimären OSMR sowie Tec (Kontrolle), Jak1-wt bzw. Jak1-KE transfiziert. Nach 48h wurden die Zellen geerntet. **A:** Die Oberflächenexpression der Chimären wurde über FACS-Analyse bestimmt, Färbung der Rezeptoren und Auswertung erfolgte wie in der Legende zu Abb. 10 beschrieben. **B:** Die Koimmunpräzipitationen wurden durchgeführt wie in der Legende zu Abb. 12 beschrieben. Zusätzlich wurden die Blots mit Antikörper gegen STAT3 angefärbt.

3.1.6 Die membranproximale Region des OSMR verhindert dessen effiziente Oberflächenexpression

Jak1 könnte die Prozessierung und damit die Oberflächenlokalisierung des OSMR auf zweifache Weise beeinflussen. Zum einen wäre denkbar, dass Jak1 selbst über ein Signal verfügt, welches sich bei Bindung an den OSMR positiv auf dessen Prozessierung auswirkt. Zum anderen besteht die Möglichkeit, dass der OSMR in seiner zytoplasmatischen Region ein negativ-regulatorisches Signal enthält. An den Rezeptor assoziierte Jak1 würde dieses Signal maskieren und somit eine erhöhte Rezeptorprozessierung ermöglichen. Da die Jak1-Bindung an die membranproximale Box1/2-Region von Zytokinrezeptoren erfolgt, sollte ein solches negativ-regulatorisches Signal in dieser Region lokalisiert sein. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden zwei Deletionskonstrukte generiert, die in Abb. 14A schematisch dargestellt sind. Während das Konstrukt β Ost4 direkt nach der Box2-Region deletiert ist, enthält das Konstrukt β O Δ cyt nur noch drei zytoplasmatische Aminosäuren. COS-7-Zellen wurden mit den drei Konstrukten β Ost1, β Ost4 und β O Δ cyt transfiziert, und deren Expression mittels FACS und Westernblot analysiert.

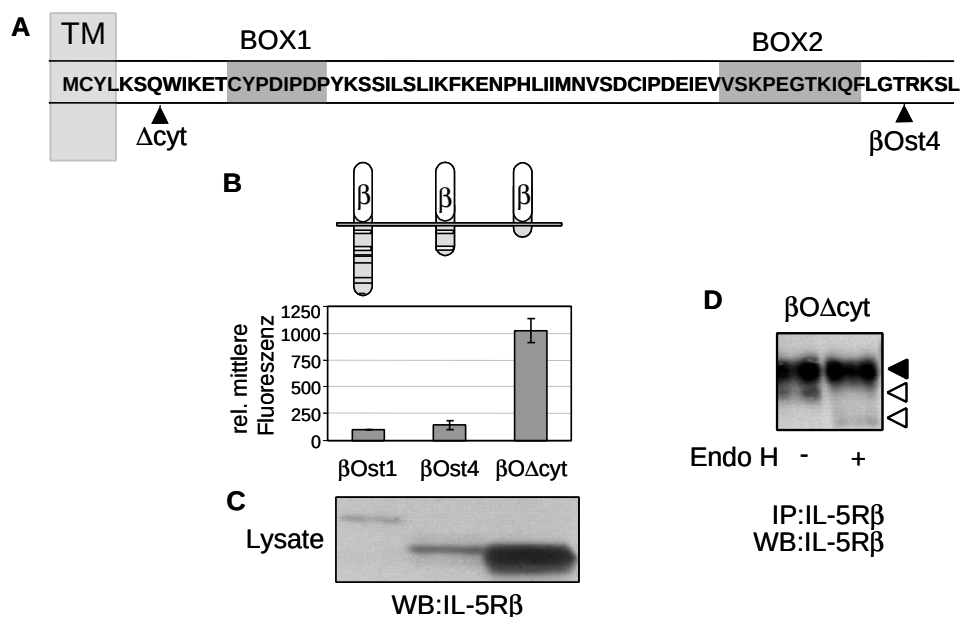


Abbildung 14: Einfluss des membranproximalen Bereiches des OSMR auf dessen Oberflächenexpression. Die verkürzten Rezeptorchimären β Ost1, β Ost4 und β O Δ cyt wurden transient in COS-7-Zellen exprimiert und die Zellen 48h nach Transfektion geerntet. **A:** Schema der verkürzten Konstrukte. Die Aminosäuresequenz der Box1/2-Region des OSMR ist im Ein-Buchstaben-Code dargestellt, die Box1- und Box2-Bereiche sind grau hervorgehoben. **B:** Die Oberflächenexpression der transient exprimierten Rezeptoren wurde, wie in der Legende zu Abb. 10 beschrieben, über Durchflusszytometrie analysiert. Die erhaltenen Messwerte wurden auf die mittlere Fluoreszenz von β Ost1-transfizierten Zellen normiert. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus mindestens drei unabhängigen Experimenten. **C:** Zellen wurden in Triton-Lysispuffer lysiert, die Proteine gelelektrophoretisch aufgetrennt und die Rezeptoren, wie zuvor beschrieben, im Westernblot detektiert. **D:** Die Endo H-Analyse von präzipitiertem β O Δ cyt erfolgte wie in der Legende zu Abb. 11 beschrieben.

Die Untersuchungen ergaben, dass das Konstrukt β Ost1 zum großen Teil im ER lokalisiert ist, es wies aber auch eine deutliche Kolo­kalisation mit dem Golgi-Markerprotein auf (Abb. 15A). In Übereinstimmung mit den biochemischen Befunden war das zytoplasmatisch verkürzte Rezeptorkonstrukt β O Δ cyt hingegen kaum im ER lokalisiert, sondern vorwiegend im Golgi-Kompartiment und an der Plasmamembran (Pfeile) nachweisbar (Abb. 15B). Alle diese Ergebnisse lassen vermuten, dass der zytoplasmatische Bereich des OSMR, genauer die OSMR-Box1/2-Region, ein Signal enthält, welches die effiziente Oberflächenexpression von OSMR-Chimären verhindert. Die Deletion des membranproximalen Rezeptorbereichs führt dementsprechend zu Rezeptoren, welche effizient prozessiert und überwiegend an der Plasmamembran exprimiert werden.

3.1.7 Das negativ-regulatorische Signal des OSMR ist auf andere Rezeptoren übertragbar

In den vorangegangenen Versuchen konnte gezeigt werden, dass die Deletion des membranproximalen Bereichs des OSMR zu einem Konstrukt führt, welches bedeutend besser als das Ausgangskonstrukt an der Zelloberfläche exprimiert wird. Im Folgenden wurde der umgekehrte Ansatz gewählt: Der Box1/2-Bereich des OSMR wurde auf das gp130-Konstrukt β 130 Δ cyt transferiert. Befindet sich in dieser Region des OSMR tatsächlich ein Signal, welches die effiziente Oberflächenlokalisation des OSMR verhindert, so sollte das Fusionskonstrukt β 130 Δ cyt-OSMR-Box1/2 (kurz: β Δ cyt-ORB1/2) eine bedeutend schlechtere Oberflächenexpression aufweisen als das Ausgangskonstrukt β 130 Δ cyt, welches im Allgemeinen äußerst gut an der Zellmembran exprimiert wird. In Abbildung 16A sind die eingesetzten Konstrukte β 130 Δ cyt und β Δ cyt-ORB1/2 schematisch dargestellt. Beide Rezeptoren wurden transient in COS-7-Zellen exprimiert, und die Rezeptorexpression wurde jeweils über Durchflusszytometrie und Westernblotdetektion analysiert. Dabei zeigte sich tatsächlich, dass das Fusionskonstrukt β Δ cyt-ORB1/2 erheblich schlechter als das Ausgangskonstrukt β 130 Δ cyt an der Oberfläche exprimiert wurde (Abb. 16B). Dieser Befund korreliert mit der Tatsache, dass β 130 Δ cyt, nicht aber β Δ cyt-ORB1/2 im Westernblot als Doppelbande detektiert werden konnte (Abb. 16C). Offensichtlich hat also der Transfer der 60 membranproximalen Aminosäuren des OSMR auf β 130 Δ cyt zu einem Konstrukt geführt, dass sich durch eine deutlich verminderte Prozessierung und Oberflächenexpression auszeichnet.

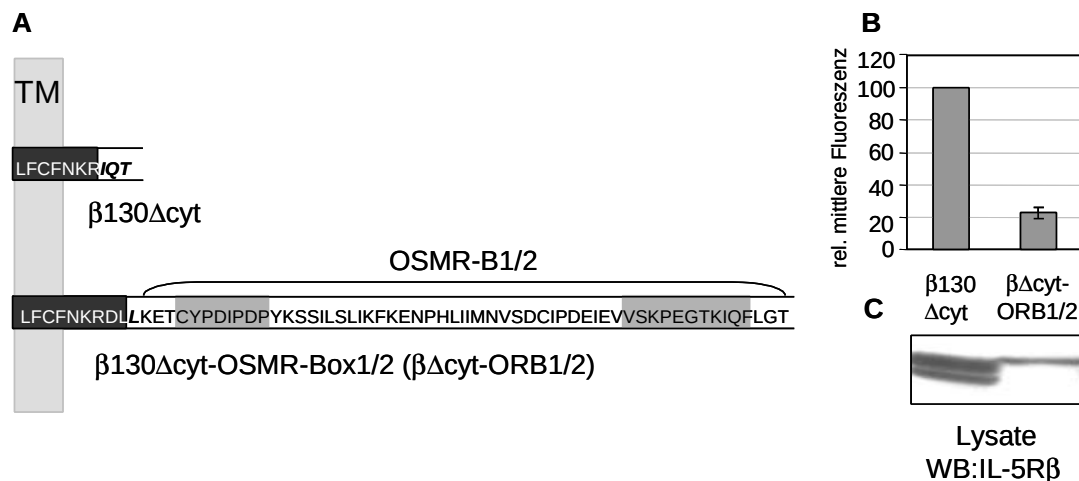


Abbildung 16: Transfer des membranproximalen Bereichs des OSMR auf das Konstrukt $\beta 130\Delta\text{cyt}$ führt zu Rezeptoren mit verminderter Oberflächenexpression. Die Konstrukte $\beta 130\Delta\text{cyt}$ sowie $\beta\Delta\text{cyt-ORB1/2}$ wurden transient in COS-7-Zellen exprimiert, und die Zellen 48h nach Transfektion geerntet. **A:** Schema der Konstrukte. Aus gp130 stammende Bereiche sind schwarz markiert, Aminosäuren, die durch die Klonierung zusätzlich eingefügt wurden, fett und kursiv dargestellt. In dem Fusionskonstrukt wird der transferierte membranproximale Bereich des OSMR durch eine Klammer gekennzeichnet. Die Box1- und Box2-Bereiche sind hervorgehoben. **B+C:** FACS- und Westernblotanalysen erfolgten wie in der Legende zu Abb. 10 beschrieben. Es wurde auf $\beta 130\Delta\text{cyt}$ -exprimierende Zellen normiert. Mittelwerte und Standardabweichungen aus mindestens drei unabhängigen Versuchen sind dargestellt.

In weiteren Experimenten wurde nun die Expression des Fusionskonstruktes $\beta\Delta\text{cyt-ORB1/2}$ mit der Expression der Rezeptorchimären βOst4 und dem analogen gp130-Konstrukt $\beta 130\text{B1/2}$ verglichen. Dabei zeigte sich, dass die beiden Rezeptoren, welche die OSMR-Box1/2-Region enthalten (d.h. βOst4 und $\beta\Delta\text{cyt-ORB1/2}$) in transient transfizierten COS-7-Zellen eine ähnliche, relativ geringe Plasmamembranlokalisation aufwiesen, wohingegen die gp130-Chimäre $\beta 130\text{B1/2}$ sehr viel besser an der Zelloberfläche exprimiert wurde (Abb. 17B). Das negativ-regulatorische Signal scheint also spezifisch für die Box1/2-Region des OSMR zu sein. Dieser Befund passt zu der zuvor gemachten Beobachtung, dass die Oberflächenexpression des chimären OSMR, nicht aber des chimären gp130 durch Jak1-Koexpression positiv beeinflusst werden kann (Abb. 10). Im Weiteren sollte nun geklärt werden, ob das Konstrukt $\beta\Delta\text{cyt-ORB1/2}$ im Gegensatz zu dem gp130-Konstrukt $\beta 130\text{B1/2}$ durch Jak1 an der Oberfläche hochreguliert werden kann. Wie aus Abb. 17E ersichtlich wird, ist dies tatsächlich der Fall: Während die Koexpression von Jak1 auf die Oberflächenexpression der Chimäre $\beta 130\text{B1/2}$ keinen messbaren Effekt hat, wies das Konstrukt $\beta\Delta\text{cyt-ORB1/2}$ bei Jak1-Koexpression eine deutlich erhöhte Oberflächenexpression auf (Abb. 17E). Dabei ist zu beachten, dass in den Koimmunpräzipitationsversuchen beide Konstrukte zu einer effizienten Bindung von Jak1 in der Lage waren (Abb. 17F, die etwas

schlechtere Kopräzipitation von Jak1 durch $\beta 130B1/2$ ist nicht repräsentativ). Somit führt der Transfer der OSMR-Box1/2-Region auf die verkürzte gp130-Chimäre $\beta 130\Delta cyt$ nicht nur zu einem Konstrukt, welches deutlich geringer an der Oberfläche exprimiert ist als das Ausgangskonstrukt; zusätzlich ist dieses Konstrukt im Gegensatz zum gp130-Vergleichskonstrukt $\beta 130B1/2$ durch Jak1 in seiner Oberflächenexpression regulierbar. Es deutet somit alles darauf hin, dass die Jak1-vermittelte Steigerung der OSMR-Oberflächenexpression tatsächlich auf der Maskierung eines in der Box1/2-Region liegenden negativen Signals beruht.

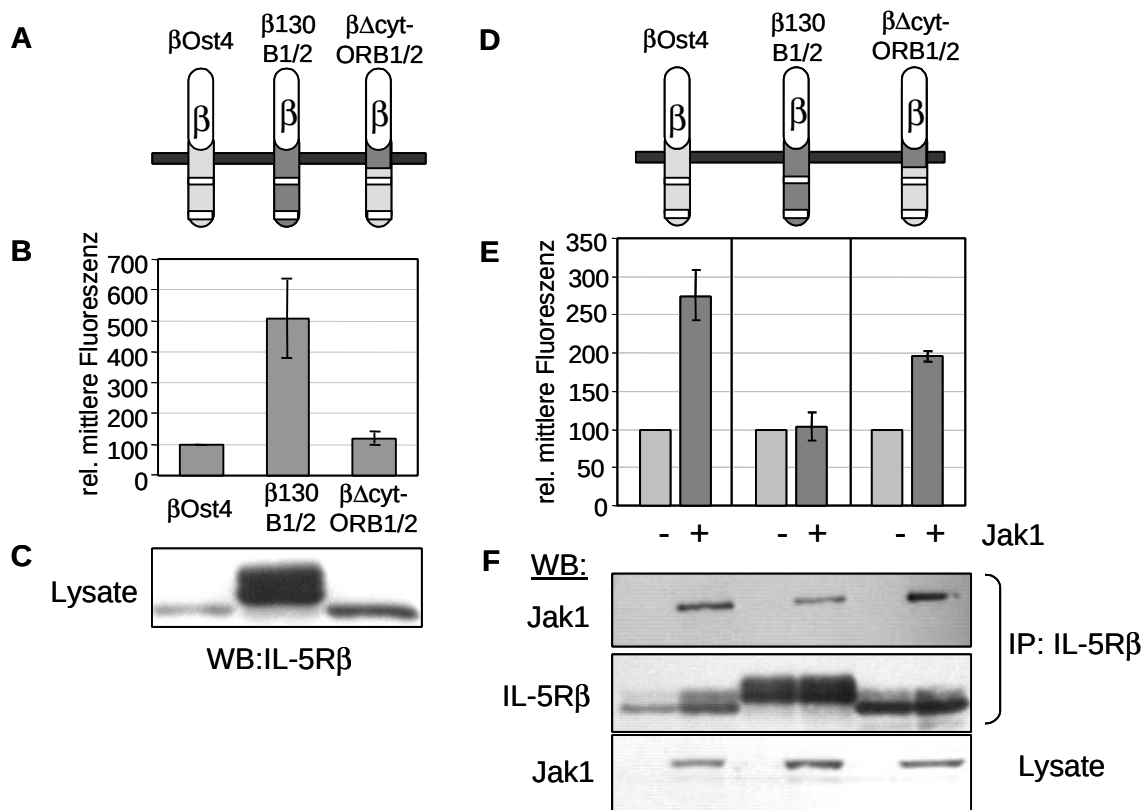


Abbildung 17: Transfer der membranproximalen Region des OSMR auf das Konstrukt $\beta 130\Delta cyt$ führt zu Rezeptoren, die sich durch Jak1-Koexpression an der Zelloberfläche hochregulieren lassen. COS-7-Zellen wurden jeweils mit Expressionsvektoren für die angegebenen Rezeptoren transfiziert und nach 48h geerntet. **A + D:** Schema der transfizierten Konstrukte. **B + C:** Versuchsdurchführung und Auswertung erfolgte wie in der Legende zu Abb. 10 beschrieben, in **B** wurden die Fluoreszenzwerte auf das Konstrukt $\beta Ost4$ normiert. **E + F:** Die Zellen wurden zusätzlich zu den Rezeptorkonstrukten mit Leervektor oder mit einem Expressionsvektor für Jak1 transfiziert. Die Messung der Oberflächenexpression über Durchflusszytometrie und die Bindungsstudien wurden durchgeführt wie in der Legende zu Abb. 13 beschrieben. Normierung in **E** erfolgte jeweils auf Leervektor-transfizierte Zellen.

3.1.8 In Jak1-defizienten Zellen ist die Oberflächenexpression des endogenen OSMR gegenüber Parentalzellen reduziert

Alle bisherigen Daten sprechen dafür, dass Jak1 für eine effiziente Prozessierung des OSMR von Bedeutung ist. Da die bisherigen Resultate aber mit Hilfe von überexprimierten Rezeptoren und Januskinasen erhalten wurden, stellt sich die Frage, inwieweit sich die so gezogenen Schlussfolgerungen auch auf endogene Rezeptoren übertragen lassen. Um dies zu klären, wurden zwei Jak1-defiziente humane Fibrosarkom-Zelllinien (U4A, U4C) bezüglich der Expression des endogenen OSMR mit den jeweiligen parental Zellen (2fTGH, 2C4) verglichen. Um die Vergleichbarkeit der verschiedenen Zelllinien zu überprüfen, wurde in diesen auch die Oberflächenexpression des HLA Klasse I-Moleküls untersucht. In beiden Fällen unterschieden sich parentale Zellen und Jak1-defiziente Tochterzellen bezüglich der HLA-Oberflächenexpression nicht signifikant (Abb. 18A + B, rechte Diagrammhälfte). Dahingegen war sowohl in den U4A-Zellen (Abb. 18A, linke Hälfte) als auch in den U4C-Zellen (Abb. 18B, linke Hälfte) deutlich weniger endogener OSMR an der Zelloberfläche nachweisbar als in den jeweiligen Parentalzelllinien.

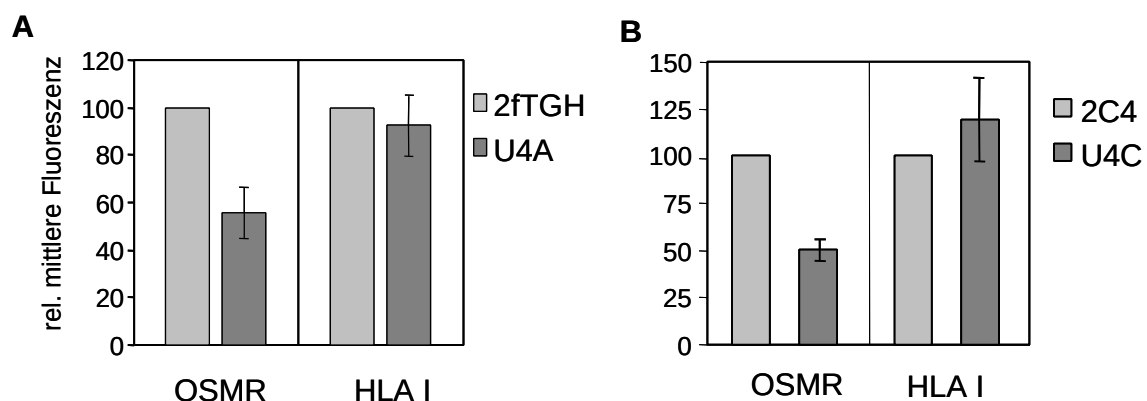


Abbildung 18: In Jak1-defizienten Zellen wird weniger endogener OSMR an der Oberfläche exprimiert als in den jeweiligen Parentalzellen. Jak1-defiziente U4A- und U4C-Fibrosarkomzellen sowie deren Parentalzelllinien 2fTGH und 2C4 wurden per FACS-Analyse bzgl. der Oberflächenexpression des humanen OSMR untersucht. Dazu wurden Zellen zunächst mit monoklonalen Antikörpern gegen den Extrazellulärbereich des OSMR und danach mit PE-konjugierten Zweitantikörpern inkubiert. Zur Kontrolle wurde auch die Expression des HLA-Klasse I-Moleküls untersucht, hierzu wurden Zellen mit monoklonalen Antikörpern gegen HLA I und danach mit PE-konjugierten Zweitantikörpern behandelt. Mittelwerte und Standardabweichungen von jeweils mindestens drei unabhängigen Messungen sind dargestellt. Die Normierung erfolgte jeweils auf die in den Parentalzellen erhaltenen Fluoreszenzwerte.

Durch transiente Expression von Jak1 ließ sich in beiden Jak1-defizienten Zelllinien die messbare Oberflächenexpression des endogenen OSMR deutlich erhöhen (Abb. 19A + B). Da sich der OSMR über Westernblotanalyse jedoch nicht nachweisen lässt, war nicht absolut auszuschließen, dass dieser Effekt eventuell auf einer Jak1-vermittelten Erhöhung der OSMR-

Gesamtexpression beruht. So könnten z.B. Jak1-vermittelte Signalprozesse die Regulation des OSMR-Gens beeinflussen. In weiteren Versuchen wurde deshalb in den U4C-Zellen neben Jak1-wt auch die Kinase-inaktive Jak1 (Jak1-KE) transient exprimiert. Es zeigte sich, dass die Expression beider Jaks zu einer vergleichbaren Erhöhung der OSMR-Oberflächenexpression führte (Abb. 19B). Dies macht eine mögliche transkriptionelle Regulation des OSMR-Gens durch transient exprimiertes Jak1 eher unwahrscheinlich.

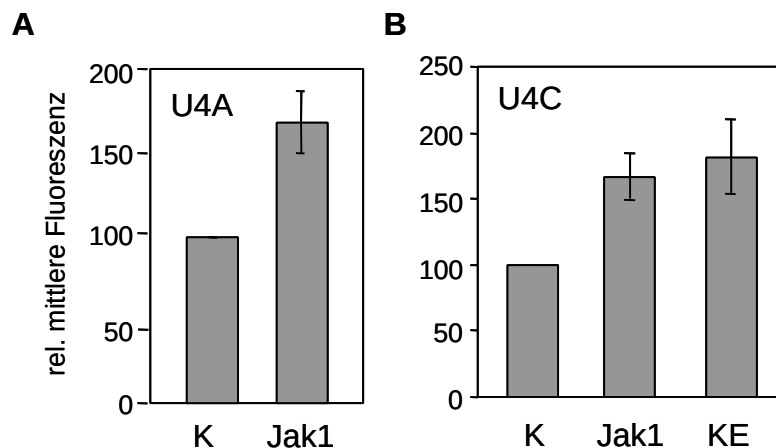


Abbildung 19: Transiente Expression von Jak1 führt in U4A- und U4C-Fibrosarkomzellen zu erhöhter Oberflächenexpression des endogenen OSMR. In U4A- oder U4C-Zellen wurde Jak1 transient exprimiert. 48h nach Transfektion wurde die Oberflächenexpression des endogenen OSMR, wie in der Legende zu Abb. 18 beschrieben, über Durchflusszytometrie untersucht. **B:** In U4C-Zellen wurde zusätzlich auch das Kinase-negative Konstrukt Jak1-KE exprimiert. Mittelwerte und Standardabweichungen aus mindestens drei unabhängigen Versuchen sind dargestellt.

3.1.9 Auch Jak2 und Tyk2, nicht aber Jak3, führen zu einer erhöhten Oberflächenexpression des OSMR

Obwohl die Oberflächenexpression des endogenen OSMR in Jak1-defizienten Fibrosarkomzellen gegenüber den parental Zellen signifikant herabgesetzt ist, lässt sich in diesen Zellen immer noch eine beachtliche Menge des OSMR an der Plasmamembran nachweisen. Sollte die OSMR-Oberflächenexpression tatsächlich von der Maskierung eines negativen Signals in der Box1/2-Region abhängen, so weist dieser Befund darauf hin, dass neben Jak1 auch andere Januskinasen bei der Regulation der OSMR-Lokalisation eine Rolle spielen könnten. Um diese Möglichkeit zu testen, wurden zunächst Versuche in COS-7-Zellen durchgeführt. Der OSMR wurde jeweils mit der Kinase Tec, bzw. den Januskinasen Jak1, Jak2, Jak3 oder Tyk2 koexprimiert und die Oberflächenexpression des OSMR durchflusszytometrisch bestimmt. Während die Koexpression von Jak2 und Tyk2 zu einer

ähnlichen Erhöhung der OSMR-Oberflächenexpression führte wie die Koexpression von Jak1 (Abb. 20A), hatte die Koexpression von Jak3 keinen Effekt (Abb. 20B), obwohl diese Kinase sehr gut in COS-7-Zellen exprimiert wurde (Abb. 20C, untere Reihe). Alle Januskinasen wurden nun auf ihre Fähigkeit untersucht, die Oberflächenexpression des endogenen OSMR in U4C-Zellen zu erhöhen. In völliger Übereinstimmung mit den COS-7-Versuchen zeigte sich, dass die transiente Expression von Jak1, Jak2 und Tyk2, nicht aber von Jak3, in diesen Zellen zu einer gesteigerten Oberflächenlokalisierung des endogenen OSMR führte (Abb. 20D).

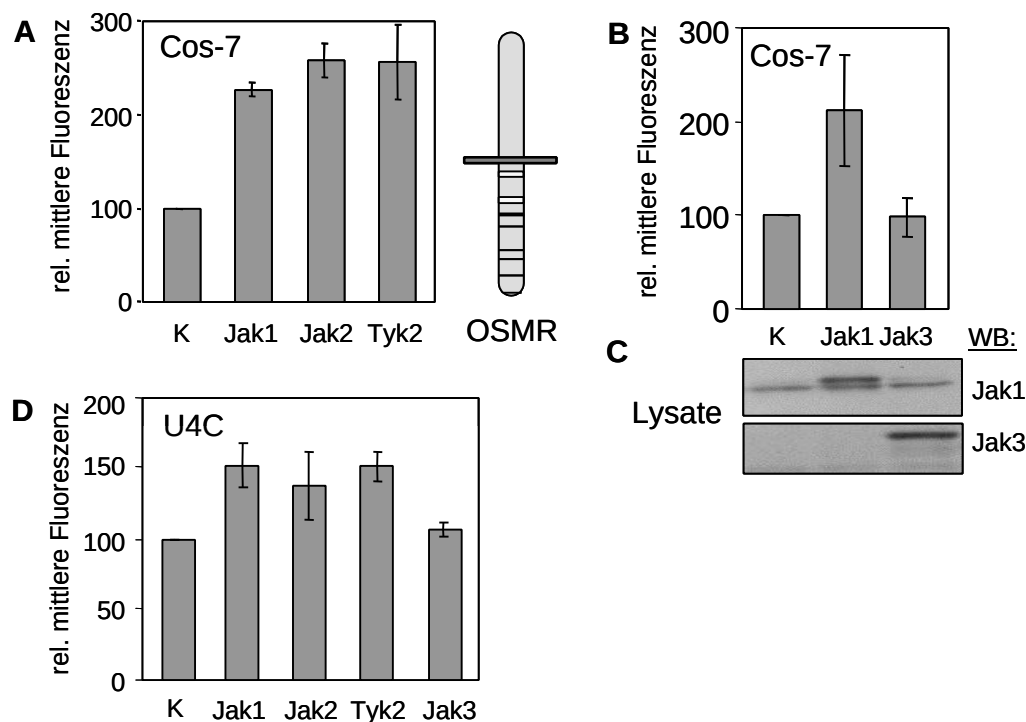


Abbildung 20: Die Oberflächenexpression des OSMR lässt sich durch transiente Expression der Januskinasen Jak1, Jak2 und Tyk2, nicht aber Jak3 erhöhen. **A + B:** COS-7-Zellen wurden mit Expressionsvektoren für den OSMR sowie für Tec oder die Januskinasen Jak1, Jak2, Tyk2 bzw. Jak3 transfiziert. Nach 48h wurden die Zellen geerntet. Die Oberflächenexpression des OSMR wurde über Durchflusszytometrie analysiert, Normierung erfolgte auf Tec-transfizierte Zellen. **C:** Tritonlysate transfizierter COS-7-Zellen wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt, und die Jak1- bzw. Jak3-Expression wurde im Westernblot nachgewiesen. Die bei der Jak1-Detektion auftretende untere Bande ist unspezifisch. **D:** Jak1-defiziente U4C-Fibrosarkomzellen wurden mit Leervektor (K) oder Expressionsvektoren für Jak1, Jak2, Tyk2 oder Jak3 transfiziert und die Oberflächenexpression des endogenen OSMR nach 48h über Durchflusszytometrie analysiert. Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Versuchen sind dargestellt. Normierung erfolgte auf Leervektor-transfizierte Zellen.

