

Relevanz der Transmembran- und Intrazellulärregion von gp130, LIFR und OSMR für deren Liganden- induzierte Signaltransduktion

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
Heike Margarete Hermanns

aus Simmerath

Berichter: Universitätsprofessor Dr. Peter C. Heinrich
Universitätsprofessor Dr. Fritz Kreuzaler

Tag der mündlichen Prüfung: 21. Juni 2000

Veröffentlichungen

wesentliche Teile der vorliegenden Arbeit wurden veröffentlicht:

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**: 6651-6658

Hermanns, H. M., Radtke, S., Schaper, F., Heinrich, P. C., Behrmann, I. (2000).

Non-redundant signal transduction of interleukin-6-type cytokines: the adaptor protein Shc is specifically recruited to the oncostatin M receptor. *J. Biol. Chem.* **275**: 40742-40748

weitere Veröffentlichungen:

Behrmann, I., Janzen, C., Gerhartz, C., Schmitz-Van de Leur, H., Hermanns, H., Heesel, B., Graeve, L., Horn, F., Tavernier, J., Heinrich, P.C. (1997).

A single STAT recruitment module in a chimeric cytokine receptor complex is sufficient for STAT activation. *J. Biol. Chem.* **272**: 5269-5274

Haan, C., Hermanns, H. M., Heinrich, P.C., Behrmann, I. (2000).

A single amino acid substitution W666A 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

* gleichberechtigt beteiligte Autoren

meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS.....	I
VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN.....	IV

I EINLEITUNG **1**

1. ZYTOKINE UND IHRE FUNKTIONEN	1
2. AUFBAU DER REZEPTORKOMPLEXE DER IL-6-TYP ZYTOKINE	1
3. SIGNALTRANSDUKTION ÜBER ZYTOKINREZEPTOREN	4
4. ABSCHALTMECHANISMEN EINER ZYTOKINSTIMULATION	9
5. ZIEL DER ARBEIT	10

II MATERIAL UND METHODEN **11**

1. CHEMIKALIEN	11
2. ZYTOKINE UND REZEPTOREN	11
3. ANTIKÖRPER	11
4. PLASMIDE	13
5. EUKARYONTISCHE ZELLEN UND DEREN KULTIVIERUNG	14
5.1 PERMANENTE ZELLINIEN	14
5.2 NÄHRMEDIEN UND LÖSUNGEN FÜR DIE ZELLKULTUR	15
6. PROKARYONTISCHE ZELLEN UND DEREN KULTIVIERUNG	15
7. ISOLIERUNG UND ANALYSE VON PLASMID-DNA	16
7.1 TRANSFORMATION VON BAKTERIEN	16
7.2 PRÄPARATION VON PLASMID-DNA IM KLEINEN MAßSTAB	16
7.3 PRÄPARATION VON PLASMID-DNA IM GROßEN MAßSTAB	16
7.4 KONZENTRATIONSBESTIMMUNG VON NUKLEINSÄUREN	16
7.5 RESTRIKTION VON DNA	17
7.6 AUFFÜLLREAKTION MIT DER KLENOW-POLYMERASE	17
7.7 DEPHOSPHORYLIERUNG LINEARISierter PLASMID-DNA	17
7.8 AUFTRENNUNG VON DNA-FRAGMENTEN IN DER AGAROSE-GELELEKTROPHORESE	17
7.9 ISOLIERUNG VON DNA-FRAGMENTEN AUS AGAROSEGELEN	18
7.10 DNA-LIGATION	18
7.11 DNA-SEQUENZIERUNG	19
8. KONSTRUKTION VON REZEPTORMUTANTEN	19
8.1 POLYMERASE-KETTENREAKTION (PCR)	19

8.2	OLIGONUKLEOTIDE	20
9.	EXPRESSION DER CHIMÄREN IL-5R-KONSTRUKTE IN EUKARYONTISCHEN ZELLEN	21
9.1	TRANSIENTE TRANSFEKTION VON COS-7-ZELLEN	21
9.2	TRANSIENTE TRANSFEKTION VON HEPG2- UND MCF-7-ZELLEN	21
9.3	STABILE TRANSFEKTION VON BA/F3-ZELLEN	22
10.	NACHWEIS DER IN EUKARYONTISCHEN ZELLEN EXPRIMIERTEN CHIMÄREN REZEPTORKONSTRUKTE	22
10.1	HERSTELLUNG VON ZELLYSATEN	22
10.2	IMMUNPRÄZIPITATION	23
10.3	SDS-POLYACRYLAMID-GELELEKTROPHORESE	23
10.4	DURCHFLUßZYTOMETRIE	24
11.	UNTERSUCHUNG DER BIOLOGISCHEN AKTIVITÄT DER CHIMÄREN REZEPTOR-MUTANTEN	25
11.1	BESTIMMUNG DER STAT-AKTIVIERUNG IM ELEKTROPHORETISCHEN MOBILITÄTSSHIFT-ASSAY (EMSA)	25
11.1.1	Herstellung von Kernextrakten aus COS-7-Zellen	25
11.1.2	Proteinbestimmung nach Bradford <i>et al.</i> (1976)	26
11.1.3	Radioaktive Markierung doppelsträngiger DNA-Sonden	26
11.1.4	Elektrophoretischer Mobilitätsshift Assay (EMSA)	26
11.2	BESTIMMUNG DER TRANSKRIPTIONSINDUKTION MIT HILFE EINES REPORTERGEN-ASSAYS	27
III	ERGEBNISSE	28

1.	VERGLEICH DER SIGNALTRANSDUKTION DURCH DIE REZEPTORKETTEN GP130 UND LIFR	28
1.1	ETABLIERUNG DES CHIMÄREN REZEPTORSYSTEMS	28
1.2	MEMBRANPROXIMALE SOWIE MEMBRANDISTALE BEREICHE DES LIFR SIND AN DER SIGNALTRANSDUKTION EINES GP130/LIFR-HETERODIMERS BETEILIGT	31
1.3	DIE JANUS-KINASEN JAK1, JAK2 UND TYK2 SIND IN DER LAGE, MIT GP130 UND DEM LIFR ZU ASSOZIIEREN	33
1.4	SIGNALTRANSDUKTION NACH GEZIELTER HOMODIMERISIERUNG DER ZYTOPLASMATISCHEN BEREICHE DES LIFR	37
1.4.1	Chimäre LIFR-Homodimere vermitteln in COS-7-Zellen keine STAT-Aktivierung	37
1.4.2	Die LIFR-Homodimerisierung vermittelt keine negativ-regulatorischen Signale, die <i>in trans</i> die Signaltransduktion anderer Rezeptorkomplexe beeinflussen	38
1.4.3	Der LIFR weist eine zelltypspezifische Signalkompetenz auf	40
2.	STUDIEN ZUR SPEZIFITÄT UND AKTIVIERUNG DER JANUS-KINASEN	41

2.1	BEDEUTUNG DER DREI KINASEN JAK1, JAK2 UND TYK2 FÜR DIE GP130-VERMITTELTE SIGNALTRANSDUKTION	41
2.2	DIE POSITIONIERUNG DER BOX 1-REGION IST WICHTIG FÜR DIE GP130-VERMITTELTE SIGNALTRANSDUKTION	43
3.	DER OSMR VERMITTELT EINE SPEZIFISCHE SIGNALTRANSDUKTION	45
3.1	OSM, NICHT ABER IL-6 ODER LIF, INDUZIERT DIE PHOSPHORYLIERUNG DES ADAPTOR-PROTEINS SHC IN HEPG2-ZELLEN UND FÜHRT ZU DESSEN ASSOZIATION MIT GRB2	45
3.2	PP1, EIN SRC-KINASEN-SPEZIFISCHER INHIBITOR, BEEINTRÄCHTIGT DIE OSM-VERMITTELTE SHC-PHOSPHORYLIERUNG NICHT	48
3.3	DIE PHOSPHORYLIERUNG VON SHC ERFOLGT AM OSMR	49
3.4	DIE REGION ZWISCHEN ASPARAGIN 836 UND SERIN 866 DES OSMR IST ESSENTIELL FÜR DIE SHC-ASSOZIATION	50
3.5	DIE SHC-REKRUTIERUNG AN DEN OSMR IST AUF DEN TYROSINREST 861 ANGEWIESEN	52
3.6	DIE AKTIVIERUNG DER MAP-KINASEN ERK1 UND ERK2 BENÖTIGT DEN TYROSINREST 861 DES OSMR	55
3.7	TYROSIN 861 DES OSMR IST AN EINER EFFIZIENTEN AKTIVIERUNG DES α 2M-GENS BETEILIGT	56
4.	DIE BEDEUTUNG DER TRANSMEMBRANREGION FÜR DIE SIGNALTRANSDUKTION	58
4.1	DIE GP130-TRANSMEMBRANREGION IST NICHT ESSENTIELL FÜR EINE GP130-VERMITTELTE SIGNALTRANSDUKTION	58
4.2	DIE MUTATION EINZELNER AMINOSÄUREN IN DER TRANSMEMBRANREGION VERRINGERT DIE SIGNALSTÄRKE DES REZEPTORS	59
4.3	DIE ANZAHL VON AMINOSÄUREN IN DER TRANSMEMBRANREGION IST WICHTIG FÜR DIE SIGNALTRANSDUKTION DURCH GP130	61
4.3.1	Chimäre IL-5R/gp130-Konstrukte mit unterschiedlich langen Transmembranregionen erlauben unterschiedlich starke Signale	63
4.3.2	Insertionen bzw. Deletionen von Aminosäuren im Transmembranbereich von gp130 demonstrieren die Beteiligung der TM-Region an der Signaltransduktion in stabil transfizierten Ba/F3-Zellen	65
4.4	EINE VERLÄNGERUNG ODER VERKÜRZUNG DER GP130-TRANSMEMBRANREGION BEEINFLUßT DIE SIGNALTRANSDUKTION EINES GP130/LIFR-HETERODIMERS	68

IV DISKUSSION **69**

1.	GP130 UND DER LIFR SIND IN IHRER SIGNALTRANSDUZIERENDEN FÄHIGKEIT HOCH REDUNDANT	69
2.	SPEZIFITÄT UND AKTIVIERUNG DER JANUS-KINASEN	71

2.1	DIE JANUS-KINASEN JAK1, JAK2 UND TYK2 ZEIGEN UNTERSCHIEDLICHE PHOSPHORYLIERUNGSPOTENTIALE	71
2.2	DIE POSITIONIERUNG DER BOX1/2-REGION ERSCHEINT KRITISCH FÜR DIE JAK-AKTIVIERUNG	72
3.	DER OSMR REKRUTIERT SPEZIFISCH DAS ADAPTORPROTEIN SHC	73
4.	DER EINFLUß DER TRANSMEMBRANDOMÄNE AUF DIE SIGNALTRANSDUKTION DURCH GP130	77
4.1	DIE GP130-TRANSMEMBRANREGION KANN DURCH DIE ENTSPRECHENDE REGION DER IL-5-REZEPTOREN ERSETZT WERDEN	77
4.2	DIE ANZAHL DER AMINOSÄUREN INNERHALB DER TRANSMEMBRANREGION BEEINFLUßT DIE SIGNALTRANSDUKTION	78
5.	AUSBLICK	81
5.1	WELCHE SPEZIFISCHE AUFGABE ÜBERNIMMT DER LIFR?	81
5.2	GIBT ES EINE SPEZIFITÄT DER JANUS-KINASEN BEI DER PHOSPHORYLIERUNG DER TYROSINRESTE IM GP130, LIFR ODER OSMR?	82
5.3	WIE EMPFINDLICH IST DIE POSITIONIERUNG DER BOX1/2-REGION FÜR DIE GP130-VERMITTELTE SIGNALTRANSDUKTION?	82
5.4	WIE WIRD SHC ÜBER DEN OSMR AKTIVIERT UND WOHIN FÜHRT DER WEITERE SIGNALWEG?	83
5.5	WELCHEN EINFLUß HAT DIE TRANSMEMBRANDOMÄNE AUF DIE SIGNAL-TRANSDUKTION?	86

V ZUSAMMENFASSUNG

89

VI LITERATUR

91

Verzeichnis der Abkürzungen

Abb.	Abbildung
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BCR	<i>B cell receptor</i>
BRIJ	Polyoxyethylen-10-oleyether
BSA	bovines Serumalbumin
CD	<i>cluster of differentiation</i>
CH	<i>collagen</i> -Homologie-Domäne
CNTF	<i>ciliary neurotrophic factor</i>
cpm	<i>counts per minute</i>
CT-1	Cardiotrophin-1
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
DEAE	Diethylaminoethyl
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
E	Extinktion
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
EMSA	<i>electrophoretic mobility shift assay</i>
Epo	Erythropoetin
Erk	<i>extracellular signal regulated kinase</i>
ESS	erweiterte SH2-Subdomäne
Fab	<i>fragment antigen binding</i>
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
FKS	fötales Kälberserum
GDP	Guanosindiphosphat
GM-CSF	<i>granulocyte/macrophage colony-stimulating factor</i>
gp	Glykoprotein
Grb	<i>growth factor receptor bound protein</i>
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde
HBS	<i>Hepes buffered saline</i>
Hepes	N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-2-ethansulfonsäure
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
Jak	Janus-Kinase
JH	Jak-Homologie Region
KD	Kinasedomäne
kDa	Kilodalton
KIR	Kinase-inhibitorische Region

KLD	Kinase-ähnliche Domäne (<i>kinase-like domain</i>)
LB	Luria-Bertani-Medium
LIF	<i>leukemia inhibitory factor</i>
MAPK	<i>mitogen activated protein kinase</i>
MEK	MAP/Erk Kinase
min	Minute
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
Neo ^R	Neomycin-Resistenz
OD	optische Dichte
OSM	Oncostatin M
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDGF	<i>platelet derived growth factor</i>
PEG	Polyethylenglycol
Pen ^R	Penicillin-Resistenz
PIAS	<i>Protein inhibitor of activated STAT</i>
PKC	Proteinkinase C
PMA	4b-Phorbol-12-Myristat-13-Acetat
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PTB	Phosphotyrosin-Bindungsdomäne
PVDF	Polyvinylidendifluorid
pY	Phosphotyrosin
R	Rezeptor
rp	<i>reverser Primer</i>
SCID	<i>severe combined immune deficiency</i>
SDS	<i>Sodiumdodecylsulfate</i>
sec	Sekunde
SH	Src-Homologie-Domäne
Shc	SH2-/CH-Domänen enthaltendes Protein
SHP	SH2-Domänen-enthaltende Tyrosinphosphatase
SIE	sis-induzierbares Element
SOCS	<i>suppressor of cytokine signalling</i>
Sos	<i>son of sevenless</i>
sp	Sequenz-Primer
STAT	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
TEMED	N, N, N', N' - Tetramethylethylendiamin
TF	Transkriptionsfaktor
TIMP	<i>tissue inhibitor of metalloproteases</i>
TM	Transmembranregion
TNF	Tumornekrose-Faktor
Tris	Tris(hydroxy)aminomethan
U	<i>unit</i>
upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
Vol	Volumen
ZBM	Zytokin-bindendes Modul

I Einleitung

1. Zytokine und ihre Funktionen

Die Koordination der vielfältigen Funktionen, die ein vielzelliger Organismus ausführen muß, um effizient arbeiten zu können, erfordert ein höchst komplexes Kommunikationssystem. Wichtige Mediatoren einer solchen Kommunikation sind neben den klassischen Hormonen unter anderem die Zytokine. Zytokine wurden zunächst als immunregulatorische Substanzen beschrieben, doch ist mittlerweile klar, daß sie weitreichendere Funktionen ausüben. So sind sie maßgeblich an der Regulation der Hämatopoese durch Induktion der Reifung von Erythrozyten, Thrombozyten, Monozyten, Granulozyten und Lymphozyten beteiligt. Des weiteren koordinieren Zytokine wie z.B. verschiedene Interleukine oder der Tumornekrose-Faktor (TNF) die Entzündungs- und Akutphase-Reaktionen im Körper.

Zytokine gehören mit Wachstumsfaktoren wie *epidermal growth factor* (EGF) und *platelet-derived growth factor* (PDGF) zu einer großen Gruppe von Proteinen, die - anders als die Hormone - von verschiedenen Zelltypen meist nach Aktivierung produziert und sezerniert werden. Sie wirken auto-, para- oder endokrin.

Die Klassifizierung der Zytokine kann auf drei Ebenen erfolgen: entsprechend ihrer biologischen Wirkung als pro- und anti-inflammatorische Zytokine, aufgrund ihrer charakteristischen dreidimensionalen Struktur und hinsichtlich ihrer Nutzung verschiedener Zelloberflächenrezeptoren (97).

2. Aufbau der Rezeptorkomplexe der IL-6-Typ Zytokine

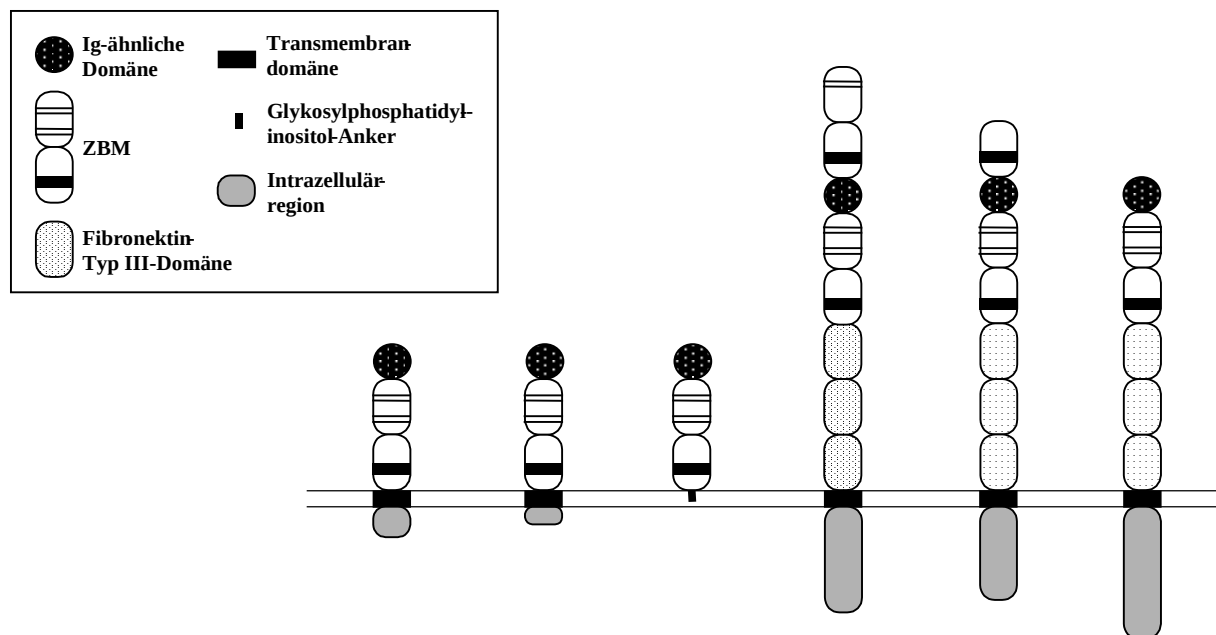
Die Mitglieder der Familie der IL-6-Typ Zytokine, der neben IL-6 auch IL-11, *leukemia inhibitory factor* (LIF), Oncostatin M (OSM), *ciliary neurotrophic factor* (CNTF), Cardiotrophin-1 (CT-1) und das erst kürzlich klonierte Zytokin *novel neurotrophin-1/B-cell stimulatory factor-3* (NNT-1/BSF-3) angehören, weisen eine gemeinsame dreidimensionale Struktur auf. Sie gehören zu den sogenannten langkettigen 4-Helix-Bündel-Zytokinen (97) und üben vielfältige physiologische Funktionen aus. So sind sie an der Akutphase-Reaktion des Körpers (8, 16, 104, 111, 122), an der Hämatopoese, der Differenzierung und dem Wachstum von B- und T-Zellen sowie an der neuronalen Differenzierung beteiligt (50). Die

IL-6-Typ Zytokine definieren sich zusätzlich über die Nutzung einer gemeinsamen Rezeptoruntereinheit, dem Glykoprotein 130 (gp130) (52).

Wie alle anderen Zytokine üben auch die IL-6-Typ Zytokine ihre Wirkung auf Zielzellen aus, indem sie an spezifische hochaffine Zelloberflächenrezeptoren binden. Diese Rezeptoren weisen - wie auch die Zytokine selbst - eine strukturelle Verwandtschaft auf und gehören der Superfamilie der hämatopoetischen Rezeptoren an. Es handelt sich um Typ I-Membranproteine, die durch einen extrazellulär gelegenen N-Terminus und eine einzelne Transmembrandomäne charakterisiert sind (9). Eine Ausnahme bildet der CNTF-Rezeptor, der anstelle einer Transmembrandomäne einen Glykosylphosphatidylinositol-Anker besitzt (25). Die hämatopoetischen Rezeptoren werden weiter in zwei Klassen unterteilt. Die Klasse I-Rezeptoren besitzen mindestens ein sogenanntes Zytokin-bindendes Modul (ZBM) aus zwei Fibronectin-Typ III-ähnlichen Domänen, wobei die N-terminale Domäne vier konservierte Cysteinreste, die C-terminale Domäne ein konserviertes Tryptophan-Serin-X-Tryptophan-Serin-Motiv (WSXWS; X ist eine nicht konservierte Aminosäure) enthält (9). Dieses Motiv fehlt den Klasse II-Rezeptoren. Die Rezeptoren der IL-6-Typ Zytokine gehören zu den Klasse I-Proteinen und enthalten neben den ZBM Immunglobulin (Ig)-ähnliche Domänen sowie teilweise noch weitere Fibronectin-Typ III-ähnliche Domänen (Abb.1). Die Funktion der ZBM ist sehr genau untersucht und ihre Bedeutung für die Zytokinbindung ist unumstritten. Neuere Studien weisen darauf hin, daß auch die Ig-ähnlichen Domänen an dieser Bindung beteiligt sind. Die Funktion der membranproximalen Fibronectin-Typ III-ähnlichen Domänen von gp130, LIFR und OSMR ist Gegenstand intensiver Studien, die darauf hindeuten, daß sie eine Rolle bei der Rezeptordimerisierung und -aktivierung spielen (65).

Bestandteil aller hochaffinen Rezeptorkomplexe der IL-6-Typ Zytokine ist die gp130-Untereinheit. IL-6 und - soweit bisher bekannt - auch IL-11 führen zu einer Homodimerisierung von gp130 (91, 147). CNTF, LIF und CT-1 signalisieren über ein gp130/LIFR-Heterodimer (24, 39, 103), und OSM ist das einzige Zytokin, das über zwei Rezeptorkomplexe, nämlich gp130/LIFR und gp130/OSMR (39, 54), signalisieren kann. Während LIF und OSM direkt an die signaltransduzierenden Ketten binden können - LIF an den LIFR und OSM an gp130 - benötigen IL-6, IL-11 und CNTF ihre spezifischen, nicht signalisierenden α -Rezeptoren (IL-6R (145), IL-11R (53) und CNTFR (25)) (Abb. 1). Auch für CT-1 wird ein α -Rezeptor diskutiert (112), dessen Existenz bislang aber nicht bestätigt

werden konnte. Die α -Rezeptoren für IL-6, IL-11 und CNTF kommen außer in membranständiger auch in löslicher Form vor.



Eigenschaft	IL-6R	IL-11R	CNTFR	LIFR	OSMR	gp130
<u>Anzahl der Aminosäuren</u>						
Vorläuferprotein	468	422	372	1097	979	918
Reifes Protein	449	400	352	1053	952	896
Extrazellulärregion	339	343	352	789	712	597
Transmembranregion	28	26		26	22	22
Intrazellulärregion	82	31		238	218	277
<u>Molekulargewicht (kDa)</u>						
errechnet	49,9	43,1	38,9	111	107	101
beobachtet	80	n.d.	72	190	180	130-150

(nach (50))

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

Der extrazelluläre Bereich der Rezeptoren der IL-6-Typ Zytokine besteht aus Ig-ähnlichen Domänen, einem oder zwei ZBM und Fibronectin-Typ III-ähnlichen Domänen. Bis auf den CNTFR enthalten alle Rezeptoren eine Transmembrandomäne und unterschiedlich lange intrazelluläre Bereiche. Im unteren Teil der Abbildung sind einige Eigenschaften der verschiedenen Rezeptoren aufgeführt.

Für ihre Entstehung wurden zwei Mechanismen beschrieben: zum einen konnte in *in vitro*-Studien nach PMA-induzierter limitierter Proteolyse, dem sogenannten *Shedding*, in Zellüberständen von IL-6R-transfizierten COS-7-Zellen löslicher IL-6R nachgewiesen werden (87). Die *Shedding*-Protease ist noch unbekannt. Zum anderen entstehen die löslichen Formen durch alternatives Spleißen der mRNA (88). Dieser Mechanismus scheint

physiologisch relevanter zu sein. Im Gegensatz zu vielen anderen Rezeptoren, bei denen lösliche Rezeptorformen eine antagonistische Wirkung zeigen, können die löslichen Rezeptoren sIL-6R, sIL-11R und sCNTFR nach Bindung ihrer Liganden die signaltransduzierenden Ketten dimerisieren und somit agonistisch wirken (132). Ob der Agonismus auch physiologisch eine Rolle spielt, wird vor allem seit der Entdeckung einer löslichen Form von gp130 (95) kritisch diskutiert. Möglicherweise modulieren die löslichen Formen z.B. des IL-6R und des gp130 in Kombination als eine Art Puffersystem systemische Effekte von IL-6 (89).

3. Signaltransduktion über Zytokinrezeptoren

Der erste Schritt einer Signaltransduktion über Zytokinrezeptoren ist die ligandeninduzierte Homo- oder Heterodimerisierung der signalweiterleitenden Rezeptorketten, was zu einer Interaktion ihrer zytoplasmatischen Bereiche und somit zur Auslösung der Signalkaskade führt. Im Gegensatz zu den Rezeptoren der Wachstumsfaktoren EGF oder PDGF besitzen die Zytokinrezeptoren keine intrinsische Tyrosinkinaseaktivität zur Weiterleitung des Signals. Es konnte jedoch gezeigt werden, daß sie mit zytoplasmatischen Tyrosinkinasen der Janus-Familie interagieren. Diese Proteine haben ein Molekulargewicht zwischen 120 und 140 kDa. In Säugetieren sind bisher vier Mitglieder dieser Familie bekannt: Jak1 (143), Jak2 (49), Jak3 (133) und Tyk2 (34). Ein weiteres Jak-Homolog wurde in *Drosophila* identifiziert; das Gen liegt mit dem *hopscotch* (*hop*)-Genlocus assoziiert vor (11). Mutationen in *hopscotch* bewirken eine abnormale Proliferation und Differenzierung des larvalen hämatopoetischen Systems und damit eine Leukämie in *Drosophila* (47). Über Mutationen innerhalb der Janus-Kinasen (Jak) in Säugetieren sowie deren Pathologie ist noch wenig bekannt. In Jak3 wurden jedoch Mutationen beobachtet, die für die Entstehung von autosomal rezessiver SCID (*severe combined immune deficiency*) mitverantwortlich sind (79). Mit Ausnahme von Jak3 werden die Janus-Kinasen in allen Geweben und Zelllinien exprimiert. Die vorwiegend auf myeloide und lymphoide Zellen sowie aktivierte Makrophagen limitierte Expression von Jak3 mag erklären, warum natürlich auftretende Mutationen nur von dieser Kinase beobachtet wurden. Das ubiquitäre Auftreten von Jak1, Jak2 und Tyk2 zeigt, daß diese Kinasen für die Signaltransduktion vieler Zytokine von solch großer Bedeutung sind, daß Mutationen zum Verlust wichtiger signalweiterleitender Funktionen führen würden. Jak1-defiziente Mäuse sterben um den Zeitpunkt der Geburt herum, sie sind nicht in der Lage, Milch zu saugen,

haben einen verkleinerten Thymus und eine abnormale Lymphozytenentwicklung (113). Jak2-defiziente Mäuse sind embryonal letal, sie zeigen keine definitive Erythropoese (96).

Betrachtet man die Struktur der Janus-Kinasen wird klar, woher diese Familie ihren Namen bezieht. Neben der C-terminal angelegten Kinasedomäne (KD) kann N-terminal dazu eine zweite Kinase-ähnliche Domäne (KLD) definiert werden, weshalb in Anlehnung an die römische Mythologie der Name des doppelgesichtigen Gottes Janus für diese Proteine gewählt wurde (28). Eine genauere Analyse der Aminosäureabfolge der KLD zeigt, daß diese zwar einige Kinasemotive enthält, nicht aber die für eine katalytische Funktion kritischen Bereiche. Die genaue Funktion der KLD ist noch unklar. Es gibt sowohl Hinweise auf eine positiv- als auch auf eine negativ-regulatorische Rolle bei der Signaltransduktion (75, 140). Alle vier Jak-Familienmitglieder besitzen im N-terminalen Bereich fünf Abschnitte mit konservierten Sequenzen, die an der Rezeptorbindung beteiligt sind (19, 146) und wahrscheinlich die Bindungsspezifität der Kinasen definieren (15, 63) (Abb. 2). Ob der N-Terminus konservierte Regionen wie SH2- oder SH3-Domänen enthält, ist weiterhin umstritten. Da die Janus-Kinase/Rezeptor-Interaktion aber ein mögliches Ziel einer Intervention in den Signalweg darstellt, ist dieser Bereich Gegenstand intensiver Forschungsaktivität.

Eine der Hauptaufgaben der Zytokinrezeptorketten scheint zu sein, die mit ihnen assoziierten Janus-Kinasen nach Zytokin-induzierter Rezeptordimerisierung in die für die Jak-Aktivierung essentielle räumliche Nähe zueinander zu bringen (28, 55). In Ba/F3-Zellen konnte gezeigt werden, daß die Aggregation von CD16/Jak2-Fusionsproteinen mit Hilfe eines anti-CD16-Antikörpers eine Autophosphorylierung und somit eine Aktivierung der Fusionsproteine bewirkte, ohne daß eine Phosphorylierung der endogenen, nicht aggregierten Jak2-Proteine induziert wurde (115). Der genaue Aktivierungsmechanismus der Janus-Kinasen ist noch nicht geklärt. Eine gegenseitige Tyrosinphosphorylierung von für die katalytische Funktion wichtigen Tyrosinresten erscheint in Analogie zu den Rezeptortyrosinkinasen wahrscheinlich (33, 38, 58).

Im Falle der IL-6-Typ Zytokine konnte eine Aktivierung der Kinasen Jak1, Jak2 und Tyk2 beobachtet werden (77, 94, 127). Verschiedene Zellen wiesen unterschiedliche Aktivierungsprofile der drei Jaks auf (83, 127), was möglicherweise auf unterschiedliche Expressionsraten der Kinasen zurückzuführen ist. Studien mit Hilfe von Jak1-, Jak2- oder Tyk2-defizienten Fibrosarkom-Zelllinien verdeutlichten die besondere Rolle, die Jak1 bei der Signaltransduktion der IL-6-Typ Zytokine spielt. Jak2 und Tyk2 konnten, obwohl sie phosphoryliert wurden, Jak1 in Jak1-defizienten Zellen nicht substituieren, d.h. die

Signaltransduktion war in diesen Zellen unterbrochen (45). Neben der Aktivierung von Janus-Kinasen konnten in verschiedenen Untersuchungen weitere Proteintyrosinkinasen identifiziert werden, die gp130-abhängig aktiviert werden. Dazu gehören die Kinasen Btk, Tec (82), Fes (81) und Hck (30), deren Bedeutung für die Signaltransduktion noch ungeklärt ist.

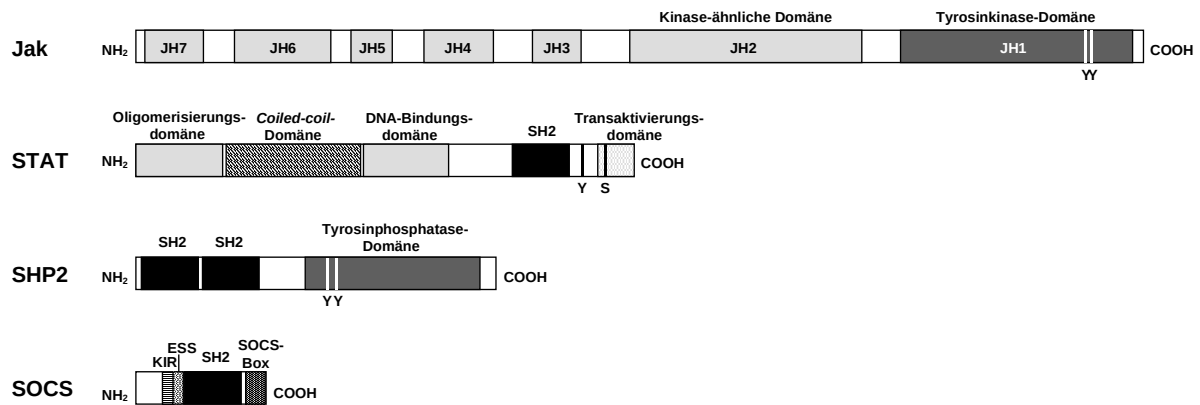


Abb. 2: Strukturelle Organisation von Janus-Kinasen, STAT-Faktoren, der Tyrosinphosphatase SHP2 und der SOCS-Proteine

Die einzelnen Domänen der Proteine sind schematisch dargestellt; für die Aktivierung der Proteine wichtige Tyrosin- und Serinreste sind markiert (JH: Janus-Homologie-Region, SH2: Src-Homologie-Domäne, KIR: Kinase-inhibitorische Region, ESS: erweiterte SH2-Subdomäne)

Auf Seiten der signaltransduzierenden Zytokinrezeptoren spielt die membranproximale Box1/Box2-Region für die Bindung der Jaks eine wichtige Rolle. Box1 ist eine prolinreiche Region von acht Aminosäuren Länge. Auffällig ist vor allem das hochkonservierte Prolin-X-X-Prolin-X-Prolin-Motiv, dem meist eine voluminöse, aromatische Aminosäure vorausgeht (z.B. IWPNVDPDP für gp130) (100). Die Box2-Region ist durch eine Ansammlung von hydrophoben, gefolgt von positiv geladenen Aminosäuren gekennzeichnet. Jüngere Studien schlagen weiterhin die Beteiligung eines Tryptophanrestes zwischen Box1 und Box2 an der Interaktion der Rezeptoren mit den Jaks vor (5, 86).

Im membrandistalen Bereich scheinen vor allem die Tyrosinreste von besonderer Bedeutung zu sein. Nach ihrer Phosphorylierung - wahrscheinlich durch die nach der Rezeptordimerisierung aktivierten Janus-Kinasen - stellen die Tyrosinreste Rekrutierungsstellen für Proteine mit Src-Homologie-2 (SH2)-Domänen dar. Für die IL-6-Typ Zytokine wurden verschiedene SH2-Domänen enthaltende Proteine beschrieben, die eine wichtige Rolle spielen: die sogenannten STAT-Faktoren (*signal transducers and activators of transcription*) (40, 128) und die Tyrosinphosphatase SHP2 (35, 128) (Abb. 2). Bisher sind sieben STAT-Proteine bekannt: STAT1, 2, 3, 4, 5a, 5b und 6. Sie bestehen aus 750-850 Aminosäuren und weisen eine konservierte Domänenorganisation auf. Vom N-Terminus zum C-Terminus

enthalten sie eine Oligomerisierungsdomäne, eine *Coiled-Coil*-Domäne, eine DNA-Bindungsregion, eine SH2- und eine Transaktivierungsdomäne (124) (Abb. 2). Im Fall der IL-6-Typ Zytokine wird vor allem eine Aktivierung der Transkriptionsfaktoren STAT3 und STAT1 beobachtet. Die Aktivierung erfolgt über die Phosphorylierung eines im C-terminalen Bereich lokalisierten Tyrosinrestes (Y705 bei STAT3 (59); Y701 bei STAT1 (125)), die essentiell für die Dimerisierung der STATs ist. Diese Dimerisierung erfolgt über die SH2-Domänen, mit denen die STATs vor ihrer Aktivierung an die Phosphotyrosinreste der aktivierten Rezeptoren gp130, LIFR oder OSMR gebunden waren. Für gp130 konnte gezeigt werden, daß STAT1 an ein Tyrosinmotiv $Y-X_h-P-X_p$ und STAT3 an ein Motiv $Y-X_{h,p}-X_{h,p}-Q$ bindet (h steht für hydrophobe und p für positiv geladene Aminosäuren) (40, 128). Unter Annahme dieser Konsensussequenzen enthält gp130 vier STAT3-Rekrutierungsstellen, von denen zwei auch STAT1 binden könnten, der LIFR enthält drei und der OSMR zwei putative STAT3-Bindungsstellen. Mit Hilfe chimärer STAT-Faktoren, in denen die SH2-Domäne des STAT3 gegen die SH2-Domäne des STAT1 ausgetauscht wurde, konnte demonstriert werden, daß die SH2-Domäne die Spezifität der STAT-Faktoren bestimmt (51). Nach Homo- oder Heterodimerisierung der aktivierten STAT-Faktoren translozieren diese in den Zellkern, wo sie an Promotor- und Enhancer-Elemente verschiedener Zielgene binden und deren Transkriptionsrate beeinflussen (Abb. 3). Für die transaktivierende Wirkung der STATs scheint neben der Tyrosin- auch eine Serinphosphorylierung (S727 für STAT1 und STAT3) notwendig zu sein (76, 149). Für STAT3 konnte vor kurzem gezeigt werden, daß diese Serinphosphorylierung durch die Proteinkinase C δ bewirkt wird (56).

Die minimalen strukturellen Voraussetzungen für eine Bindung der Tyrosinphosphatase SHP2 - wahrscheinlich über eine oder beide ihrer SH2-Domänen (Abb. 2) - an einen Rezeptor der IL-6-Typ Zytokine wurden ebenfalls für gp130 definiert. Eine Konsensussequenz von vier Aminosäuren in der Abfolge $Y-X-X-L/V/I$ - in gp130 $Y759-S-T-V$ - ist ausreichend, um SHP2 effizient zu rekrutieren (35, 128). Für den LIFR und auch den OSMR wurde bisher keine direkte Interaktion mit SHP2 beschrieben. Im Gegensatz zu den STAT-Proteinen besitzt SHP2 eine katalytische Domäne, die sie der Klasse der Phosphatasen zuweist (Abb. 2). Ob die Phosphataseaktivität dazu dient, die Signaltransduktion über gp130 abzuschalten, ist Gegenstand kontroverser Diskussionen. Es wurde jedoch gezeigt, daß nach Unterdrückung der SHP2-Rekrutierung an gp130 durch die Einführung einer Punktmutation $Y759F$ sowohl die STAT-Faktoren länger aktiviert bleiben als auch Reporter-gen-Konstrukte deutlich stärker induziert werden (118). Unumstritten ist die Bedeutung von SHP2 für die Aktivierung eines weiteren Signaltransduktionsweges, des Ras/Raf/MAPK-Weges. Nach eigener Phos-

phorylierung am aktivierten Rezeptor bietet SHP2 Bindungsstellen für das Adaptorprotein Grb2 (*growth factor receptor bound protein-2*), ein Protein ohne katalytische Funktion, dafür aber mit einer SH2- und zwei SH3-Domänen (36). Über diese SH3-Domänen rekrutiert Grb2 seinerseits den Guaninnukleotid-Austausch-Faktor Sos (*son of sevenless*), was zu einer Translokation dieses Proteins vom Zytoplasma an die Zellmembran führt. Dadurch induziert Sos die Konversion der inaktiven GDP-gebundenen Form von Ras in die GTP-gebundene aktive Form. Ras assoziiert seinerseits mit Raf-1, einem Mitglied der Raf-Familie von Serin/Threonin-Kinasen (150), das nach seiner Aktivierung als übergeordnete Kinase für die dualspezifische Kinase MEK-1 dient. MEK-1 aktiviert die MAP-Kinasen Erk1/2 über eine Tyrosin-/ Threoninphosphorylierung, bevor diese anschließend verschiedene Transkriptionsfaktoren (TF) modifizieren (3) (Abb. 3).