Lysate von parentalen bzw. Jak1-defizienten Fibrosarkomzellen wurden nun bezüglich der Expression der Januskinasen Jak1, Jak2 und Tyk2 untersucht. In Zelllysaten waren nur Jak1 und Tyk2 nachweisbar (Abb. 21A), für den Nachweis von Jak2 musste diese Kinase zunächst über Immunpräzipitation aus Lysaten angereichert werden (Abb. 21B). Über die Präzipitation von Jak2 und Tyk2 aus Lysaten unbehandelter bzw. OSM-stimulierter U4C-Zellen konnte

außerdem demonstriert werden, dass beide Kinasen OSM-abhängig phosphoryliert werden (Abb. 21B), was stark für eine Assoziation dieser Kinasen mit dem endogenen OSMR spricht. Prinzipiell könnten also tatsächlich die in U4C-Zellen exprimierten Januskinasen Tyk2 und Jak2 die Ursache für die noch vorhandene Oberflächenexpression des endogenen OSMR sein.

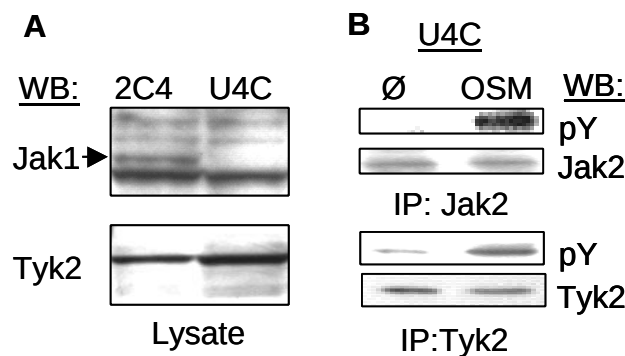


Abbildung 21: Jak2 und Tyk2 werden in U4C-Zellen exprimiert und nach OSM-Stimulation phosphoryliert. **A:** U4C- und 2C4-Fibrosarkomzellen wurden in Triton-Lysispuffer lysiert, die Lysate gelelektrophoretisch aufgetrennt und geblottet. Die Blots wurden mit Antikörpern gegen Jak1 und Tyk2 detektiert. **B:** U4C-Zellen wurden über Nacht gehungert, 15 min mit 20 ng/ml OSM stimuliert und in Triton-Lysispuffer lysiert. Jak2 und Tyk2 wurden präzipitiert, und Präzipitate gelelektrophoretisch aufgetrennt. Westernblots wurden zunächst mit Antikörpern gegen Phosphotyrosin (pY) detektiert, nach dem „Strippen“ der Membran wurden die Blots mit Antikörpern gegen Jak2 bzw. Tyk2 gegengefärbt.

3.1.10 Der OSMR ist auch in Jak1-defizienten Zellen zu Signaltransduktion in der Lage

Es ist mehrfach beschrieben worden, dass Jak1 eine herausragende Rolle bei der Signalweiterleitung von IL-6-Typ-Zytokinen spielt [22, 23]. Da die OSM-Stimulation in Jak1-defizienten U4C-Zellen zur Aktivierung der Januskinasen Jak2 und Tyk2 führt, stellt sich nun die Frage, inwieweit diese Kinasen auch weitere Signaltransduktionsprozesse in Gang setzen können. Um dies zu testen, wurden in den Jak1-defizienten U4C- und in parentalen 2C4-Fibrosarkomzellen die OSM- und IL-6-vermittelte STAT- und MAP-Kinasen-Aktivierung untersucht. Wie in Abbildung 22 zu sehen ist, führte eine OSM-Stimulation in 2C4-Zellen zur Aktivierung von STAT1, STAT3 und Erk1/2, wohingegen IL-6-Stimulation in diesen Zellen lediglich zu einer relativ schwachen STAT3-Aktivierung führte. In den U4C-Lysaten war zwar keine OSM-induzierte STAT1- und Erk-Aktivierung mehr nachweisbar, wohl aber ein beachtliches STAT3-Signal. Somit wird der endogene OSMR in Jak1-defizienten Fibrosarkomzellen nicht nur an der Oberfläche exprimiert, sondern ist auch zur

Jak/STAT-Signaltransduktion in der Lage, und es ist sehr wahrscheinlich, dass Jak2 und/oder Tyk2 bei beiden Prozessen eine Rolle spielen.

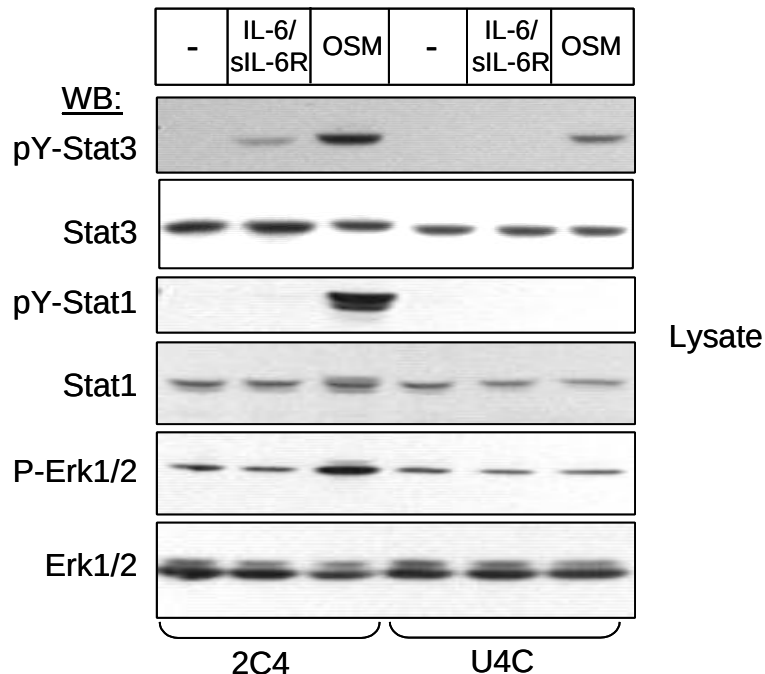


Abbildung 22: OSM- und IL-6-vermittelte Signaltransduktion in 2C4- und U4C-Zellen. 2C4- und U4C-Zellen wurden für fünf Stunden in FCS-freiem Medium gehungert und 15 min mit 20 ng/ml OSM bzw. 20 ng/ml (=200U) IL-6 und 1 µg/ml sIL-6R stimuliert. Unbehandelte und stimulierte Zellen wurden in Triton-Lysispuffer lysiert und gleiche Lysatmengen gelelektrophoretisch aufgetrennt. Auf den Blots wurden phosphoryliertes Stat1, Stat3 und Erk1/2 mit den entsprechenden Phosphospezifischen Antikörpern nachgewiesen. Blots wurden „gestrippt“ und mit Antikörpern gegengefärbt, die Stat1, Stat3 bzw. Erk1/2 unabhängig von ihrem Phosphorylierungszustand erkennen. Die abgebildeten Blots sind repräsentativ für mindestens drei unabhängige Experimente.

3.2 Eingrenzung des negativ regulatorischen Signals in der Box1/2-Region des OSMR

Im ersten Teil dieser Arbeit konnte demonstriert werden, dass Januskinasen für die effiziente Oberflächenexpression des OSMR von Bedeutung sind. Dies geschieht wahrscheinlich durch Maskierung eines in der Box1/2-Region vorhandenen negativ-regulatorischen Signals. Ziel des zweiten Teils der vorliegenden Arbeit war es nun, dieses Signal weiter einzugrenzen und es bezüglich seines Wirkungsmechanismus zu charakterisieren.

3.2.1 Durch sukzessive Deletion der Box2 und des Interbox1/2-Bereichs lässt sich die Oberflächenexpression von OSMR-Chimären deutlich erhöhen

Anhand der verkürzten OSMR-Chimären β Ost4 und β O Δ cyt konnte in den vorangegangenen Experimenten demonstriert werden, dass der membranproximale Bereich des OSMR für dessen schlechte Oberflächenexpression verantwortlich ist. Mit Hilfe weiterer Deletionsmutanten sollte das hierfür erforderliche Signal nun genauer eingegrenzt werden. Abb. 23A enthält ein detailliertes Schema des membranproximalen Bereiches des OSMR, welcher sich grob in die Box1-, die Interbox1/2- und die Box2-Region unterteilen lässt. In diesem Schema sind die bereits existierenden Deletionskonstrukte β Ost4 und β O Δ cyt sowie die neu generierten Konstrukte β Ost5 und β Ost6 markiert. Gegenüber β Ost4 zeichnet sich das Konstrukt β Ost5 durch die Deletion der Box2-Region aus, dem Konstrukt β Ost6 fehlt zusätzlich noch der größte Teil der Interbox1/2-Region und β O Δ cyt enthält, wie bereits zuvor erwähnt, nur noch drei zytoplasmatische Aminosäuren. Alle vier Konstrukte wurden transient in COS-7-Zellen exprimiert und die Expression der Rezeptoren mittels Durchflusszytometrie und Westernblot analysiert.

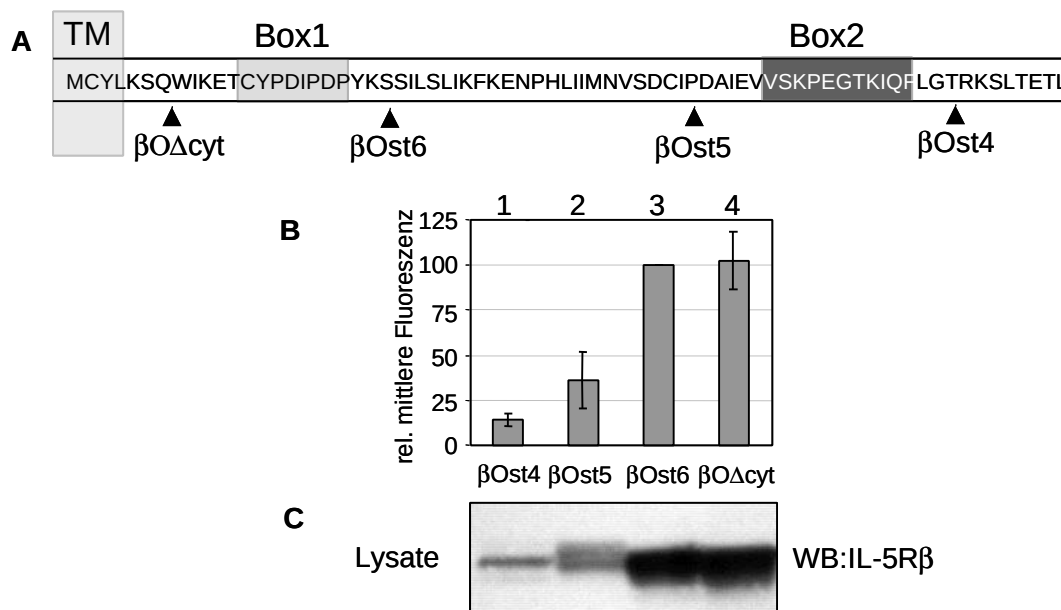


Abbildung 23: Sukzessive Deletion des membranproximalen Bereichs des OSMR führt zu Konstrukten mit deutlich erhöhter Oberflächenexpression. Die Konstrukte β Ost4, β Ost5, β Ost6 und β O Δ cyt wurden transient in COS-7-Zellen exprimiert. **A:** Schema des membranproximalen Bereichs des OSMR. Der Box1- bzw. Box2-Bereich ist hell- bzw. dunkelgrau hervorgehoben. Die jeweils letzte C-terminale Aminosäure aller verwendeten Konstrukte ist in dem Schema durch eine Pfeilspitze markiert. **B+C:** Die Expression der Konstrukte wurde über Durchflusszytometrie und Westernblotanalyse untersucht.

Es zeigte sich, dass die Deletion der Box2-Region (β Ost5) sowie des Interbox1/2-Bereiches (β Ost6), nicht aber die zusätzliche Entfernung der Box1 (β O Δ cyt) jeweils zu einer

signifikanten Erhöhung der Oberflächenexpression der jeweiligen Konstrukte führte (Abb. 23B, vgl. Spuren 1+2, 2+3 bzw. 3+4). Bei den drei verkürzten Konstrukten β Ost5, β Ost6 und β O Δ cyt war im Gegensatz zu β Ost4, dem Konstrukt mit vollkommen intakter Box1/2-Region, im Westernblot jeweils eine Rezeptor-Doppelbande erkennbar (Abb. 23C), was mit der besseren Oberflächenexpression dieser Konstrukte korrelierte. Während sich die Rezeptorchimäre β Ost5 in Bezug auf die Gesamtexpression nicht signifikant von dem längeren Konstrukt β Ost4 unterscheidet (Abb. 23C, vgl. Spuren 1+2), hatte die Deletion des Interbox1/2-Bereiches aber offenbar nicht nur einen positiven Effekt auf die Oberflächenexpression, sondern auch auf die Rezeptor-Gesamtexpression: die kürzere Deletionsmutante β Ost6 ist deutlich besser exprimiert als β Ost4 und β Ost5 (Abb. 23C, vgl. Spuren 1-3). Wiederum war kein Unterschied zwischen dem kürzesten Konstrukt β O Δ cyt und β Ost6 erkennbar (Abb. 23C, Spuren 3+4). Aus diesen Befunden lässt sich zum einen ableiten, dass das Konstrukt β Ost6, im Gegensatz zu den beiden längeren Konstrukten, kein funktionelles negatives Signal mehr enthält. Zum anderen deuten die Ergebnisse darauf hin, dass sowohl der Interbox1/2-Bereich als auch die Box2-Region zur Regulation der OSMR-Oberflächenexpression beitragen. Der Interbox1/2-Bereich beeinflusst zusätzlich auch die Rezeptor-Gesamtexpression.

3.2.2 Ein negativ-regulatorisches Signal lässt sich auf den Interbox1/2-Bereich des OSMR eingrenzen

Um genauer untersuchen zu können, welchen relativen Anteil die einzelnen Bereiche der OSMR-Box1/2-Region jeweils an der Regulation der Oberflächenlokalisation haben, wurden nun zusätzlich die Rezeptorkonstrukte β Ost4 Δ Box1 und β Ost4 Δ Interbox1/2 (kurz: β Ost4 Δ I) hergestellt. Die in diesen Konstrukten jeweils deletierten Bereiche sind in Abbildung 24A gekennzeichnet. Vergleicht man die Expression von β Ost4 Δ Box1, β Ost4 Δ I und β Ost5 in COS-7-Zellen, so zeigt sich zum einen, dass die Deletion der Box1, wie aufgrund der vorherigen Ergebnisse zu erwarten war, einen nur geringen Effekt auf die Oberflächenexpression hat. Das Konstrukt β Ost4 Δ Box1 wies sowohl im FACS als auch im Westernblot eine dem Ausgangskonstrukt β Ost4 sehr ähnliche Expression auf (Abb. 24B+C, vgl. Spuren 1+2). Außerdem zeigen die FACS-Analysen sehr deutlich, dass sich die Deletion des Interbox1/2-Bereiches sehr viel stärker auf die Rezeptor-Oberflächenexpression auswirkt als die Deletion der Box2-Region: So war signifikant mehr β Ost4 Δ I als β Ost5 an der Zelloberfläche nachweisbar (Abb. 24B, Spuren 3+4). Im Westernblot traten beide Konstrukte

zwar deutlich als Doppelbande auf (Abb. 24C, Spuren 3+4), ähnlich wie bei dem Konstrukt $\beta\text{Ost}\Delta\text{cyt}$ war aber die obere Rezeptorbande bei $\beta\text{Ost}4\Delta\text{I}$ sehr viel stärker ausgeprägt. Tatsächlich ergab die Endo H-Analyse, dass ein Großteil des Konstrukts $\beta\text{Ost}4\Delta\text{I}$ in vollständig prozessierter, Endo H-resistenter Form vorlag (Abb. 24D, schwarze Pfeilspitze). Übereinstimmend mit diesen biochemischen Daten konnte mittels Immunfluoreszenz-Mikroskopie gezeigt werden, dass $\beta\text{Ost}4\Delta\text{I}$ vorwiegend an der Plasmamembran und im Golgi-Kompartiment, aber kaum im ER der transfizierten Zellen lokalisiert war (Abb. 24E).

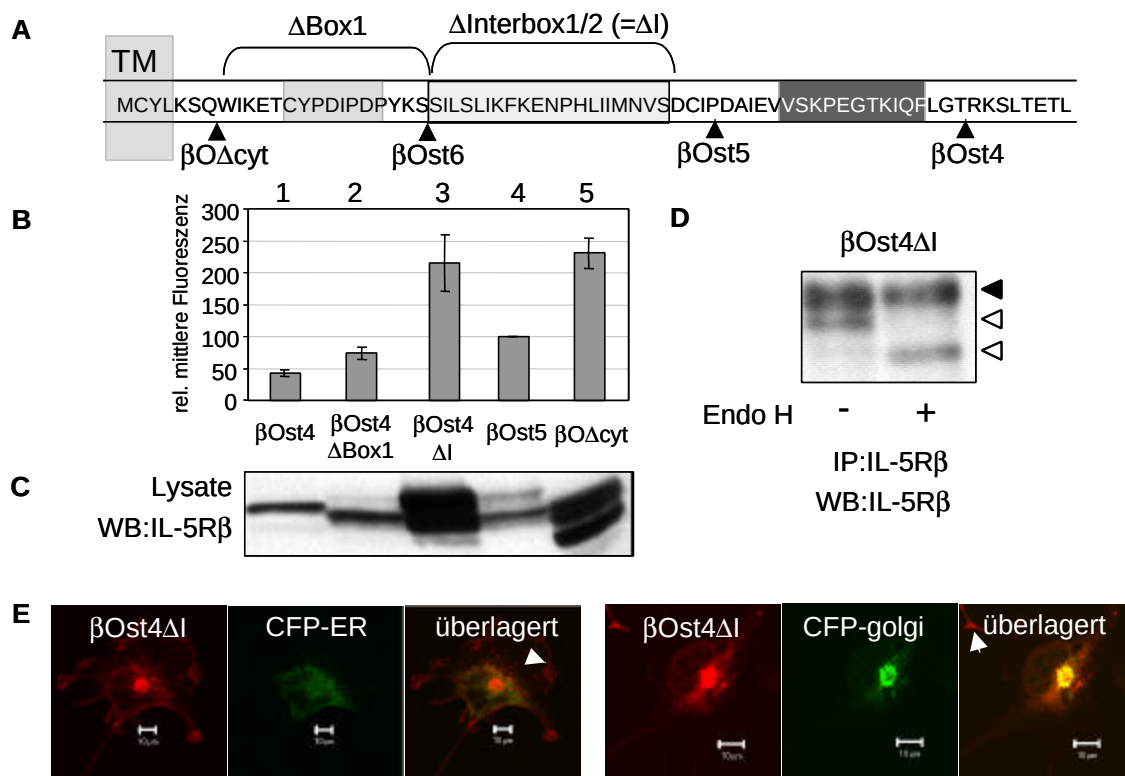


Abbildung 24: Einfluss des Interbox1/2-Bereiches auf die Expression des chimären OSMR. $\beta\text{Ost}4$, $\beta\text{Ost}4\Delta\text{Box1}$, $\beta\text{Ost}4\Delta\text{I}$, $\beta\text{Ost}5$ und $\beta\text{Ost}\Delta\text{cyt}$ wurden transient in COS-7-Zellen exprimiert. **A:** Überblick über die verwendeten Konstrukte. In dem Schema der OSMR-Box1/2-Region sind die Bereiche markiert, die in den neu hergestellten Konstrukten deletiert wurden. Box1, Box2 und der deletierte Bereich der Interbox1/2-Region sind grau unterlegt. **B+C:** 48h nach Transfektion wurde die Rezeptorexpression im Westernblot und im FACS untersucht. **D:** Die Endo H-Analyse des Konstruktes $\beta\text{Ost}4\Delta\text{I}$ erfolgte wie in der Legende zu Abb. 11 beschrieben. Endo H-resistente Rezeptoren sind mit einer schwarzen, Endo H-sensitive Rezeptoren mit einer weißen Pfeilspitze markiert. **E:** In COS-7-Zellen wurde $\beta\text{Ost}4\Delta\text{I}$ mit einem CFP-markierten Golgi- bzw. ER-Markerprotein koexprimiert. Die Immunfluoreszenzuntersuchungen erfolgten wie in der Legende zu Abb. 9 beschrieben. Die angefärbten Rezeptoren erscheinen in rot, CFP-Markerproteine in grün, kolokalisierte Proteine in gelb. Weiße Pfeilspitzen markieren an der Plasmamembran lokalisierte Rezeptoren.

Insgesamt wird in diesen Untersuchungen eine große Ähnlichkeit zwischen den Konstrukten $\beta\text{Ost}4\Delta\text{I}$ und $\beta\text{Ost}\Delta\text{cyt}$ deutlich: Beide Konstrukte lassen sich mittels Durchflusszytometrie gleich gut an der Plasmamembran nachweisen (Abb. 24B, Säulen 3+5) und zeichnen sich im Vergleich zu allen anderen Konstrukten im Westernblot durch eine signifikant erhöhte Gesamtexpression sowie ein deutlich anderes Glykosylierungsmuster aus (Abb. 24C, Spuren

3+5). Unter Berücksichtigung der bereits in Abb. 23 dargestellten Ergebnisse lässt sich somit festhalten, dass alle Konstrukte, in denen der Interbox1/2-Bereich deletiert ist (β Ost4 Δ I, β Ost6, β O Δ cyt) extrem gut an der Zelloberfläche exprimiert werden, und zwar unabhängig davon, ob diese Konstrukte noch die Box1-Region (im Fall von β Ost6) bzw. die Box1- und die Box2-Region (β Ost4 Δ I) enthalten oder nicht (β O Δ cyt). Umgekehrt zeichnen sich alle Konstrukte mit intakter Interbox1/2-Region (β Ost4, β Ost4 Δ Box1, β Ost5) durch eine deutlich schlechtere Oberflächenexpression aus, wobei jedoch sowohl β Ost4 Δ Box1 als auch β Ost5 geringfügig besser als das Ausgangskonstrukt β Ost4 an der Oberfläche exprimiert werden (Abb. 24B, vgl. Säule 1 mit Säulen 2+4). Diese Befunde deuten stark darauf hin, dass sich das negativ-regulatorische Signal in der Interbox1/2-Region des OSMR befindet, dass aber seine volle Wirksamkeit auch eine intakte Box1- bzw. Box2-Region erfordert.

3.2.3 Die Deletion des Interbox1/2-Bereiches führt auch beim Wildtyp-OSMR zu einer signifikant erhöhten Oberflächenexpression

Um die inhibitorische Wirkung des Interbox1/2-Bereiches auf die Rezeptoroberflächenexpression zu verifizieren, wurde dieser Bereich nun auch im Wildtyp-OSMR deletiert. Der OSMR und das neue Konstrukt OSMR Δ I (Abb. 25A) wurden in COS-7-Zellen exprimiert und die Oberflächenexpression beider Rezeptoren durchflusszytometrisch bestimmt. Erwartungsgemäß wurde OSMR Δ I bedeutend besser an der Zelloberfläche exprimiert als der Wildtyp-OSMR (Abb. 25B, Säulen 1+2).

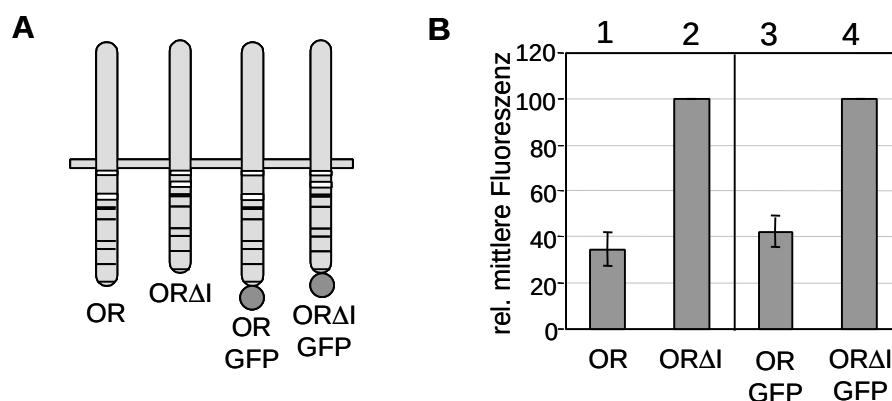


Abbildung 25: Deletion des Interbox1/2-Bereiches im OSMR hat eine signifikant erhöhte Oberflächenexpression zur Folge. **A:** Schema der neu generierten OSMR-Konstrukte. Das jeweils C-terminal fusionierte GFP-Protein wird durch den Kreis symbolisiert. **B:** COS-7-Zellen wurden mit Expressionsvektoren für die angegebenen Rezeptorkonstrukte transfiziert und die Oberflächenexpression der Rezeptoren nach 48h durchflusszytometrisch bestimmt. Anfärbung der Rezeptoren erfolgte wie in der Legende zu Abb. 7 beschrieben. Die Normierung erfolgte jeweils auf die Konstrukte mit deletierter Interbox1/2-Region. Mittelwerte und Standardabweichungen von mindestens drei unabhängigen Versuchen sind dargestellt.

Da sich die Rezeptorexpression des OSMR im Westernblot nicht nachweisen lässt, kann man jedoch keine Aussagen über die Gesamtexpression beider Rezeptoren machen. Um dieses Problem zu umgehen, wurden beide Rezeptorkonstrukte C-terminal mit GFP fusioniert (Abb. 25A). Durch eine Reihe von Versuchen konnte in Zusammenarbeit mit Angela Jörissen bereits gezeigt werden, dass sich der GFP-markierte OSMR nicht wesentlich von dem Wildtyp-OSMR unterscheidet (Angela Jörissen, medizinische Doktorarbeit in Vorbereitung). Dementsprechend verhielten sich die beiden GFP-markierten Konstrukte in der FACS-Analyse analog zu den unmarkierten Konstrukten, d.h. der Rezeptor mit deletiertem Interbox1/2-Bereich wies eine deutlich erhöhte Oberflächenexpression auf (Abb. 25B, Säulen 3+4). Durch die GFP-Markierung des OSMR konnte neben der Oberflächenexpression nun auch die Gesamtexpression der transfizierten GFP-Konstrukte durchflusszytometrisch bestimmt werden. Die Abbildungen 26A, B und C stellen die dazu notwendige Vorgehensweise dar: In Zellen, die OSMR-GFP exprimieren, kann die Oberflächenexpression dieser Konstrukte über die herkömmliche Antikörperfärbung erfolgen; das in der Durchflusszytometrie im Fluoreszenzkanal 2 messbare Fluoreszenzsignal stammt hier von den zur Färbung eingesetzten PE-konjugierten Zweitantikörpern. Gleichzeitig sollten alle Rezeptoren ein vom GFP stammendes, zweites Fluoreszenzsignal erzeugen, welches im Fluoreszenzkanal 1 messbar ist. Somit können während der durchflusszytometrischen Messung für jede einzelne Zelle beide Fluoreszenzwerte gleichzeitig unabhängig voneinander bestimmt werden.