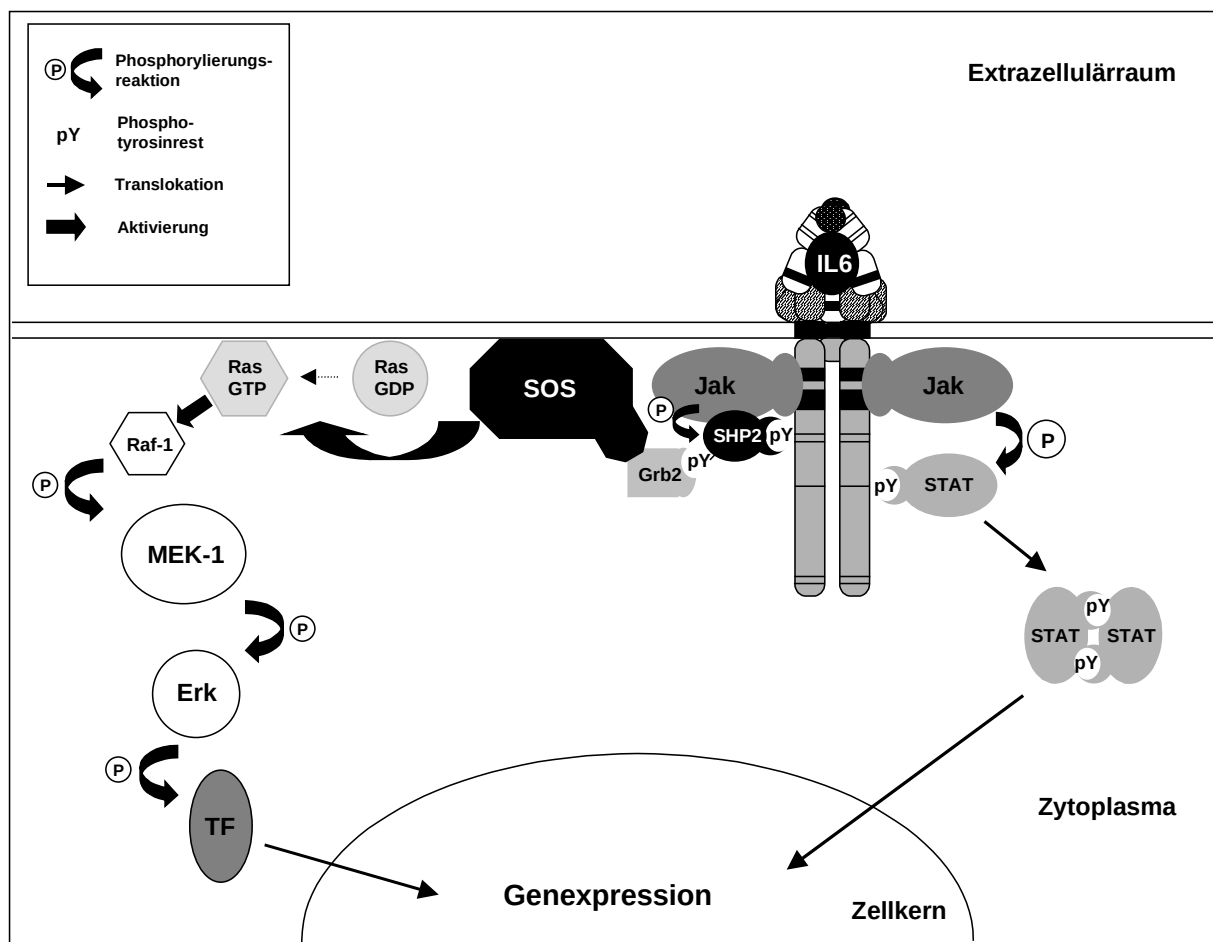


Abb. 3: Zwei verschiedene Wege der IL-6-induzierten Signaltransduktion

Die ligandeninduzierte Dimerisierung von gp130 führt neben der Aktivierung des Jak/STAT-Signaltransduktionsweges auch zur Initiation der Ras/Raf/MAPK-Kaskade. Dabei erfolgt die Einleitung der Ras/Raf/MAPK-Kaskade über die Rekrutierung der Tyrosinphosphatase SHP2 an den Rezeptor. Das Adaptorprotein Grb2 rekrutiert, nach Bindung an SHP2, den Guaninnukleotid-Austausch-Faktor Sos, der seinerseits Ras aktiviert, wodurch die MAPK-Kaskade gestartet wird.

4. Abschaltmechanismen einer Zytokinstimulation

Um zu verhindern, daß es zu einer unkontrollierten Antwort auf einen Stimulus kommt, ist es unerlässlich, daß die einmal gestartete Signaltransduktion auch wieder abgeschaltet wird. Eine kürzlich entdeckte Familie von Proteinen spielt für die Abschaltung eines IL-6-Typ Zytokin-induzierten Signals eine wichtige Rolle: die *suppressors of cytokine signalling*, kurz SOCS-Proteine genannt (Abb. 2) (130). Diese werden - dem heutigen Wissensstand zufolge - erst nach einer Zytokin-Stimulation gebildet und wirken dann als *Feedback*-Inhibitoren. Wie die SOCS-Proteine genau die Signaltransduktion unterbinden, ist derzeit Gegenstand vieler Untersuchungen. Kürzlich konnte gezeigt werden, daß SOCS1 an die Janus-Kinasen Jak1, Jak2 und Tyk2 bindet (29, 93), was zu der Vermutung führte, daß die SOCS-Proteine die Janus-Kinasen inaktivieren und somit eine weitere Aktivierung der STAT-Faktoren verhindern. Neuere Studien deuten aber auch darauf hin, daß die SOCS-Proteine direkt an den Rezeptor binden können und dort ihre negativ-regulatorische Funktion ausüben (121).

Neben den SOCS-Proteinen können auch die *protein inhibitors of activated STATs* (PIAS) negativ auf eine Zytokin-induzierte Signaltransduktion wirken. Sie scheinen phosphorylierte STAT-Faktoren erkennen und binden zu können. Das 68 kDa-Protein PIAS3 koimmun-präzipitiert mit STAT3, aber nicht mit STAT1. Es blockiert die DNA-Bindung und STAT3-vermittelte Genaktivierung (20). Ein ähnliches Protein, PIAS1, wurde für die Inhibierung von STAT1 beschrieben (70). Wie die Aktivität der PIAS reguliert wird, ist noch unbekannt.

Lange Zeit wurde auch die Rezeptor-Endozytose als möglicher Abschaltmechanismus diskutiert. Diese reguliert die Oberflächenexpression verschiedener Rezeptorproteine. Für den IL-6-Rezeptorkomplex konnte eine *Down*-Regulation nachgewiesen werden. Mittlerweile ist bekannt, daß gp130 konstitutiv über ein Dileucin-Motiv in der zytoplasmatischen Domäne internalisiert wird (137), der IL-6R wird nach Ligandenbindung über den ternären Komplex internalisiert (151). Der Austausch des Dileucin-Motivs gegen Alaninreste führt zu einer Verlangsamung der Endozytoserate (27). Da gp130 konstitutiv endozytiert wird, scheint dieser Mechanismus für die Abschaltung der Signaltransduktion aber nicht der entscheidende zu sein (138).

5. Ziel der Arbeit

Die Familie der IL-6-Typ Zytokine ist u. a. durch ihre gemeinsame Nutzung der signaltransduzierenden Rezeptoruntereinheit gp130 charakterisiert. Mit Ausnahme von IL-6 und IL-11 benötigen die weiteren Mitglieder der Familie – LIF, OSM, CNTF, CT-1 und NNT-1/BSF3 – eine zweite signaltransduzierende Rezeptorkette: den LIFR oder den OSMR. Während die Signalweiterleitung über den zytoplasmatischen Bereich von gp130 bereits gut erforscht ist, wurde die Signalfähigkeit des LIFR oder OSMR weniger intensiv untersucht.

Mit Hilfe eines chimären Rezeptorsystems, das auf den Rezeptorketten für IL-5 (IL-5R α und IL-5R β) basiert und dadurch eine gezielte Heterodimerisierung zytoplasmatischer Bereiche erlaubt, sollte die Signaltransduktion eines gp130/LIFR-Heterodimers im Vergleich zum gp130-Homodimer untersucht werden. Sind die Signalwege überwiegend redundant oder gibt es auch spezifische Eigenschaften?

Wie unterscheidet sich die OSM-vermittelte Signaltransduktion von einer IL-6- oder LIF-stimulierten Signalweiterleitung? Gibt es spezifische Signale, die über den OSMR eingeschaltet werden?

Ein weiterer Aspekt, der für eine Zytokin-vermittelte Signaltransduktion von wachsender Bedeutung zu sein scheint, ist die Beteiligung der Transmembranregion an der Rezeptoraktivierung. Es sollte daher - ebenfalls mit Hilfe des chimären Rezeptorsystems - untersucht werden, inwieweit die TM-Region des gp130 für eine über den zytoplasmatischen Bereich dieser Rezeptorkette vermittelte Signaltransduktion wichtig ist. Dazu sollten chimäre Rezeptoren hergestellt werden, die neben den Extrazellulärbereichen der IL-5-Rezeptorketten die Transmembranregion entweder des gp130 oder der IL-5-Rezeptoren enthalten. Sind Rezeptoren mit der IL-5R-TM-Region nach Stimulation mit IL-5 in der Lage, ein Signal über den zytoplasmatischen Bereich von gp130 effizient in die Zelle weiterzuleiten?

II Material und Methoden

1. Chemikalien

Alle Chemikalien wurden in der Qualität *pro analysi* verwendet. Die Restriktionsenzyme sowie die dazugehörigen Reaktionspuffer wurden, falls im Text nicht anders vermerkt, von der Firma AGS (Heidelberg) bezogen.

Radiochemikalien

$\alpha[^{32}\text{P}]\text{dATP}$ (Amersham; Buchler, Braunschweig)

2. Zytokine und Rezeptoren

- Epo rekombinantes humanes Erythropoetin ($2,2 \times 10^5$ U/mg Protein) wurde von der Firma Boehringer Mannheim, Penzberg zur Verfügung gestellt
- IL-5 (a) rekombinantes humanes Interleukin-5 wurde von Dr. J. Tavernier (Gent, Belgien) (135) zur Verfügung gestellt oder
(b) von der Firma Cell Concepts (Umkirch) bezogen
- IL-6 humanes Interleukin-6 wurde nach Arcone *et al.* (1) rekombinant hergestellt; die spezifische Aktivität betrug 1×10^6 BSF2 U/mg Protein
- LIF rekombinanter humaner *leukemia inhibitory factor* wurde von Dr. N. Nicola (Melbourne, Australien) zur Verfügung gestellt
- OSM rekombinantes humanes Oncostatin M wurde von der Firma Cell Concepts (Umkirch) bezogen
- sIL-6R löslicher, humaner IL-6 Rezeptor wurde aus Baculovirus-infizierten Insektenzellen gewonnen (141)

3. Antikörper

- Kaninchen-anti-Maus Ig polyklonales Antiserum gegen den konstanten Bereich des Maus-Immunglobulins; unkonjugiert (DAKO, Hamburg)
- Ziege-anti-Kaninchen Ig polyklonales Antiserum gegen den konstanten Bereich des Kaninchen-Immunglobulins; Peroxidase- (HRP-) konjugiert (DAKO, Hamburg)

Kaninchen-anti-Ziege Ig	polyklonales Antiserum gegen den konstanten Bereich des Ziegen-Immunglobulins; HRP-konjugiert (DAKO, Hamburg)
Ziege-anti-Maus Ig	polyklonales Antiserum gegen den konstanten Bereich des Maus-Immunglobulins; HRP-konjugiert (DAKO, Hamburg)
PE-Ziege-anti-Maus IgG Fab	polyklonales Antiserum gegen Maus IgG, R- Phycoerythrin-konjugiert (Dianova, Hamburg)
Anti-Jak1	polyklonales Antiserum gegen die Kinase-ähnliche Domäne der Jak1 (zur Verfügung gestellt von Dr. A. Ziemiecki, Bern)
Anti-Jak2	polyklonales Antiserum gegen die Kinase-ähnliche Domäne der Jak2 (zur Verfügung gestellt von Dr. A. Ziemiecki, Bern)
Anti-Tyk2	monoklonaler Antikörper gegen die Janus-Kinase Tyk2 (Transduction Laboratories, USA)
Anti-IL-5R β (S-16)	monoklonaler Antikörper gegen den extrazellulären Bereich der gemeinsamen signaltransduzierenden Rezeptoruntereinheit von IL-3/IL-5/GM-CSF (Santa Cruz, USA)
Anti-IL-5R β (N-20)	polyklonales Antiserum gegen den extrazellulären Bereich der gemeinsamen signaltransduzierenden Rezeptoruntereinheit von IL-3/IL-5/GM-CSF (Santa Cruz, USA)
Anti-IL-5R α (16-4)	monoklonaler Antikörper gegen den extrazellulären Bereich der α -Kette des humanen IL-5-Rezeptors (zur Verfügung gestellt Dr. J. Tavernier, Gent)
Anti-Shc	polyklonales Antiserum gegen Shc (Transduction Laboratories, USA)
Anti-Grb2	polyklonales Antiserum gegen Grb2 (Santa Cruz, USA)
Anti-Erk1	polyklonales Antiserum gegen die Serin/Threonin-Kinase Erk1 (Santa Cruz, USA)
Anti-Erk2	polyklonales Antiserum gegen die Serin/Threonin-Kinase Erk2 (Santa Cruz, USA)
Anti-MAPK (T202/Y204)	polyklonales Antiserum gegen die aktive Form der Kinasen Erk1/Erk2, phosphoryliert an Threonin 202, Tyrosin 204 (New England Biolabs, USA)
Anti-STAT1	monoklonaler Antikörper gegen STAT1 (Transduction Laboratories, USA)

Anti-STAT3	monoklonaler Antikörper gegen den N-terminalen Bereich des Transkriptionsfaktors STAT3 (Transduction Laboratories, USA)
Anti-STAT3 (Y705)	polyklonales Antiserum gegen die tyrosinphosphorylierte Form des Transkriptionsfaktors STAT3 (New England Biolabs, USA)
Anti-SHP2	polyklonales Antiserum gegen die Tyrosinphosphatase SHP2 (Santa Cruz, USA)
4G10	monoklonaler Antikörper gegen Phosphotyrosin (Upstate, USA)
B-T12	monoklonaler Antikörper gegen die Domänen D4 bis D6 des humanen gp130 (142)
B-P8	monoklonaler, synergistischer Antikörper gegen die dritte Domäne (D3) des humanen gp130 (142)

4. Plasmide

pSVL	eukaryontischer Expressionsvektor, Pen ^R (Pharmacia, Freiburg)
pBS II KS	Klonierungsvektor, Pen ^R (Stratagene, Heidelberg)
pRC/CMV	eukaryontischer Expressionsvektor, Pen ^R (Pharmacia, Freiburg)
pSV2-Neo	Neo ^R , zur Verfügung gestellt von Dr. K. Friedrich (Würzburg)
pSVL-IL-5R α /gp130 (α /gp130)	pSVL, in den die cDNA für einen chimären IL-5R α /gp130-Rezeptor inseriert wurde; der extrazelluläre Bereich des IL-5R α ist mit der Transmembran- und intrazellulären Region des gp130 fusioniert (10)
pSVL-IL-5R β /gp130 (β /gp130)	pSVL, in den die cDNA für einen chimären IL-5R β /gp130-Rezeptor inseriert wurde; der extrazelluläre Bereich des IL-5R β ist mit der Transmembran- und intrazellulären Region des gp130 fusioniert (10)
pSVL-IL-5R α /gp130-B1/2 (α /gp130-B1/2)	pSVL, in den die cDNA für einen chimären IL-5R α /gp130-Rezeptor inseriert wurde; der extrazelluläre Bereich des IL-5R α ist mit der Transmembran- und einem Teil der intrazellulären Region (Box1/Box2) des gp130 fusioniert (10)
pSVL-IL-5R β /gp130-B1/2 (β /gp130-B1/2)	pSVL, in den die cDNA für einen chimären IL-5R β /gp130-Rezeptor inseriert wurde; der extrazelluläre Bereich des IL-5R β ist mit der Transmembran- und einem Teil der intrazellulären Region (Box1/Box2) des gp130 fusioniert (10)

pSVL-IL-5R β / Δ cyt (β / Δ cyt)	pSVL, in den die cDNA für einen chimären IL-5R β / Δ cyt-Rezeptor inseriert wurde; der extrazelluläre Bereich des IL-5R β ist mit der Transmembranregion des gp130 fusioniert; intrazellulär sind nur noch 3 Aminosäuren vorhanden (10)
pSVL-IL-5R α /LIFR (α /LIFR)	pSVL, in den die cDNA für einen chimären IL-5R α /LIFR-Rezeptor inseriert wurde; der extrazelluläre Bereich des IL-5R α ist mit der Transmembran- und intrazellulären Region des LIFR fusioniert (136)
pSVL-IL-5R β /LIFR (β /LIFR)	pSVL, in den die cDNA für einen chimären IL-5R β /LIFR-Rezeptor inseriert wurde; der extrazelluläre Bereich des IL-5R β ist mit der Transmembran- und intrazellulären Region des LIFR fusioniert (136)
pSVL-IL-5R α /OSMR (α /OSMR)	pSVL, in den die cDNA für einen chimären IL-5R α /OSMR-Rezeptor inseriert wurde; der extrazelluläre Bereich des IL-5R α ist mit der Transmembran- und intrazellulären Region des OSMR fusioniert (107)
pSVL-IL-5R β /OSMR (β /OSMR)	pSVL, in den die cDNA für einen chimären IL-5R β /OSMR-Rezeptor inseriert wurde; der extrazelluläre Bereich des IL-5R β ist mit der Transmembran- und intrazellulären Region des OSMR fusioniert (107)

5. Eukaryontische Zellen und deren Kultivierung

5.1 Permanente Zelllinien

A375	adhärent wachsende humane Melanom-Zelllinie (ATCC; CRL-1619); Kultivierung in RPMI-Medium, ergänzt mit 5% FKS
Ba/F3	nicht adhärent wachsende murine prä-B-Zelllinie; Kultivierung in DMEM-Medium, ergänzt mit 10% FKS und 5% konditioniertem, IL-3-haltigem BPV-mIL-3 Kulturüberstand
COS-7	adhärent wachsende Affennieren-Zelllinie (ATCC; CRL-1651); Kultivierung in DMEM-Medium, ergänzt mit 10% FKS
HepG2	adhärent wachsende humane Hepatom-Zelllinie (ATCC; HB-8058); Kultivierung in DMEM/F12-Medium, ergänzt mit 10% FKS
MCF-7	adhärent wachsende humane Brustkarzinom-Zelllinie (ATCC; HTB-22); Kultivierung in DMEM-Medium, ergänzt mit 10% FKS

5.2 Nährmedien und Lösungen für die Zellkultur

DMEM Flüssigmedium	(Gibco, Eggenstein)
DMEM/F12 Flüssigmedium	(Gibco, Eggenstein)
RPMI 1640 Flüssigmedium	(Gibco, Eggenstein)
FKS; mykoplasmenfreies fötales Kälberserum	(Seromed, Berlin)
Penicillin/Streptomycin	(Gibco, Eggenstein)
Trypsin(0,05%)/EDTA(0,02%)-Lösung	(Biochrom, Berlin)

Die Zellen wurden bei 37°C in wassergesättigter Luft mit 5% CO₂ kultiviert. Den verschiedenen Medien wurden außer den angegebenen Mengen fötalen Kälberserums 100 mg/l Streptomycin und 60 mg/l Penicillin zugesetzt. Zur Weiterkultivierung wurden konfluente Platten adhärent wachsender Zellen mit PBS gewaschen und die Zellen durch eine Behandlung mit Trypsin/EDTA von der Platte gelöst. A375- und COS-7-Zellen wurden in einer 1:2- bis 1:12-Verdünnung in frischem Medium aufgenommen. Die Vereinzelung von HepG2- und MCF-7-Zellen erfolgte mit Hilfe einer Kanüle.

Zur Langzeitaufbewahrung wurden die Zellen in Medium mit 10% DMSO aufgenommen, in Kryoröhrchen aliquotiert und für 24 h bei -80°C gelagert, bevor sie zur längeren Aufbewahrung in flüssigen Stickstoff überführt wurden.

PBS:	200 mM NaCl
	2,5 mM KCl
	8,0 mM Na ₂ HPO ₄
	1,5 mM KH ₂ PO ₄

6. Prokaryontische Zellen und deren Kultivierung

Alle Klonierungsschritte wurden entweder in *E.coli* JM83 oder *E.coli* XL1Blue durchgeführt. Die Anzucht rekombinanter *E.coli*-Bakterien erfolgte in LB-Flüssigmedium unter Zugabe von 100 µg/ml Ampicillin. Stammkulturen zur längerfristigen Lagerung wurden mit 15% Glycerin versetzt und bei -80°C gelagert.

LB-Flüssigmedium:	5 g/l NaCl
	5 g/l Yeast extract (Difco, Detroit, USA)
	10 g/l Bactotrypton (Difco, Detroit, USA)
	10 mM Tris-HCl pH 8
	1 mM MgSO ₄

Die Herstellung von LB-Nährböden erfolgte durch Zugabe von 1,5% Bacto-Agar.

7. Isolierung und Analyse von Plasmid-DNA

7.1 Transformation von Bakterien

100 µl kompetenter Bakterien, hergestellt nach Sambrook *et al.* (116), wurden mit 10-20 µl eines Ligationsansatzes (7.10) oder 1 ng Plasmid-DNA 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte eine einminütige Inkubation bei 42°C, gefolgt von zwei weiteren Minuten auf Eis, nach denen die Zellen in 1 ml LB-Medium aufgenommen wurden. Nach mindestens 30 min bei 37°C wurden die Bakterien abzentrifugiert, in 100 µl LB-Medium resuspendiert und auf LB-Agarplatten mit geeigneten Antibiotika ausplattiert. Die Agarplatten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert und nachfolgend rekombinante Klone analysiert.

7.2 Präparation von Plasmid-DNA im kleinen Maßstab

Die Präparation von Plasmid-DNA im kleinen Maßstab dient der schnellen Charakterisierung rekombinanter Bakterienklone. Die Bakterien wurden über Tag in einer 2 ml LB-Kultur vermehrt und anschließend durch Zentrifugation sedimentiert. Der Aufschluß der Bakterien und die Isolation der Plasmid-DNA erfolgte mit Hilfe des Qiaspin-Plasmidpräparationskits (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers.

7.3 Präparation von Plasmid-DNA im großen Maßstab

Zur Isolierung größerer Mengen hochreiner Plasmid-DNA wurden die Zellen einer 50 ml bzw. einer 500 ml Übernachtskultur mit Hilfe von Midi- bzw. Maxi-Plasmidpräparationskits (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben aufgearbeitet. Die isolierte DNA wurde in Wasser resuspendiert.

7.4 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die quantitative Bestimmung der DNA erfolgte photometrisch in einem UV-Spektrometer (Pharmacia, Freiburg) über die OD_{260} . Eine Extinktion $E_{260} = 1,0$ entspricht einer Konzentration von 50 µg doppelsträngiger DNA/ml. Der Reinheitsgrad wurde mit Hilfe des Quotienten $E_{260}:E_{280}$ bestimmt, der zwischen 1,8 - 2,0 liegen sollte (116).

7.5 Restriktion von DNA

Die Restriktion der DNA erfolgte nach Angaben der Enzymhersteller. Die Inkubationszeiten betrugen 1 h bis zu 3 h bei präparativen Ansätzen. Sollte die DNA einem doppelten Restriktionsverdau unterzogen werden, so wurden die beiden Endonukleasen gleichzeitig eingesetzt, sofern die entsprechenden Pufferbedingungen dies zuließen. Erwiesen sich die Puffersysteme als unverträglich, wurde nach der ersten Restriktion eine Phenol-Chloroform-Extraktion und eine DNA-Fällung mit 1 Vol Isopropanol und 0,025 Vol 8 M LiCl für 30 min bei -20°C durchgeführt. Nach Zentrifugation (10 min, 14.000 upm) wurde die DNA mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in Wasser gelöst. Im Anschluß wurde mit dem zweiten Restriktionsenzym geschnitten.

7.6 Auffüllreaktion mit der Klenow-Polymerase

Mit Hilfe der Klenow-Polymerase (Boehringer Mannheim) wurden 5'-überhängende DNA-Enden nach einem Restriktionsverdau aufgefüllt. Dazu wurde die mit Endonukleasen behandelte DNA gefällt und in 20 μl Wasser resuspendiert. Dieser Reaktionsansatz wurde mit 4 μl 10x NT-Puffer, je 330 μM dATP, dCTP, dGTP, dTTP, 0,5 U Klenow-Polymerase und 12,5 μl Wasser für 30 min bei 37°C inkubiert. Die DNA wurde wie unter 7.5 beschrieben gefällt und in 20 μl Wasser resuspendiert.

10x NT-Puffer:	500 mM Tris-HCl pH 7,4
	100 mM MgSO_4
	1 mM DTT
	500 $\mu\text{g/ml}$ BSA

7.7 Dephosphorylierung linearisierter Plasmid-DNA

Um die Möglichkeit der Vektor-Religation nach einem Restriktionsverdau zu reduzieren und damit die Ligationseffizienz der gewünschten Insertion zu erhöhen, wurde die endständige 5'-Phosphatgruppe der linearisierten Vektor-DNA entfernt. Nach der Restriktion wurde die DNA 30 min mit 1 U alkalischer Phosphatase (Boehringer Mannheim) unter Zugabe des mitgelieferten 10 fach-Puffers behandelt. Zum Abstoppen der Reaktion durch Entfernung des Enzyms wurde eine Phenolextraktion durchgeführt (7.5).

7.8 Auftrennung von DNA-Fragmenten in der Agarose-Gelelektrophorese

Nach der enzymatischen Restriktion wurden die Größen der DNA-Fragmente gelelektrophoretisch ermittelt. Dazu wurden die Reaktionsansätze mit 10x DNA-Probenpuffer

versetzt und auf ein Agarosegel (1% SeaKem-LE-Agarose, Biozym, Hameln) geladen. Der Agarose wurde 0,1 µg Ethidiumbromid/ml zugesetzt, um die DNA-Banden unter UV-Licht sichtbar zu machen. Als Größenstandard diente die KB-Leiter.

10x DNA-Probenpuffer:	25	%	Ficoll 400.000
	0,4	%	Xylencyanolblau
	0,4	%	Bromphenolblau
1x TAE-Laufpuffer	40	mM	Tris-Base
	50	mM	EDTA
	5	mM	Na-Acetat
	32	mM	Essigsäure

7.9 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die nach Restriktion (7.5) oder PCR (8.9) erhaltenen und im Agarosegel aufgetrennten DNA-Fragmente wurden mit Hilfe des Qiaex-Kits (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben aus der Gelmatrix isoliert und in Wasser aufgenommen.

7.10 DNA-Ligation

Die Ligation doppelsträngiger DNA erfolgte in Gegenwart von ATP durch die T4-DNA-Ligase (Boehringer Mannheim). 20-50 ng geschnittenen Vektors wurden mit einem 2-10 fachen molaren Überschuß an zu inserierender DNA gemischt und für 2 h bei 37°C oder über Nacht bei RT inkubiert. Anschließend wurden Bakterien mit den Ligationsansätzen transformiert (7.1).

10x Ligationspuffer (überhängende Enden):	440	mM	Tris·HCl pH 8,0
	220	mM	Tris·HCl pH 7,4
	100	mM	DTT
	100	mM	MgCl ₂
	500	µg/ml	BSA
	10	mM	ATP
5x Ligationspuffer (glatte Enden):	250	mM	Tris·HCl pH 7,4
	50	mM	MgCl ₂
	5	mM	DTT
	5	mM	ATP
	250	µg/ml	Polyethylenglycol 6000

7.11 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung der DNA wurde unter Verwendung des PRISMTM Ready Reaction DyeDeoxyTM Terminator Cycle Sequencing Kits (Perkin Elmer) durchgeführt. Die PCR wurde wie folgt angesetzt:

9,5 µl Terminator-Prämix
1,0 µg ds DNA-Matrize
3-10 pmol Oligonukleotid *Primer*
ad 20 µl Wasser (*ad iniectionem*)

Die DNA-Matrize wurde durch 25 Reaktionszyklen in einem Thermocycler unter Einbau fluoreszenzmarkierter Didesoxynukleotide amplifiziert. Ein Reaktionszyklus bestand aus:

20 sec, 96°C Denaturierung
40 sec, 48°C *Primer*-Bindung
20 sec, 60°C DNA-Extension

Nach der Amplifikation wurde die DNA mit 10 µl 3 M Na-Acetat (pH 5,2) und 50 µl 100% Ethanol für 20 min gefällt und bei 14.000 upm abzentrifugiert. Das DNA-Sediment wurde mit 70% Ethanol gewaschen, getrocknet und in 3,4 µl deionisiertem Formamid und 0,6 µl EDTA (50 mM, pH 8,0) resuspendiert. Die Analyse erfolgte mit Hilfe des ABI Modell 310A Sequenzierers nach Angaben des Herstellers.

8. Konstruktion von Rezeptormutanten

8.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Alle in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Mutationen im gp130-, LIFR- oder OSMR-Molekül wurden mittels PCR-Technik (Sambrook *et al.* (116)) eingeführt. Als DNA-Matrizen dienten die Vektoren pSVL-IL-5Rβ/gp130 (10), pSVL-IL-5Rα/LIFR (136) oder pSVL-IL-5Rβ/OSMR (107). Synthetische Oligonukleotide dienten als *Primer*, um die zu mutierenden Bereiche der cDNAs mit Hilfe der Vent- oder Taq-Polymerase zu amplifizieren.

Ein PCR-Ansatz enthielt folgende Komponenten:

0,1-100 ng DNA-Matrize
100-200 pmol *Primer*
je 250 µM dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)
0,5 U Vent- oder Taq-Polymerase
ad 50 µl Wasser

Die Reaktionsansätze wurden vor Zugabe der dNTPs und des Enzyms für 5 min bei 94°C denaturiert. Anschließend wurden folgende Schritte im Thermocycler durchgeführt:

1 min	94°C	1. Denaturierung
2 min	37-52°C	<i>Primer</i> -Bindung
2 min	72°C	Extension
5 min	72°C	letzte Extension

Die Temperatur für die *Primer*-Bindung wurde individuell für jede PCR in Abhängigkeit des gewählten Oligonukleotids variiert. Es wurden 25-35 Zyklen durchlaufen.

8.2 Oligonukleotide

gp130mutbox1 (sp)	5'-CTAATGTTGCAGATGCTTCAAAGA-3'
gp130mutbox1 (rp)	5'-CTTTGAAGCATCTGCAACATTAGGC-3'
gp130(box1-CT) (sp)	5'-GGTAGGGCATGCGAGACCTAATTAACAAACAC-3'
gp130TM-2AS (rp)	5'-GGGCCTTCTTAAGTAGGTCTCGCTTATTAAAGCAGAA CAGCACTCCCAGTGTCAATAGGAATGCTAAG-3'
gp130TM-1AS (rp)	5'-GGGCCTTCTTAAGTAGGTCTCGCTTATTAAAGCAGAA CAGCACTCCCAGAAGTGTCAATAGGAATGCTAAGCA AACAG-3'
gp130TM+1AS (rp)	5'-GGGCCTTCTTAAGTAGGTCTCGCTTATTAAAGCAGAA CAGCACTCCTAGGAGAAGAGTTGTCAATAGGAA-3'
gp130TM+2AS (rp)	5'-GGGCCTTCTTAAGTAGGTCTCGCTTATTAAAGCAGAA CAGCACTCCTAGTACTAGAAGAGTTGTCAATAGGAA-3'
gp130T632/633A (rp)	5'-TCCCAGAAGAGCTGCCAATAGGAATGCTAAGC-3'
gp130T632/633A (sp)	5'-TTCCTATTGGCAGCTCTTCTGGGAGTGC-3'
gp130P624L (sp)	5'-CCATAGTCGTGCTTGTTTGCTTAGC-3'
gp130P624L (rp)	5'-GCTAAGCAAACAAGCACGACTATGG-3'
gp130C626S (sp)	5'-CCATAGTCGTGCCTGTTAGCTTAGCATTCTATTG-3'
gp130C626S (rp)	5'-CAATAGGAATGCTAAGCTAACAGGCACGACTATGG-3'
gp130C640S (sp)	5'-CTGGGAGTGCTGTTTCAGCTTTAATAAGCGAGACC-3'
gp130C640S (rp)	5'-GTCTCGCTTATTAAAGCTGAACAGCACTCCCAG-3'
LIFRmutbox1 (sp)	5'-CCTGATATTGCAAATGCAGAAAAGTG-3'
LIFRmutbox1 (rp)	5'-AGTTTTCTGCATTTGCAATATCAGGG-3'

OSMRY837F (sp)	5'-GCCTAACTTCCTTTATCTCCTTCCAACAG-3'
OSMRY837F (rp)	5'-GATAAAGGAAGTTAGGCTTAGTCAACTCG-3'
OSMRY861F (sp)	5'-CTTGACCTTTAACCAGGCAGCTTCTGA-3'
OSMRY861F (rp)	5'-CTGGTTAAAGGTCAAGTTCTCAAAACAG-3'

9. Expression der chimären IL-5R-Konstrukte in eukaryontischen Zellen

9.1 Transiente Transfektion von COS-7-Zellen

COS-7-Zellen wurden mit Hilfe der DEAE-Dextran-Methode transfiziert. Bei 85%iger Konfluenz wurden die Zellen dazu in einer 75 mm² Flasche mit einem Gemisch aus 7,5 ml DMEM-Medium ohne FKS, 15-30 µg Plasmid-DNA, 6 µl Chloroquine (100 mM) und 60 µl DEAE-Dextran (50 mg/ml) 90 min unter Luftabschluß inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen und für 2 min in PBS/10% DMSO inkubiert. Die Zellen wurden erneut mit PBS gewaschen und über Nacht in Medium kultiviert.

9.2 Transiente Transfektion von HepG2- und MCF-7-Zellen

HepG2- und MCF-7-Zellen wurden transient mit Hilfe der Calciumphosphat-Präzipitation transfiziert. 1 h vor der Transfektion wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und in DMEM-Medium mit 10% FKS inkubiert. 10-20 µg DNA wurden in 62 µl 2 M CaCl₂ aufgenommen, mit 0,5 ml 2x HBS versetzt und mit 10 ml DMEM-Medium mit 10% FKS gut vermischt. Die Mischung wurde auf zwei ca. 50% konfluente 6 cm-Kulturschalen verteilt und die Zellen über Nacht inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurde das Transfektionsmedium entfernt, die Zellen zweimal gewaschen und in DMEM/F12-Medium für HepG2- bzw. in DMEM-Medium für MCF-7-Zellen inkubiert.

2x HBS:	10 g/l	Hepes
	16 g/l	NaCl
	0,74 g/l	KCl
	0,25 g/l	Na ₂ HPO ₄ x 2 H ₂ O
	2 g/l	Glukose

9.3 Stabile Transfektion von Ba/F3-Zellen

Zur ständigen Expression mutierter Rezeptorkonstrukte wurden Ba/F3-Zellen stabil mit entsprechenden cDNAs transfiziert. Diese Transfektion erfolgte durch Elektroporation. $3,5 \times 10^6$ Zellen wurden mit insgesamt 30 µg DNA gemischt und mit einem Puls von 200 V für 70 msec elektroporiert (Biorad-Elektroporator). Zwei µg des Plasmids pSV2 Neo, das für eine Neomycinresistenz kodiert, wurden kotransfiziert, um transfizierte Zellen selektieren zu können. Im Anschluß an die Elektroporation wurden die Zellen zunächst für 24 h ohne Selektionsdruck in DMEM/IL-3 kultiviert. Am nächsten Tag wurden die Zellen abzentrifugiert und in 48 ml Medium mit 0,5 mg Genitacin G418/ml aufgenommen. Jeweils 1 ml Zellsuspension wurde in 24-Loch-Zellkulturplatten ausgesät. Sieben bis 14 Tage später waren erste G418-resistente Klone zu erkennen, die in frischem G418-haltigem Medium auf 6-Loch-Platten überführt und vermehrt wurden. In diesem Stadium wurden die resistenten Zellen durchflußzytometrisch (10.4) auf die Expression des transfizierten Rezeptorkonstruktes überprüft. Positive Klone wurden weiter kultiviert bzw. in flüssigem Stickstoff gelagert.

10. Nachweis der in eukaryontischen Zellen exprimierten chimären Rezeptorkonstrukte

10.1 Herstellung von Zellysaten

Zur Herstellung von Zellysaten für Kopräzipitationsversuche wurden die Zellen zwei Tage nach der Transfektion zweimal in kaltem PBS/Na-Vanadat gewaschen. Nach Zugabe von 500 µl kaltem BRIJ-Lysispuffer mit Proteaseinhibitoren/10 cm-Zellkulturschale wurden die Zellen mit Hilfe eines Gummischabers von der Platte gelöst und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Nach 30-minütiger Inkubation auf Eis und kurzem *Vortexen* wurden durch Zentrifugation bei 10.000 upm die Membranbestandteile abgetrennt. 25 µl der Zellysate wurden für ein quantitativ analytisches Polyacrylamid-Gel abgenommen und bei – 20°C gelagert. Das restliche Lysat wurde einer Immunpräzipitation (10.2) unterzogen. Sollten die Zellysate zur Analyse von phosphorylierten Proteinen hergestellt werden, wurden die Zellen in Triton- statt BRIJ-Lysispuffer lysiert.