Abb. 26B und C stellen exemplarisch das Ergebnis einer FACS-Analyse von COS-7-Zellen dar, die transient mit einem Vektor für das Konstrukt OSMR-GFP transfiziert wurden. In dem abgebildeten *Dot-Plot* (Abb. 26B) wurden alle gemessenen Fluoreszenz 1-Werte gegen die entsprechenden Fluoreszenz 2-Werte aufgetragen. Damit entspricht jeder Diagrammpunkt den Fluoreszenzwerten einer spezifischen Zelle. Es sind zwei Punktwolken erkennbar, transfizierte Zellen sind in Grau dargestellt; diese befinden sich in der markierten Diagramm-Region R1. Alle Zellen in dieser Region weisen ein signifikant erhöhtes GFP-Signal (Fluoreszenz 1) und PE-Signal auf, vermittelt über angefärbte Rezeptoren an der Zelloberfläche (Fluoreszenz 2). Die Diagrammregion R1 ist in Abb. 26C vergrößert dargestellt. Die transfizierten Zellen wurden hier gemäß ihrer Fluoreszenz 1-Werte in Subpopulationen eingeteilt, die sich jeweils in den Diagrammregionen R2 bis R6 befinden. Für jede Zellpopulation R2 bis R6 kann nun die mittlere GFP- bzw. PE-vermittelte Fluoreszenz bestimmt werden. Abbildung 26D stellt ein repräsentatives Resultat einer solchen Auswertung dar. Wie deutlich zu erkennen ist, korreliert im Falle des Konstruktes ORAI-GFP eine zunehmende Rezeptorexpression (also ein zunehmendes GFP-Signal) mit der

entsprechenden Zunahme der messbaren Oberflächenexpression (also zunehmendes PE-Signal). Demgegenüber ist die Plasmamembranlokalisation des Konstruktes OR-GFP stark limitiert: bei steigender Rezeptorexpression kommt es nicht zu einer vergleichbaren Erhöhung der messbaren Oberflächenexpression; in diesem Fall scheinen die zusätzlich exprimierten Rezeptoren also vermehrt intrazellulär vorzuliegen. Somit bestätigen diese Versuche sehr anschaulich die mit den β -Chimären erhaltenen biochemischen Daten.

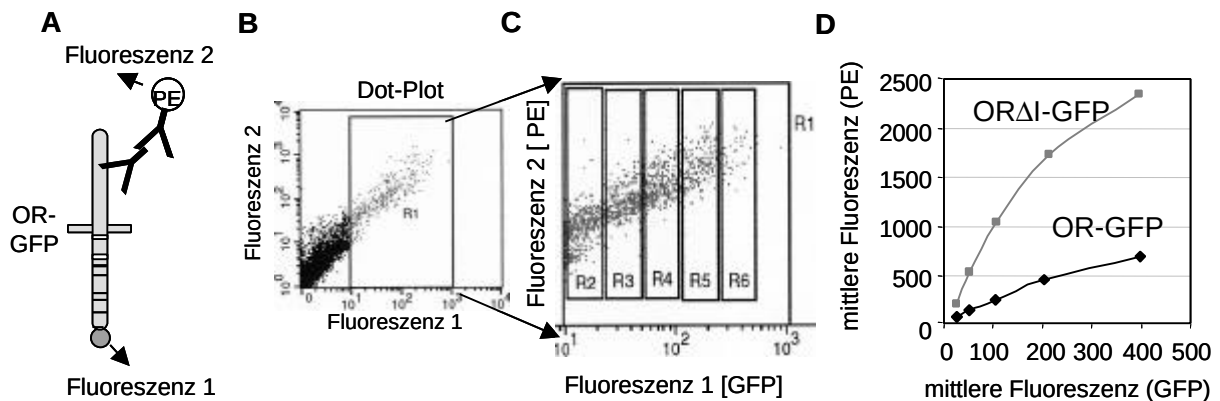


Abbildung 26: Die limitierte Oberflächenexpression des Konstruktes OSMR-GFP wird durch Deletion des Interbox1/2-Bereiches aufgehoben. Die Konstrukte OSMR-GFP und OSMR Δ I-GFP wurden transient in COS-7-Zellen exprimiert, und die Expression der Rezeptoren wurde durchflusszytometrisch analysiert. **A:** Prinzip der FACS-Analyse von GFP-markierten OSMR-Konstrukten. Während sich die Oberflächenexpression der Rezeptoren über Antikörperfärbung nachweisen lässt, kann die Gesamtexpression der Rezeptoren über die GFP-vermittelte Fluoreszenz verfolgt werden. **B:** Die Expression von OSMR-GFP in transient transfizierten Zellen. Die gesamte Zellpopulation ist in der Dot-Plot-Auftragung dargestellt, jeder Punkt repräsentiert eine Zelle. Diagrammpunkte innerhalb der Diagrammregion R1 sind in Grau dargestellt, sie repräsentieren transfizierte Zellen. **C:** Vergrößerte Ansicht der Region R1. Diese wurde in die fünf Subregionen R2 bis R6 eingeteilt. Zellen innerhalb einer Subregion zeichnen sich durch relativ ähnliche Fluoreszenz 1-Werte aus. Für die Zellen in jeder Region kann nun die mittlere GFP- und PE-Fluoreszenz ermittelt werden. **D:** FACS-Analyse der Expression von OSMR-GFP und OSMR Δ I-GFP. Die Korrelation zwischen Gesamtexpression (mittlere Fluoreszenz 1) und Oberflächenexpression (mittlere Fluoreszenz 2) ist dargestellt. Die Auswertung erfolgte wie oben beschrieben. Jeder Diagrammpunkt repräsentiert mindestens 200 transfizierte Zellen.

3.2.4 Mutation eines oder mehrerer Dileucin-Signale innerhalb des Interbox1/2-Bereichs führt zu Konstrukten, die wesentlich besser an der Oberfläche exprimiert werden

In den folgenden Untersuchungen sollte nun das Signal in der Interbox1/2-Region, welches für die Regulation der OSMR-Oberflächenlokalisation verantwortlich ist, exakter identifiziert werden. Generell kann die Oberflächenexpression von Transmembranproteinen durch drei verschiedene Mechanismen negativ reguliert werden: ER-Retention bzw. *Retrieval*, lysosomales *Targeting* sowie Internalisierung (vgl. Abb. 6, Einleitung). Ein ER-Retentions- oder *Retrieval*-Mechanismus verhindert, dass das exprimierte Protein das ER verlassen kann, bzw. führt zu dessen Rückführung in das ER. Im Gegensatz zu ER-Retentionsmotiven sind ER-*Retrieval*-Signale recht gut charakterisiert. Hierbei handelt es sich um Lysin- oder

Arginin-basierende kurze Signale, wobei die Lysin-enthaltenden Signale meist am extremen C-Terminus des Transmembranproteins vorliegen müssen, um funktionell zu sein [133-135]. Im Fall des lysosomalen *Targetings* verlassen die Proteine das ER und werden im Golgi-Apparat vollständig prozessiert, bevor sie dann zum Lysosom transportiert und dort degradiert werden. Bereits an der Plasmamembran angelangte Proteine können durch Internalisierungsprozesse negativ reguliert werden. Internalisierte Proteine werden entweder zum Lysosom transportiert und abgebaut oder zurück zur Plasmamembran „recycelt“ [106]. Sowohl bei lysosomalen *Targeting*- also auch bei Internalisierungsmotiven handelt es sich sehr oft entweder um Tyrosin-basierende oder um Dileucin-Motive [106, 110]. Abbildung 27 zeigt schematisch den OSMR-Interbox1/2-Bereich. Die Aminosäuresequenz wurde auf das Vorhandensein von bekannten negativ-regulatorischen Signalen untersucht. Alle als Signal in Frage kommenden Aminosäuresequenzen sind in dem Schema hervorgehoben.

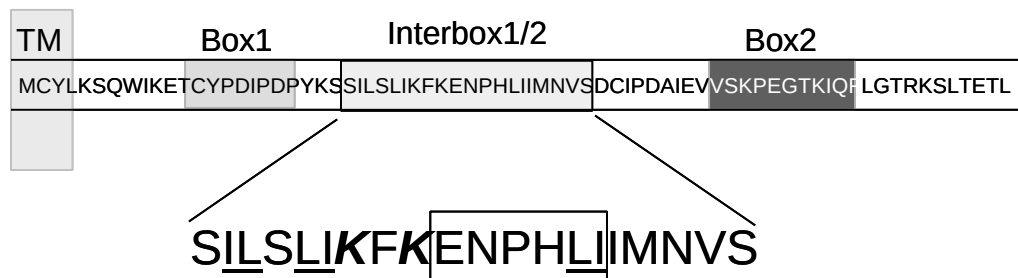


Abbildung 27: Schema des Interbox1/2-Bereichs des OSMR. Aminosäuren, welche Teil eines Dileucin-ähnlichen Signals sein könnten, sind unterstrichen. Die Box markiert eine Sequenz, die einem Konsensusmotiv für lysosomales *Targeting* entspricht. Ein potentielles ER-Retentionsmotiv erscheint in fetter, kursiver Schrift

Zwar befindet sich im Interbox1/2-Bereich ein dem klassischen ER-*Retrieval*-Signal KKXX ähnliches Signal KXK, eine entsprechende Funktion dieses Motivs ist aber aufgrund der Lage im Protein sehr unwahrscheinlich. Beachtlicherweise enthält der Interbox1/2-Bereich des OSMR aber drei Dileucin-ähnliche Motive, von denen die zwei membranproximalen nur durch eine einzige Aminosäure voneinander getrennt sind. Das membrandistale Motiv stimmt interessanterweise mit der Konsensussequenz für lysosomales *Targeting* D/EXXXL/I/V [136-138] überein. Um zu untersuchen, ob eines dieser vier putativen Signale für die negativ-regulatorische Funktion des Interbox1/2-Bereiches verantwortlich ist, wurden basierend auf dem Konstrukt β Ost1 drei neue Konstrukte hergestellt, in denen die für die jeweiligen Signale wichtigen Aminosäuren zu Alanin mutiert wurden. Die neu generierten Konstrukte sind in Abbildung 28A schematisch dargestellt. Zusätzlich wurde das Konstrukt β Ost1 Δ I hergestellt. In diesem wurde analog zum Konstrukt β Ost4 Δ I der gesamte Interbox1/2-Bereich deletiert, diese Rezeptorchimäre diente in den Versuchen als Positivkontrolle. Alle Rezeptoren wurden in Bezug auf Oberflächen- und Gesamtexpression mit dem Konstrukt β Ost1 verglichen. Wie

bereits vermutet, hat die Mutation des Motivs KXXK zu AXA keinen Effekt: die Konstrukte β Ost1 und β Ost1-KKmut unterscheiden sich weder in Bezug auf ihre Oberflächenexpression noch in Bezug auf ihre Gesamtexpression. (Abb. 28B und C, Säulen/Spuren 1+2). Dahingegen wird die Punktmutante β Ost1-AA, in welcher das membrandistale Dileucin-Motiv mutiert wurde, deutlich besser an der Oberfläche exprimiert als β Ost1 (Abb. 28B, vgl. Säulen 1+3). Die messbare Oberflächenexpression der Dreifachmutante β Ost1-3AA, in der alle drei putativen Dileucin-Signale zu Alanin mutiert wurden, ist demgegenüber noch weiter erhöht, interessanterweise unterscheidet sich dieses Konstrukt kaum von der Positivkontrolle β Ost1 Δ I (Abb. 29B, vgl. Säulen 4+5).

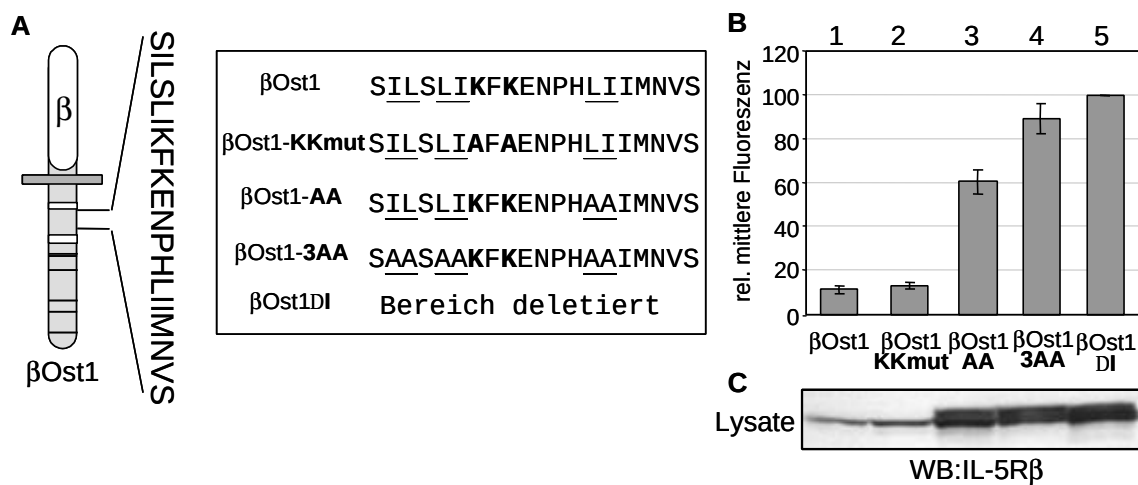


Abbildung 28: Mutation der Dileucin-Motive im Interbox1/2 Bereich des OSMR führt zu Rezeptoren mit erhöhter Oberflächenexpression. **A:** Schema der neuen Konstrukte. Das Ausgangskonstrukt β Ost1 ist links schematisch dargestellt. Der Interbox1/2-Bereich ist vergrößert dargestellt. Putative Dileucin-Signale sind unterstrichen, das potentielle ER-Retrieval-Signal ist in fetten Buchstaben gedruckt. In den Mutanten wurden die relevanten Aminosäuren jeweils zu Alanin mutiert, bei β Ost1 Δ I wurde der gesamte Interbox1/2-Bereich entfernt. **B:** Die Konstrukte wurden in COS-7-Zellen exprimiert und die Oberflächenexpression über Durchflusszytometrie untersucht. Die Normierung erfolgte auf das Konstrukt β Ost1 Δ I. **C:** Transfizierte Zellen wurden in Triton-Lysispuffer lysiert, und gleiche Mengen Protein wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt. Der Nachweis der Rezeptoren erfolgte im Westernblot. Ein repräsentativer Blot ist abgebildet.

Wie β Ost1 Δ I sind auch β Ost1-AA und β Ost1-3AA im Westernblot deutlich als Doppelbande erkennbar (Abb. 28C). Diese Resultate legen die Vermutung nahe, dass die drei Dileucin-Motive innerhalb des Interbox1/2-Bereichs für dessen negativ-regulatorische Funktion von Bedeutung sind. Der Unterschied zwischen der Oberflächenexpression der Konstrukte β Ost1-AA auf der einen sowie β Ost1-3AA und β Ost1- Δ I auf der anderen Seite deutet stark darauf hin, dass mindestens zwei unabhängige negative Signale in diesem Bereich vorhanden sind. Andererseits könnte aber die bessere Oberflächenexpression von β Ost1 Δ I und β Ost1-3AA auch lediglich auf einer besseren Gesamtexpression dieser beiden Proteine gegenüber β Ost1-AA beruhen. Zwar wiesen die drei Konstrukte im Westernblot überwiegend eine ähnliche

Expression auf (siehe Abb. 28C), in einigen Versuchen hingegen schienen β Ost1 Δ I und β Ost1-3AA geringfügig besser exprimiert zu sein (Daten nicht gezeigt). Um diese Frage zu klären, wurden GFP-markierte Chimären hergestellt. Die Konstrukte β Ost4-GFP, β Ost4-AA-GFP und β Ost4-3AA-GFP sind in Abb. 29A schematisch dargestellt. Sie enthalten jeweils C-terminal das fusionierte GFP-Molekül. Bei Expression dieser Fusionsproteine in COS-7-Zellen zeigte sich, dass sich die Konstrukte analog zu den oben beschriebenen Chimären β Ost1, β Ost1-AA und β Ost1-3AA verhalten: Wiederum waren die Konstrukte mit mutiertem Dileucin-Motiv deutlich stärker an der Oberfläche exprimiert (Abb. 29B) und wiesen zudem im Westernblot eine zusätzliche, langsamer migrierende Rezeptorbande auf (Abb. 29C).

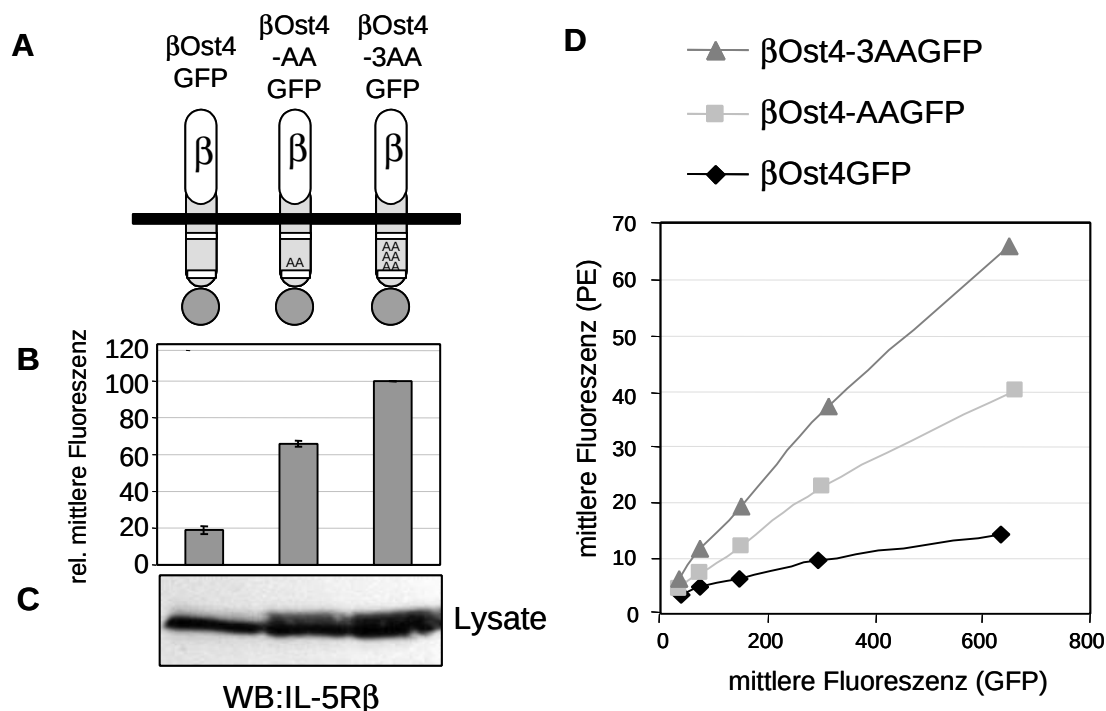


Abbildung 29: Der Interbox1/2-Bereich enthält zwei unabhängige negativ-regulatorische Signale. COS-7-Zellen wurden mit Expressionsvektoren für die angegebenen Konstrukte transfiziert und nach 48h geerntet. **A:** Die verwendeten Konstrukte sind schematisch dargestellt. Sie entsprechen in ihrer Länge dem Konstrukt β Ost4, an dieses wurde C-terminal das GFP-Protein fusioniert. Zusätzlich sind das distale bzw. alle drei Dileucin-Motive punktmuiert. **B+C:** Die Untersuchung der Rezeptorexpression erfolgte über FACS- und Westernblotanalyse wie in der Legende zu Abb. 10 beschrieben. **D:** Korrelation zwischen Gesamt- und Oberflächenexpression bei den verschiedenen Rezeptorkonstrukten. Die Auswertung der FACS-Analyse erfolgte wie in der Legende zu Abb. 26 beschrieben. Ein repräsentatives Diagramm ist abgebildet.

In der FACS-Analyse konnte nun in transient transfizierten COS-7-Zellen untersucht werden, wie sich eine erhöhte Gesamtexpression der Konstrukte, messbar über die GFP-vermittelte Fluoreszenz, jeweils auf deren Oberflächenexpression auswirkt. Dabei zeigte sich, dass Zellen, welche steigende Mengen des Konstruktes β Ost4-GFP exprimierten, nur bedingt auch eine vermehrte Oberflächenexpression dieses Rezeptors aufwiesen (Abb. 29D, rautenförmige

Symbole). Dagegen korrelierte in Zellen, die mit dem Konstrukt β Ost4-3AA-GFP transfiziert waren, die messbare Gesamtexpression pro Zelle viel stärker mit der jeweils gemessenen Oberflächenexpression (Abb. 29D, dreieckige Symbole). Beide Rezeptoren verhalten sich somit analog zu den Konstrukten OSMR-GFP und OSMR Δ I-GFP (Abb. 26D). Die Rezeptorchimäre β Ost4-AA-GFP nimmt zwischen β Ost4-GFP und β Ost4-3AA-GFP eine Intermediärstellung ein (Abb. 29D, viereckige Symbole): Vergleicht man also Zellen mit gleicher Rezeptorgesamtexpression, so wird β Ost4-3AA-GFP deutlich besser an der Oberfläche exprimiert als β Ost4-AA-GFP. Man kann also davon ausgehen, dass die beiden membranproximalen Dileucin-ähnlichen Signale ein zusätzliches negativ-regulatorisches Signal darstellen, welches für die schlechtere Oberflächenexpression von β Ost4-AA-GFP verantwortlich ist.

3.2.5 Die Oberflächenexpression von Konstrukten mit mutiertem Dileucin-Motiv wird durch Jak1 kaum noch beeinflusst

Die bisherigen Versuche lassen vermuten, dass das negativ-regulatorische Signal im membranproximalen Bereich des OSMR ein mindestens zweigeteiltes Signal darstellt, welches aus zwei membranproximalen und einem weiteren membrandistalen Dileucin-ähnlichen Motiv besteht. Sollte es sich bei diesen drei Motiven wirklich um die Signale handeln, welche durch Jak-Bindung an die Box1/2-Region des OSMR maskiert werden, so dürfte sich die Oberflächenexpression des Rezeptors β Ost1-3AA, in dem diese Signale vollständig mutiert sind, durch Jak1-Koexpression nicht mehr beeinflussen lassen. Dahingegen sollte sich eine Jak1-Koexpression auf die Oberflächenexpression von β Ost1-AA eventuell positiv auswirken, da dieses Konstrukt die beiden membranproximalen Dileucin-ähnlichen Signale noch enthält. Um diese Hypothese zu testen, wurden die Konstrukte β Ost1, β Ost1-KKmut, β Ost1-AA, β Ost1-3AA und β Ost1 Δ I in COS-7-Zellen mit Jak1-wt oder der nicht-bindenden Mutante Jak1-L80AY81A koexprimiert. Zunächst wurde die Fähigkeit dieser Konstrukte, Jak1 zu rekrutieren, untersucht. Die Bindungsstudien ergaben, dass abgesehen von dem Konstrukt β Ost1 Δ I, bei dem die Jak1-Bindung reproduzierbar schwächer ausfiel (Abb. 30B, 1. Reihe, letzte Spur), alle Konstrukte noch zu einer ähnlich guten Assoziation von Jak1 in der Lage waren (Abb. 30B, 1. Reihe: die schlechtere Bindung von Jak1 an das Konstrukt β Ost1-3AA ist nicht repräsentativ). Die Jak1-Koexpression führte dementsprechend bei diesen Konstrukten zu einer Liganden-unabhängigen Rezeptor-Tyrosinphosphorylierung (Abb. 30B, 3. Reihe), so dass auch das Adapterprotein Shc mit diesen Rezeptoren koimmunpräzipitiert

werden konnte (Abb. 30B, 4. Reihe). Diese Daten sind ein Beleg dafür, dass die Jak1-Rekrutierung an die verschiedenen Konstrukte, mit Ausnahme von β Ost1 Δ I, in jeweils ähnlicher Weise erfolgte. Die FACS-Analyse ergab, dass sich die Koexpression von Jak1-wt, wie vermutet, am stärksten auf die Oberflächenexpression von β Ost1 und β Ost1KKmut auswirkte (Abb. 30A, Säulen 1-4). Auch die Oberflächenexpression des Konstruktes β Ost1-AA ließ sich durch Jak1 geringfügig, aber reproduzierbar, steigern: die Rezeptoren wiesen bei Jak1-Koexpression durchschnittlich eine etwa 1,4-fach erhöhte Oberflächenexpression auf, und lagen damit im Bereich der Oberflächenexpression des Konstruktes β Ost1-3AA ohne Jak1-Koexpression (vgl. Säulen 6+7 in Abb. 30A).

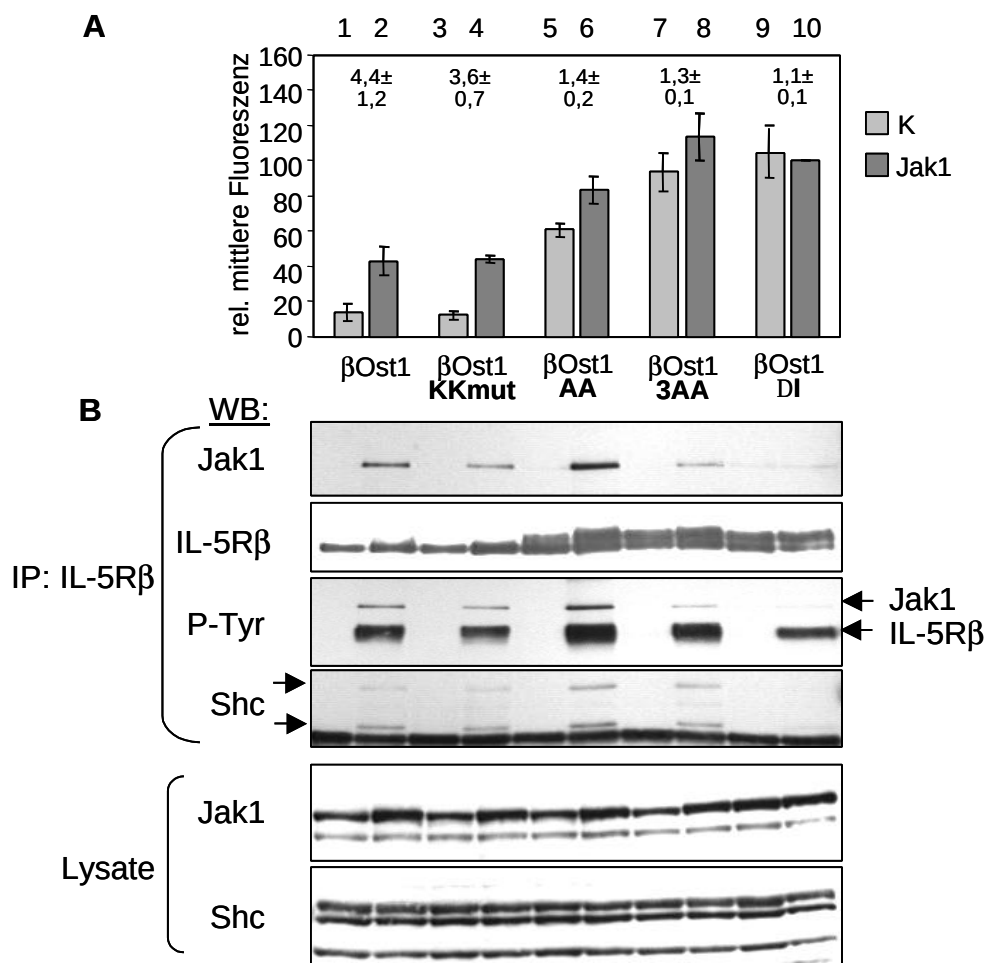


Abbildung 30: Einfluss von Jak1-Koexpression auf die Oberflächenexpression verschiedener OSMR-Chimären. Die angegebenen Rezeptoren wurden mit Jak1-wt bzw. Jak1-L80AY81A (K) in COS-7-Zellen koexprimiert. **A:** Die Oberflächenexpression der Rezeptoren wurde über FACS-Analyse bestimmt, wobei in jeder Versuchsreihe auf das Konstrukt β Ost1 Δ I normiert wurde. In dem Balkendiagramm sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus mindestens drei unabhängigen Versuchsreihen dargestellt. In einer alternativen Auswertung wurde für jeden Rezeptor separat die Jak1-vermittelte Hochregulation errechnet. Die gemittelten Werte $\pm$ Standardabweichung sind im oberen Teil des Diagramms für jeden Rezeptor angegeben. **B:** Für die Bindungsstudien wurden die Zellen nach 48h in Brij-Lysispuffer lysiert, und die Rezeptoren immunpräzipitiert. Präzipitate wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt, und kopräzipitierte Proteine mit den entsprechenden Antikörpern im Westernblot nachgewiesen.