BRIJ-Lysispuffer:

20 mM	Tris-HCl pH 7,5
150 mM	NaCl
1 mM	EDTA
1 %	BRIJ97
10 mM	NaF

Triton-Lysispuffer:	20 mM	Tris-HCl pH 7,5
	150 mM	NaCl
	1 mM	EDTA
	1 %	Triton X-100
	10 mM	NaF
Proteaseinhibitoren:	1 mM	Na ₃ VO ₄
	1 mM	PMSF
	5 µg/ml	Aprotinin
	2 µg/ml	Leupeptin

10.2 Immunpräzipitation

Zur Immunpräzipitation wurden die Zellysate mit 0,8-1 µg der Antikörper gegen die zu präzipitierenden Proteine versetzt und über Nacht im Rotationsschüttler bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Protein-Antikörper-Komplexe mit Hilfe von 4 mg Protein A-Sepharose/Ansatz in einer einstündigen Inkubation bei 4°C präzipitiert. Durch Zentrifugation (10.000 upm, 1 min) wurde die Sepharose sedimentiert und anschließend zur Verringerung der unspezifischen Bindung zweimal mit 1 ml kaltem Waschpuffer gewaschen. Danach wurde die Sepharose in 30 µl 2x Lämmli-Probenpuffer aufgenommen und die gebundenen Proteine durch Erhitzen auf 95°C für 5 min abgelöst.

BRIJ-Waschpuffer:	20 mM	Tris-HCl pH 7,5
	150 mM	NaCl
	1 mM	EDTA
	0,1 %	BRIJ97
	10 mM	NaF

Proteaseinhibitoren: siehe 10.1

2x Lämmli-Probenpuffer:	20 %	Glyzerin
	10 %	β-Mercaptoethanol
	4 %	SDS
	125 mM	Tris-HCl pH 6,8
	0,01 %	Bromphenolblau

10.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

In der denaturierenden SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese werden Proteine ihrem Molekulargewicht entsprechend aufgetrennt. Die Eigenladung des Proteins wird durch das in den Lösungen befindliche Detergenz SDS überdeckt, die Faltung durch Reduktion der Disulfidbrücken mit β-Mercaptoethanol aufgehoben. Die Elektrophorese erfolgte in einer BioMetra-Kammer bei 30 mA in einem diskontinuierlichen Gel nach Lämmli (1970). Je nach

Größe der zu analysierenden Proteine wurden 7,5%ige, 10%ige oder 12,5%ige Trenngele mit 3%igen Sammelgelen eingesetzt.

Acrylamidlösung:	22,2	%	Acrylamid
	0,6	%	Bisacrylamid
4 x Trenngelpuffer:	1,5	M	Tris-HCl pH 8,8
	0,4	%	SDS
4 x Sammelgelpuffer:	0,5	M	Tris-HCl pH 6,8
	0,4	%	SDS
10 x Elektrodenpuffer:	0,25	M	Tris-Base
	1,92	M	Glycin
	1	%	SDS

10.4 Durchflußzytometrie

Zur Überprüfung der Oberflächenexpression chimärer Rezeptorkonstrukte in transient transfizierten COS-7-Zellen bzw. von gp130-Konstrukten in stabil transfizierten Ba/F3-Zellen wurden die Zellen zwei Tage nach der Transfektion geerntet, gewaschen und in PBS/Azid resuspendiert. Fünf $\times 10^5$ bis 1×10^6 Zellen wurden anschließend in 100 μ l PBS/Azid mit 0,1 μ g eines spezifischen Antikörpers gegen den extrazellulären Bereich der IL-5R α - bzw. - β -Kette oder 0,5 μ g eines gp130-spezifischen Antikörpers 20 min bei 4°C inkubiert. Die Zellen wurden mit 3 ml PBS/Azid gewaschen und zur Detektion der an die Zellen gebundenen Antikörper mit einer Suspension aus 100 μ l PBS/Azid mit 1 μ l R-Phycoerythrin-konjugierten Kaninchen-anti-Maus IgG Fab für weitere 30 min bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Nach erneutem Waschen mit 3 ml PBS/Azid wurden 10^4 Zellen durchflußzytometrisch in einem FACScalibur (Becton Dickinson) mit einem 488 nm Argonlaser analysiert.

PBS/Azid:	5	%	FKS
	0,1	%	NaN ₃
	in PBS		

11. Untersuchung der biologischen Aktivität der chimären Rezeptor-mutanten

11.1 Bestimmung der STAT-Aktivierung im elektrophoretischen Mobilitäts-shift-Assay (EMSA)

11.1.1 Herstellung von Kernextrakten aus COS-7-Zellen

Transient transfizierte COS-7-Zellen wurden ca. 36 h nach der Transfektion (9.1) in FKS-freies DMEM-Medium überführt. Nach weiteren 6 h Inkubation wurden die Zellen entweder mit 80 ng/ml IL-5 (135) oder mit 20 ng/ml IL-5 (Cell Concepts, Umkirch) für 30 min bei 37°C stimuliert. Nach zweimaligem Waschen mit PBS/Vanadat wurden die Zellen mit Hilfe eines Gummischabers von der Platte gelöst. Ein Aliquot der Zellen wurde zur Überprüfung der Oberflächenexpression der Rezeptorkonstrukte einer FACS-Analyse unterzogen (10.4). Die abgelösten Zellen wurden sedimentiert (2 min, 1500 upm) und in 400 µl Kernextraktpuffer A resuspendiert. Nach zehnminütiger Inkubation auf Eis wurden die Zellen mechanisch mit Hilfe eines *Vortex* (10 sec) aufgebrochen. Die intakten Zellkerne wurden mittels Zentrifugation (30 sec, 14000 upm) sedimentiert und in 35–70 µl Kernextraktpuffer C aufgenommen. Nach 20-minütiger Inkubation auf Eis wurden die Membranbestandteile sedimentiert (30 sec, 14000 upm) und die kernproteinhaltige Fraktion abgenommen. Zur Überprüfung des Proteingehaltes wurde ein Biorad-Protein-Assay (11.1.2) durchgeführt.

PBS/Vanadat:	100	μM	Na_3VO_4 in PBS
Kernextraktpuffer A:	10	mM	Hepes-KOH pH 7,8
	1,5	mM	MgCl_2
	10	mM	KCl
	0,5	mM	DTT
	0,2	mM	PMSF
	1	mM	Na_3VO_4
Kernextraktpuffer C:	20	mM	Hepes-KOH pH 7,8
	1,5	mM	MgCl_2
	420	mM	NaCl
	0,2	mM	EDTA
	25	%	Glyzerin (v/v)
	0,5	mM	DTT
	0,2	mM	PMSF

11.1.2 Proteinbestimmung nach Bradford *et al.* (1976)

Der Proteingehalt verschiedener Lösungen wurde photometrisch mit Hilfe eines Kits der Firma Biorad (München) nach der Methode von Bradford *et al.* (1976) ermittelt. Dazu wurden 1-3 µl der Proben mit einer 1:4-Verdünnung der Biorad-Gebrauchslösung gemischt und die Absorption bei 595 nm bestimmt.

11.1.3 Radioaktive Markierung doppelsträngiger DNA-Sonden

Die radioaktive Markierung doppelsträngiger DNA erfolgte durch Auffüllen der 5'-überhängenden Enden mit dem Klenow-Enzym (7.6) unter Verwendung von [³²P]dATP. Nach Inkubation des Reaktionsansatzes für 30 min bei 37°C wurden die freien Nukleotide mit Hilfe des QIAquick Nucleotide Removal Kits (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben entfernt. Zur Überprüfung der gebundenen Radioaktivität wurde 1 µl des Eluats im β-Counter analysiert.

Markierungsansatz:	2,5	pM	DNA
	6	µl	10x Restriktionspuffer M (Boehringer Mannheim)
	je 1	µl	dCTP, dGTP, dTTP (je 0,5 mM)
	2	µl	[³² P]dATP
	2,5	µl	Klenow-Enzym

Zur Bestimmung der STAT-Aktivierung in COS-7-Kernextrakten (11.1.1) wurde eine radioaktiv markierte m67SIE-DNA-Sonde verwendet. Diese Sequenz ist dem humanen *c-fos*-Promotor entnommen und repräsentiert das sis-induzierbare Element (SIE). Eine Mutation (m67) erlaubt die Bindung der Faktoren STAT1 und STAT3 mit gleich hoher Affinität.

m67SIE: 5'-GATCCGGGAGGGATTACGGGAAATGCTG-3'

11.1.4 Elektrophoretischer Mobilitätsshift Assay (EMSA)

Zehn bis 15 µg der Kernextrakte (11.1.1, 11.1.2) wurden mit 9,5 µl Reaktionslösung und 10.000 cpm der radioaktiven m67SIE-DNA-Probe für 10 min bei RT inkubiert. Dies erlaubt die Bindung der Transkriptionsfaktoren an die DNA-Sequenz. Die Protein-DNA-Komplexe wurden anschließend in einem 4,5%-igen nativen Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die Elektrophorese wurde mit 250 V über eine Laufstrecke von 20 cm durchgeführt. Die geringe Salzkonzentration des Laufpuffers erforderte eine Umwälzung des Puffers mit Hilfe einer Pumpe bis zum Erreichen einer Laufront von 12 cm. Nach der Elektrophorese wurde das Gel

für 15 min in 10% Methanol/10% Essigsäure fixiert und unter Vakuum getrocknet. Die Protein-DNA-Komplexe konnten über Autoradiographie sichtbar gemacht werden.

Reaktionslösung:

4	µl	5 x Gelshiftpuffer (s.u.)
0,1	µl	1 M DTT
0,2	µl	200 mM PMSF
1	µl	Poly(dI-dC)-Poly(dI-dC) (1 mg/ml)
2	µl	BSA (10 mg/ml)
9,5	µl	Wasser

5 x Gelshiftpuffer:

50	mM	Hepes-KOH pH 7,8
5	mM	EDTA
25	mM	MgCl ₂
50	%	Glyzerin (v/v)

Gellösung:

6,75	ml	Acrylamidlösung (40 : 2)
4,5	ml	Glyzerin (99%)
3	ml	5 x TBE
45	ml	Wasser
200	µl	APS (20%)
40	µl	TEMED

TBE:

54	g	Tris-Base
27,5	g	Borsäure
ad 1000	ml	Wasser
		pH 8,3 einstellen

11.2 Bestimmung der Transkriptionsinduktion mit Hilfe eines Reportergen-Assays

HepG2- oder MCF-7-Zellen wurden mit Hilfe der Calciumphosphat-Methode transient transfiziert (9.2). 16 h nach der Transfektion wurden die Zellen vereinzelt und nach einer 12-stündigen Erholungsphase für 16 h mit 80 ng/ml IL-5 (135) oder 20 ng/ml IL-5 (Cell Concepts, Umkirch) stimuliert. Die Zellyse und Chemilumineszenz-Analyse erfolgte mit Hilfe des Luziferase-Assay-Systems der Firma Promega (Madison, USA) nach Herstellerangaben.

III Ergebnisse

1. Vergleich der Signaltransduktion durch die Rezeptorketten gp130 und LIFR

Die Familie der IL-6-Typ Zytokine, bestehend aus IL-6, IL-11, LIF, OSM, CNTF, CT-1 und NNT-1/BSF3, ist über die gemeinsame Nutzung der signaltransduzierenden Rezeptoruntereinheit gp130 charakterisiert (52). Die Zytokine, die ihre Signaltransduktion nicht über eine Homodimerisierung von gp130 ausüben, d.h. LIF, OSM, CNTF, CT-1 und NNT-1/BSF3, nutzen den LIFR als zweite signaltransduzierende Rezeptorkette (24, 39, 103, 123). Während die Signalweiterleitung über gp130 bereits sehr gut untersucht wurde, ist über den LIFR weniger bekannt. Ein Problem beim Studium der Signaltransduktion der IL-6-Typ Zytokine ist die ubiquitäre Expression des gp130. Nahezu jede Zelle des menschlichen Körpers exprimiert gp130 auf ihrer Zelloberfläche, was bedeutet, daß bei Transfektion von gp130-Rezeptorkonstrukten gleichzeitig auch der endogene Rezeptor vorhanden ist, wodurch es schwierig ist zu unterscheiden, ob das untersuchte Signal über den endogenen Rezeptor oder das zutransfizierte Konstrukt erfolgt. Um dieses Problem zu umgehen, wurde ein chimäres Rezeptorsystem etabliert. Es besteht aus Proteinen, bei denen die extrazellulären Bereiche der α - bzw. der β -Kette des IL-5-Rezeptors jeweils mit dem Transmembran- und dem intrazellulären Bereich des gp130 oder des LIFR fusioniert sind. Da die IL-5R α -Kette nur auf eosinophilen sowie basophilen Granulozyten exprimiert wird und auch die Expression der β -Kette auf hämatopoetische Zellen beschränkt ist, bietet dieses System die Möglichkeit, die Signaltransduktion über gp130 und den LIFR in geeigneten Zellen ohne den störenden Einfluß endogener Rezeptoren zu untersuchen.

1.1 Etablierung des chimären Rezeptorsystems

Bevor Aussagen über Regionen des LIFR gemacht werden können, die aktiv an der Signaltransduktion beteiligt sind, mußte sichergestellt werden, daß das chimäre Rezeptorsystem in der Lage ist, die Situation einer gp130/LIFR-vermittelten Signaltransduktion nachzuahmen. Daher wurden zunächst COS-7-Zellen mit Expressionsplasmiden für α /gp130 in Kombination mit β /gp130, α /gp130 mit β /LIFR und α /LIFR mit β /gp130 transfiziert (s. Abb. 4). 48 Stunden nach der Transfektion wurden die

Zellen geerntet, Kernextrakte gewonnen und im EMSA analysiert. Zellen, die die Kombination α /gp130 + β /gp130 exprimierten, zeigten nach IL-5-Stimulation eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors STAT1 (Abb. 4A, Spur 2). Ebenso zeigten Zellen, die mit Expressionsplasmiden für α /gp130 + β /LIFR bzw. α /LIFR + β /gp130 transfiziert worden waren eine STAT1-Aktivierung nach IL-5-Stimulation. Es ist jedoch anzumerken, daß die STAT1-Aktivierung nach Induktion einer Heterodimerisierung des zytoplasmatischen Bereiches von gp130 mit dem des LIFR deutlich schwächer war als nach einer gp130-Homodimerisierung (Abb. 4A, Spuren 4 und 6). Eine durchflußzytometrische Analyse der Oberflächenexpression der verschiedenen Rezeptorchimären ergab jedoch eine äquivalente Expression der gp130- bzw. der LIFR-Chimären (Abb. 4B), so daß ausgeschlossen werden kann, daß die geringere STAT1-Aktivierung durch gp130/LIFR-Heterodimere auf eine geringere Oberflächenexpression der LIFR-Chimären zurückzuführen ist. Weiterhin konnte ausgeschlossen werden, daß ein gp130/LIFR-Heterodimer STAT-Faktoren mit einer anderen Zeitkinetik aktiviert als ein gp130-Homodimer (Abb. 4C).

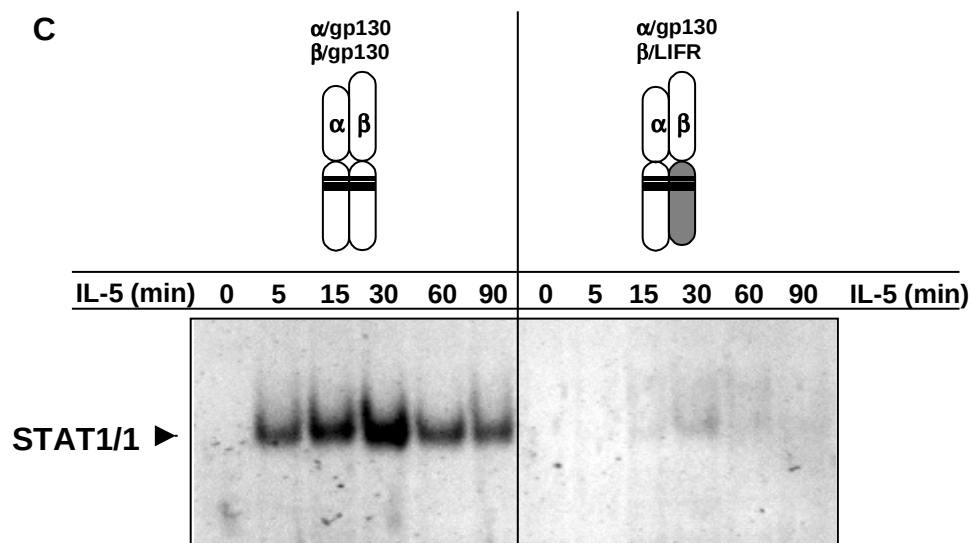
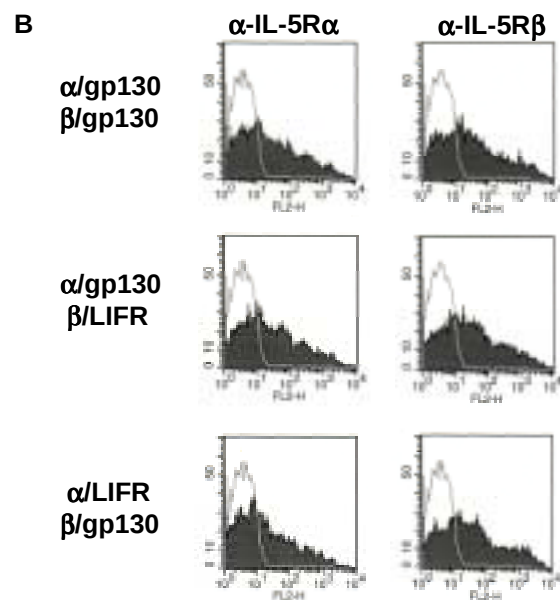
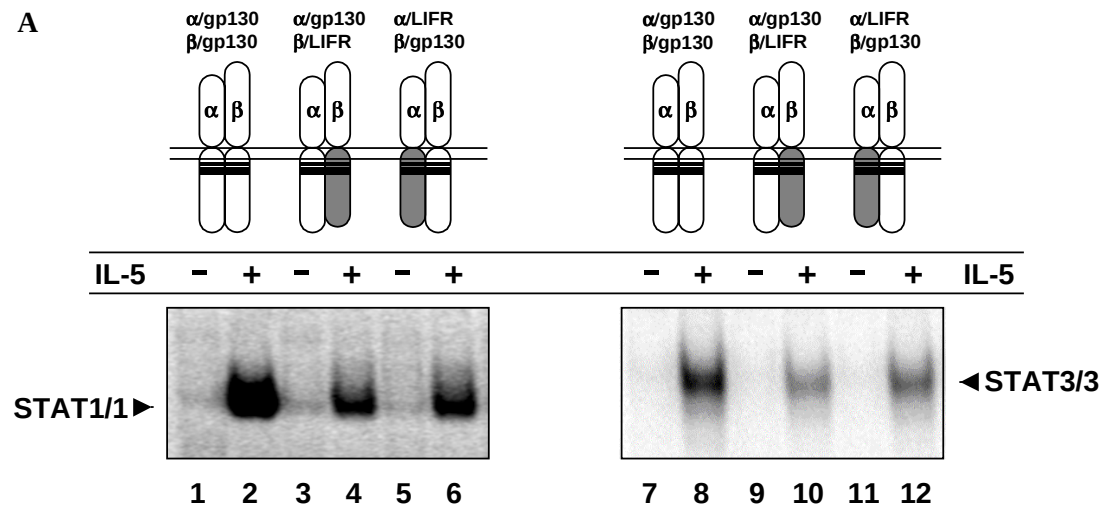
Nächste Seite:

Abb. 4: Die IL-5-induzierte Heterodimerisierung der zytoplasmatischen Bereiche von LIFR und gp130 führt zur STAT-Aktivierung

A. COS-7-Zellen wurden mit Expressionsplasmiden für die dargestellten IL-5R α - und IL-5R β -Konstrukte transfiziert. Rechts wurde zusätzlich ein Expressionsplasmid für STAT3 (5 μ g) kotransfiziert. Drei Tage nach der Transfektion wurden die Zellen für 30 min mit IL-5 (80 ng/ml) stimuliert und anschließend Kernextrakte hergestellt. Der EMSA wurde mit der SIE-Probe durchgeführt. Die Position der an die SIE-Probe gebundenen STAT1- bzw. STAT3-Homodimere ist markiert.