Interessanterweise ließ sich auch die Expression des Konstruktes β Ost1-3AA durch Jak1-Koexpression noch minimal erhöhen, wohingegen die Expression des Konstruktes β Ost1 Δ I durch Jak1 nicht beeinflussbar war, was auf der verminderten Jak1-Bindung an dieses Konstrukt beruhen könnte. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass die Wirkung von Jak1 tatsächlich in erster Linie auf der Maskierung der drei Dileucin-ähnlichen Motive im Interbox1/2-Bereich des OSMR beruht. Zusätzlich kann nicht ausgeschlossen werden, dass auch andere unabhängige Mechanismen existieren, die für die leichte Hochregulation des Konstruktes β Ost1-3AA verantwortlich sind.

3.2.6 Eine Kolokalisation des OSMR mit dem Lysosom lässt sich nicht nachweisen

Da das distale Dileucin-Motiv innerhalb der Aminosäuresequenz **ENPHLI** liegt und somit der Konsensussequenz für lysosomales *Sorting* **D/E-X-X-X-L-L/I/V** entspricht, wäre es denkbar, dass Rezeptoren in Abwesenheit von gebundenen Jaks zum Lysosom geleitet werden und somit nicht zur Zelloberfläche gelangen können. Um zu untersuchen, ob es sich bei diesem Motiv wirklich um ein funktionelles lysosomales Sortierungsmotiv handelt, wurde eine Rezeptorchimäre hergestellt, in welcher die negativ geladene Aminosäure Glutamat an der Position -4 dieses Motivs durch die positiv geladene Aminosäure Lysin ersetzt wurde. Spielt die Aminosäure Glutamat für die Funktion des distalen Dileucin-Motivs eine Rolle, so wäre von dieser Mutation ein ähnlicher Effekt zu erwarten wie von der Mutation des distalen Dileucin-Motivs selbst.

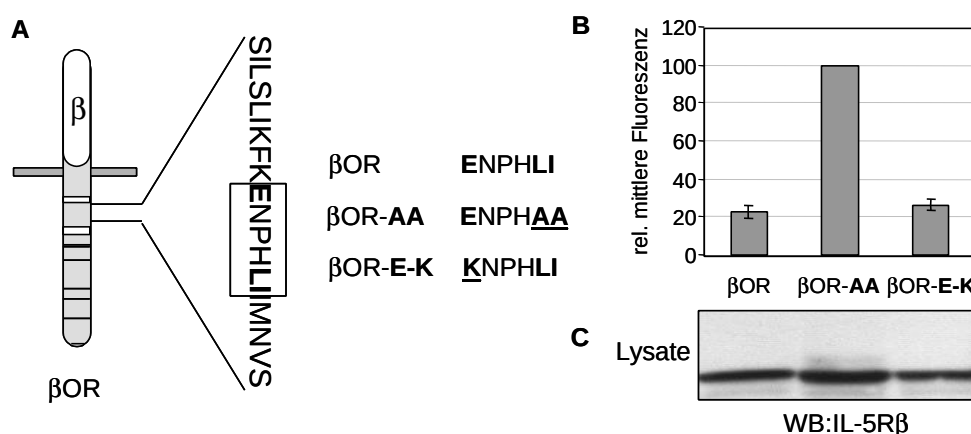


Abbildung 31: Mutation des Glutamats im putativen lysosomalen Sortierungsmotiv hat keinen Einfluss auf die Oberflächenexpression des chimären OSMR. COS-7-Zellen wurden mit Expressionsvektoren für die angegebenen Konstrukte transfiziert und nach 48h geerntet. **A:** Modell der verwendeten Konstrukte. Die Aminosäuresequenz im Bereich des putativen lysosomalen Sortierungsmotivs ist für die Konstrukte β OR, β OR-AA und β OR-E-K angegeben. **B:** Die Oberflächenexpression der Rezeptoren wurde mittels FACS, die Gesamtexpression über Westernblotanalyse untersucht.

COS-7-Zellen wurden mit dem Konstrukt β OSMR-E-K, sowie β OSMR und β OSMR-AA transfiziert und nach 48h im FACS untersucht. In Abb. 31B ist zu sehen, dass sich die Konstrukte β OSMR-E-K und β OSMR weder bezüglich ihrer Oberflächenexpression noch in ihrer Gesamtexpression unterscheiden. Hingegen wurde das mutierte Konstrukt β OSMR-AA sehr viel besser an der Oberfläche exprimiert und trat auch im Westernblot als Doppelbande auf (Abb. 31C). Diese Befunde sprechen dafür, dass das Glutamat für die Funktionalität des distalen Dileucin-Motivs keine Rolle spielt. Da aber eventuell auch Dileucin-Motive, welche nicht der Konsensussequenz D/EXXXLL entsprechen, lysosomales *Targeting* vermitteln können [139], ist es trotz des in Abb. 32B dargestellten Befundes nicht ausgeschlossen, dass es sich bei einem der drei Dileucin-Motive um ein funktionelles lysosomales Sortierungsmotiv handelt. In weiteren Experimenten wurde daher untersucht, ob sich eine Lokalisation des OSMR im Lysosom nachweisen lässt.

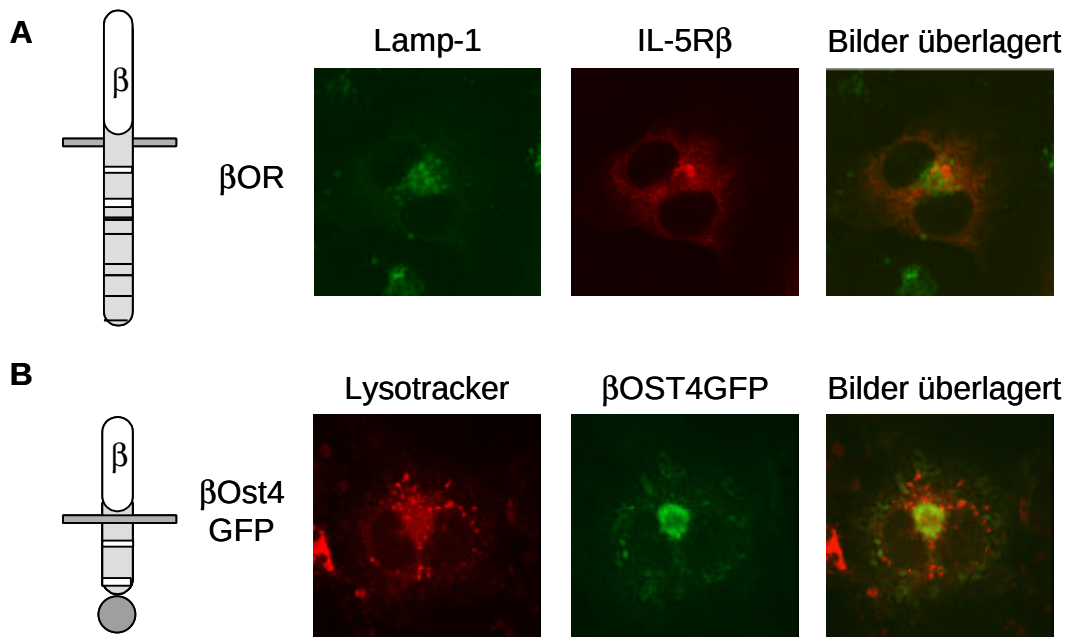


Abbildung 32: Der chimäre OSMR ist nicht im Lysosom nachweisbar. Die angegebenen Konstrukte wurden in COS-7-Zellen exprimiert, und die Zellen am Tag nach der Transfektion auf Deckgläschen ausgesät. **A:** Die Anfärbung des Lysosoms erfolgte in fixierten, permeabilisierten Zellen mit polyklonalen Antikörpern gegen den lysosomalen Marker Lamp-1 und FITC-konjugierten Zweitantikörpern. Die Rezeptoren wurden mit monoklonalen Antikörpern gegen IL-5R β und TRITC-konjugierten Zweitantikörpern sichtbar gemacht. **B:** Lebende Zellen wurden 1 - 2 h vor Fixierung mit der Substanz *Lysotracker* inkubiert. In diesem Fall wurden GFP-markierte Rezeptoren verwendet. Bilder von repräsentativen Zellen wurden jeweils mit Hilfe des ZEISS Laserscanning-Mikroskops LSM510 aufgenommen. In der linken Abb. sind die Färbungen der lysosomalen Strukturen der Zellen in Grün (A) bzw. Rot (B) dargestellt. Die mittlere Abb. zeigt die gefärbten bzw. GFP-markierten Rezeptoren. In der rechten Abb. wurden beide Bilder überlagert.

COS-7-Zellen wurden mit dem chimären Konstrukt β OR transfiziert und mittels Immunfluoreszenz untersucht. Dabei wurde das Lysosom in permeabilisierten Zellen mit Antikörpern gegen das lysosomal lokalisierte Protein Lamp-1 angefärbt. Wie Abb. 32A zeigt,

konnte eine Kolokalisation der Chimären und des lysosomalen Markers Lamp-1 nicht beobachtet werden. Um auszuschließen, dass die fehlende Kolokalisation auf schlechte Zugänglichkeit des Lysosoms für die verwendeten Rezeptor-Antikörper zurückzuführen war, wurde im Folgenden das GFP-markierte OSMR-Konstrukt β Ost4-GFP verwendet. Um außerdem zu verhindern, dass die Permeabilisierung der Zellen evtl. lysosomale Strukturen zerstört, wurde das Lysosom in diesen Versuchen mit der frei durch die Zellmembran diffundierenden Substanz *Lysotracker* angefärbt. Diese Substanz reichert sich im Lysosom an und ist mit einem roten Fluoreszenzfarbstoff versehen, was ihren Nachweis mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie erlaubt. Auch in diesem Experiment ließ sich jedoch keine Lokalisation der Rezeptorchimären im Lysosom nachweisen (Abb. 32B). Diese Befunde sprechen somit dagegen, dass es sich bei einem der drei Dileucin-Motive um ein lysosomales *Targeting*-Signal handelt. Die Oberflächenexpression des OSMR scheint also über einen anderen Mechanismus, z.B. ER-Retention oder *ER-Retrieval*, reguliert zu werden.

3.3 Die Expression des murinen OSMR

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wurde der Versuch unternommen, das Signal zu charakterisieren, welches für die Regulation der Oberflächenexpression des humanen OSMR verantwortlich ist. Tatsächlich gelang es, drei Dileucin-ähnliche Motive im Interbox1/2-Bereich dieses Rezeptors zu identifizieren, welche bei der Regulation der Rezeptor-Lokalisierung eine Rolle spielen. Da es sich bei regulatorischen Signalen oftmals um konservierte Proteinbereiche handelt, bietet es sich bei der Analyse an, homologe Proteinsequenzen aus verschiedenen Spezies miteinander zu vergleichen. Dies erlaubt häufig Rückschlüsse auf die Wichtigkeit bestimmter Aminosäuren für ein gegebenes Signal. Im Fall des OSMR sind bisher nur die humanen und murinen Gene bekannt. Deshalb wurden im dritten Teil der vorliegenden Arbeit die Rezeptoren beider Spezies in Hinblick auf die Regulation ihrer Expression verglichen.

3.3.1 Die Expression des murinen OSMR wird durch *Jak1*-Koexpression nicht beeinflusst

Ein Sequenzvergleich zwischen der humanen und murinen OSMR-Proteinsequenz zeigt, dass beide Rezeptoren sich relativ stark voneinander unterscheiden: So stimmen nur 50% aller Aminosäuren in beiden Rezeptoren miteinander überein [96]. Beim LIFR und bei gp130 liegt die Aminosäuren-Homologie zwischen den murinen und den humanen Rezeptoren bei 70

bzw. 80% und ist damit ungleich höher [140, 141]. Abbildung 33A zeigt einen Vergleich des Interbox1/2-Bereichs beider Rezeptoren, interessanterweise unterscheidet sich die humane von der murinen Sequenz an nur vier Stellen, womit 80% der 20 Aminosäuren in diesem Rezeptorbereich konserviert sind. Auffällig ist, dass die drei Dileucin-ähnlichen Motive, welche bei der Regulation des humanen OSMR eine Rolle spielen, auch im murinen Rezeptor enthalten sind. Dies deutet auf die Möglichkeit hin, dass die Expression des murinen Rezeptors einer ähnlichen Regulation unterliegen könnte wie es für den humanen OSMR in dieser Arbeit gezeigt werden konnte. Um dieser Hypothese nachzugehen, wurden beide Rezeptoren mit Tec bzw. Jak1 in COS-7-Zellen koexprimiert. Überraschenderweise zeigte sich, dass der murine im Gegensatz zum humanen OSMR in seiner Oberflächenexpression nicht durch Jak1 beeinflusst wurde (Abb. 33B).

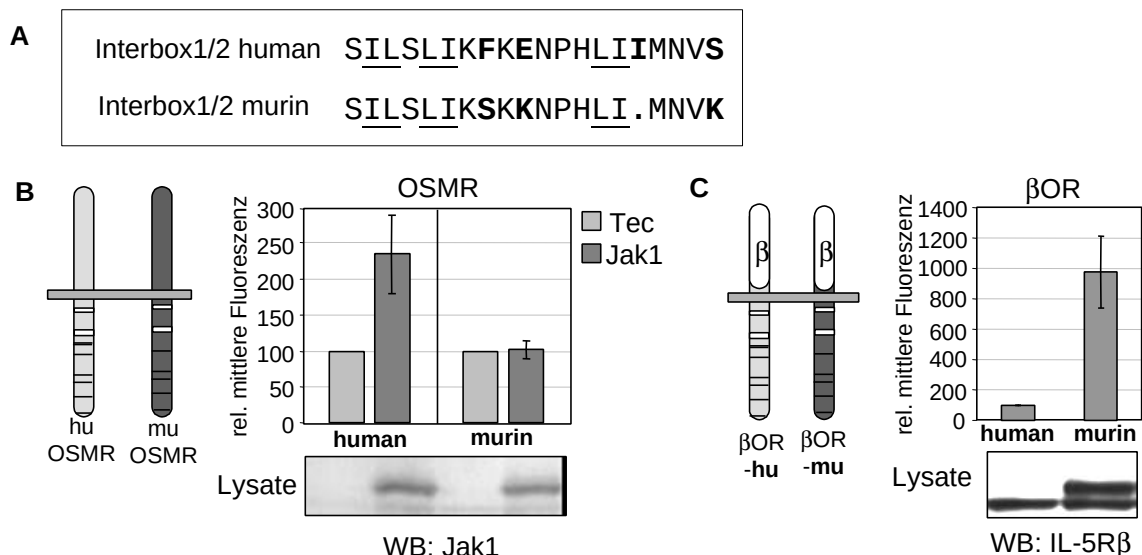


Abbildung 33: Die Oberflächenexpression des murinen OSMR wird durch Jak1-Koexpression nicht beeinflusst. **A:** Sequenzvergleich der Interbox1/2-Regionen des murinen- und des humanen OSMR. Die drei konservierten Dileucin-Signale sind unterstrichen, nicht-konservierte Aminosäuren fett gedruckt. **B:** COS-7-Zellen wurden mit Vektoren für humanen bzw. murinen OSMR sowie Tec oder Jak1 transfiziert. Nach 48h erfolgte die Analyse der Rezeptorexpression über FACS-Analyse, die Jak1-Expression wurde im Westernblot überprüft. **C:** Analoge Rezeptorchimären des humanen und murinen OSMR wurden in COS-7-Zellen exprimiert. Nach 48h wurde die Rezeptor-Expression über FACS- bzw. Westernblotanalyse untersucht.

Offenbar wird also der murine OSMR unabhängig von Jak1 effizient an der Plasmamembran exprimiert. Um nun die Expression des murinen und des humanen Rezeptors besser vergleichen zu können, wurde analog zu der bereits existierenden Rezeptor-Chimäre des humanen OSMR β OR (ab jetzt zum besseren Verständnis β OR-hu genannt) auch vom murinen OSMR eine IL-5R β -Chimäre generiert. Hierzu wurde der Extrazellulärbereich des IL-5R β an den Transmembran- und Intrazellulärbereich des murinen OSMR fusioniert. Das resultierende Konstrukt β OSMRmu (kurz: β OR-mu) sowie das humane Konstrukt β OR-hu wurden in

COS-7-Zellen exprimiert und bezüglich Oberflächenexpression und Gesamtexpression verglichen. Dabei zeigte sich, dass in der Tat das murine Konstrukt deutlich besser auf der Zelloberfläche exprimiert wurde (Abb. 33C). Die bessere Oberflächenexpression korrelierte damit, dass bei der Rezeptordetektion im Westernblot β OR-mu, nicht aber β OR-hu deutlich als Rezeptordoppelbande zu erkennen war (Abb. 33C). Diese Experimente deuten darauf hin, dass der murine Rezeptor, im Gegensatz zum humanen OSMR, unabhängig von Jak1 effizient prozessiert und auf der Zelloberfläche exprimiert wird.

3.3.2 *Der membranproximale Bereich des murinen OSMR enthält kein negativ-regulatorisches Signal*

Obwohl der murine OSMR im Interbox1/2-Bereich über die drei Dileucin-ähnlichen Motive verfügt, welche an der Negativ-Regulation des humanen OSMR beteiligt sind, wird der murine OSMR bedeutend besser exprimiert und ist zudem in seiner Expression durch Jak1 nicht regulierbar. Dieser signifikante Unterschied zwischen beiden Rezeptoren könnte darauf beruhen, dass der murine Box1/2-Bereich trotz der dort vorhandenen drei Dileucin-Motive kein wirksames negativ-regulatorisches Signal enthält. Allerdings wäre auch denkbar, dass Sequenzen außerhalb des Box1/2-Bereichs des murinen OSMR dafür sorgen, dass er trotz eines funktionellen negativ-regulatorischen Signals in seiner Box1/2-Region effizient prozessiert wird. Um zwischen diesen beiden Möglichkeiten zu unterscheiden, wurde eine Deletionsmutante hergestellt, die nur noch den Box1/2-Bereich des murinen OSMR umfasst. Das resultierende Konstrukt β Ost4-mu sowie des entsprechende humane Konstrukt β Ost4 (jetzt zum besseren Verständnis „ β Ost4-hu“) wurden in COS-7-Zellen exprimiert und bezüglich ihrer Oberflächenexpression und Gesamtexpression untersucht. Dabei zeigte sich, dass auch die verkürzte murine Rezeptorchimäre sehr viel besser als das analoge humane Rezeptorkonstrukt an der Zellmembran exprimiert wurde (Abb. 34B, oben), was mit einem höheren Anteil prozessierter Rezeptoren bei dieser Chimäre korrelierte (Abb. 34B, unten). Theoretisch könnte die bessere Expression von β Ost4-mu gegenüber β Ost4-hu allerdings auch auf Unterschieden in den Transmembranregionen beider Rezeptoren beruhen. Um diese Möglichkeit auszuschließen, wurde nun das Konstrukt $\beta\Delta$ cyt-ORB1/2mu hergestellt, in welchem die Box1/2-Region des murinen OSMR auf das gp130-Konstrukt β 130 Δ cyt übertragen wurde. Die Expression dieses sowie des analogen humanen Konstrukts $\beta\Delta$ cyt-ORB1/2 (jetzt: $\beta\Delta$ cyt-ORB1/2hu) wurden verglichen. Da aber wiederum das murine deutlich stärker als das humane Fusionskonstrukt an der Oberfläche lokalisiert war (Abb. 34C), kann tatsächlich davon ausgegangen werden, dass Unterschiede in der Box1/2-Region beider

Rezeptoren für das differentielle Expressionsmuster verantwortlich sind. Offensichtlich enthält die membranproximale Box1/2-Region des murinen OSMR im Gegensatz zum humanen Rezeptor kein negativ-regulatorisches Signal, welches eine effiziente Oberflächenexpression verhindert.

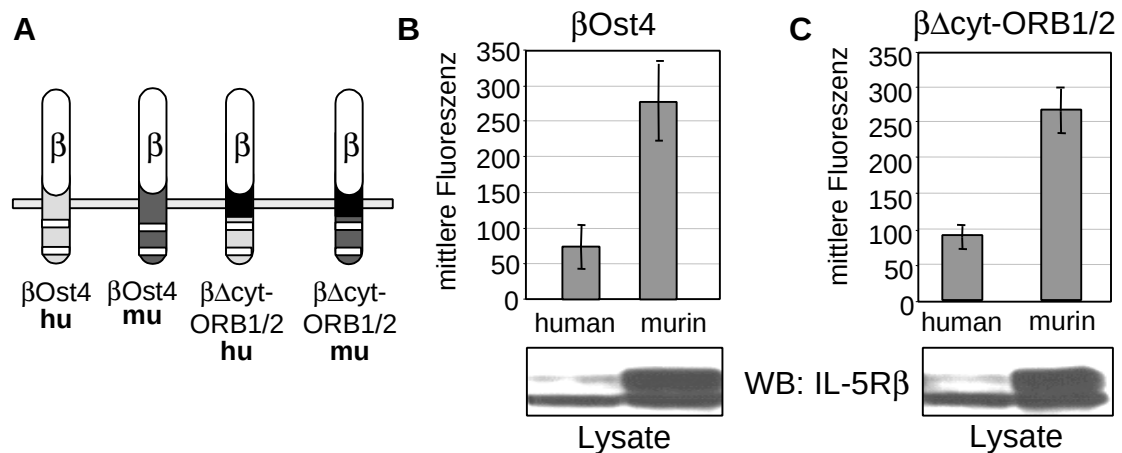


Abbildung 34: Der membranproximale Bereich des murinen OSMR enthält kein negativ-regulatorisches Signal. A: Modell der verwendeten Rezeptorchimären. Der schwarz gefärbte Bereich stammt von gp130. Die Rezeptorbereiche aus dem murinen oder humanen OSMR sind hellgrau bzw. dunkelgrau dargestellt. B+C: Die angegebenen Konstrukte wurden in COS-7-Zellen exprimiert und die Rezeptorexpression mittels FACS und Westernblot analysiert. In den Diagrammen sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten dargestellt.

3.3.3 Der Interbox1/2-Bereich des murinen OSMR ist für dessen bessere Expression verantwortlich

Abbildung 35 zeigt einen Sequenzvergleich zwischen der Box1/2-Region des murinen und des humanen Rezeptors.

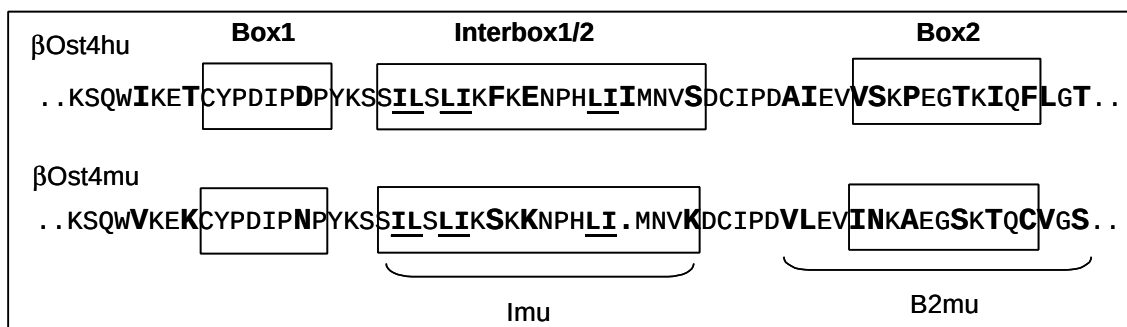


Abbildung 35: Sequenzvergleich zwischen der Box1/2-Region des humanen und des murinen OSMR. Aminosäuren, welche sich in beiden Rezeptoren unterscheiden, sind fett gedruckt. Die drei Dileucin-Motive im Interbox1/2-Bereich sind unterstrichen. Die beiden Rezeptorbereiche des murinen OSMR, die gegen die entsprechenden Abschnitte im humanen Rezeptor ausgetauscht wurden, sind mit Klammern gekennzeichnet.

Während im Box1-Bereich drei Aminosäuren zwischen beiden Rezeptorketten variieren, unterscheiden sich die beiden Interbox1/2-Bereiche an vier Stellen; diese beiden Rezeptorregionen sind somit relativ stark konserviert. Dahingegen variieren die Aminosäuren im Bereich der jeweiligen Box2-Regionen zwischen beiden Rezeptoren sehr stark: 10 von 23 Aminosäuren sind hier unterschiedlich.

Es sind nun zwei Gründe vorstellbar, warum die drei Dileucin-Signale in der Interbox1/2-Region des murinen Rezeptors nicht wirksam sind: Zum einen könnte die murine Box2-Region die Wirksamkeit dieses Signals einschränken. Dafür spricht, dass die Mutagenesestudie des humanen OSMR tatsächlich ergeben hat, dass der Box2-Bereich des OSMR für die Wirksamkeit des negativ-regulatorischen Signals von Bedeutung ist. Da sich nun die murine und die humane Box2 relativ stark voneinander unterscheiden, wäre gut vorstellbar, dass die murine Box2 im Gegensatz zur humanen Box2 die Wirksamkeit der drei Dileucin-Motive nicht effizient unterstützt. Zum anderen könnten neben den drei Dileucin-ähnlichen Signalen andere Aminosäuren innerhalb des Interbox1/2-Bereiches essentiell für die Wirksamkeit des negativ-regulatorischen Motivs sein. Hierbei sollte es sich dann um eine oder mehrere der vier Aminosäuren handeln, welche in der murinen und humanen Sequenz des Interbox1/2-Bereiches nicht übereinstimmen.

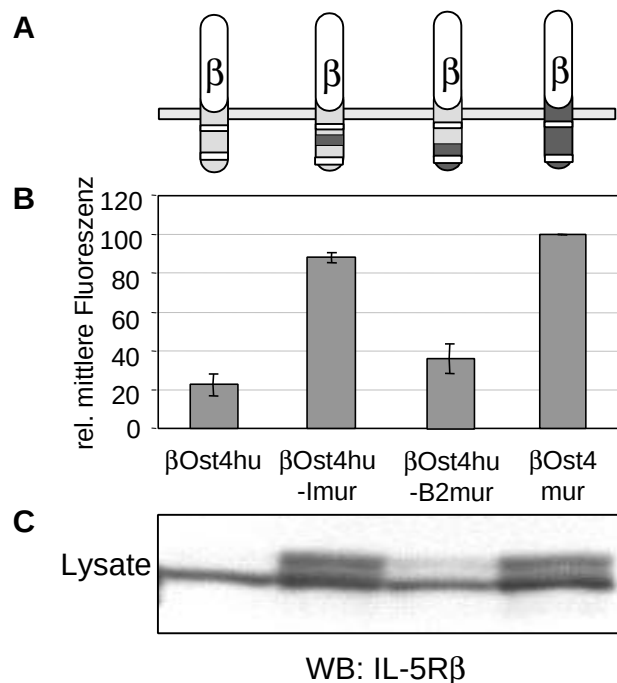


Abbildung 36: Austausch der humanen gegen die murine Interbox1/2-Region führt zu einem Konstrukt, welches bedeutend besser an der Oberfläche exprimiert wird als das Ausgangskonstrukt. A: Schema der verwendeten Konstrukte. Die murinen Rezeptorbereiche sind dunkelgrau dargestellt, Bereiche des humanen OSMR erscheinen in Hellgrau. B+C: COS-7-Zellen wurden mit Expressionsvektoren für die angegebenen Konstrukte transfiziert und 48h nach Transfektion die Expression der Konstrukte über FACS- und Westernblotanalyse untersucht.