B. Die Oberflächenexpression der chimären Konstrukte wurde bestimmt, indem eine Fraktion der transfizierten Zellen durchflußzytometrisch analysiert wurde. Die schwarzen Histogramme repräsentieren Zellen, die die chimären Konstrukte exprimieren, während die weißen Histogramme Leervektor-transfizierte Zellen darstellen.

C. COS-7-Zellen wurden mit Expressionsplasmiden für die dargestellten IL-5R α - und β -Konstrukte transfiziert. Drei Tage nach der Transfektion wurden die Zellen für die angegebenen Zeiten mit IL-5 (80 ng/ml) stimuliert und anschließend Kernextrakte hergestellt. Der EMSA wurde mit der SIE-Probe durchgeführt. Die Position der an die SIE-Probe gebundenen STAT1-Homodimere ist markiert.



In COS-7-Zellen ist erstaunlicherweise keine Aktivierung des Transkriptionsfaktors STAT3 meßbar, obwohl der Faktor in diesen Zellen exprimiert wird (s. Abb. 12). Kotransfiziert man jedoch ein Expressionsplasmid für STAT3 zusammen mit den verschiedenen Rezeptorkonstrukten, so kann im EMSA eine STAT3-Aktivierung nachgewiesen werden. Auch hier beobachtet man, daß ein gp130-Homodimer zu einer stärkeren Aktivierung des Transkriptionsfaktors führt als ein gp130/LIFR-Heterodimer (Abb. 4A, Spur 8 im Vergleich zu Spuren 10 und 12).

Das chimäre Rezeptorsystem eignet sich also zur Untersuchung der Signalkompetenz des LIFR. Verglichen mit gp130 verfügt der LIFR über eine geringere Fähigkeit, eine STAT-Aktivierung zu vermitteln.

1.2 Membranproximale sowie membrandistale Bereiche des LIFR sind an der Signaltransduktion eines gp130/LIFR-Heterodimers beteiligt

Um die Bereiche des LIFR einzugrenzen, die an der Signaltransduktion teilnehmen, wurden zunächst die Konstrukte α /LIFR-B1/2 und β /LIFR-B1/2 generiert. Diesen chimären Rezeptoren fehlt der zytoplasmatische Bereich C-terminal zur konservierten Box1/2-Region (s. Abb. 5). Zur Herstellung von α /LIFR-B1/2 wurde ein *Bam*HI/*Cel*II-Fragment aus der Rezeptorchimäre α /LIFR deletiert. Der *Bam*HI-Überhang wurde mit der S1-Nuklease abgedaut, der *Cel*II-Überhang mit Hilfe der Klenow-Polymerase aufgefüllt. Aufgrund der starken Nuklease-Aktivität entstand ein Konstrukt, welches C-terminal zur Glutaminsäure 931 drei LIFR-fremde Aminosäuren vor dem Stopcodon enthielt: Isoleucin, Glutamin, Threonin. Das Konstrukt β /LIFR-B1/2 wurde hergestellt, indem ein *Eco*RI/*Sal*I-Fragment des Expressionsplasmids β /LIFR gegen ein *Eco*RI/*Sal*I-Fragment des Plasmids α /LIFR-B1/2 ausgetauscht wurde. Die Konstrukte α /gp130-B1/2 und β /gp130-B1/2 lagen bereits vor.

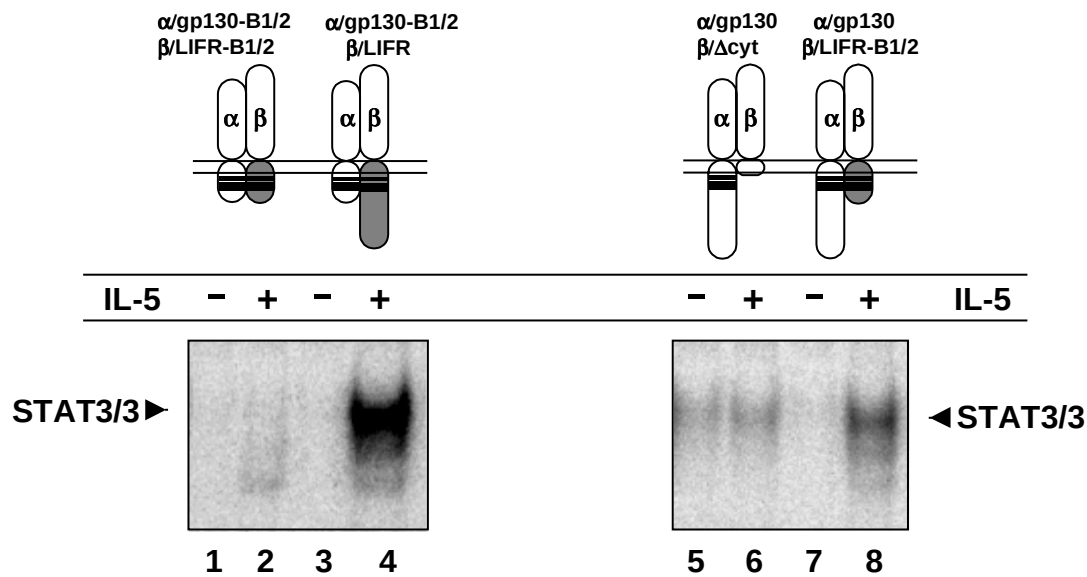


Abb. 5: Der membranproximale und der membrandistale Bereich des LIFR nehmen an der Signaltransduktion eines chimären gp130/LIFR-Komplexes teil

COS-7-Zellen wurden mit Expressionsplasmiden für die angegebenen Rezeptorkombinationen sowie einem Plasmid für STAT3 (5 μg) kotransfiziert. Drei Tage nach der Transfektion wurden die Zellen für 30 min mit IL-5 (80 ng/ml) stimuliert und anschließend Kernextrakte hergestellt. Der EMSA wurde mit der SIE-Probe durchgeführt. Die Position der an die SIE-Probe gebundenen STAT3-Homodimere ist markiert.

Die Dimerisierung von $\alpha/\text{gp130-B1/2}$ mit β/LIFR führt zu einer STAT-Aktivierung, während eine Dimerisierung von $\alpha/\text{gp130-B1/2}$ mit $\beta/\text{LIFR-B1/2}$ dies nicht erlaubt (Abb. 5, Spuren 2 und 4). Der membrandistale Bereich des LIFR muß folglich über STAT-Rekrutierungssequenzen verfügen, an denen die Aktivierung dieser Transkriptionsfaktoren erfolgt. Des weiteren konnte demonstriert werden, daß auch der membranproximale Bereich des LIFR für die Signaltransduktion unerläßlich ist. Dazu wurden COS-7-Zellen mit Expressionsplasmiden für $\alpha/\text{gp130} + \beta/\text{LIFR-B1/2}$ transfiziert. Nach einer IL-5-Stimulation konnten in den Kernextrakten DNA-bindende STAT3-Dimere nachgewiesen werden (Abb. 5, Spur 8), während dies nach Stimulation einer Rezeptorkombination aus $\alpha/\text{gp130} + \beta/\Delta\text{cyt}$ (einem Konstrukt, dem der gesamte zytoplasmatische Bereich bis auf drei Aminosäuren fehlt) nicht der Fall war (Abb. 5, Spur 6). Der membranproximale Bereich des LIFR ist wahrscheinlich für die Signaltransduktion eines gp130/LIFR-Heterodimers notwendig, weil angenommen werden kann, daß hier Janus-Kinasen binden. Somit würde er eine zweite Kinase in den Rezeptorkomplex einbringen, was für eine Aktivierung der Zytokinrezeptoren erforderlich ist. Welche Mitglieder dieser Familie von Tyrosinkinasen vom LIFR rekrutiert werden, sollte in weiteren Studien geklärt werden.

1.3 Die Janus-Kinasen Jak1, Jak2 und Tyk2 sind in der Lage, mit gp130 und dem LIFR zu assoziieren

Von den Janus-Kinasen ist bekannt, daß sie mit dem membranproximalen Bereich verschiedener Zytokinrezeptoren interagieren können. Die IL-6-Typ Zytokine führen zur Aktivierung der Janus-Kinasen Jak1, Jak2 und Tyk2. Für gp130 konnte gezeigt werden, daß nach Überexpression der Kinasen die membranproximalen 26 Aminosäuren ausreichen, um alle drei Kinasen mit dem Rezeptor zu kopräzipitieren (62). Ob und wie der LIFR mit den Kinasen interagiert, ist weniger genau untersucht. COS-7-Zellen wurden daher mit den Konstrukten β /gp130 bzw. β /LIFR sowie Expressionsplasmiden für die drei Kinasen transfiziert. 48 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen lysiert und die Rezeptorchimären mit Hilfe des Antikörpers α -IL-5R β (S-16) präzipitiert. Die Western Blot-Analyse zeigte, daß alle drei Kinasen nicht nur mit gp130, sondern auch mit dem zytoplasmatischen Bereich des LIFR koimmunpräzipitieren (Abb. 6, Spur 2 im Vergleich zu Spur 1). Um auszuschließen, daß überexprimierte Kinasen möglicherweise unspezifisch an die Rezeptoren binden, wurde das Rezeptorkonstrukt β /gp130 Δ box1 zusammen mit den Kinasen exprimiert. Diesem Konstrukt fehlt der Bereich von Aminosäure K643 bis W666, der die gesamte Box1-Region beinhaltet. Keine der drei Kinasen war in der Lage, mit diesem Rezeptor zu assoziieren (Abb. 6, Spur 3). Ein Aliquot der transfizierten Zellen wurde durchflußzytometrisch analysiert, um eine äquivalente Oberflächenexpression der Rezeptorchimären zu gewährleisten (nicht gezeigt). Um die Expression der drei Kinasen in allen Reaktionsansätzen zu überprüfen, wurden 25 μ l der Zellysate vor Immunpräzipitation der Rezeptorkonstrukte gelelektrophoretisch aufgetrennt und nach Transfer auf eine Polyvinylidendifluorid-Membran mit Antikörpern gegen die Kinasen detektiert (Abb. 6, Spuren 4-6).

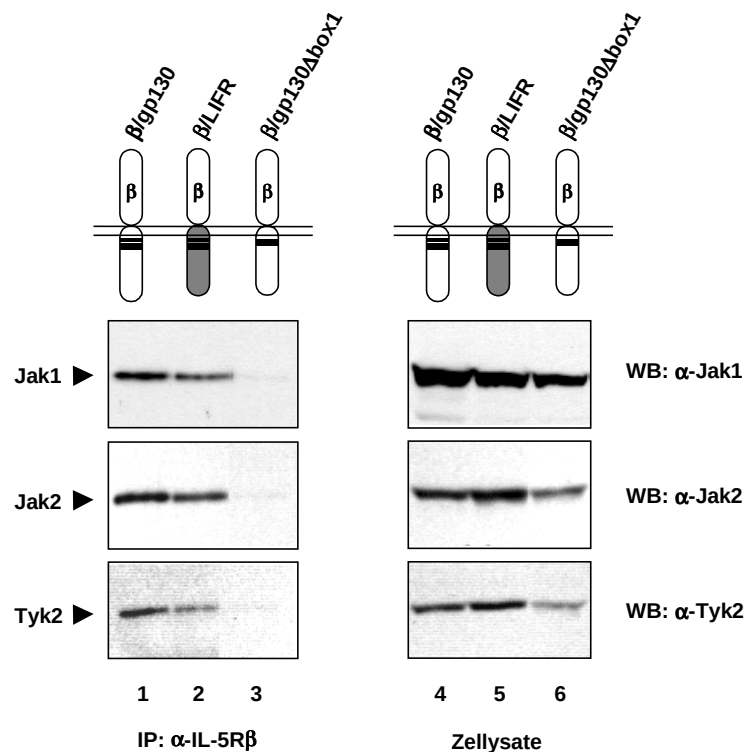


Abb. 6: Die Janus-Kinasen Jak1, Jak2 und Tyk2 assoziieren mit dem LIFR

COS-7-Zellen wurden mit Expressionsplasmiden für die dargestellten Rezeptorchimären und eine der drei Janus-Kinasen Jak1, Jak2 oder Tyk2 kotransfiziert. Nach Lyse der Zellen wurden Immunpräzipitate oder Aliquots der Lysate gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Polyvinylidendifluorid-Membran geblottet. Die Western Blots wurden mit Antikörpern gegen Jak1, Jak2 oder Tyk2 gefärbt.

Um zu überprüfen, ob auch für den LIFR die Box1/2-Region hinreichend für eine Assoziation mit den Kinasen ist, wurden neben den *full-length* Chimären β /gp130 und β /LIFR auch die Rezeptorkonstrukte β /gp130-B1/2 bzw. β /LIFR-B1/2 mit den Expressionsplasmiden für Jak1, Jak2 oder Tyk2 kotransfiziert. Tatsächlich zeigte die Immunpräzipitation der Rezeptorkonstrukte, daß auch beim LIFR die Box1/2-Region für eine Assoziation der Kinasen ausreicht (Abb. 7, Spur 4).

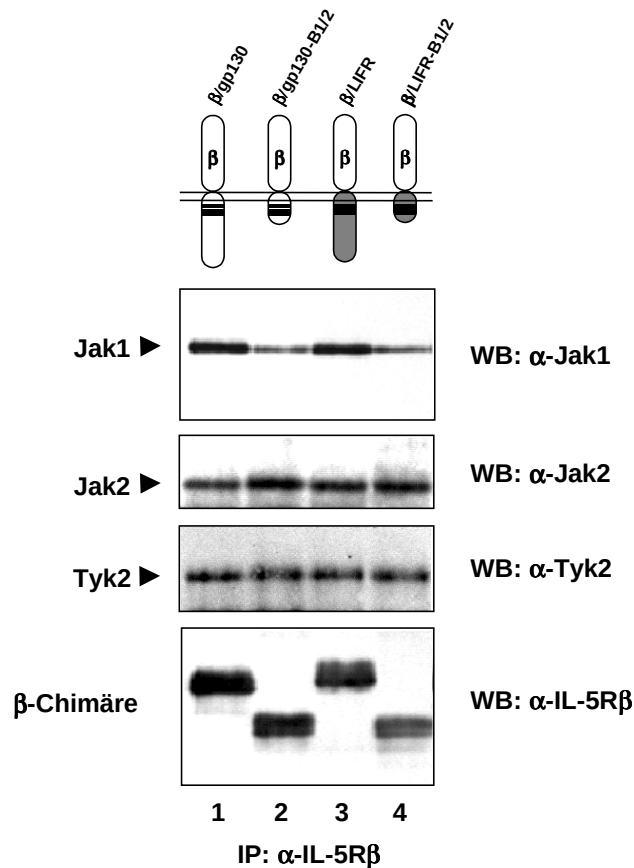


Abb. 7: Die membranproximalen Bereiche von gp130 und LIFR sind ausreichend für eine Rekrutierung der Janus-Kinasen

COS-7-Zellen wurden mit Expressionsplasmiden für die dargestellten Rezeptorchimären und eine der drei Janus-Kinasen Jak1, Jak2 oder Tyk2 kotransfiziert. Nach Lyse der Zellen wurden Immunpräzipitate gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Polyvinylidendifluorid-Membran geblottet. Die Western Blots wurden mit Antikörpern gegen Jak1, Jak2, Tyk2 oder IL-5Rβ gefärbt. Die Gegenfärbung mit Antikörpern gegen die IL-5Rβ-Chimären ist exemplarisch nur für einen Versuchsansatz (Jak1) dargestellt.

Von gp130 ist bekannt, daß die Prolin-Reste in der Box1-Region an der Rekrutierung der Kinasen beteiligt sind (92). Um zu kontrollieren, ob dies auch für den LIFR zutrifft und um die beschriebenen Befunde für gp130 zu bestätigen, wurden chimäre IL-5Rβ-Rezeptoren vom LIFR und gp130 generiert, in denen die Prolinreste 874 und 876 (für LIFR) bzw. 656 und 658 (für gp130) durch Alanine ersetzt sind. Diese Konstrukte wurden mit der Kinase Jak1 in COS-7-Zellen koexprimiert. Erstaunlicherweise scheinen überexprimierte Kinasen den Austausch zweier solch kritischer Aminosäuren zu tolerieren und binden dennoch an beide Rezeptorkonstrukte (Abb. 8A). Koexprimiert man allerdings α/gp130 + β/LIFRP874/876A, also eine Rezeptorkombination mit nur einer intakten Box1-Region, ohne gleichzeitige Überexpression der Kinasen in COS-7-Zellen und stimuliert die Zellen mit IL-5, so sind in Kernextrakten keine phosphorylierten STAT-Faktoren nachweisbar (Abb. 8B). Dies bestätigt,

daß auch die Prolinreste des LIFR für eine erfolgreiche Rezeptoraktivierung vorhanden sein müssen.

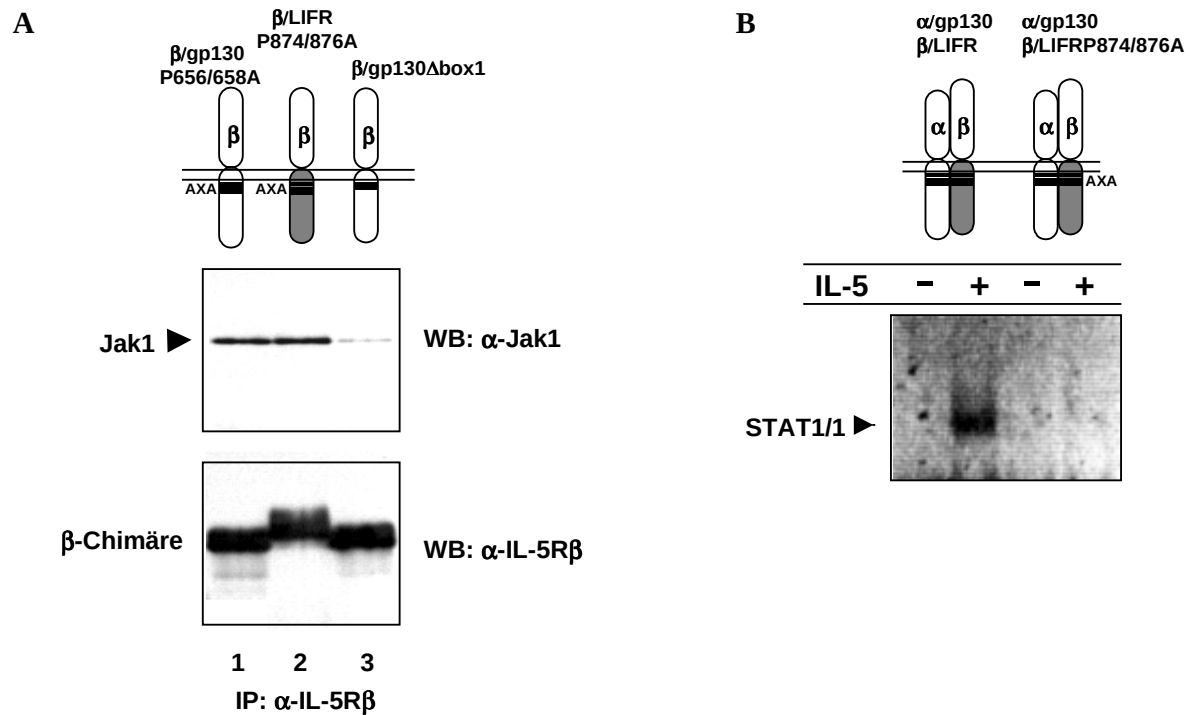


Abb. 8: Austausch zweier Prolinreste in der Box1-Region des LIFR führt zum Verlust der STAT-Aktivierbarkeit

A. COS-7-Zellen wurden mit Expressionsplasmiden für die dargestellten Rezeptorchimären und die Janus-Kinase Jak1 kotransfiziert. Nach Lyse der Zellen wurden Immunpräzipitate oder Aliquots der Lysate gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Polyvinylidendifluorid-Membran gebロットet. Die Western Blots wurden mit Antikörpern gegen Jak1 oder IL-5R β gefärbt.

B. COS-7-Zellen wurden mit Expressionsplasmiden für die dargestellten Rezeptorkombinationen transfiziert. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen für 30 min mit IL-5 (80 ng/ml) stimuliert. Die Kernextrakte wurden im EMSA analysiert. Die Position der an die SIE-Probe gebundenen STAT1-Homodimere ist markiert.

1.4 Signaltransduktion nach gezielter Homodimerisierung der zytoplasmatischen Bereiche des LIFR

Obwohl der LIFR bisher nur in heterodimerisierter Form mit gp130 beschrieben ist, gibt es einige Studien, die nach artifizieller Homodimerisierung des LIFR durch chimäre Rezeptorsysteme eine Signalfähigkeit solcher Homodimere zeigen (64, 129). Das IL-5R-System ermöglicht neben der zuvor beschriebenen Kombination verschiedener Rezeptorketten auch die Homodimerisierung zweier zytoplasmatischer Bereiche des LIFR.

1.4.1 Chimäre LIFR-Homodimere vermitteln in COS-7-Zellen keine STAT-Aktivierung

Koexprimiert man α /LIFR + β /LIFR in COS-7-Zellen, so ist nach IL-5-Stimulation eines solchen zytoplasmatisch homodimerisierten LIFR keine STAT-Aktivierung nachweisbar (Abb. 9A, Spur 4). Dies ist insofern verwunderlich, als der LIFR genau wie gp130 putative STAT1- und STAT3-Rekrutierungsstellen in seinem zytoplasmatischen Bereich enthält. Außerdem konnte in Abb. 5 gezeigt werden, daß nach IL-5-Stimulation eines Heterodimers, welches nur die Tyrosinmotive des LIFR enthält, eine STAT3-Aktivierung erfolgt. Auch bezüglich der Rekrutierung von Janus-Kinasen war kein deutlicher Unterschied zwischen gp130 und dem LIFR feststellbar. Die in der Literatur beschriebenen signalisierenden LIFR-Homodimere wurden mit Hilfe extrazellulärer Bereiche von Rezeptoren generiert, die - anders als der IL-5R-Komplex - natürlicherweise homodimerisieren (64, 129). Um auszuschließen, daß die fehlende Signaltransduktion eines α /LIFR + β /LIFR-Dimers auf einen möglicherweise störenden Einfluß der extrazellulären Bereiche der IL-5-Rezeptoren zurückzuführen ist, wurden COS-7-Zellen mit Expressionsplasmiden für chimäre Konstrukte transfiziert, die den extrazellulären Bereich des Epo-Rezeptors besitzen (40). Der EpoR signalisiert als Homodimer und wurde bereits mehrfach zur Herstellung chimärer Rezeptoren verwendet. Doch auch ein EpoR/LIFR-Konstrukt vermittelt nach Epo-Stimulation keine STAT1-Aktivierung (Abb. 9B, Spur 4), während das EpoR/gp130-Konstrukt - wie auch schon bei den IL-5R-Chimären beobachtet (Abb. 9A, Spur 2) - STAT1 aktivieren kann (Abb. 9B, Spur 2).

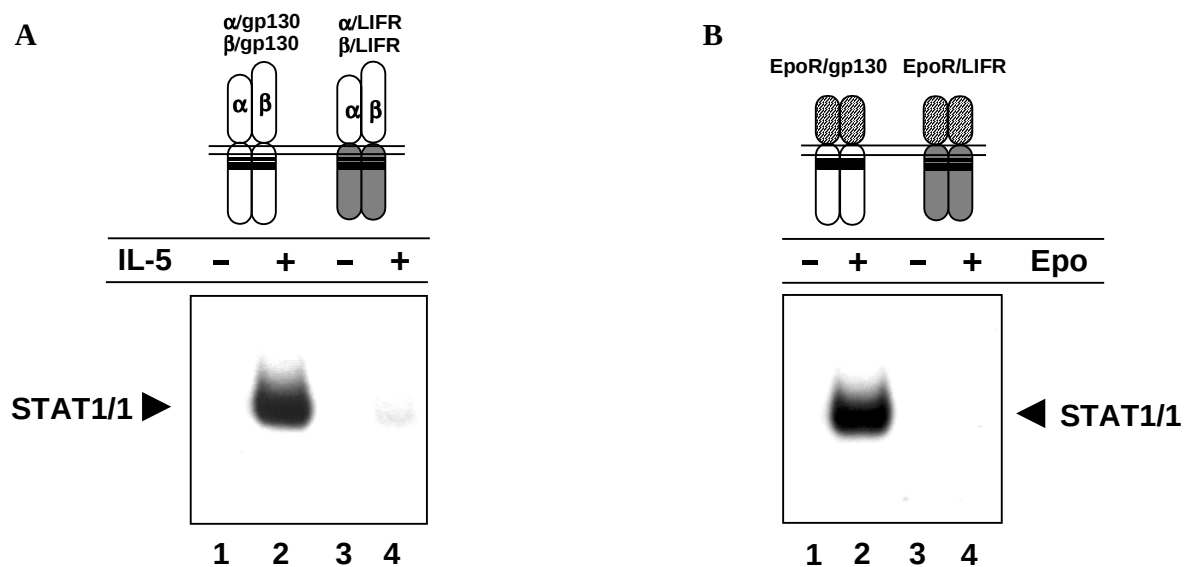


Abb. 9: Homodimerisierte zytoplasmatische Bereiche des LIFR sind in COS-7-Zellen signalinkompetent
 COS-7-Zellen wurden mit Expressionsplasmiden für die angegebenen Rezeptorkombinationen transfiziert. Drei Tage nach der Transfektion wurden die Zellen für 30 min mit IL-5 (80 ng/ml) (A) oder für 15 min mit Epo (7U/ml) (B) stimuliert und anschließend Kernextrakte hergestellt. Der EMSA wurde mit der SIE-Probe durchgeführt. Die Position der an die SIE-Probe gebundenen STAT1-Homodimere ist markiert.

1.4.2 Die LIFR-Homodimerisierung vermittelt keine negativ-regulatorischen Signale, die *in trans* die Signaltransduktion anderer Rezeptorkomplexe beeinflussen

Wie in den zuvor beschriebenen Experimenten demonstriert, weist das gp130/LIFR-Heterodimer eine deutlich geringere STAT1- und STAT3-Aktivierung auf als ein induziertes gp130-Homodimer (Abb. 4); ein LIFR-Homodimer ist in COS-7-Zellen sogar signaltransduktionsinkompetent (Abb. 9). Liegt die verringerte STAT-Aktivierung des gp130/LIFR-Heterodimers vielleicht nicht an einem fehlenden positiven, sondern an einem starken negativen Signal?

Um dieser Frage nachzugehen, wurden COS-7-Zellen außer mit den chimären IL-5R-Konstrukten zusätzlich mit einem Expressionsplasmid für EpoR/gp130 transfiziert. Eine Epo-Stimulation führt zur Homodimerisierung dieser Chimäre und somit zu einer mit der IL-6-Induktion vergleichbaren Signaltransduktion. Diese Versuchskonstellation erlaubt zu überprüfen, ob von den IL-5R/LIFR-Chimären ein negatives Signal induziert wird, das *in trans* auf ein anderes, nämlich das Epo-Rezeptorsystem, wirkt. In diesem Fall wäre eine Beeinträchtigung der Epo-vermittelten Signaltransduktion zu erwarten.

Kotransfiziert man das EpoR/gp130-Konstrukt gemeinsam mit den IL-5R-Kombinationen α/LIFR + β/LIFR oder α/gp130 + β/LIFR in COS-7-Zellen und stimuliert für 15 min mit

Epo, so erfolgt eine STAT1-Aktivierung, die über die EpoR/gp130-Chimäre vermittelt wird (Abb. 10, Spuren 2 und 6). Nach IL-5-Stimulation des Heterodimers α /gp130 + β /LIFR kann man - wie bereits zuvor gesehen - eine STAT1-Aktivierung im EMSA nachweisen, nach Stimulation von α /LIFR + β /LIFR hingegen nicht (Abb. 10, Spuren 7 bzw. 3). Würde nun vom LIFR ein negativ-regulatorisches Signal ausgehen, z.B. durch Induktion einer noch nicht identifizierten Phosphatase, so wäre es möglich, daß dieses Signal auch auf Prozesse wirkt, die vom EpoR/gp130-Komplex ausgehen. Dann müßte das STAT1-Signal bei gleichzeitiger Stimulation mit Epo und IL-5 in seiner Intensität abnehmen. Wie jedoch in Abb. 10 (Spuren 4 und 8) zu erkennen ist, nimmt im Gegenteil das STAT1-Signal in seiner Intensität zu, was bedeuten könnte, daß sich die beiden Rezeptorkomplexe sogar positiv beeinflussen. Es kann somit ausgeschlossen werden, daß vom LIFR - bei gleichzeitiger Stimulation - ein negativ-regulatorisches Signal vermittelt wird, das *in trans* auf andere Rezeptorkomplexe wirkt.

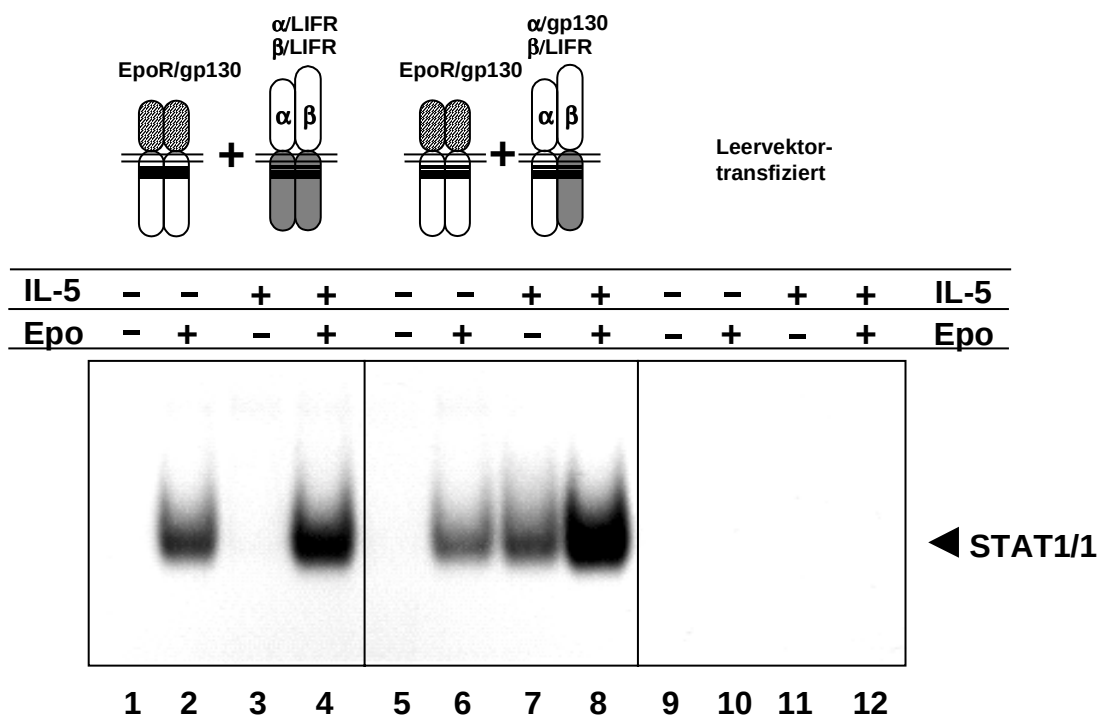


Abb. 10: Der LIFR vermittelt kein *in trans* wirkendes negativ-regulatorisches Signal

COS-7-Zellen wurden mit Expressionsplasmiden für die dargestellten Rezeptorkombinationen kotransfiziert. 48 h nach der Transfektion wurden für 15 min mit Epo (7 U/ml) oder für 30 min mit IL-5 (80 ng/ml) oder mit beiden Zytokinen stimuliert. Nach Präparation der Kernextrakte wurden diese im EMSA analysiert. Die Position der an die SIE-Probe gebundenen STAT1-Homodimere ist markiert.

1.4.3 Der LIFR weist eine zelltypspezifische Signalkompetenz auf

Die fehlende Signaltransduktion nach Homodimerisierung der zytoplasmatischen Bereiche des LIFR könnte auch auf die Wahl des Zelltyps zurückgeführt werden, in dem die Untersuchungen durchgeführt wurden. So wäre es durchaus denkbar, daß den COS-7-Zellen Proteine fehlen, die für die LIFR-vermittelte Signaltransduktion erforderlich sind. Aus diesem Grund wurden zusätzlich HepG2-Hepatom- und MCF-7-Brustkarzinomzellen für die Versuche herangezogen (in Zusammenarbeit mit Dipl.Biol. S. Radtke). Nach Transfektion beider Zelllinien mit Expressionsplasmiden für α /gp130 + β /gp130 oder α /LIFR + β /LIFR konnte in MCF-7-Brustkarzinomzellen eine nur unsignifikant unterschiedliche Aktivierung des α 2M-Promotors durch beide Rezeptorkombinationen nachgewiesen werden (Abb. 11, Spuren 1 und 2). In HepG2-Hepatomzellen ist das LIFR-Homodimer zwar durchaus in der Lage, den α 2M-Promotor zu induzieren, die Aktivierung fällt jedoch deutlich geringer aus als bei einem gp130-Homodimer (Abb. 11, Spuren 3 und 4). Die Signalfähigkeit des LIFR-Homodimers scheint also vom Zelltyp abhängig zu sein.

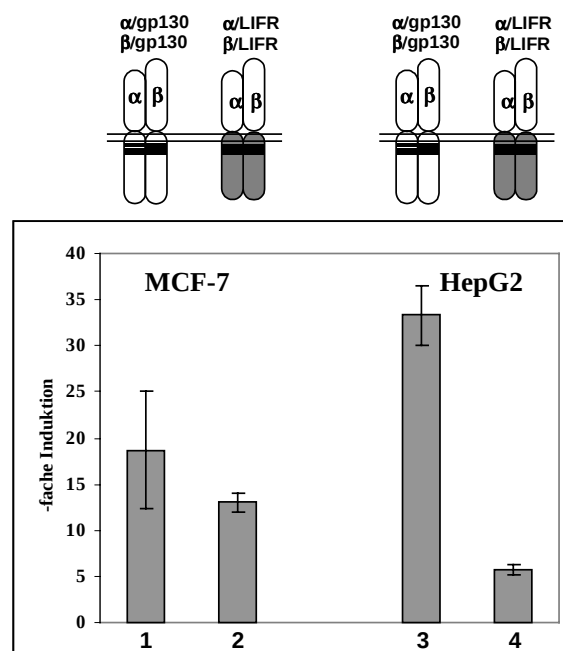


Abb. 11: Die Signalkompetenz homodimerisierter zytoplasmatischer LIFR-Bereiche ist Zelltyp-abhängig

Reporter-Gen-Assays. MCF-7-Brustkarzinomzellen (links) oder HepG2-Hepatomzellen (rechts) wurden mit Expressionsplasmiden für die dargestellten Rezeptorkombinationen gemeinsam mit α 2M-Promotor-regulierten Luziferase-Reporter-Genkonstrukten transfiziert. Einen Tag nach der Transfektion wurden die Zellen für 16 h mit IL-5 (80 ng/ml) stimuliert. Die Luziferase-Aktivität der Lysate wurde gegen die Aktivität der koexprimierten β -Galaktosidase abgeglichen. Dargestellt ist die in drei oder vier unabhängigen Experimenten gemessene -fache Luziferase-Induktion (bezogen auf unstimulierte Zellen).

2. Studien zur Spezifität und Aktivierung der Janus-Kinasen

2.1 Bedeutung der drei Kinasen Jak1, Jak2 und Tyk2 für die gp130-vermittelte Signaltransduktion

Die IL-6-Typ Zytokine aktivieren die Janus-Kinasen Jak1, Jak2 und Tyk2. Mit Hilfe einer Jak1-defizienten Fibrosarkom-Zelllinie (U4A) konnte die wesentliche Rolle dieser Kinase für die IL-6-vermittelte Signaltransduktion gezeigt werden. Weder Jak2 noch Tyk2 sind in der Lage, Jak1 zu ersetzen. Andererseits konnte in Jak2- bzw. Tyk2-defizienten Zelllinien eine Signaltransduktion nach IL-6 demonstriert werden (45). Um zu untersuchen, inwieweit die drei Kinasen in der Lage sind, gp130 zu phosphorylieren und damit die Rekrutierung bestimmter zytoplasmatischer Proteine zu ermöglichen, wurde die Rezeptorchimäre β /gp130 mit jeweils einer der drei Kinasen koexprimiert. Die Koexpression der Kinasen erlaubt eine Rezeptorphosphorylierung unabhängig von einer Zytokin-Stimulation (105). Studien von Gerhartz *et al.* (40) haben gezeigt, daß die einzelnen Tyrosinreste im gp130 spezifische Funktionen übernehmen: Y767 und Y814 sind für eine Aktivierung von STAT3, Y905 und Y915 von STAT3 und STAT1 verantwortlich. Für den Tyrosinrest 759 im intrazellulären Bereich des gp130 konnte gezeigt werden, daß er nach Phosphorylierung der Rekrutierung der Tyrosinphosphatase SHP2 dient (35, 128). Somit kann über eine Koimmunpräzipitation der bindenden Proteine (STATs bzw. SHP2) auf eine Tyrosinphosphorylierung der respektiven Tyrosinreste geschlossen werden.

Nach Immunpräzipitation des Rezeptorkonstrukts β /gp130 aus Zellysaten wurde untersucht, welche Proteine sich mit dem Rezeptor koimmunpräzipitieren ließen. Alle drei Kinasen sind in der Lage, gp130 an den für die Rekrutierung der STAT-Faktoren STAT1 und STAT3 verantwortlichen Tyrosinresten zu phosphorylieren (Abb. 12, obere und mittlere Reihe). Betrachtet man die einzelnen Immunpräzipitationen, so scheinen sowohl STAT3 als auch STAT1 und SHP2 nach Überexpression von Jak1 am besten an gp130 binden zu können. Tyk2 scheint in allen Ansätzen die geringste Fähigkeit zur Phosphorylierung von gp130 zu besitzen. Da es aber keine Möglichkeit gibt, die Expressionsmengen der drei Kinasen direkt miteinander zu vergleichen, sind diese Aussagen schwierig zu beweisen. Vergleicht man die Menge von STAT1 bzw. STAT3 im Lysat mit der kopräzipitierten Menge, so fällt auf, daß STAT3 deutlich besser von gp130 gebunden wird als STAT1, was vermuten läßt, daß STAT3 eine höhere Affinität zu gp130 besitzt als STAT1. Dies ist insofern verwunderlich, als endogenes STAT3 in COS-7-Zellen zwar an den Rezeptor rekrutiert wird, in Kernextrakten aber keine entsprechende DNA-Bindungsaktivität nachweisbar ist (Abb. 4A).