Um diese beiden Möglichkeiten zu überprüfen, wurden zwei neue Rezeptorkonstrukte hergestellt. In dem Konstrukt β Ost4hu-Imur, wurde der humane Interbox1/2-Bereich gegen den analogen murinen Bereich ausgetauscht. Das Konstrukt β Ost4hu-B2mur enthält statt der humanen die murine Box2. In Abbildung 35 sind die jeweils eingefügten murinen Bereiche gekennzeichnet. Diese Konstrukte sowie β Ost4hu und β Ost4mu wurden in COS-7-Zellen exprimiert und die Rezeptorexpression analysiert. Es zeigte sich, dass der Austausch der Box2 zwar einen geringen positiven Effekt auf die Oberflächenexpression des humanen OSMR-Konstrukts hatte, demgegenüber führte der Austausch der humanen Interbox1/2-Region durch die entsprechende murine Region aber zu einem Konstrukt, welches fast genauso gut an der Oberfläche exprimiert wurde wie das murine Konstrukt β Ost4mu (Abb. 36B). Auch im Westernblot waren diese beiden Konstrukte nicht zu unterscheiden (Abb. 36C). Somit scheint die unterschiedliche Expression der Konstrukte β Ost4hu und β Ost4mu hauptsächlich auf den unterschiedlichen Interbox1/2-Regionen der beiden Rezeptoren zu beruhen.

3.3.4 *Das LII-Motiv in der Interbox1/2-Region ist für dessen inhibitorische Funktion bei der Regulation der Oberflächenexpression des humanen OSMR von essentieller Bedeutung*

Die obigen Versuche haben einwandfrei demonstriert, dass sich die geringe Oberflächenexpression des humanen Rezeptorkonstrukts β Ost4 drastisch steigern lässt, wenn der humane Interbox1/2-Bereich gegen den analogen murinen Bereich ausgetauscht wird. Diese beiden Konstrukte unterscheiden sich aber nur in vier Aminosäuren, anstelle von Phenylalanin 788 tritt im murinen Rezeptor ein Serin, Glutamat 790 ist im murinen Rezeptor durch ein Lysin ersetzt. Des Weiteren ist das Isoleucin 796, welches im humanen Rezeptor direkt nach dem distalen Dileucin-Motiv folgt, im murinen Rezeptor nicht vorhanden. Schließlich ist die letzte Aminosäure des Interbox1/2-Bereiches, das Serin 800, im murinen Rezeptor durch Lysin ersetzt. Um die Rolle dieser Aminosäuren bei der Regulation der Oberflächenexpression des humanen OSMR zu untersuchen, wurden ausgehend von der Chimäre β Ost4hu drei weitere Rezeptor-Konstrukte generiert (Abb. 37A). In diesen Punktmutanten wurden die Aminosäuren F788 bzw. E790 durch die jeweilige murine Aminosäure ersetzt bzw. die Aminosäure I796 deletiert. Die resultierenden Konstrukte β Ost4huF-S, β Ost4huE-K sowie β Ost4huLII-LI wurden neben den Konstrukten β Ost4hu und β Ost4hu-Imu in COS-7-Zellen exprimiert. Erwartungsgemäß hatte die Mutation des Glutamats 790 keinen Effekt auf die Rezeptorexpression, denn es konnte schon in früheren Versuchen demonstriert werden, dass dieses Glutamat für das negativ-regulatorische Signal

im humanen OSMR nicht relevant ist (vgl. Abb. 31). Dem Phenylalanin 788 hingegen scheint eine gewisse Funktion in dem inhibitorischen Motiv zuzukommen; das Konstrukt β Ost4huF-S wies gegenüber dem Ausgangskonstrukt β Ost4hu eine deutlich erhöhte Oberflächenexpression auf (Abb. 37B). Einen noch größeren Effekt hatte allerdings die Deletion des Isoleucin 796: die Mutante β Ost4-LII-LI wurde fast ebenso gut an der Zelloberfläche exprimiert wie das Kontrollkonstrukt β Ost4hu-Imu; auch im Bezug auf das Erscheinungsbild im Westernblot ähnelten sich diese beiden Rezeptoren. Somit scheint das Isoleucin 796 für die inhibitorische Funktion des Interbox1/2-Bereichs des humanen OSMR von essentieller Bedeutung zu sein. Man kann somit postulieren, dass es sich bei dem membrandistalen negativ-regulatorischen Signal nicht um ein Dileucin- sondern vielmehr um ein Trileucin-ähnliches Motiv handelt.

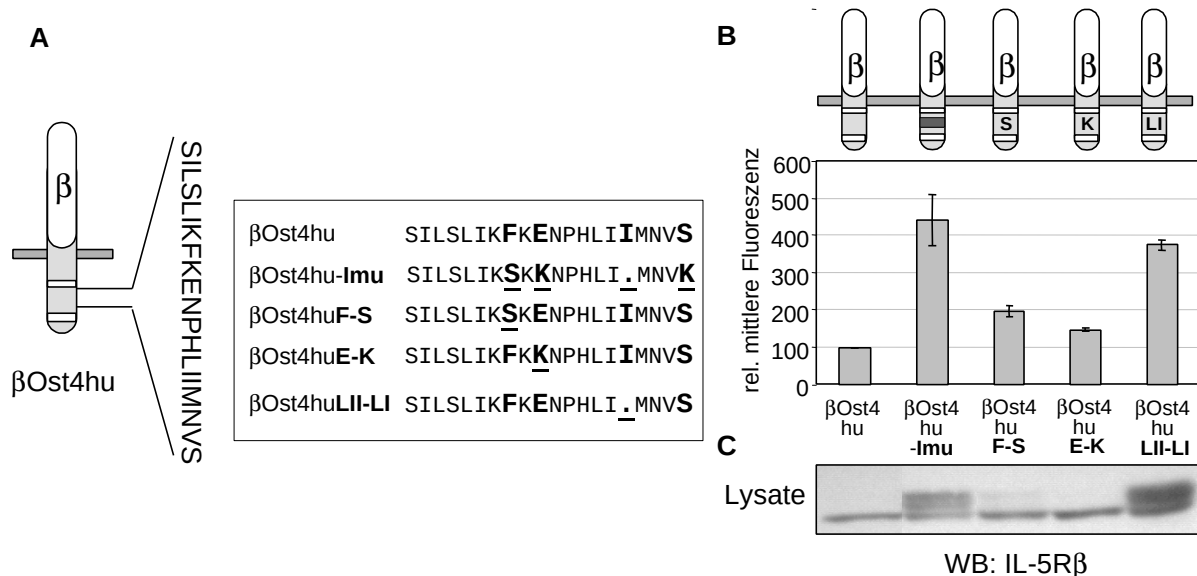


Abbildung 37: Deletion des Isoleucin 796 führt zu einer erheblichen Steigerung der Rezeptoroberflächenexpression. **A:** Schema der verwendeten Konstrukte. Der Interbox1/2-Bereich aller Konstrukte ist angegeben. Die jeweils mutierte/deletierte Aminosäure ist unterstrichen. Die vier Aminosäuren, welche sich im humanen und murinen Rezeptor unterscheiden, sind fett gedruckt. **B+C:** Die angegebenen Konstrukte wurden transient in COS-7-Zellen exprimiert und die Rezeptorexpression über Durchflusszytometrie und Westernblotdetektion analysiert.

4 Diskussion

4.1 Die Regulation der OSMR-Oberflächenexpression durch Januskinasen

4.1.1 Die Jak1-vermittelte Hochregulation der OSMR-Oberflächenexpression

Die hier aufgeführten Ergebnisse geben Einblick in eine neue Funktion der Januskinase Jak1. So ist lange bekannt, dass Jak1 maßgeblich an der Signaltransduktion von IL-6-Typ-Zytokinen beteiligt ist [22, 23]. In dieser Arbeit konnte nun zusätzlich gezeigt werden, dass Jak1 für die effiziente Lokalisation des Oncostatin M-Rezeptors auf der Zelloberfläche von Bedeutung ist: In mehreren Zelllinien führt die Koexpression der Januskinase Jak1 zu einer erhöhten Oberflächenexpression des transient exprimierten OSMR, wohingegen die Expression der Tyrosinkinase Tec die Oberflächenexpression des OSMR nicht zu beeinflussen vermag (Abb. 7 und 8). Hier handelt es sich aber offenbar nicht um einen generellen Effekt von Jak1 auf die Expression von Zytokinrezeptoren, denn die Koexpression von Jak1 wirkt sich im Vergleich sehr viel weniger auf die Oberflächenexpression von gp130 oder des LIFR aus (Abb. 9, 10). Zudem ist eine Interaktion zwischen dem OSMR und Jak1 für dessen Hochregulation durch die Januskinase unbedingt erforderlich, denn Rezeptoren, welche Jak1 aufgrund einer deletierten bzw. mutierten Box1 nicht mehr binden können, werden nicht durch Jak1 reguliert (Abb.12). Auch die Koexpression von Jak1-Konstrukten, welche in der N-terminalen, für die Rezeptorassoziation wichtigen β -grasp-Domäne mutiert waren, führt nicht zu einer erkennbaren Hochregulation des OSMR an der Zelloberfläche (Abb. 12).

Nun haben wir selber in vorangegangenen Untersuchungen gezeigt, dass die Überexpression von Januskinasen die Liganden-unabhängige Tyrosinphosphorylierung der koexprimierten Rezeptoren induziert [56]. Da die Lokalisation von Transmembranproteinen in vielen Fällen durch Phosphorylierungsprozesse reguliert wird [142-146], könnte man annehmen, dass auch die Oberflächenexpression des OSMR durch dessen Phosphorylierung beeinflusst wird. Offensichtlich ist aber die Jak1-Kinaseaktivität für die Erhöhung der OSMR-Oberflächenexpression nicht essentiell (Abb. 13), was eine Beteiligung von Jak1-abhängigen Signalwegen an dieser Regulation sehr unwahrscheinlich macht. Vielmehr scheint Jak1 ausschließlich strukturell für die Oberflächenexpression des OSMR von Bedeutung zu sein.

Diese Befunde gelten nicht nur für überexprimierten OSMR: In zwei unabhängigen, Jak1-defizienten Fibrosarkom-Zelllinien ist signifikant weniger endogener OSMR an der Oberfläche nachweisbar als in den beiden Parentalzelllinien (Abb. 18). Durch Koexpression von Jak1 wiederum lässt sich die Oberflächenexpression des endogenen OSMR in beiden Jak1-defizienten Zelllinien steigern (Abb. 19). Da sich die Expression des endogenen OSMR auf Proteinebene nicht überprüfen lässt, könnte dieser Effekt prinzipiell auf einer gesteigerten OSMR-Gesamtexpression beruhen. Allerdings bewirkt die Expression von Kinase-negativer Jak1 eine ähnliche Erhöhung der messbaren OSMR-Oberflächenlokalisation wie die Expression von wt-Jak1 (Abb.19B). Somit kann zumindest ausgeschlossen werden, dass Jak1 über Signaltransduktionsprozesse, etwa durch Erhöhung der Transkriptionsrate des OSMR-Gens, eine erhöhte Expression des OSMR bewirkt.

Die hier dargestellten Befunde erinnern in vielerlei Hinsicht an die Regulation des IFNAR1-Rezeptors durch Tyk2. Auch hier scheint die mit der IFNAR1-Kette assoziierte Januskinase Tyk2 ausschließlich eine strukturelle Rolle für deren Expression zu spielen; die Kinaseaktivität ist für diese Funktion von Tyk2 nicht essentiell [124]. Allerdings wurde in diesen Untersuchungen lediglich ein Effekt von Tyk2 auf die Expression der endogenen IFNAR1-Kette beobachtet: Wird IFNAR1 überexprimiert, so ist kein Effekt von Tyk2 auf dessen Expression zu erkennen [124]. Im Fall des OSMR hingegen lässt sich sowohl eine Regulation des endogenen als auch des überexprimierten Rezeptors durch Jak1 nachweisen. Diese Unterschiede lassen sich aber eventuell dadurch erklären, dass im Fall des IFNAR1-Rezeptors dessen Gesamtexpression, im Fall des OSMR dessen Oberflächenexpression untersucht wurde. Somit erscheint ein Vergleich dieser Ergebnisse nur begrenzt möglich.

4.1.2 Auch Jak2 und Tyk2 beeinflussen die Oberflächenexpression des OSMR

Die Tatsache, dass der endogene OSMR in Jak1-defizienten Zellen überhaupt an der Zelloberfläche exprimiert wird, deutet darauf hin, dass Jak1 zwar für die Oberflächenlokalisation des OSMR wichtig, nicht aber essentiell ist. Der Grund hierfür liegt aller Wahrscheinlichkeit darin, dass auch die Januskinasen Jak2 und Tyk2 die Oberflächenexpression des OSMR positiv regulieren können. So führt die Koexpression dieser Januskinasen zu einer deutlichen Erhöhung der messbaren OSMR-Oberflächenexpression in COS-Zellen, wohingegen die Koexpression von Jak3 die Oberflächenexpression des OSMR nicht beeinflusst (Abb. 20). Genau das gleiche Bild ergibt sich in Bezug auf den endogenen OSMR: In Jak1-defizienten U4C-Zellen ist dessen Oberflächenlokalisation durch die Expression von Jak2 oder Tyk2, nicht aber von Jak3

steigerbar (Abb. 20). Die Tatsache, dass neben Jak1 auch Jak2 und Tyk2 für die Oberflächenregulation des OSMR eine Rolle spielen, korreliert mit publizierten Befunden, dass diese beiden Kinasen auch an der OSM-vermittelten Signaltransduktion beteiligt sind [87, 99]. In U4C-Zellen konnte dies bestätigt werden: Tatsächlich werden in diesen Zellen Jak2 und Tyk2 nach OSM-Stimulation aktiviert (Abb. 21). Somit können offenbar alle Kinasen, die bei der OSMR-Signaltransduktion eine Rolle spielen, auch die zelluläre Lokalisation des OSMR regulieren.

4.1.3 Jaks unterscheiden sich bezüglich ihrer Fähigkeit, spezifische Signalwege zu aktivieren

Obwohl die zwei Januskinasen Jak2 und Tyk2 die OSMR-Oberflächenexpression ebenso effizient zu regulieren vermögen wie Jak1, scheint ihre Fähigkeit, spezifische Signalwege zu aktivieren, gegenüber Jak1 erheblich begrenzt zu sein. In Jak1-defizienten Zellen führt eine OSM-Stimulation zwar, wie erwähnt, zur Aktivierung der Kinasen Jak2 und Tyk2, resultiert aber, anders als in den Parentalzellen, in keiner deutlichen STAT1- oder Erk1/2-Aktivierung. Kürzlich durchgeführte Experimente haben zudem ergeben, dass auch die Stress-aktivierten MAPK p38 und JNK in diesen Zellen nicht mehr effizient durch OSM aktiviert werden (Ergebnisse nicht gezeigt). Desweiteren konnte bereits in früheren Untersuchungen gezeigt werden, dass das Adapterprotein SHP-2 in Jak1-defizienten Zellen nicht mehr IL-6-abhängig phosphoryliert wird [147]. Anders als im Fall einer IL-6-Stimulation ist aber in diesen Zellen noch eine signifikante STAT3-Phosphorylierung nachweisbar (Abb. 22). Für diese Befunde kann es zahlreiche Ursachen geben. So könnten sich die Januskinasen bezüglich ihrer Fähigkeit unterscheiden, spezifische Tyrosinmotive in den beteiligten Rezeptorketten zu phosphorylieren. Beispielsweise dienen Tyrosinmotive der Konsensussequenz YXXQ zur Rekrutierung von STAT3, wohingegen STAT1 an phosphorylierte YXPQ-Motive bindet [31]. Wiederum andere Tyrosin-Sequenzen in gp130 bzw. dem OSMR vermitteln – über die Rekrutierung der als Adapteren wirkenden Proteine SHP-2 bzw. Shc – die Erk1/2-Aktivierung [56]. Interessanterweise konnte in früheren Versuchen bereits demonstriert werden, dass die Rekrutierung der Proteine STAT1 und STAT3 an überexprimiertes gp130 entscheidend davon abhängt, welche Januskinase jeweils mit gp130 koexprimiert wird: Während sich STAT3 sowohl nach Koexpression von Jak1, Jak2 und Tyk2 mit dem Rezeptor kopräzipitieren lässt, scheint STAT1 deutlich stärker auf die Tyrosinphosphorylierung des Rezeptors durch Jak1 angewiesen zu sein [148]. Diese Befunde sprechen dafür, dass sich tatsächlich nicht alle Rezeptortyrosinmotive gleich gut von Jak1, Tyk2 und Jak2 phosphorylieren lassen. Ebenso

könnten sich die Jaks auch in Bezug auf ihre Fähigkeit unterscheiden, die an den Rezeptor rekrutierten Proteine zu phosphorylieren. In diesem Zusammenhang ist noch nicht zweifelsfrei geklärt, ob die Phosphorylierung der STATs überhaupt durch die Januskinasen selbst oder durch andere Tyrosinkinasen erfolgt. Im letzteren Fall wäre denkbar, dass sich die verschiedenen Jaks in ihrer Fähigkeit unterscheiden, andere Tyrosinkinasen zu rekrutieren und/oder zu aktivieren. Weitere Untersuchungen sind somit nötig, um die Ursachen für diesen Effekt zu klären.

4.2 Maskierung eines negativ-regulatorischen Signals in der OSMR-Box1/2-Region durch Jak1

4.2.1 Der Interbox1/2-Bereich des OSMR enthält ein transferierbares, negativ-regulatorisches Signal, welches durch Jak1 maskierbar ist

Die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente deuten sehr stark darauf hin, dass der Jak1-vermittelten Hochregulation des OSMR an der Zelloberfläche ein Maskierungsmechanismus zugrunde liegt. Für diesen Mechanismus spricht, dass in der Jak-Bindungsregion des OSMR, also in der Box1/2-Region, ein negativ-regulatorisches Signal identifiziert werden konnte: So hat die Deletion des gesamten Box1/2-Bereiches des OSMR bzw. von 20 Aminosäuren aus dem Interbox1/2-Bereich jeweils eine signifikante Erhöhung der Rezeptoroberflächenexpression zur Folge (Abb. 14, 15, 23-25). Auch der Transfer dieser Region auf Rezeptorkonstrukte, welche normalerweise äußerst gut an der Membran lokalisiert sind, führt zu einer drastischen Abnahme der messbaren Oberflächenexpression (Abb. 16). Somit kann man postulieren, dass die Jak1-Bindung an die Box1/2-Region dieses Signal verdecken und somit die Oberflächenexpression des OSMR ermöglichen könnte. Tatsächlich wird mit dem Transfer der Box1/2-Region des OSMR auf das Rezeptorkonstrukt $\beta 130\Delta\text{cyt}$ nicht nur die Oberflächenexpression des Ausgangskonstrukts herabgesetzt, sondern dieses Konstrukt wird - im Gegensatz zu einem vergleichbaren gp130-Konstrukt - durch Jak1-Koexpression auch an der Oberfläche hochreguliert (Abb. 17). Durch den Transfer des negativen Signals wurde dieses Konstrukt somit gleichzeitig „sensitiv“ für den Maskierungseffekt durch Jak1. Die Tatsache, dass sich die Jak1-Koexpression sehr viel stärker auf die Oberflächenexpression des OSMR als auf den LIFR oder gp130 auswirkt, kann damit erklärt werden, dass diese offenbar in ihrer Box1/2-Region nicht über ein ähnlich starkes negativ-regulatorisches Motiv verfügen wie der OSMR.

Interessanterweise gibt es viele Beispiele für die Regulation der Oberflächenexpression von Transmembranproteinen durch Maskierung von negativ-regulatorischen Signalen. Allerdings wurde dieser Mechanismus bisher hauptsächlich für Proteine beschrieben, welche Teil von multimeren Komplexen sind. So wird z.B. der aus acht Untereinheiten bestehende T-Zell-Rezeptor-Komplex nur dann an der Zelloberfläche exprimiert, wenn alle Rezeptoruntereinheiten korrekt angeordnet sind [149]. Die Expression einzelner Untereinheiten führt zu intrazellulärer Retention, oft gefolgt von Degradation dieser Ketten [149, 150]. In verschiedenen T-Zell-Rezeptoruntereinheiten konnten mittlerweile Signale für ER-Retention, Degradation und lysosomales *Targeting* identifiziert werden [151-158], die durch eine korrekte Anordnung der verschiedenen Untereinheiten maskiert werden können [137, 151, 159, 160]. Auch für den IgE-Rezeptor [161], für verschiedene Ionen-Kanäle wie z.B. den ATP-sensitiven K^+ -Kanal [133] und den spannungsaktivierten Ca^{++} -Kanal [162], sowie für den GABA_B-Rezeptor GB1, ein Mitglied der G-Protein-gekoppelten Rezeptor-Familie [163], sind ähnliche Maskierungsprozesse beschrieben worden. In allen Fällen gelangen die jeweiligen Transmembranproteine nur dann zur Zelloberfläche, wenn das negativ-regulatorische Signal in einer Untereinheit durch eine korrekt angeordnete andere Untereinheit des Proteinkomplexes maskiert ist. Somit wird gewährleistet, dass nur funktionale Komplexe an der Zelloberfläche exprimiert werden.

4.2.2 Ein Jak-vermittelter Maskierungsmechanismus als Qualitätskontrolle für Zytokinrezeptoren

Auch im OSMR scheint die Existenz des maskierbaren, negativ-regulatorischen Signals sicherzustellen, dass nur funktionaler, also signalkompetenter OSMR an die Zelloberfläche gelangt: In COS-7-Zellen konnte mit Hilfe von GFP-markierten OSM-Rezeptoren demonstriert werden, dass die Zahl der an der Zelloberfläche detektierbaren Rezeptoren selbst bei massiver Rezeptorexpression stark eingeschränkt ist. Ist hingegen der Interbox1/2-Bereich der GFP-markierten Konstrukte deletiert, so korreliert die Zunahme der Gesamtexpression des OSMR mit einer ähnlichen Zunahme der messbaren OSMR-Oberflächenexpression (Abb. 25). Dieser Befund spricht in der Tat stark dafür, dass ein zellulärer Faktor, und zwar mit großer Wahrscheinlichkeit die endogenen Januskinasen, die Oberflächenexpression des überexprimierten OSMR effizient limitiert. Durch die Deletion des negativ-regulatorischen Signals wäre die so vermittelte Qualitätssicherung außer Kraft gesetzt, da die Rezeptoren nun unabhängig von gebundenen Januskinasen an die Zelloberfläche gelangen können.

Wie bereits erwähnt ist die Regulation der Expression von Zytokinrezeptoren durch assoziierte Januskinasen nicht auf den OSMR beschränkt. Neben der Regulation des IFNAR1 durch Tyk2 ist mittlerweile auch die Regulation des EpoR durch Jak2 demonstriert worden [164]. Dies spricht dafür, dass es sich bei der Regulation von Zytokinrezeptoren durch assoziierte Januskinasen um einen verbreiteten Mechanismus innerhalb dieser Rezeptorfamilie handeln könnte. Allerdings werden offenbar nicht alle Zytokinrezeptoren gleichermaßen durch die assoziierten Januskinasen reguliert. So konnte in der vorliegenden Arbeit demonstriert werden, dass die Jak1-Koexpression auf die Oberflächenexpression von gp130 und des LIFR nur einen geringen Einfluss hat (Abb. 9, 10). Auch scheint die Kinase Jak3 weder für die Oberflächenexpression der endogenen noch der überexprimierten *common gamma chain* essentiell zu sein (John O`Shea, persönliche Mitteilung). Um die Ursachen für diese Unterschiede zu ermitteln, muss aber zunächst geklärt werden, auf welchem Mechanismus die Jak-vermittelte Regulation der Zytokinrezeptoren jeweils beruht. So könnte es sein, dass die Effizienz anderer Regulationsmechanismen sehr viel stärker von der Anzahl der exprimierten Rezeptoren beeinträchtigt wird, als dies beim OSMR der Fall ist. Befunde, die mit überexprimiertem gp130 oder LIFR erhoben wurden, erlauben deshalb nicht unbedingt Rückschlüsse auf zelluläre Situationen, in denen erheblich weniger Rezeptoren exprimiert werden. Tatsächlich haben eigene Untersuchungen kürzlich ergeben, dass die Oberflächenexpression des endogenen gp130 in Jak1-defizienten Zellen erheblich stärker reduziert ist, als man dies aufgrund der Versuche in COS-7-Zellen erwarten würde (Ergebnisse nicht gezeigt).

4.3 Drei Dileucin-ähnliche Motive im Interbox1/2-Bereich des OSMR wirken sehr wahrscheinlich als ER-Retentions-/Retrieval-Signal

4.3.1 Drei Dileucin-Motive im Interbox1/2-Bereich des OSMR wirken als negativ-regulatorisches Signal

Der Interbox1/2-Bereich des OSMR enthält drei Dileucin-ähnliche Motive, wovon das distale der Konsensussequenz für lysosomales *Targeting* D/E-X-X-X-L-L/I/M entspricht, wie es z.B. in der CD3 γ -Kette identifiziert wurde [136-138]. Tatsächlich bewirkt die Mutation des distalen Motivs eine signifikante Steigerung der Oberflächenexpression. Aber auch die membranproximalen Motive sind an dem negativ-regulatorischen Signal beteiligt. Durch die zusätzliche Mutation dieser beiden Motive kann die Oberflächenexpression des OSMR weiter erhöht werden; solche Konstrukte weisen eine ähnliche Oberflächenexpression auf wie

Konstrukte, in denen der Interbox1/2-Bereich vollständig deletiert ist (Abb. 28). Während sich die Koexpression von Jak1 nicht signifikant auf die Oberflächenexpression der Konstrukte mit drei mutierten Dileucin-Motiven auswirkt, lässt sich die Oberflächenexpression eines Konstrukts, in dem die beiden membranproximalen Motive noch erhalten sind, deutlich durch Jak1-Koexpression steigern (Abb. 30). Man darf aufgrund dieser Befunde davon ausgehen, dass alle drei Dileucin-Motive durch Jak1-Bindung maskiert werden können.

4.3.2 Lysosomales Targeting des OSMR ist nicht nachweisbar

Obwohl das distale Dileucin-Motiv in der Interbox1/2-Region des OSMR der Konsensussequenz für lysosomales *Targeting* entspricht, und lysosomales *Targeting* mit dem Expressionsmuster des OSMR sehr gut vereinbar wäre, sprechen weitere in dieser Arbeit gemachten Befunde stark dagegen, dass das negativ-regulatorische Signal den Transport des OSMR zum Lysosom induziert. Zunächst konnte klar gezeigt werden, dass ein Austausch der sauren Aminosäure Glutamat durch die basische Aminosäure Lysin an der wichtigen Stelle -4 des putativen lysosomalen *Targetingsignals* ENPHLI keinen Effekt auf die Oberflächenexpression des chimären OSMR hat (Abb. 31). Dies spricht stark dagegen, dass es sich bei dem distalen Motiv um ein klassisches lysosomales *Targeting*motiv handelt. Um zu untersuchen, ob die drei Dileucinmotive eventuell trotzdem lysosomales *Targeting* vermitteln können, wurde mit verschiedenen Methoden versucht, eine lysosomale Lokalisation des chimären OSMR nachzuweisen, doch weder das chimäre Konstrukt β OR noch ein GFP-markiertes, verkürztes Konstrukt lokalisieren im Lysosom (Abb. 32). Da das Lysosom in den Versuchen auf zwei verschiedene Weisen angefärbt wurde, ist es unwahrscheinlich, dass die fehlende Kolokalisation ein experimentelles Problem darstellt. Dieser Befund korreliert mit der Tatsache, dass auch verschiedene lysosomale Inhibitoren wie Chloroquin und Ammoniumchlorid in bisherigen Experimenten keinen Einfluss auf die OSMR-Expression hatten (Ergebnisse nicht gezeigt). Somit ist davon auszugehen, dass die Wirkung der drei im Interbox1/2-Bereich des OSMR vorhandenen Dileucin-Motive nicht auf lysosomalem *Targeting* sondern auf einem anderen Mechanismus beruht.

4.3.3 Das Expressionsmuster des chimären OSMR deutet auf eine ER-Retention dieses Rezeptors hin

In Immunfluoreszenzuntersuchungen lassen sich chimäre OSMR-Konstrukte mit intaktem Interbox1/2-Bereich zu einem großen Anteil intrazellulär, und zwar in ER und Golgi, lokalisieren (Abb.11, 15). Konstrukte, denen der Interbox1/2-Bereich fehlt, sind hingegen kaum noch im ER, sondern vorwiegend im Golgi und an der Zelloberfläche nachweisbar (Abb.15, 24). Die veränderte Lokalisation dieser Konstrukte korreliert jeweils mit einer deutlichen Zunahme der Endo H-resistenten, d.h. vollständig prozessierten Rezeptorform. Diese Befunde deuten stark auf eine ER-Retention des OSMR hin. Auch kürzlich durchgeführte *pulse-chase*-Experimente mit chimären OSMR-Konstrukten sind sehr gut mit der ER-Retention des humanen OSMR vereinbar, denn in diesen Versuchen trat eine effiziente Rezeptorprozessierung nur bei Konstrukten mit deletiertem Interbox1/2-Bereich auf (Ergebnisse nicht gezeigt). Diese Befunde sind insofern überraschend, als dass es sich bei dem negativ-regulatorischen Signal im OSMR um Dileucin-ähnliche Motive handelt. Diese Motive spielen zwar bei mehreren *Targeting*-Prozessen eine Rolle, so vermitteln sie u.a. die Internalisierung und, wie erwähnt, das lysosomale Targeting von Proteinen [104, 105]; aber in beiden Fällen werden jeweils vollständig prozessierte Proteine transportiert. Die ER-Lokalisation des chimären OSMR lässt sich somit durch ein typisches Dileucin-Motiv nicht erklären.

Interessanterweise scheint mittlerweile geklärt zu sein, wie Tyk2 die Expression des IFNAR1 reguliert: Anscheinend maskiert Tyk2 ein Dileucin-Signal, welches sich im membranproximalen Bereich der IFNAR1-Kette befindet. Die Maskierung dieses Motivs durch Tyk2 verhindert offenbar die Internalisierung des Rezeptors von der Plasmamembran. Im Gegensatz zum OSMR wird der IFNAR1 effizient prozessiert, d.h. Tyk2 beeinflusst durch Maskierung des Dileucin-Signals nicht die Prozessierung, sondern vielmehr die Lokalisation der vollständig prozessierten Rezeptoren. Assoziiert Tyk2 an die prozessierten Rezeptoren, so verbleiben diese an der Plasmamembran. In Abwesenheit von Tyk2 werden die Rezeptoren internalisiert und befinden sich in Endosomen-ähnlichen Strukturen (Sandra Pelligrini, unveröffentlichte Ergebnisse). Somit handelt es sich bei dem Dileucin-Motiv im IFNAR1-Rezeptor – im Gegensatz zu den Dileucin-Motiven im OSMR – um ein typisches Dileucin-Signal.

4.3.4 Bei dem distalen negativ-regulatorischen Motiv handelt es sich um kein Dileucin- sondern um ein Trileucin-ähnliches Motiv

Wie der humane OSMR, so enthält auch der murine OSMR in seiner Interbox1/2-Region drei Dileucin-Motive. Deshalb war stark zu vermuten, dass auch die Expression des murinen OSMR durch diese Motive reguliert wird. Das Gegenteil ist jedoch der Fall: Im Gegensatz zum humanen Rezeptor wirkt sich eine Jak1-Koexpression nicht auf die Oberflächenexpression des murinen OSMR aus (Abb. 33). Zudem wird der chimäre murine OSMR - im Gegensatz zum analogen humanen Konstrukt - effizient prozessiert und sehr gut an der Zelloberfläche exprimiert (Abb. 33). Ferner konnte gezeigt werden, dass die bessere Expression des murinen Rezeptors zumindest teilweise darauf zurückzuführen ist, dass in diesem Rezeptor das Isoleucin 796 fehlt, welches im humanen OSMR direkt auf das distale Dileucin-Motiv folgt. Wird dieses Isoleucin im humanen Rezeptor deletiert, so steigt der Anteil von vollständig prozessierten und an der Zelloberfläche exprimierten Rezeptoren beachtlich (Abb. 37). Somit scheint es sich beim funktionalen distalen Motiv im humanen OSMR also nicht um das Dileucin- ähnliche Motiv LI sondern vielmehr um das Trileucin-ähnliche Motiv LII zu handeln. Dieser Umstand ist ein weiterer Beleg dafür, dass das distale Motiv in der Tat kein typisches Dileucin-Motiv darstellt. Dieses neuartige Signal könnte nun auf zweierlei Art eine ER-Retention des OSMR vermitteln.

- **Modell 1: Das LII-Motiv im Interbox1/2-Bereich des OSMR wirkt als ER Retrieval-Signal**

Wie bereits mehrfach erwähnt, wird die ER-Lokalisation von Transmembranproteinen oftmals über Lysin- oder Arginin-haltige ER-Retrieval-Motive vermittelt. Nun ist vor einiger Zeit jedoch eine neue Klasse von ER-Retrieval-Signalen beschrieben worden, die nicht auf Lysin oder Arginin basieren [165]. Diese sind sehr viel schlechter charakterisiert als die oben aufgeführten Motive und zeichnen sich unter anderem durch das Vorhandensein von aromatischen Aminosäuren aus [165]. In dem OSMR-Interbox1/2-Bereich befindet sich interessanterweise die aromatische Aminosäure Phenylalanin, und es konnte gezeigt werden, dass die Mutation dieses Phenylalanins eine Steigerung der Rezeptoroberflächenexpression zur Folge hat (Abb. 37). Diese Aminosäure sowie das membrandistale Trileucinmotiv könnten also Teil eines neuartigen ER-Retrieval-Signals sein.

- **Modell 2: Die Dileucin-ähnlichen Motive sind Teil einer dreidimensionalen, hydrophoben Struktur, welche die ER-Retention vermittelt**

Eine weitere Möglichkeit besteht darin, dass die drei Dileucin-Motive im Interbox1/2-Bereich kein lineares Signal darstellen, welches ER-Retrieval vermittelt, sondern vielmehr Teil einer dreidimensionalen Struktur sind, welche zur ER-Retention der Rezeptoren führt. Dies würde erklären, warum die Wirkung dieses Bereiches so stark vermindert ist, wenn der Box2-Bereich deletiert wird (Abb. 23, 24, 36): Die Entfernung eines solch großen Rezeptorbereichs hätte wohl einen sehr viel größeren Einfluss auf eine dreidimensionale Struktur als auf ein kurzes, lineares Signal. Es wäre z. B. vorstellbar, dass die Leucine und Isoleucine im Interbox1/2-Bereich eine hydrophobe Struktur darstellen, die normalerweise durch gebundenes Jak1 verdeckt wird. Es ist bekannt, dass hydrophobe Bereiche von Proteinen während der Faltung im ER solange von Chaperonen gebunden werden, bis sie dann - nach erfolgter Faltung - innerhalb der Proteinstruktur verdeckt vorliegen [100]. Da die anhaltende Bindung von Transmembranproteinen an ER-Chaperone eine ER-Retention verursachen kann [100], wäre vorstellbar, dass ein nicht durch Jak1 verdecktes, hydrophobes Signal im Interbox1/2-Bereich des OSMR dessen ER-Retention vermittelt. In diesem Fall würden Januskinasen also mit ER-Chaperonen um die Bindung an den membranproximalen Bereich des OSMR konkurrieren, und durch die Verdrängung von Chaperonen dem OSMR das Verlassen des ERs ermöglichen.

Die Regulation des EpoR durch Jak2 weist interessanterweise sehr viel Ähnlichkeit mit den in dieser Arbeit gemachten Befunden auf. Schon in älteren Veröffentlichungen ist gezeigt worden, dass nur ein geringer Teil des überexprimierten EpoR das ER verlässt und zur Zelloberfläche gelangt, ein Großteil der Rezeptoren wird über das Proteasom abgebaut [102]. In einer kürzlich erschienenen Veröffentlichung konnte nun außerdem demonstriert werden, dass die Deletion des membranproximalen Bereichs des EpoR wie im Fall des OSMR zu einer erhöhten Oberflächenexpression führt [164]. Im Gegensatz zum OSMR konnte in der Box1/2-Region des EpoR jedoch kein einzelner Bereich identifiziert werden, welcher die Oberflächenexpression des EpoR negativ beeinflusst. Die Autoren vermuten, dass die ER-Retention des EpoR darauf beruht, dass dessen Box1/2-Bereich nur sehr ineffizient im ER gefaltet wird. Jak2 kann dem Modell zufolge dessen Faltung positiv beeinflussen und somit gleichsam als Chaperon wirken [164].

Interessant erscheint in diesem Zusammenhang die Tatsache, dass der ungefaltete EpoR über das Proteasom abgebaut wird [102]. Vermittelt ein hydrophobes Signal im Interbox1/2-

Bereich des OSMR tatsächlich dessen ER-Retention, so ist es sehr wahrscheinlich, dass auch ein Teil des OSMR über das Proteasom abgebaut wird. In dieser Arbeit konnte demonstriert werden, dass chimäre OSMR-Konstrukte, bei denen die drei Dileucin-Motive mutiert waren, oder deren Interbox1/2-Bereich deletiert war, nicht nur eine bessere Oberflächenexpression sondern auch eine erhöhte Gesamtexpression aufwiesen (Abb. 14, 23, 24, 28). Dieser Umstand ist sehr gut mit einem proteasomalen Abbau des OSMR vereinbar.

4.3.5 Die Prozessierung von Rezeptor/Jak-Komplexen

Unabhängig davon, wie die Dileucin-Signale im membranproximalen Bereich des OSMR dessen ER-Lokalisation vermitteln, setzt eine solche Lokalisation voraus, dass die Bindung der Jaks an den OSMR bereits im ER erfolgt, denn nur so kann das negative Signal maskiert werden. Für Jak2 ist eine ER-Lokalisation mehrfach beschrieben worden [123, 164]. Immunfluoreszenzdaten aus unserem Labor zeigen, dass auch Jak1 teilweise am ER lokalisiert ist (unveröffentlichte Befunde Auyeung, Smyczek). Dies spricht dafür, dass Jaks tatsächlich schon sehr früh während der Rezeptorprozessierung mit dem OSMR interagieren können, was im Einklang mit der engen Beziehung zwischen Zytokinrezeptoren und assoziierten Januskinasen stünde. Leider gibt es noch keine gelöste Proteinstruktur von einem Zytokinrezeptor-Jak-Komplex, so dass man nur spekulieren kann, welcher Art die Interaktion von Rezeptor und Januskinasen auf Proteinebene tatsächlich ist. Mit Hinblick darauf ist es bemerkenswert, dass die Januskinasen im gp130/Jak1-Komplex den Rezeptor, an den sie einmal gebunden haben, wohl nicht mehr verlassen (Giese et al., zur Veröffentlichung eingereicht). Beide Proteine weisen zudem vergleichbare Halblebenszeiten auf [166]. Man kann also davon ausgehen, dass der Komplex aus Zytokinrezeptor und Kinase nach erfolgter Zusammenlagerung im ER tatsächlich eine ähnliche Einheit darstellt wie Rezeptortyrosinkinasen. Zumindest für den humanen OSMR kann man postulieren, dass „nackte“ Rezeptoren ohne assoziierte Januskinase ausserhalb des ER nicht existieren.

4.4 Die unterschiedliche Regulation des humanen und des murinen OSMR

Überraschenderweise konnte im Laufe dieser Arbeit festgestellt werden, dass die Oberflächenexpression des murinen und des humanen OSMR unterschiedlich reguliert wird, obwohl es sich hier um homologe Rezeptoren handelt. Auch andere Befunde sprechen dafür, dass sich diese beiden Rezeptorketten relativ stark voneinander unterscheiden. Zum einen weisen beide

Rezeptoren mit einer Homologie von nur 50% eine relativ niedrige Ähnlichkeit auf [96, 97]. Die Homologie der anderen beiden signaltransduzierenden Rezeptoruntereinheiten der IL-6-Typ-Zytokine, gp130 und LIFR, liegt deutlich höher [140, 141]. Zudem unterscheiden sich der murine und der humane OSMR maßgeblich dadurch, dass weder murines OSM über den humanen, noch humanes OSM über den murinen Rezeptor zu signalisieren vermag [97]. Auch dies verhält sich z.B. bei dem Zytokin IL-6 anders. Während humanes OSM mit geringer Affinität an gp130, aber nicht an den humanen OSMR bindet, kann murines OSM sowohl an den murinen OSMR als auch an murines gp130 binden [96]. Der größte Unterschied zwischen beiden Rezeptorsystemen besteht aber darin, dass das Zytokin OSM im murinen System ausschließlich über den gp130/OSMR-Komplex signalisiert [66]. Demgegenüber signalisiert humanes OSM sowohl über den OSMR/gp130- als auch alternativ über den LIFR/gp130-Komplex [9]. Somit bestätigen die hier gemachten Befunde den Umstand, dass es in Bezug auf die OSM-Signaltransduktion beträchtliche Unterschiede zwischen dem humanen und dem murinen System gibt. Was die Regulation des Rezeptors durch Jak1 angeht, erinnert der murine OSMR sehr viel stärker an den humanen LIFR als an den humanen OSMR. Aufgrund dieser zahlreichen Unterschiede sollten Befunde, welche die OSM-Signaltransduktion betreffen, nicht ohne weiteres aus dem murinen System auf das humane System übertragen werden und umgekehrt.

4.5 Die Relevanz der Rezeptoroberflächenexpression für die Signaltransduktion von Zytokinrezeptoren

In dieser Arbeit konnte demonstriert werden, dass der humane OSMR, nicht aber humanes gp130, der humane LIFR oder der murine OSMR, einer stringenten Qualitätskontrolle unterliegt. Offenbar gelangen im Fall des humanen OSMR nur Rezeptoren zur Zelloberfläche, welche Jak1, Jak2 oder Tyk2 assoziiert haben, wohingegen bei den anderen Rezeptoren – zumindest im Falle ihrer Überexpression - davon auszugehen ist, dass sie auch ohne assoziierte Januskinasen effizient an der Plasmamembran exprimiert werden. Während Rezeptoren wie der IFNAR1 und der EpoR sich wie der humane OSMR verhalten, also wohl einer stringenten Kontrolle unterliegen, verhält sich die *common g-chain* anscheinend eher analog zu den anderen IL-6-Typ-Rezeptoren. Abbildung 38 fasst exemplarisch die unterschiedliche Regulation des humanen OSMR und des humanen LIFR zusammen. Die unterschiedliche Regulation dieser beiden Rezeptoren hat zur Folge, dass es bei Überexpression dieser Rezeptoren zu einem sehr unterschiedlichen Expressionsbild kommt:

So ist in diesem Modell zwar sehr viel weniger OSMR an der Plasmamembran lokalisiert als LIFR, allerdings verfügen alle OSMR-Moleküle an der Zelloberfläche über assoziiertes Jak1, wohingegen ein beträchtlicher Anteil des LIFR ohne Jak1 zur Zellmembran gelangt ist. In diesem Modell sollten diese LIFR-Moleküle deshalb nicht signalkompetent sein. In früheren Versuchen haben wir interessanterweise festgestellt, dass chimäre OSMR-Konstrukte in COS-7-Zellen trotz einer bedeutend schlechteren Oberflächenexpression als entsprechende LIFR-Konstrukte sehr viel besser zu signalisieren vermögen [20]. Dies könnte auf der in dem Modell in Abb. 38 dargestellten unterschiedlichen Qualitätskontrolle dieser beiden Rezeptoren beruhen.

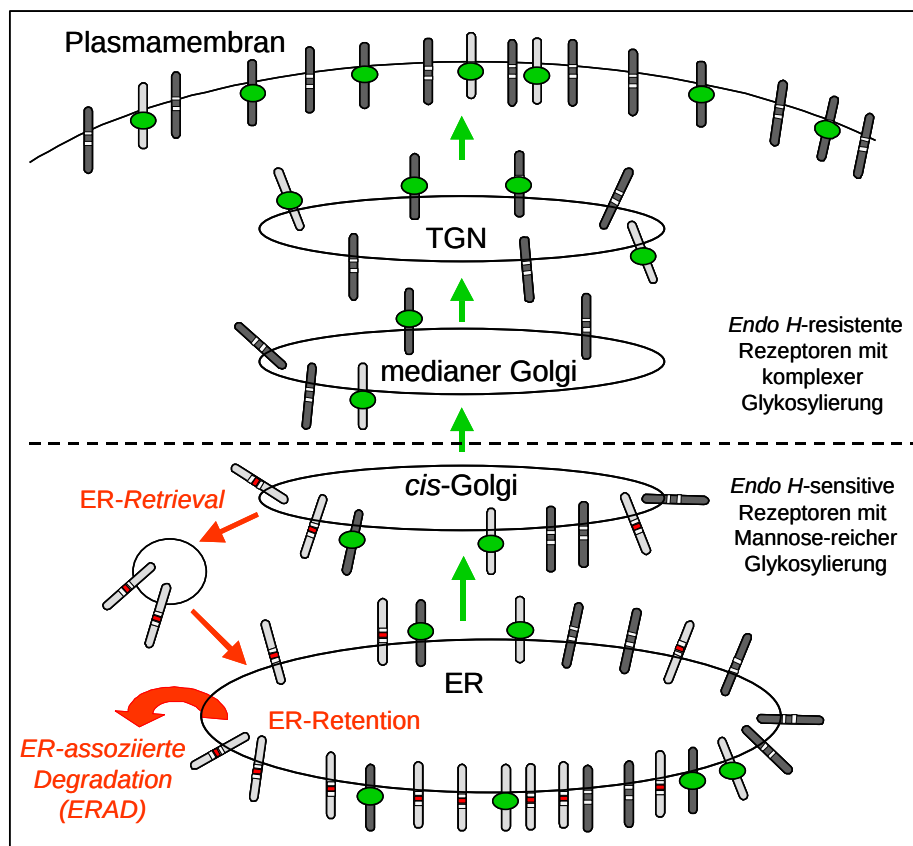


Abbildung 38: Modell für die unterschiedliche Regulation verschiedener Zytokinrezeptoren durch Jak1. Der humane OSMR ist in diesem Modell in Hellgrau dargestellt, das negativ-regulatorische Signal durch eine rote Box symbolisiert. Rezeptoren ohne ein vergleichbares Signal wie der LIFR (sowie gp130, mur OSMR, OSMRAI) sind in Dunkelgrau dargestellt. Jak1 wird durch ein grünes Oval repräsentiert. In dem Schema liegen vollständig prozessierte Rezeptoren oberhalb der gestrichelten Linie vor, Rezeptoren unterhalb der Linie zeichnen sich durch Mannose-reiche Glykosylierung aus.

Führt man Versuche mit rekombinanten Rezeptoren durch, sollte daher also unbedingt vermieden werden, dass diese Rezeptoren zu stark überexprimiert werden, denn dies könnte zu der Oberflächenexpression von dominant-negativen Rezeptoren führen.

Bisher lässt sich nicht abschätzen, in wieweit die in dieser Arbeit beschriebenen Unterschiede zwischen den Rezeptoren gp130, OSMR und LIFR in vivo von Bedeutung sind. Tatsächlich

gibt es aber zahlreiche Beispiele dafür, dass das Zytokin OSM in bestimmten Zellen eine stärkere biologische Antwort hervorruft als die Zytokine IL-6 und LIF. Ein Grund für diesen Umstand könnte in der hohen Qualitätssicherung des humanen OSMR liegen, die dafür sorgt, dass der OSMR nur in signalkompetenter Form zur Zellmembran gelangt. Weitere Versuche werden in Zukunft zu klären haben, welche Relevanz die unterschiedliche Qualitätskontrolle der Rezeptoren in verschiedenen zellulären Situationen auf deren Signaltransduktion hat.

5 Ausblick

5.1 Die Regulation der Oberflächenexpression von gp130, LIFR und OSMR durch Jak1

5.1.1 Effekt von Jak1-Koexpression auf gp130 und LIFR

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass auch die Oberflächenexpression von gp130 und LIFR einer Regulation durch Jak1 unterliegt. Die relative Hochregulation an der Zelloberfläche war aber bei diesen beiden Rezeptoren deutlich geringer als beim humanen OSMR. Weitere Experimente sollen in Zukunft klären, worauf dieser Unterschied beruht:

- Handelt es sich hier - wie beim humanen OSMR - um einen Maskierungseffekt, lässt sich also in den jeweiligen Box1/2-Regionen ein negativ-regulatorisches Signal identifizieren?
- Wenn dies so ist, warum werden dann LIFR und gp130 so viel besser exprimiert als der humane OSMR? Besitzen diese Rezeptoren einen Mechanismus zur Qualitätssicherung, wenn ja, warum ist der Wirkungsmechanismus bei diesen beiden Rezeptoren so ineffizient?
- Hier stellt sich insbesondere die Frage, ob sich die Effekte von Jak1 bei geringerer Expression der beiden Rezeptoren verstärken lassen. Um diese Frage zu beantworten, sollen in Zukunft GFP-markierte LIFR- bzw. gp130-Rezeptorchimären konstruiert werden. Mittels dieser Rezeptoren kann dann überprüft werden, wie sich eine erhöhte Gesamtexpression jeweils auf die Oberflächenexpression beider Rezeptoren auswirkt. Ist diese durch endogenes Jak1 limitiert oder nicht?

5.1.2 Untersuchung der Expression endogener Rezeptoren in U4C-Zellen

Es konnte hier bereits demonstriert werden, dass die Oberflächenexpression des endogenen humanen OSMR in Jak1-defizienten U4C-Zellen herabgesetzt ist. Kürzlich durchgeführte Versuche deuten darauf hin, dass auch die Oberflächenexpression des endogenen gp130 in diesen Zellen signifikant reduziert ist. Wie beim endogenen OSMR lässt sich die Oberflächenexpression des gp130 durch transiente Expression von Jak1 sowie Jak1-KE steigern.

- Diese ersten Befunde sollen in weiteren Experimenten verifiziert werden, desweiteren stellt sich die Frage, ob sich endogenes gp130 auch durch Jak2 oder Tyk2 hochregulieren lässt.
- Die Tatsache, dass die Expression der Kinase-inaktiven Jak1-KE zu einer erhöhten Oberflächenexpression von gp130 und vom humanen OSMR führt, spricht dagegen, dass Jak1-vermittelte Signaltransduktionsprozesse an der beobachteten Regulation beteiligt sind. Um diese Möglichkeit jedoch endgültig ausschließen zu können, soll in Zukunft mRNA aus U4C- sowie parental 2C4-Zellen isoliert, und die Genexpression von gp130 und LIFR in beiden Zellen verglichen werden. Hierzu können *Real-Time-RT-PCR*-Analysen mit Hilfe des *Light-Cyclers* durchgeführt werden.

5.1.3 Der Einfluss der Januskinasen Jak2 und Tyk2 auf die Oberflächenexpression von IL-6-Typ-Zytokinrezeptoren

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass nicht nur die Jak1-, sondern auch eine Jak2- und eine Tyk2-Expression zu einer erhöhten Oberflächenexpression des überexprimierten OSMR in COS-7-Zellen bzw. des endogenen OSMR in U4C-Zellen führt.

- Deshalb stellt sich die Frage, ob diese Kinasen auch einen Effekt auf die Expression von gp130 und LIFR haben.
- Des Weiteren existieren - analog zu den Jak1-defizienten U4C-Zellen - Fibrosarkomzellen, in denen Jak2 bzw. Tyk2 nicht mehr exprimiert wird. Mit Hilfe dieser Zellen sollte sich klären lassen, ob diese Kinasen eine Rolle bei der Regulation des endogenen OSMR bzw. des endogenen gp130 spielen.
- In einem alternativen Ansatz sollen die Januskinasen Jak1, Jak2 und Tyk2 in verschiedenen Zelllinien über doppelsträngige, inhibitorische RNA ausgeschaltet werden. Zum einen könnte so untersucht werden, wie der endogene LIFR (der in Fibrosarkomzellen nicht exprimiert wird) durch Januskinasen reguliert wird. Zum anderen lassen sich mit diesem Ansatz evtl. Zellen generieren, welche für mehrere Kinasen gleichzeitig defizient sind. Dadurch sollte sich die Oberflächenexpression von endogenem sowie überexprimiertem OSMR weiter reduzieren lassen.

5.1.4 Der Einfluss der verschiedenen Jaks auf die OSM-vermittelte Signaltransduktion

Die ersten hier präsentierten Versuche deuten darauf hin, dass Jak1 für gewisse durch OSM-vermittelte Signaltransduktionsprozesse essentiell ist, für andere jedoch nicht. So findet sich in Jak1-defizienten U4C-Zellen zwar eine OSM-induzierte STAT3-, aber weder eine STAT1- noch eine Erk-Aktivierung. In Zukunft sollen weitere Versuche helfen, die Ursachen für diesen Effekt zu finden.

- Zum einen bietet es sich hier an, wie unter 5.1.3 beschrieben, auch diese Versuche auf Jak2- bzw. Tyk2-defiziente Zellen auszudehnen. Gibt es OSM-induzierte Signalwege, für welche diese Kinasen essentiell sind?
- Zum anderen lassen sich auch für diese Untersuchungen in verschiedenen Zelllinien Jak1, Jak2 oder Tyk2 spezifisch über doppelsträngige inhibitorische RNA ausschalten.
- Eine mögliche Ursache für ein differentielles Einschalten von Signalwegen durch Jak1 bzw. Jak2 und Tyk2 besteht darin, dass die Kinasen, wie in der Diskussion dargestellt, jeweils nur spezifische Rezeptortyrosine phosphorylieren können. Um diese Hypothese zu untersuchen, wurden bereits chimäre OSMR-Konstrukte hergestellt, in denen spezifische Tyrosine gegen Phenylalanin ausgetauscht wurden. Diese Konstrukte sollen mit den verschiedenen Jaks koexprimiert werden. Über die Rezeptorphosphorylierung dieser Konstrukte sollte sich dann klären lassen, ob sich die Tyrosinphosphorylierung durch die verschiedenen Januskinasen unterscheidet.

5.1.5 Untersuchung der für die OSMR-Hochregulation wichtigen Domänen von Jak1

Wie in Abschnitt 2.1 beschrieben, kann Jak1 über die Maskierung eines negativ-regulatorischen Signals in der Box1/2-Region des humanen OSMR dessen Expression an der Zelloberfläche erhöhen. Während das inhibitorische Signal innerhalb des OSMR in dieser Arbeit durch Mutationsanalyse eingegrenzt werden konnte, ist bisher nicht bekannt, welche Bereiche von Jak1 für die Maskierung notwendig sind. In Zusammenarbeit mit Angela Jörissen soll diese Fragestellung untersucht werden.

- Für diesen Zweck wurden bereits verschiedene C-terminal verkürzte Deletionsmutanten von Jak1 hergestellt, mit denen sich klären lassen sollte, welches der minimale Bereich von Jak1 ist, der noch dazu in der Lage ist, die Expression des OSMR an der Oberfläche zu regulieren.
- Desweiteren existieren verschiedene Jak1/Jak3-Fusionsproteine, in denen jeweils verschieden lange N-terminale Bereiche von Jak3 gegen die entsprechenden Jak1-Bereiche ausgetauscht wurden [167]. Da Jak3 im Gegensatz zu Jak1 zu keiner Hochregulation des OSMR führt, eignen sich diese Fusionsproteine, um zu untersuchen, welche Bereiche von Jak1 für die Hochregulation des OSMR essentiell sind.
- Es besteht zudem die Möglichkeit, dass Januskinasen über ein Jak-intrinsisches, positives Signal die Oberflächenexpression mancher Rezeptoren steuern können. Hierbei könnte es sich z.B. um ein ER-Exit-Signal handeln. Lässt sich ein solches Signal in den Jak-Molekülen identifizieren?

5.2 Charakterisierung des negativ-regulatorischen Signals im OSMR

5.2.1 Nachweis der ER-Retention

Die bisher durchgeführten Immunfluoreszenzen und Endo H-Analysen sprechen dafür, dass der OSMR in Abwesenheit von Jak1 im ER zurückgehalten wird. Auch erste *pulse-chase*-Experimente korrelieren mit einer ER-Retention des OSMR.

- In weiteren *pulse-chase*-Experimenten sollen diese Befunde verifiziert werden. Insbesondere kann hier untersucht werden, ob sich eine Jak1-Koexpression vorwiegend auf die Prozessierung auswirkt oder evtl. auch die Halblebenszeit des OSMR beeinflusst. Durch Einsatz von Proteasomen-Inhibitoren kann gleichzeitig untersucht werden, ob der unvollständig prozessierte OSMR der ER-assoziierten Degradation (ERAD) unterliegt.

- Zusätzlich soll die zelluläre Lokalisation des OSMR mit Hilfe von GFP-markierten Fusionskonstrukten untersucht werden. Über FACS-Analyse lässt sich, wie bereits in dieser Arbeit demonstriert, gleichzeitig die Oberflächenexpression sowie die Gesamtexpression dieser Konstrukte analysieren. Durch Inkubation der Zellen mit Cycloheximid kann die Proteinsynthese in transfizierten Zellen unterbunden werden. Dies sollte es in Zukunft erlauben, über FACS-Analyse die Halblebenszeit der Rezeptorproteine sowie die Halblebenszeit dieser Rezeptoren an der Zelloberfläche zu untersuchen.

5.2.2 Molekularbiologische Analyse des negativ-regulatorischen Signals

Die bisherige Mutagenese des humanen OSMR hat ergeben, dass drei Dileucin-Signale in der Interbox1/2-Region des OSMR eine effiziente Oberflächenexpression verhindern. Diese sollten in Zukunft noch eingehender charakterisiert werden.

- Der Beitrag der zwei membranproximalen Dileucin-Motive an der negativen Regulation des OSMR ist zu klären. Dazu sollten diese Motive einzeln mutiert werden.
- Es stellt sich die Frage, ob die drei identifizierten Leucin-basierenden Motive jeweils einen Teil desselben Signals darstellen. Alternativ könnte es sich um drei unabhängige Signale handeln. So ist die Frage interessant, ob das membrandistale Dileucin-Motiv alleine noch eine ER-Retention der Rezeptoren vermitteln kann. In diesem Zusammenhang ist zu prüfen, ob es sich bei den membranproximalen Motiven eventuell um typische Dileucin-Motive handelt, welche z.B. die Internalisierung von Rezeptoren vermitteln, die ohne assoziierte Januskinase zur Oberfläche gelangt sind.
- Im Übrigen ist zu klären, ob es sich bei dem negativ-regulatorischen Signal um ein lineares (z.B. ER-Retrieval-Signal), oder um ein nicht-lineares, strukturelles Signal handelt. Hierzu kann überprüft werden, ob Transfer von kurzen Aminosäurenbereichen aus der Interbox1/2-Region des OSMR die Oberflächenexpression eines Reporterkonstrukts (z.B. β 130 Δ cyt) inhibieren kann. Ist dies der Fall, so ist davon auszugehen, dass es sich bei diesem Signal tatsächlich um ein lineares Signal handelt.

- Über Koimmunpräzipitationsanalysen mit verschiedenen OSMR-Mutanten kann untersucht werden, ob sich eine Assoziation des OSMR mit typischen ER-Chaperonen nachweisen lässt, was auf einen ER-Retentionsmechanismus deuten würde.

5.3 Die Regulation der Expression des murinen OSMR

5.3.1 Mutagenesestudie am murinen OSMR

Die bisherigen Daten belegen, dass die bessere Expression des murinen OSMR gegenüber dem humanen OSMR auf Unterschieden in der Box1/2-Region beider Rezeptoren beruht. Unter anderem konnte in diesem Zusammenhang das Isoleucin 798 identifiziert werden; Deletion dieser Aminosäure im humanen Konstrukt β Ost4 führte zu einer Mutante, die deutlich besser exprimiert wird.

- Das Einfügen des humanen Interbox1/2-Bereichs in den murinen OSMR bzw. Einfügen eines zusätzlichen Isoleucins sollte eine gegenteilige Wirkung haben, d.h. der murine Rezeptor sollte dann weniger gut an der Zellmembran lokalisiert sein. Ist dies tatsächlich der Fall, und ist die Oberflächenexpression der resultierenden Rezeptorkonstrukte jeweils durch Jak1 regulierbar?
- Sind die membranproximalen Isoleucin-Motive im murinen Rezeptor wirksam, d.h. lässt sich die ohnehin schon exzellente Expression des murinen OSMR durch Mutation dieser Motive noch weiter steigern?

5.3.2 Regulation des endogenen murinen OSMR

Es existieren murine embryonale Fibroblasten aus Jak1^{-/-} Mäusen sowie wt-Mäusen. Anhand dieser Zellen sollte sich die Regulation des endogenen murinen OSMR durch Jak1 untersuchen lassen. Analog zu den U4C-Zellen kann aus diesen Zellen RNA gewonnen werden und die Genexpression des murinen OSMR sowie des murinen gp130 über *Real-Time*-PCR untersucht werden.

5.3.3 Einfluss der differentiellen Qualitätskontrolle auf die Signaltransduktion des murinen sowie des humanen OSMR

Alle bisherigen Befunde deuten darauf hin, dass der murine OSMR im Gegensatz zu seinem humanem Gegenpart über keine stringente Qualitätssicherung verfügt, d.h. es ist davon auszugehen, dass bei erhöhter Expression des murinen OSMR ein Teil der Rezeptoren ohne assoziierte Januskinase zur Zelloberfläche gelangen kann.

- Es stellt sich die Frage, wie sich die unterschiedliche Regulation des humanen und des murinen Rezeptors auf die Signaltransduktion beider Proteine auswirkt. Mit Hilfe der vorhandenen chimären Rezeptoren kann also überprüft werden, ob sich die Signaltransduktion beider Rezeptorketten unterscheidet.
- Insbesondere soll untersucht werden, ob der murine OSMR unter Umständen dominant negativ auf die OSM-vermittelte Signaltransduktion wirken kann. Hierzu sollen der humane sowie der murine OSMR massiv überexprimiert werden. Es soll überprüft werden, ob unter diesen Bedingungen der humane Rezeptor wegen seiner stringenten Qualitätskontrolle im Gegensatz zum murinen OSMR noch zur Signaltransduktion in der Lage ist.

6 Zusammenfassung

Da Zytokinrezeptoren über keine intrinsische Kinaseaktivität verfügen, sind sie zur Signaltransduktion auf die Hilfe von Januskinasen angewiesen. Der Oncostatin M Rezeptor (OSMR) beispielsweise nutzt zur Signalweiterleitung u.a. die Januskinase Jak1. Dieser Kinase konnte in dieser Arbeit eine völlig neue Funktion zugewiesen werden. So führt die Jak1-Koexpression in verschiedenen Zelllinien zu einer Erhöhung der Oberflächenexpression des überexprimierten OSMR. Auch die Expression des endogenen OSMR wird offenbar durch Jaks reguliert, denn in Jak1-defizienten Fibrosarkomzellen wird deutlich weniger endogener OSMR an der Oberfläche exprimiert als in den Parentalzellen. Die verbliebene OSMR-Oberflächenexpression wird wahrscheinlich durch Jak2 und Tyk2 unterstützt, welche auch in COS-Zellen dazu in der Lage sind, die Oberflächenexpression des OSMR positiv zu regulieren. Mit Hilfe von chimären Rezeptoren und Jak-Mutanten konnte gezeigt werden, dass die Jak1-Bindung, nicht aber die Jak1-Kinaseaktivität eine Voraussetzung für diesen Effekt darstellt. Durch Mutagenese in der Box1/2-Region des humanen OSMR, welche für die Jak-Assoziation von Bedeutung ist, wurde ein negativ-regulatorisches Signal identifiziert, das drei Dileucin-ähnliche Motive beinhaltet. Diese Daten führten zur Erstellung eines Modells, wonach die Maskierung eines negativ-regulatorischen Signals durch Jak-Assoziation zu einer gesteigerten Rezeptorexpression an der Plasmamembran führt. Obwohl das distale Dileucin-Motiv der Konsensussequenz für lysosomales *Targeting* entspricht, konnte eine lysosomale Lokalisation des OSMR nicht nachgewiesen werden. Vielmehr deuten sowohl Immunfluoreszenzstudien als auch die biochemischen Analysen darauf hin, dass das inhibitorische Signal eine ER-Retention des OSMR vermittelt. Da bisher keine Fälle bekannt sind, in denen Dileucin-Motive für die ER-Retention eines Transmembranproteins sorgen, stellen die drei Dileucin-ähnlichen Motive im humanen OSMR somit ein neuartiges negativ-regulatorisches Motiv dar.

Obwohl ein ähnliches Motiv auch im murinen OSMR vorliegt, wird dieser Rezeptor sehr viel besser an der Zelloberfläche exprimiert als der humane Rezeptor, und die Oberflächenexpression dieses Rezeptors ist zudem unabhängig von Jak1-Koexpression. Über eine eingehende Mutagenesestudie konnte geklärt werden, dass die Dileucin-Motive im Inter-box1/2-Bereich des murinen Rezeptors aufgrund des Fehlens eines im humanen Rezeptor zusätzlich vorhandenen Isoleucins nicht oder kaum wirksam sind. Bei dem funktionalen distalen Motiv im humanen OSMR handelt es sich somit tatsächlich um ein Trileucin-ähnliches Motiv. Aufgrund des hydrophoben Charakters dieses Signals ist gut vorstellbar,

dass dieser Rezeptorbereich, wenn er nicht durch gebundene Jak1 maskiert wird, verstärkt von ER-Chaperonen gebunden wird und somit zu ER-Retention führt. Alternativ könnte es sich bei diesem Signal um ein neuartiges ER-*Retrieval*-Signal handeln. Da davon auszugehen ist, dass der humane OSMR aufgrund dieses sehr wirkungsvollen inhibitorischen Signals nur an die Zelloberfläche gelangt, wenn Januskinasen an den Rezeptor assoziiert sind, könnte dieser Mechanismus der Qualitätskontrolle dienen und einer der Gründe dafür sein, dass das Zytokin OSM oftmals wesentlich stärkere biologische Signale hervorruft als die anderen IL-6-Typ-Zytokine.

7 Literatur

1. Bazan, J. F. (1990) Structural design and molecular evolution of a cytokine receptor superfamily, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 87, 6934-8.
2. Ullrich, A. & Schlessinger, J. (1990) Signal transduction by receptors with tyrosine kinase activity, *Cell.* 61, 203-12.
3. Yeh, T. C. & Pellegrini, S. (1999) The Janus kinase family of protein tyrosine kinases and their role in signaling, *Cell Mol Life Sci.* 55, 1523-34.
4. Heinrich, P. C., Behrmann, I., Müller-Newen, G., Schaper, F. & Graeve, L. (1998) Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway, *Biochem J.* 334, 297-314.
5. Senaldi, G., Varnum, B. C., Sarmiento, U., Starnes, C., Lile, J., Scully, S., Guo, J., Elliott, G., McNinch, J., Shaklee, C. L., Freeman, D., Manu, F., Simonet, W. S., Boone, T. & Chang, M. S. (1999) Novel neurotrophin-1/B cell-stimulating factor-3: a cytokine of the IL- 6 family, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96, 11458-63.
6. Elson, G. C., Lelievre, E., Guillet, C., Chevalier, S., Plun-Favreau, H., Froger, J., Suard, I., de Coignac, A. B., Delneste, Y., Bonnefoy, J. Y., Gauchat, J. F. & Gascan, H. (2000) CLF associates with CLC to form a functional heteromeric ligand for the CNTF receptor complex, *Nat Neurosci.* 3, 867-72.
7. Lelievre, E., Plun-Favreau, H., Chevalier, S., Froger, J., Guillet, C., Elson, G. C., Gauchat, J. F. & Gascan, H. (2001) Signaling pathways recruited by the cardiotrophin-like cytokine/cytokine-like factor-1 composite cytokine: specific requirement of the membrane-bound form of ciliary neurotrophic factor receptor alpha component, *J Biol Chem.* 276, 22476-84.
8. Robledo, O., Fourcin, M., Chevalier, S., Guillet, C., Auguste, P., Pouplard-Barthelaix, A., Pennica, D. & Gascan, H. (1997) Signaling of the cardiotrophin-1 receptor. Evidence for a third receptor component, *J Biol Chem.* 272, 4855-63.
9. Mosley, B., De Imus, C., Friend, D., Boiani, N., Thoma, B., Park, L. S. & Cosman, D. (1996) Dual oncostatin M (OSM) receptors. Cloning and characterization of an alternative signaling subunit conferring OSM-specific receptor activation, *J Biol Chem.* 271, 32635-43.
10. Taga, T., Hibi, M., Hirata, Y., Yamasaki, K., Yasukawa, K., Matsuda, T., Hirano, T. & Kishimoto, T. (1989) Interleukin-6 triggers the association of its receptor with a possible signal transducer, gp130, *Cell.* 58, 573-81.
11. Mackiewicz, A., Schooltink, H., Heinrich, P. C. & Rose-John, S. (1992) Complex of soluble human IL-6-receptor/IL-6 up-regulates expression of acute-phase proteins, *J Immunol.* 149, 2021-7.
12. Martens, A. S., Bode, J. G., Heinrich, P. C. & 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, 3593-602.
13. Murakami, M., Narazaki, M., Hibi, M., Yawata, H., Yasukawa, K., Hamaguchi, M., Taga, T. & Kishimoto, T. (1991) Critical cytoplasmic region of the interleukin 6 signal transducer gp130 is conserved in the cytokine receptor family, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88, 11349-53.
14. Pellegrini, S. & Dusanter-Fourt, I. (1997) The structure, regulation and function of the Janus kinases (JAKs) and the signal transducers and activators of transcription (STATs), *Eur J Biochem.* 248, 615-33.
15. Tanner, J. W., Chen, W., Young, R. L., Longmore, G. D. & Shaw, A. S. (1995) The conserved box 1 motif of cytokine receptors is required for association with JAK kinases, *J Biol Chem.* 270, 6523-30.
16. Haan, C., Heinrich, P. C. & Behrmann, I. (2002) Structural requirements of the interleukin-6 signal transducer gp130 for its interaction with Janus kinase 1: the receptor is crucial for kinase activation., *Biochem. J.* 361, 105-11.
17. Haan, C., Hermanns, H. M., Heinrich, P. C. & Behrmann, I. (2000) A single amino acid substitution (Trp666-->Ala) in the interbox1/2 region of the interleukin-6 signal transducer gp130 abrogates binding of JAK1, and dominantly impairs signal transduction, *Biochem J.* 349, 261-266.

18. Stahl, N., Boulton, T. G., Farruggella, T., Ip, N. Y., Davis, S., Witthuhn, B. A., Quelle, F. W., Silvennoinen, O., Barbieri, G., Pellegrini, S. & et al. (1994) Association and activation of Jak-Tyk kinases by CNTF-LIF-OSM-IL-6 beta receptor components, *Science*. 263, 92-5.
19. Lütticken, C., Wegenka, U. M., Yuan, J., Buschmann, J., Schindler, C., Ziemiecki, A., Harpur, A. G., Wilks, A. F., Yasukawa, K., Taga, T. & et al. (1994) Association of transcription factor APRF and protein kinase Jak1 with the interleukin-6 signal transducer gp130, *Science*. 263, 89-92.
20. Hermanns, H. M., Radtke, S., Haan, C., Schmitz-Van de Leur, H., Tavernier, J., Heinrich, P. C. & Behrmann, I. (1999) Contributions of leukemia inhibitory factor receptor and oncostatin M receptor to signal transduction in heterodimeric complexes with glycoprotein 130, *J Immunol*. 163, 6651-8.
21. Ihle, J. N. & Kerr, I. M. (1995) Jaks and Stats in signaling by the cytokine receptor superfamily, *Trends Genet*. 11, 69-74.
22. Guschin, D., Rogers, N., Briscoe, J., Witthuhn, B., Watling, D., Horn, F., Pellegrini, S., Yasukawa, K., Heinrich, P., Stark, G. R. & Kerr, I. M. (1995) A major role for the protein tyrosine kinase JAK1 in the JAK/STAT signal transduction pathway in response to interleukin-6, *Embo J*. 14, 1421-9.
23. Rodig, S. J., Meraz, M. A., White, J. M., Lampe, P. A., Riley, J. K., Arthur, C. D., King, K. L., Sheehan, K. C., Yin, L., Pennica, D., Johnson, E. M., Jr. & Schreiber, R. D. (1998) Disruption of the Jak1 gene demonstrates obligatory and nonredundant roles of the Jaks in cytokine-induced biologic responses, *Cell*. 93, 373-83.
24. Haan, C., Is'harc, H., Hermanns, H. M., Schmitz-Van De Leur, H., Kerr, I. M., Heinrich, P. C., Grötzinger, J. & Behrmann, I. (2001) Mapping of a Region within the N Terminus of Jak1 Involved in Cytokine Receptor Interaction, *J Biol Chem*. 276, 37451-8.
25. O'Shea, J. J., Gadina, M. & Schreiber, R. D. (2002) Cytokine signaling in 2002: new surprises in the Jak/Stat pathway, *Cell*. 109 Suppl, S121-31.
26. Kovanen, P. E., Junttila, I., Takaluoma, K., Saharinen, P., Valmu, L., Li, W. & Silvennoinen, O. (2000) Regulation of Jak2 tyrosine kinase by protein kinase C during macrophage differentiation of IL-3-dependent myeloid progenitor cells, *Blood*. 95, 1626-32.
27. Rui, L. & Carter-Su, C. (1999) Identification of SH2-bbeta as a potent cytoplasmic activator of the tyrosine kinase Janus kinase 2, *Proc Natl Acad Sci U S A*. 96, 7172-7.
28. Carter-Su, C., Rui, L. & Stofega, M. R. (2000) SH2-B and SIRP: JAK2 binding proteins that modulate the actions of growth hormone, *Recent Prog Horm Res*. 55, 293-311.
29. Rane, S. G. & Reddy, E. P. (2002) JAKs, STATs and Src kinases in hematopoiesis, *Oncogene*. 21, 3334-58.
30. Stahl, N., Farruggella, T. J., Boulton, T. G., Zhong, Z., Darnell, J. E., Jr. & Yancopoulos, G. D. (1995) Choice of STATs and other substrates specified by modular tyrosine- based motifs in cytokine receptors, *Science*. 267, 1349-53.
31. Gerhartz, C., Heesel, B., Sasse, J., Hemmann, U., Landgraf, C., Schneider-Mergener, J., Horn, F., Heinrich, P. C. & Graeve, L. (1996) Differential activation of acute phase response factor/STAT3 and STAT1 via the cytoplasmic domain of the interleukin 6 signal transducer gp130. I. Definition of a novel phosphotyrosine motif mediating STAT1 activation, *J Biol Chem*. 271, 12991-8.
32. May, P., Gerhartz, C., Heesel, B., Welte, T., Doppler, W., Graeve, L., Horn, F. & Heinrich, P. C. (1996) Comparative study on the phosphotyrosine motifs of different cytokine receptors involved in STAT5 activation, *FEBS Lett*. 394, 221-6.
33. Fujitani, Y., Hibi, M., Fukada, T., Takahashi-Tezuka, M., Yoshida, H., Yamaguchi, T., Sugiyama, K., Yamanaka, Y., Nakajima, K. & Hirano, T. (1997) An alternative pathway for STAT activation that is mediated by the direct interaction between JAK and STAT, *Oncogene*. 14, 751-61.
34. Decker, T. & Kovarik, P. (2000) Serine phosphorylation of STATs, *Oncogene*. 19, 2628-37.
35. Chung, J., Uchida, E., Grammer, T. C. & Blenis, J. (1997) STAT3 serine phosphorylation by ERK-dependent and -independent pathways negatively modulates its tyrosine phosphorylation, *Mol Cell Biol*. 17, 6508-16.
36. Ng, J. & Cantrell, D. (1997) STAT3 is a serine kinase target in T lymphocytes. Interleukin 2 and T cell antigen receptor signals converge upon serine 727, *J Biol Chem*. 272, 24542-9.

37. Liang, H., Venema, V. J., Wang, X., Ju, H., Venema, R. C. & Marrero, M. B. (1999) Regulation of angiotensin II-induced phosphorylation of STAT3 in vascular smooth muscle cells, *J Biol Chem.* 274, 19846-51.
38. Jain, N., Zhang, T., Kee, W. H., Li, W. & Cao, X. (1999) Protein kinase C delta associates with and phosphorylates Stat3 in an interleukin-6-dependent manner, *J Biol Chem.* 274, 24392-400.
39. Chung, C. D., Liao, J., Liu, B., Rao, X., Jay, P., Berta, P. & Shuai, K. (1997) Specific inhibition of Stat3 signal transduction by PIAS3, *Science.* 278, 1803-5.
40. Liu, B., Liao, J., Rao, X., Kushner, S. A., Chung, C. D., Chang, D. D. & Shuai, K. (1998) Inhibition of Stat1-mediated gene activation by PIAS1, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95, 10626-31.
41. Mowen, K. A., Tang, J., Zhu, W., Schurter, B. T., Shuai, K., Herschman, H. R. & David, M. (2001) Arginine methylation of STAT1 modulates IFNalpha/beta-induced transcription, *Cell.* 104, 731-41.
42. Schmidt, D. & Muller, S. (2002) Members of the PIAS family act as SUMO ligases for c-Jun and p53 and repress p53 activity, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99, 2872-7.
43. Kotaja, N., Karvonen, U., Janne, O. A. & Palvimo, J. J. (2002) PIAS proteins modulate transcription factors by functioning as SUMO-1 ligases, *Mol Cell Biol.* 22, 5222-34.
44. Nakagawa, K. & Yokosawa, H. (2002) PIAS3 induces SUMO-1 modification and transcriptional repression of IRF- 1, *FEBS Lett.* 530, 204.
45. Bode, J. G., Nimmesgern, A., Schmitz, J., Schaper, F., Schmitt, M., Frisch, W., D, H., Heinrich, P. C. & Graeve, L. (1999) LPS and TNFalpha induce SOCS3 mRNA and inhibit IL-6-induced activation of STAT3 in macrophages, *FEBS Lett.* 463, 365-370.
46. Narazaki, M., Fujimoto, M., Matsumoto, T., Morita, Y., Saito, H., Kajita, T., Yoshizaki, K., Naka, T. & Kishimoto, T. (1998) Three distinct domains of SSI-1/SOCS-1/JAB protein are required for its suppression of interleukin 6 signaling, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95, 13130-4.
47. Schmitz, J., Weissenbach, M., Haan, S., Heinrich, P. C. & Schaper, F. (2000) SOCS3 exerts its inhibitory function on interleukin-6 signal transduction through the SHP2 recruitment site of gp130, *J Biol Chem.* 275, 12848-56.
48. 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. & Hilton, D. J. (1997) A family of cytokine-inducible inhibitors of signalling, *Nature.* 387, 917-21.
49. Terstegen, L., Maassen, B. G., Radtke, S., Behrmann, I., Schaper, F., Heinrich, P. C., Graeve, L. & Gatsios, P. (2000) Differential inhibition of IL-6-type cytokine-induced STAT activation by PMA, *FEBS Lett.* 478, 100-4.
50. Terstegen, L., Gatsios, P., Bode, J. G., Schaper, F., Heinrich, P. C. & Graeve, L. (2000) The inhibition of interleukin-6-dependent STAT activation by mitogen-activated protein kinases depends on tyrosine 759 in the cytoplasmic tail of glycoprotein 130, *J Biol Chem.* 275, 18810-7.
51. 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., Komiya, S. & Yoshimura, A. (1997) A new protein containing an SH2 domain that inhibits JAK kinases, *Nature.* 387, 921-4.
52. Anhuf, D., Weissenbach, M., Schmitz, J., Sobota, R., Hermanns, H. M., Radtke, S., Linnemann, S., Behrmann, I., Heinrich, P. C. & Schaper, F. (2000) Signal transduction of IL-6, leukemia-inhibitory factor, and oncostatin M: structural receptor requirements for signal attenuation, *J Immunol.* 165, 2535-43.
53. Lehmann, U., Schmitz, J., Weissenbach, M., Sobota, R. M., Hortner, M., Friederichs, K., Behrmann, I., Tsiaris, W., Sasaki, A., Schneider-Mergener, J., Yoshimura, A., Neel, B. G., Heinrich, P. C. & Schaper, F. (2002) SHP2 and SOCS3 contribute to Y759-dependent attenuation of IL-6- signaling through gp130, *J Biol Chem.* 277, 27.
54. Faris, M., Ensoli, B., Stahl, N., Yancopoulos, G., Nguyen, A., Wang, S. & Nel, A. E. (1996) Differential activation of the extracellular signal-regulated kinase, Jun kinase and Janus kinase-Stat pathways by oncostatin M and basic fibroblast growth factor in AIDS-derived Kaposi's sarcoma cells, *Aids.* 10, 369-78.
55. Amaral, M. C., Miles, S., Kumar, G. & Nel, A. E. (1993) Oncostatin-M stimulates tyrosine protein phosphorylation in parallel with the activation of p42MAPK/ERK-2 in Kaposi's cells. Evidence that this pathway is important in Kaposi cell growth, *J Clin Invest.* 92, 848-57.

56. Hermanns, H. M., Radtke, S., Schaper, F., Heinrich, P. C. & Behrmann, I. (2000) Non-redundant signal transduction of interleukin-6-type cytokines. The adapter protein Shc is specifically recruited to the oncostatin M receptor, *J Biol Chem.* 275, 40742-8.
57. Bode, J. G., Ludwig, S., Freitas, C. A., Schaper, F., Ruhl, M., Melmed, S., Heinrich, P. C. & Häussinger, D. (2001) The MKK6/p38 mitogen-activated protein kinase pathway is capable of inducing SOCS3 gene expression and inhibits IL-6-induced transcription, *Biol Chem.* 382, 1447-53.
58. Ogata, A., Chauhan, D., Teoh, G., Treon, S. P., Urashima, M., Schlossman, R. L. & Anderson, K. C. (1997) IL-6 triggers cell growth via the Ras-dependent mitogen-activated protein kinase cascade, *J Immunol.* 159, 2212-21.
59. Li, W., Nishimura, R., Kashishian, A., Batzer, A. G., Kim, W. J., Cooper, J. A. & Schlessinger, J. (1994) A new function for a phosphotyrosine phosphatase: linking GRB2-Sos to a receptor tyrosine kinase, *Mol Cell Biol.* 14, 509-17.
60. Vogel, W. & Ullrich, A. (1996) Multiple in vivo phosphorylated tyrosine phosphatase SHP-2 engages binding to Grb2 via tyrosine 584, *Cell Growth Differ.* 7, 1589-97.
61. Brown, T. J., Lioubin, M. N. & Marquardt, H. (1987) Purification and characterization of cytostatic lymphokines produced by activated human T lymphocytes. Synergistic antiproliferative activity of transforming growth factor beta 1, interferon-gamma, and oncostatin M for human melanoma cells, *J Immunol.* 139, 2977-83.
62. Bruce, A. G., Linsley, P. S. & Rose, T. M. (1992) Oncostatin M, *Prog Growth Factor Res.* 4, 157-70.
63. Suda, T., Chida, K., Todate, A., Ide, K., Asada, K., Nakamura, Y., Suzuki, K., Kuwata, H. & Nakamura, H. (2002) Oncostatin m production by human dendritic cells in response to bacterial products, *Cytokine.* 17, 335-40.
64. Malik, N., Kallestad, J. C., Gunderson, N. L., Austin, S. D., Neubauer, M. G., Ochs, V., Marquardt, H., Zarling, J. M., Shoyab, M., Wei, C. M. & et al. (1989) Molecular cloning, sequence analysis, and functional expression of a novel growth regulator, oncostatin M, *Mol Cell Biol.* 9, 2847-53.
65. Rose, T. M., Lagrou, M. J., Fransson, I., Werelius, B., Delattre, O., Thomas, G., de Jong, P. J., Todaro, G. J. & Dumanski, J. P. (1993) The genes for oncostatin M (OSM) and leukemia inhibitory factor (LIF) are tightly linked on human chromosome 22, *Genomics.* 17, 136-40.
66. Ichihara, M., Hara, T., Kim, H., Murate, T. & Miyajima, A. (1997) Oncostatin M and leukemia inhibitory factor do not use the same functional receptor in mice, *Blood.* 90, 165-73.
67. Gearing, D. P., Comeau, M. R., Friend, D. J., Gimpel, S. D., Thut, C. J., McGourty, J., Brasher, K. K., King, J. A., Gillis, S., Mosley, B. & et al. (1992) The IL-6 signal transducer, gp130: an oncostatin M receptor and affinity converter for the LIF receptor, *Science.* 255, 1434-7.
68. Gearing, D. P. & Bruce, A. G. (1992) Oncostatin M binds the high-affinity leukemia inhibitory factor receptor, *New Biol.* 4, 61-5.
69. Richards, C. D., Brown, T. J., Shoyab, M., Baumann, H. & Gauldie, J. (1992) Recombinant oncostatin M stimulates the production of acute phase proteins in HepG2 cells and rat primary hepatocytes in vitro, *J Immunol.* 148, 1731-6.
70. Rose, T. M. & Bruce, A. G. (1991) Oncostatin M is a member of a cytokine family that includes leukemia- inhibitory factor, granulocyte colony-stimulating factor, and interleukin 6, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88, 8641-5.
71. Liu, J., Spence, M. J., Wallace, P. M., Forcier, K., Hellstrom, I. & Vestal, R. E. (1997) Oncostatin M-specific receptor mediates inhibition of breast cancer cell growth and down-regulation of the c-myc proto-oncogene, *Cell Growth Differ.* 8, 667-76.
72. Kortylewski, M., Heinrich, P. C., Mackiewicz, A., Schniertshauer, U., Klingmüller, U., Nakajima, K., Hirano, T., Horn, F. & Behrmann, I. (1999) Interleukin-6 and oncostatin M-induced growth inhibition of human A375 melanoma cells is STAT-dependent and involves upregulation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27/Kip1, *Oncogene.* 18, 3742-53.
73. Kortylewski, M., Heinrich, P. C., Mackiewicz, A., Schniertshauer, U., Klingmüller, U., Nakajima, K., Hirano, T., Horn, F. & Behrmann, I. (1999) Interleukin-6 and oncostatin M-induced growth inhibition of human A375 melanoma cells is STAT-dependent and involves upregulation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27/Kip1, *Oncogene.* 18, 3742-53.

74. Zarling, J. M., Shoyab, M., Marquardt, H., Hanson, M. B., Lioubin, M. N. & Todaro, G. J. (1986) Oncostatin M: a growth regulator produced by differentiated histiocytic lymphoma cells, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 83, 9739-43.
75. Ihn, H. & Tamaki, K. (2000) Oncostatin M stimulates the growth of dermal fibroblasts via a mitogen- activated protein kinase-dependent pathway, *J Immunol.* 165, 2149-55.
76. Wijelath, E. S., Carlsen, B., Cole, T., Chen, J., Kothari, S. & Hammond, W. P. (1997) Oncostatin M induces basic fibroblast growth factor expression in endothelial cells and promotes endothelial cell proliferation, migration and spindle morphology, *J Cell Sci.* 110, 871-9.
77. Vasse, M., Pourtau, J., Trochon, V., Muraine, M., Vannier, J. P., Lu, H., Soria, J. & Soria, C. (1999) Oncostatin M induces angiogenesis in vitro and in vivo, *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 19, 1835-42.
78. Broxmeyer, H. E., Bruns, H. A., Zhang, S., Cooper, S., Hangoc, G., McKenzie, A. N., Dent, A. L., Schindler, U., Naeger, L. K., Hoey, T. & Kaplan, M. H. (2002) Th1 cells regulate hematopoietic progenitor cell homeostasis by production of oncostatin M, *Immunity.* 16, 815-25.
79. Yanai, N. & Obinata, M. (2001) Oncostatin m regulates mesenchymal cell differentiation and enhances hematopoietic supportive activity of bone marrow stromal cell lines, *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 37, 698-704.
80. Miyajima, A., Kinoshita, T., Tanaka, M., Kamiya, A., Mukouyama, Y. & Hara, T. (2000) Role of Oncostatin M in hematopoiesis and liver development, *Cytokine Growth Factor Rev.* 11, 177-83.
81. Wallace, P. M., MacMaster, J. F., Rillema, J. R., Peng, J., Burstein, S. A. & Shoyab, M. (1995) Thrombocytopoietic properties of oncostatin M, *Blood.* 86, 1310-5.
82. Gatsios, P., Haubeck, H. D., Van de Leur, E., Frisch, W., Apte, S. S., Greiling, H., Heinrich, P. C. & Graeve, L. (1996) Oncostatin M differentially regulates tissue inhibitors of metalloproteinases TIMP-1 and TIMP-3 gene expression in human synovial lining cells, *Eur J Biochem.* 241, 56-63.
83. Langdon, C., Leith, J., Smith, F. & Richards, C. D. (1997) Oncostatin M stimulates monocyte chemoattractant protein-1- and interleukin-1-induced matrix metalloproteinase-1 production by human synovial fibroblasts in vitro, *Arthritis Rheum.* 40, 2139-46.
84. Varghese, S., Yu, K. & Canalis, E. (1999) Leukemia inhibitory factor and oncostatin M stimulate collagenase-3 expression in osteoblasts, *Am J Physiol.* 276, E465-71.
85. Pourtau, J., Mirshahi, F., Li, H., Muraine, M., Vincent, L., Tedgui, A., Vannier, J. P., Soria, J., Vasse, M. & Soria, C. (1999) Cyclooxygenase-2 activity is necessary for the angiogenic properties of oncostatin M, *FEBS Lett.* 459, 453-7.
86. Bellido, T., O'Brien, C. A., Roberson, P. K. & Manolagas, S. C. (1998) Transcriptional activation of the p21(WAF1,CIP1,SDI1) gene by interleukin-6 type cytokines. A prerequisite for their pro-differentiating and anti-apoptotic effects on human osteoblastic cells, *J Biol Chem.* 273, 21137-44.
87. Levy, J. B., Schindler, C., Raz, R., Levy, D. E., Baron, R. & Horowitz, M. C. (1996) Activation of the JAK-STAT signal transduction pathway by oncostatin-M cultured human and mouse osteoblastic cells, *Endocrinology.* 137, 1159-65.
88. Richards, C. D., Langdon, C., Deschamps, P., Pennica, D. & Shaughnessy, S. G. (2000) Stimulation of osteoclast differentiation in vitro by mouse oncostatin M, leukaemia inhibitory factor, cardiotrophin-1 and interleukin 6: synergy with dexamethasone, *Cytokine.* 12, 613-21.
89. Shih, C. & Yen, C. C. (1999) Effect of oncostatin-M on proliferation and activity in osteoblastic MC3T3-E1 cells, *Zhonghua Yi Xue Za Zhi (Taipei).* 62, 710-6.
90. Strand, K., Murray, J., Aziz, S., Ishida, A., Rahman, S., Patel, Y., Cardona, C., Hammond, W. P., Savidge, G. & Wijelath, E. S. (2000) Induction of the urokinase plasminogen activator system by oncostatin M promotes endothelial migration, *J Cell Biochem.* 79, 239-48.
91. Knight, D. A., Asokanathan, N., Watkins, D. N., Misso, N. L., Thompson, P. J. & Stewart, G. A. (2000) Oncostatin M synergises with house dust mite proteases to induce the production of PGE(2) from cultured lung epithelial cells, *Br J Pharmacol.* 131, 465-72.
92. Matsui, T., Kinoshita, T., Hirano, T., Yokota, T. & Miyajima, A. (2002) STAT3 down-regulates the expression of cyclin D during liver development, *J Biol Chem.* 277, 36167-73.

93. Van Wagoner, N. J., Choi, C., Repovic, P. & Benveniste, E. N. (2000) Oncostatin M regulation of interleukin-6 expression in astrocytes: biphasic regulation involving the mitogen-activated protein kinases ERK1/2 and p38, *J Neurochem.* 75, 563-75.
94. Palmqvist, P., Persson, E., Conaway, H. H. & Lerner, U. H. (2002) IL-6, leukemia inhibitory factor, and oncostatin M stimulate bone resorption and regulate the expression of receptor activator of NF- κ B ligand, osteoprotegerin, and receptor activator of NF- κ B in mouse calvariae, *J Immunol.* 169, 3353-62.
95. Wang, Y., Robledo, O., Kinzie, E., Blanchard, F., Richards, C., Miyajima, A. & Baumann, H. (2000) Receptor subunit-specific action of oncostatin M in hepatic cells and its modulation by leukemia inhibitory factor, *J Biol Chem.* 275, 25273-85.
96. Tanaka, M., Hara, T., Copeland, N. G., Gilbert, D. J., Jenkins, N. A. & Miyajima, A. (1999) Reconstitution of the functional mouse oncostatin M (OSM) receptor: molecular cloning of the mouse OSM receptor beta subunit, *Blood.* 93, 804-15.
97. Lindberg, R. A., Juan, T. S., Welcher, A. A., Sun, Y., Cupples, R., Guthrie, B. & Fletcher, F. A. (1998) Cloning and characterization of a specific receptor for mouse oncostatin M, *Mol Cell Biol.* 18, 3357-67.
98. Kuropatwinski, K. K., De Imus, C., Gearing, D., Baumann, H. & Mosley, B. (1997) Influence of subunit combinations on signaling by receptors for oncostatin M, leukemia inhibitory factor, and interleukin-6, *J Biol Chem.* 272, 15135-44.
99. Auguste, P., Guillet, C., Fourcin, M., Olivier, C., Veziers, J., Pouplard-Barthelaix, A. & Gascan, H. (1997) Signaling of type II oncostatin M receptor, *J Biol Chem.* 272, 15760-4.
100. Ellgaard, L., Molinari, M. & Helenius, A. (1999) Setting the standards: quality control in the secretory pathway, *Science.* 286, 1882-8.
101. Petaja-Repo, U. E., Hogue, M., Laperriere, A., Walker, P. & Bouvier, M. (2000) Export from the endoplasmic reticulum represents the limiting step in the maturation and cell surface expression of the human delta opioid receptor, *J Biol Chem.* 275, 13727-36.
102. Supino-Rosin, L., Yoshimura, A., Altartatz, H. & Neumann, D. (1999) A cytosolic domain of the erythropoietin receptor contributes to endoplasmic reticulum-associated degradation, *Eur J Biochem.* 263, 410-9.
103. Hilton, D. J., Watowich, S. S., Murray, P. J. & Lodish, H. F. (1995) Increased cell surface expression and enhanced folding in the endoplasmic reticulum of a mutant erythropoietin receptor, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92, 190-4.
104. Schekman, R. & Orci, L. (1996) Coat proteins and vesicle budding, *Science.* 271, 1526-33.
105. Rothman, J. E. & Wieland, F. T. (1996) Protein sorting by transport vesicles, *Science.* 272, 227-34.
106. Mukherjee, S., Ghosh, R. N. & Maxfield, F. R. (1997) Endocytosis, *Physiol Rev.* 77, 759-803.
107. Nishimura, N. & Balch, W. E. (1997) A di-acidic signal required for selective export from the endoplasmic reticulum, *Science.* 277, 556-8.
108. Nishimura, N., Bannykh, S., Slabough, S., Matteson, J., Altschuler, Y., Hahn, K. & Balch, W. E. (1999) A di-acidic (DXE) code directs concentration of cargo during export from the endoplasmic reticulum, *J Biol Chem.* 274, 15937-46.
109. Votsmeier, C. & Gallwitz, D. (2001) An acidic sequence of a putative yeast Golgi membrane protein binds COPII and facilitates ER export, *Embo J.* 20, 6742-50.
110. Clague, M. J. (1998) Molecular aspects of the endocytic pathway, *Biochem J.* 336, 271-82.
111. Dittrich, E., Haft, C. R., Muys, L., Heinrich, P. C. & Graeve, L. (1996) A di-leucine motif and an upstream serine in the interleukin-6 (IL-6) signal transducer gp130 mediate ligand-induced endocytosis and down-regulation of the IL-6 receptor, *J Biol Chem.* 271, 5487-94.
112. Thiel, S., Behrmann, I., Dittrich, E., Muys, L., Tavernier, J., Wijdenes, J., Heinrich, P. C. & Graeve, L. (1998) Internalization of the interleukin 6 signal transducer gp130 does not require activation of the Jak/STAT pathway, *Biochem J.* 330, 47-54.
113. Thiel, S., Dahmen, H., Martens, A., Muller-Newen, G., Schaper, F., Heinrich, P. C. & Graeve, L. (1998) Constitutive internalization and association with adaptor protein-2 of the interleukin-6 signal transducer gp130, *FEBS Lett.* 441, 231-4.
114. Thiel, S., Behrmann, I., Timmermann, A., Dahmen, H., Müller-Newen, G., Schaper, F., Tavernier, J., Pitard, V., Heinrich, P. C. & Graeve, L. (1999) Identification of a Leu-Ile

- internalization motif within the cytoplasmic domain of the leukaemia inhibitory factor receptor, *Biochem J.* 339, 15-9.
115. Blanchard, F., Duplomb, L., Wang, Y., Robledo, O., Kinzie, E., Pitard, V., Godard, A., Jacques, Y. & Baumann, H. (2000) Stimulation of leukemia inhibitory factor receptor degradation by extracellular signal-regulated kinase, *J Biol Chem.* 275, 28793-801.
 116. Gibson, R. M., Schiemann, W. P., Prichard, L. B., Reno, J. M., Ericsson, L. H. & Nathanson, N. M. (2000) Phosphorylation of human gp130 at Ser-782 adjacent to the Di-leucine internalization motif. Effects on expression and signaling, *J Biol Chem.* 275, 22574-82.
 117. Hicke, L. (2001) A new ticket for entry into budding vesicles-ubiquitin, *Cell.* 106, 527-30.
 118. Hofmann, K. & Falquet, L. (2001) A ubiquitin-interacting motif conserved in components of the proteasomal and lysosomal protein degradation systems, *Trends Biochem Sci.* 26, 347-50.
 119. Shih, S. C., Katzmann, D. J., Schnell, J. D., Sutanto, M., Emr, S. D. & Hicke, L. (2002) Epsins and Vps27p/Hrs contain ubiquitin-binding domains that function in receptor endocytosis, *Nat Cell Biol.* 4, 389-93.
 120. Polo, S., Sigismund, S., Faretta, M., Guidi, M., Capua, M. R., Bossi, G., Chen, H., De Camilli, P. & Di Fiore, P. P. (2002) A single motif responsible for ubiquitin recognition and monoubiquitination in endocytic proteins, *Nature.* 416, 451-5.
 121. Helenius, A. & Aebi, M. (2001) Intracellular functions of N-linked glycans, *Science.* 291, 2364-9.
 122. Parodi, A. J. (2000) Role of N-oligosaccharide endoplasmic reticulum processing reactions in glycoprotein folding and degradation, *Biochem J.* 348 Pt 1, 1-13.
 123. Cohen, J., Altaratz, H., Zick, Y., Klingmuller, U. & Neumann, D. (1997) Phosphorylation of erythropoietin receptors in the endoplasmic reticulum by pervanadate-mediated inhibition of tyrosine phosphatases, *Biochem J.* 327, 391-7.
 124. Gauzzi, M. C., Barbieri, G., Richter, M. F., Uze, G., Ling, L., Fellous, M. & Pellegrini, S. (1997) The amino-terminal region of Tyk2 sustains the level of interferon alpha receptor 1, a component of the interferon alpha/beta receptor, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94, 11839-44.
 125. Karaghiosoff, M., Neubauer, H., Lassnig, C., Kovarik, P., Schindler, H., Pircher, H., McCoy, B., Bogdan, C., Decker, T., Brem, G., Pfeffer, K. & Muller, M. (2000) Partial impairment of cytokine responses in Tyk2-deficient mice, *Immunity.* 13, 549-60.
 126. Shimoda, K., Kato, K., Aoki, K., Matsuda, T., Miyamoto, A., Shibamori, M., Yamashita, M., Numata, A., Takase, K., Kobayashi, S., Shibata, S., Asano, Y., Gondo, H., Sekiguchi, K., Nakayama, K., Nakayama, T., Okamura, T., Okamura, S. & Niho, Y. (2000) Tyk2 plays a restricted role in IFN alpha signaling, although it is required for IL-12-mediated T cell function, *Immunity.* 13, 561-71.
 127. Radtke, S. (1999) *Signaltransduktion von IL-6-Typ Zytokinen*, Diplomarbeit RWTH Aachen.
 128. Arcone, R., Pucci, P., Zappacosta, F., Fontaine, V., Malorni, A., Marino, G. & Ciliberto, G. (1991) Single-step purification and structural characterization of human interleukin-6 produced in *Escherichia coli* from a T7 RNA polymerase expression vector, *Eur J Biochem.* 198, 541-7.
 129. Weiergräber, O., Hemmann, U., Küster, A., Müller-Newen, G., Schneider, J., Rose-John, S., Kurschat, P., Brakenhoff, J. P., Hart, M. H., Stabel, S. & et al. (1995) Soluble human interleukin-6 receptor. Expression in insect cells, purification and characterization, *Eur J Biochem.* 234, 661-9.
 130. Sambrook, Fritsch & Maniatis. (1989) *Molecular cloning: A laboratory manual*, Cold Spring Harbour.
 131. Horsten, U. (1997) *Identifizierung einer Region in Signaltransduktor gp130 für die Interaktion mit Interleukin-6 (IL-6) im ternären IL-6/IL-6-Rezeptor/gp130-Komplex*, Dissertation RWTH Aachen.
 132. Briscoe, J., Rogers, N. C., Witthuhn, B. A., Watling, D., Harpur, A. G., Wilks, A. F., Stark, G. R., Ihle, J. N. & Kerr, I. M. (1996) Kinase-negative mutants of JAK1 can sustain interferon-gamma-inducible gene expression but not an antiviral state, *Embo J.* 15, 799-809.
 133. Zerangue, N., Schwappach, B., Jan, Y. N. & Jan, L. Y. (1999) A new ER trafficking signal regulates the subunit stoichiometry of plasma membrane K(ATP) channels, *Neuron.* 22, 537-48.
 134. Jackson, M. R., Nilsson, T. & Peterson, P. A. (1990) Identification of a consensus motif for retention of transmembrane proteins in the endoplasmic reticulum, *Embo J.* 9, 3153-62.

135. Jackson, M. R., Nilsson, T. & Peterson, P. A. (1993) Retrieval of transmembrane proteins to the endoplasmic reticulum, *J Cell Biol.* 121, 317-33.
136. Dietrich, J., Kastrup, J., Nielsen, B. L., Odum, N. & Geisler, C. (1997) Regulation and function of the CD3gamma DxxxLL motif: a binding site for adaptor protein-1 and adaptor protein-2 in vitro, *J Cell Biol.* 138, 271-81.
137. Dietrich, J. & Geisler, C. (1998) T cell receptor zeta allows stable expression of receptors containing the CD3gamma leucine-based receptor-sorting motif, *J Biol Chem.* 273, 26281-4.
138. Ogata, S. & Fukuda, M. (1994) Lysosomal targeting of Limp II membrane glycoprotein requires a novel Leu-Ile motif at a particular position in its cytoplasmic tail, *J Biol Chem.* 269, 5210-7.
139. Brunet, A., Samaan, A., Deshaies, F., Kindt, T. J. & Thibodeau, J. (2000) Functional characterization of a lysosomal sorting motif in the cytoplasmic tail of HLA-DObeta, *J Biol Chem.* 275, 37062-71.
140. Gearing, D. P., Thut, C. J., VandeBos, T., Gimpel, S. D., Delaney, P. B., King, J., Price, V., Cosman, D. & Beckmann, M. P. (1991) Leukemia inhibitory factor receptor is structurally related to the IL-6 signal transducer, gp130, *Embo J.* 10, 2839-48.
141. Saito, M., Yoshida, K., Hibi, M., Taga, T. & Kishimoto, T. (1992) Molecular cloning of a murine IL-6 receptor-associated signal transducer, gp130, and its regulated expression in vivo, *J Immunol.* 148, 4066-71.
142. Kuwana, T., Peterson, P. A. & Karlsson, L. (1998) Exit of major histocompatibility complex class II-invariant chain p35 complexes from the endoplasmic reticulum is modulated by phosphorylation, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95, 1056-61.
143. Scott, D. B., Blanpied, T. A., Swanson, G. T., Zhang, C. & Ehlers, M. D. (2001) An NMDA receptor ER retention signal regulated by phosphorylation and alternative splicing, *J Neurosci.* 21, 3063-72.
144. Shiratori, T., Miyatake, S., Ohno, H., Nakaseko, C., Isono, K., Bonifacino, J. S. & Saito, T. (1997) Tyrosine phosphorylation controls internalization of CTLA-4 by regulating its interaction with clathrin-associated adaptor complex AP-2, *Immunity.* 6, 583-9.
145. Cottin, V., Van Linden, A. & Riches, D. W. (1999) Phosphorylation of tumor necrosis factor receptor CD120a (p55) by p42(mapk/erk2) induces changes in its subcellular localization, *J Biol Chem.* 274, 32975-87.
146. Kato, Y., Misra, S., Puertollano, R., Hurley, J. H. & Bonifacino, J. S. (2002) Phosphoregulation of sorting signal-VHS domain interactions by a direct electrostatic mechanism, *Nat Struct Biol.* 9, 532-6.
147. Schaper, F., Gendo, C., Eck, M., Schmitz, J., Grimm, C., Anhuf, D., Kerr, I. M. & Heinrich, P. C. (1998) Activation of the protein tyrosine phosphatase SHP2 via the interleukin- 6 signal transducing receptor protein gp130 requires tyrosine kinase Jak1 and limits acute-phase protein expression, *Biochem J.* 335, 557-65.
148. Hermanns, H. M. (2000) *Relevanz der Transmembran- und Intrazellulärregion von gp130, LIFR und OSMR für deren Liganden-induzierte Signaltransduktion*, Dissertation RWTH Aachen.
149. Bonifacino, J. S., Mercep, M., Sussman, J. J., Klausner, R. D. & Ashwell, J. D. (1988) The T-cell antigen receptor: a complex signal-transducing molecule, *Princess Takamatsu Symp.* 19, 87-104.
150. Bonifacino, J. S., Suzuki, C. K., Lippincott-Schwartz, J., Weissman, A. M. & Klausner, R. D. (1989) Pre-Golgi degradation of newly synthesized T-cell antigen receptor chains: intrinsic sensitivity and the role of subunit assembly, *J Cell Biol.* 109, 73-83.
151. Bonifacino, J. S., Suzuki, C. K. & Klausner, R. D. (1990) A peptide sequence confers retention and rapid degradation in the endoplasmic reticulum, *Science.* 247, 79-82.
152. Bonifacino, J. S., Cosson, P., Shah, N. & Klausner, R. D. (1991) Role of potentially charged transmembrane residues in targeting proteins for retention and degradation within the endoplasmic reticulum, *Embo J.* 10, 2783-93.
153. Dietrich, J., Hou, X., Wegener, A. M. & Geisler, C. (1994) CD3 gamma contains a phosphoserine-dependent di-leucine motif involved in down-regulation of the T cell receptor, *Embo J.* 13, 2156-66.
154. Dietrich, J., Kastrup, J., Lauritsen, J. P., Menne, C., von Bulow, F. & Geisler, C. (1999) TCRzeta is transported to and retained in the Golgi apparatus independently of other TCR chains: implications for TCR assembly, *Eur J Immunol.* 29, 1719-28.

155. Letourneur, F. & Klausner, R. D. (1992) A novel di-leucine motif and a tyrosine-based motif independently mediate lysosomal targeting and endocytosis of CD3 chains, *Cell*. 69, 1143-57.
156. Lee, S. J. (1998) Endoplasmic reticulum retention and degradation of T cell antigen receptor beta chain, *Exp Mol Med*. 30, 159-64.
157. Mallabiabarrena, A., Jimenez, M. A., Rico, M. & Alarcon, B. (1995) A tyrosine-containing motif mediates ER retention of CD3-epsilon and adopts a helix-turn structure, *Embo J*. 14, 2257-68.
158. Mallabiabarrena, A., Fresno, M. & Alarcon, B. (1992) An endoplasmic reticulum retention signal in the CD3 epsilon chain of the T-cell receptor, *Nature*. 357, 593-6.
159. Wileman, T., Carson, G. R., Concino, M., Ahmed, A. & Terhorst, C. (1990) The gamma and epsilon subunits of the CD3 complex inhibit pre-Golgi degradation of newly synthesized T cell antigen receptors, *J Cell Biol*. 110, 973-86.
160. Wileman, T., Kane, L. P., Young, J., Carson, G. R. & Terhorst, C. (1993) Associations between subunit ectodomains promote T cell antigen receptor assembly and protect against degradation in the ER, *J Cell Biol*. 122, 67-78.
161. Letourneur, F., Hennecke, S., Demolliere, C. & Cosson, P. (1995) Steric masking of a dilysine endoplasmic reticulum retention motif during assembly of the human high affinity receptor for immunoglobulin E, *J Cell Biol*. 129, 971-8.
162. Bichet, D., Cornet, V., Geib, S., Carlier, E., Volsen, S., Hoshi, T., Mori, Y. & De Waard, M. (2000) The I-II loop of the Ca²⁺ channel alpha1 subunit contains an endoplasmic reticulum retention signal antagonized by the beta subunit, *Neuron*. 25, 177-90.
163. Margeta-Mitrovic, M., Jan, Y. N. & Jan, L. Y. (2000) A trafficking checkpoint controls GABA(B) receptor heterodimerization, *Neuron*. 27, 97-106.
164. Huang, L. J., Constantinescu, S. N. & Lodish, H. F. (2001) The N-terminal domain of Janus kinase 2 is required for Golgi processing and cell surface expression of erythropoietin receptor, *Mol Cell*. 8, 1327-38.
165. Cosson, P., Lefkir, Y., Demolliere, C. & Letourneur, F. (1998) New COP1-binding motifs involved in ER retrieval, *Embo J*. 17, 6863-70.
166. Siewert, E., Muller-Esterl, W., Starr, R., Heinrich, P. C. & Schaper, F. (1999) Different protein turnover of interleukin-6-type cytokine signalling components, *Eur J Biochem*. 265, 251-7.
167. Hilkens, C. M., Is'harc, H., Lillemeier, B. F., Strobl, B., Bates, P. A., Behrmann, I. & Kerr, I. M. (2001) A region encompassing the FERM domain of Jak1 is necessary for binding to the cytokine receptor gp130, *FEBS Lett*. 505, 87-91.

Danksagung

Bei Herrn Prof. Dr. P.C. Heinrich bedanke ich mich für die exzellenten Arbeitsbedingungen und sein großes Interesse am Fortgang dieser Arbeit.

Für die Bereitschaft, das Korreferat dieser Arbeit zu übernehmen, möchte ich mich bei Dr. J. Mey sehr herzlich bedanken.

Ferner gilt mein Dank Dr. Iris Behrmann für die vorzügliche Betreuung sowie ihre wertvollen Ratschläge und Anregungen während des Zusammenschreibens dieser Arbeit.

Bei Hildegard Schmitz-Van de Leur bedanke ich mich ganz besonders für ihre große Unterstützung bei der Klonierung der zahlreichen OSMR-Konstrukte!!!!

Dem Labor 13, das sind Claude, Kob, Angela, Christina, Sandra, Hildegard und Marlies möchte ich herzlichst für die ausgesprochen gute Arbeitsatmosphäre und große Hilfsbereitschaft danken. Hier gilt mein Dank aber auch den vielen Ex-Labor-13-Mitarbeitern, insbesondere Heike, Marcin und Andreas, durch die das Arbeiten im Labor eigentlich fast immer Spaß gemacht hat... Heike Hermanns danke ich zudem für die äußerst gute Zusammenarbeit im Labor und ihre große Hilfe beim Korrigieren dieser Arbeit!!

Bei allen Mitarbeitern des Instituts möchte ich mich für die nette Atmosphäre, die gute Zusammenarbeit und die große Hilfsbereitschaft bedanken!

Mein besonderer Dank gilt schließlich Stefan sowie meinen Eltern und Geschwistern, die mich zu allen Zeiten immer großartig unterstützt haben!!!

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Simone Radtke
Geburtsdatum: 08.05.71
Geburtsort: Minden, Westfalen
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulausbildung

1977 - 1980 Grundschole Espelkamp
1980 - 1981 Grundschole Lübbecke
1981 - 1988 Wittekind-Gymnasium Lübbecke
1988 - 1989 Austauschschülerin in La Mesa, NM, USA
1989 - 1991 Wittekind-Gymnasium Lübbecke, dort Abitur im Juni 1991

Auslandsaufenthalt

1991 - 1992 Au-pair-Aufenthalt in Brüssel, Belgien

Hochschulausbildung

1992 - 1993 Studium der Chemie an der RWTH Aachen
1993 - 1995 Studium der Biologie an der RWTH Aachen
1995 – 1996 Studium der Biologie und Biochemie an der University of St. Andrews, Schottland
1996 - 1998 Studium der Biologie an der RWTH Aachen
06/1998-09/1999 Diplomarbeit am Institut für Biochemie der RWTH Aachen im Arbeitskreis von Prof. P. C. Heinrich
seit 10/1999 wissenschaftliche Mitarbeiterin im Arbeitskreis von Prof. P. C. Heinrich
4. Februar 2003 Tag der mündlichen Doktorprüfung