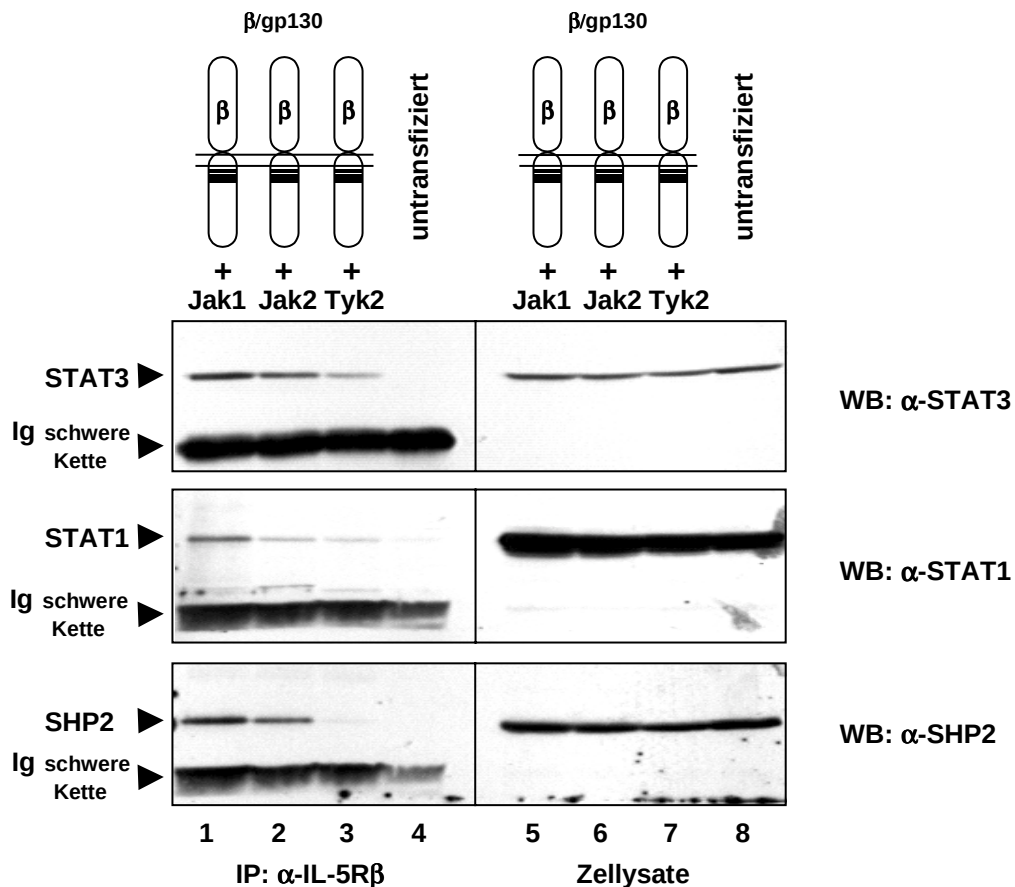


Abb. 12: Überexpression der Kinasen Jak1, Jak2 oder Tyk2 führt zu unterschiedlichen Kopräzipitationsmustern von STAT1, STAT3 und SHP2 mit gp130

COS-7-Zellen wurden mit Expressionsplasmiden für die dargestellten Rezeptorchimären und für eine der drei Kinasen Jak1, Jak2 oder Tyk2 kotransfiziert. Nach Lyse der Zellen wurden Immunpräzipitate oder Aliquots der Lysate gelelektrophoretisch aufgetrennt und auf eine Polyvinylidendifluorid-Membran geblottet. Die Western Blots wurden mit Antikörpern gegen STAT3, STAT1 oder SHP2 gefärbt.

Die Tyrosinphosphatase SHP2 kann nach Überexpression von Jak1 und Jak2 mit gp130 koimmunpräzipitiert werden, nicht aber nach Überexpression von Tyk2, was bedeuten könnte, daß Tyk2 nicht oder nur sehr schwach in der Lage ist, Y759 des gp130 zu phosphorylieren (Abb. 12, untere Reihe). Ein Aliquot der transfizierten Zellen wurde durchflußzytometrisch analysiert, wobei eine äquivalente Oberflächenexpression von β/gp130 in allen Reaktionsansätzen festgestellt werden konnte (nicht gezeigt). Eine Analyse der Zelllysate zeigte gleiche Mengen von STAT3, STAT1 oder SHP2 in allen Ansätzen (Abb. 12, Spuren 5-8). Die vorliegenden Ergebnisse geben somit Hinweise darauf, daß die Janus-Kinasen Jak1, Jak2 und Tyk2 unterschiedliche Substratspezifitäten haben.

2.2 Die Positionierung der Box 1-Region ist wichtig für die gp130-vermittelte Signaltransduktion

Die Sequenzanalyse der intrazellulären Region einer Vielzahl von Zytokinrezeptoren zeigt, daß die hochkonservierte Box1-Region bei allen Rezeptoren im membranproximalen Bereich lokalisiert ist. Dies legt die Vermutung nahe, daß die Nähe zur Membran für eine Bindung der Janus-Kinasen notwendig ist. Um dieser Annahme nachzugehen, wurden chimäre Rezeptorkonstrukte hergestellt, bei denen die Box1/2-Region nicht in Membrannähe, sondern in der Nähe des C-Terminus des Rezeptors lokalisiert ist: α /gp130(box1/2-CT) und β /gp130(box1/2-CT) (Abb. 13A). Um zu gewährleisten, daß die membranproximal gelegene Box1-Region nicht mehr in der Lage ist, eine Bindung der Janus-Kinasen zu erlauben, wurden mittels PCR-Technik die Prolinreste 656 und 658 gegen Alanine ausgetauscht. Die dadurch entstandene veränderte Box1 IWPNVADA kann kein Jak1 mehr binden (92) und erlaubt somit keine Signaltransduktion. Nach Einfügung dieser mutierten Box1 in die IL-5R/gp130-Chimären dienten die entstandenen Konstrukte α /gp130P656/658A und β /gp130P656/658A im folgenden Versuchsansatz als Negativkontrolle. In einer weiteren PCR-Reaktion wurde der Box1/2-Bereich des gp130 amplifiziert und über *Primer*-entworfene *SphI*-Schnittstellen in das Expressionsplasmid pBS-gp130P656/658A eingefügt. Die neue Box1/2-Region ist somit zwischen M901 und P902 im zytoplasmatischen Bereich des gp130 lokalisiert. Mit Hilfe eines *EcoRI/BamHI*-Verdau wurden der Transmembran- und intrazelluläre Bereich gp130(box1/2-CT) in die Expressionsvektoren für die entsprechenden IL-5R α - und IL-5R β -Chimären überführt (Abb. 13A).

Die Kotransfektion von α /gp130(box1/2-CT) + β /gp130(box1/2-CT) in COS-7-Zellen erlaubte nach IL-5-Stimulation ebenso wenig eine STAT1-Aktivierung wie die Negativkontrolle α /gp130P656/658A + β /gp130P656/658A (Abb. 13B, Spuren 6 und 4). Ist jedoch eine intakte Box1-Region in Membrannähe vorhanden (α /gp130 + β /gp130), so wird STAT1 effizient aktiviert (Abb. 13B, Spur 2). Dies deutet darauf hin, daß die Box1/2-Region - anders als die Tyrosinmotive (40) - keinen Modulcharakter aufweist. Der Transfer der Box1/2-Region zum C-Terminus führt zum Verlust der Signaltransduktionskompetenz des gp130. Erste Versuche mit chimären Rezeptoren, bei denen die Box1/2-Region nur um drei Aminosäuren von der Membran abgerückt wurden, zeigten, daß die Position oder die Struktur dieses Bereiches kritisch für eine effiziente Signaltransduktion ist (nicht gezeigt).

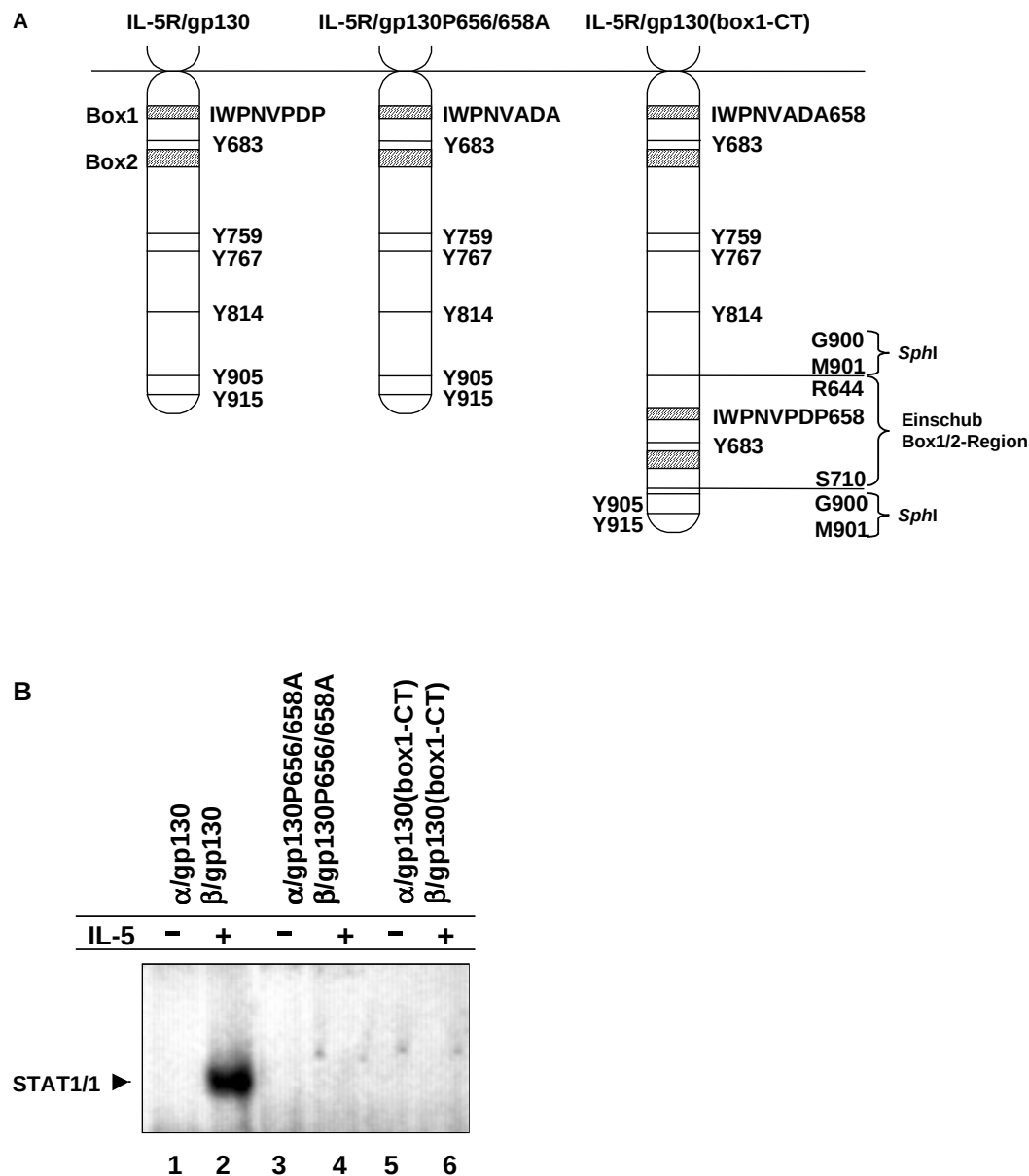


Abb. 13: Die Box1/2-Region des gp130 hat keinen Modulcharakter, sondern muß membranproximal lokalisiert sein

A. Schematische Darstellung der chimären IL-5R/gp130-Konstrukte. Die Positionen der für die Aktivierung der Rezeptoren wichtigen Tyrosinreste sind markiert. Zusätzlich sind die Aminosäuren der Box1-Region bzw. der mutierten Box1-Region aufgeführt. Für das Konstrukt IL-5R/gp130 sind die Aminosäuren N- und C-terminal zur Insertionsstelle gezeigt. Die konservierten Box1- und Box2-Regionen sind schraffiert dargestellt.

B. COS-7-Zellen wurden mit Expressionsplasmiden für die angegebenen Rezeptorkombinationen transfiziert. Drei Tage nach der Transfektion wurden die Zellen für 30 min mit IL-5 (80 ng/ml) stimuliert und anschließend Kernextrakte hergestellt. Der EMSA wurde mit der SIE-Probe durchgeführt. Die Position der an die SIE-Probe gebundenen STAT1-Homodimere ist markiert.

3. Der OSMR vermittelt eine spezifische Signaltransduktion

Ein Charakteristikum der IL-6-Typ Zytokine ist ihre enorme Redundanz. Diese wird hauptsächlich der gemeinsamen Nutzung der Rezeptoruntereinheit gp130 zugeschrieben. Dennoch gibt es Berichte über spezifische Wirkungen der Zytokine, wie z.B. unterschiedliche Präferenzen bei der STAT-Aktivierung (2, 64), Differenzierungsmechanismen von M1-Transfektanten (134), Proliferation *versus* Wachstumsinhibierung von Brustkarzinomzellen (17, 32, 71). Von OSM ist zusätzlich bekannt, daß es zu einer besonders starken Aktivierung des Inhibitors der Metalloproteasen TIMP-1 (*tissue inhibitor of metalloproteases*) führt (37). Aufgrund dieser Fähigkeit werden OSM profibrotische Attribute zugeschrieben (4). Nachdem im ersten Teil dieser Arbeit eine große Redundanz zwischen gp130 und dem LIFR nachgewiesen werden konnte, wurde im folgenden der OSM-spezifische Rezeptor einer genaueren Analyse unterzogen.

3.1 OSM, nicht aber IL-6 oder LIF, induziert die Phosphorylierung des Adaptorproteins Shc in HepG2-Zellen und führt zu dessen Assoziation mit Grb2

HepG2-Hepatomazellen wurden für verschiedene Zeitintervalle mit LIF, OSM oder IL-6 (in Anwesenheit des löslichen IL-6R) stimuliert. Es wurden Zytokinkonzentrationen verwendet, von denen bekannt ist, daß sie in HepG2-Zellen zur Aktivierung der STAT-Faktoren ausreichend sind (LIF: 100 ng/ml, OSM: 50 ng/ml, IL-6: 20 ng/ml + 1 µg/ml sIL6-R). Wie zu erwarten, führen alle drei Zytokine zur Tyrosinphosphorylierung von STAT3 (Abb. 14, oben). Die Stimulation mit OSM führt jedoch zu einer deutlich stärkeren Aktivierung der MAP-Kinasen Erk1 und Erk2 als dies nach einer IL-6- oder LIF-Stimulation festzustellen ist (Abb. 14, unten).

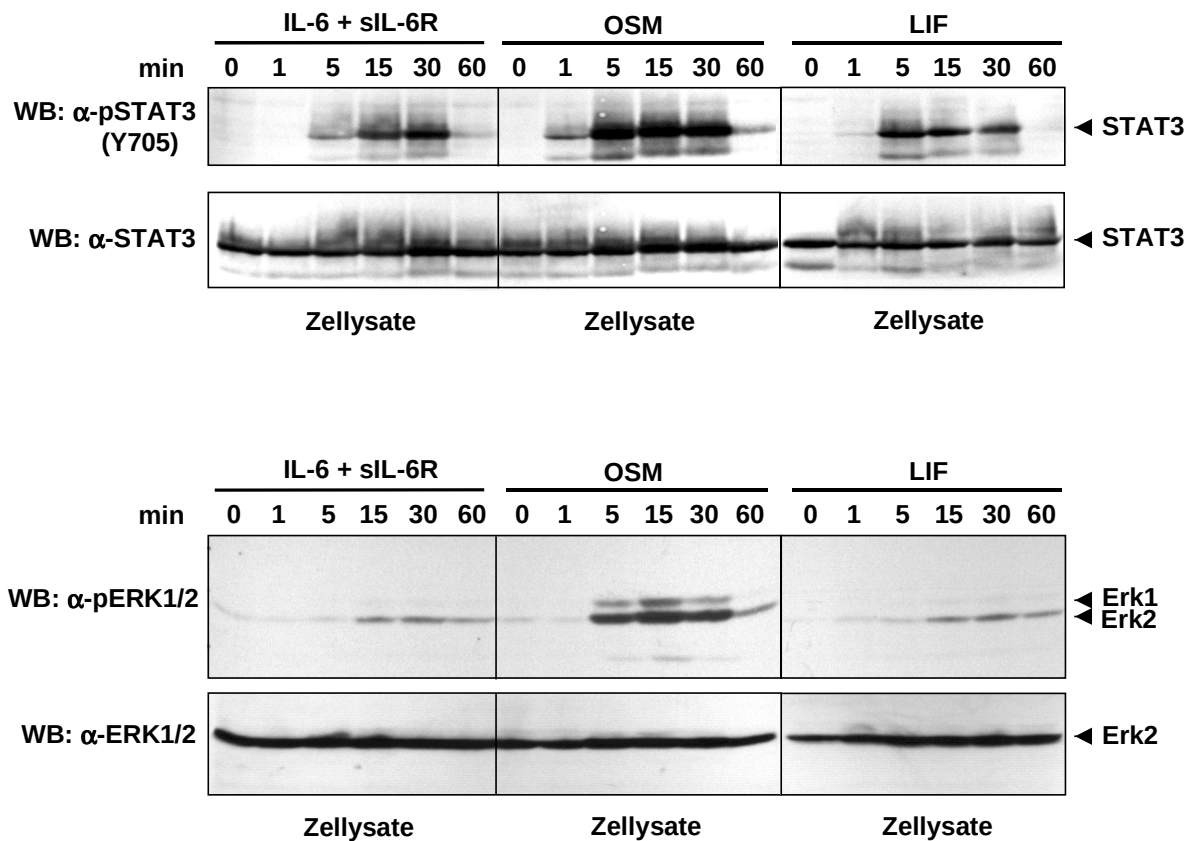


Abb. 14: Nach OSM-Stimulation von HepG2-Zellen werden die MAP-Kinasen Erk1/2 stark phosphoryliert

HepG2-Zellen wurden für die angegebenen Zeiten mit den Zytokinen IL-6 (20 ng/ml, 1 µg/ml sIL-6R), OSM (50 ng/ml) oder LIF (100 ng/ml) stimuliert. Anschließend wurden die Zellen lysiert und ein Aliquot der Lysate gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die Proteine wurden auf eine PVDF-Membran geblottet und auf den Western Blots mit Antikörpern gegen STAT3, pSTAT3(Y705), Erk1/2 oder pErk1/2 (T202/Y204) detektiert.

Die Vermittlung der Aktivierung des Ras/Raf/MAPK-Weges, der letztlich zur Aktivierung von Erk1 und Erk2 führt, wurde bisher vor allem zwei Proteinen zugeschrieben: der Tyrosinphosphatase SHP2 und dem Adaptorprotein Shc. Es sollte daher untersucht werden, ob es Unterschiede in der Aktivierung des Adaptorproteins Shc nach Stimulation mit IL-6, LIF oder OSM gibt. Das Adaptorprotein Shc existiert in drei Isoformen: einer 46 kDa- (p46), einer 52 kDa- (p52) und einer 66 kDa-Form (p66). P46 und p52 werden durch Nutzung alternativer Translationsinitiationsstellen des gleichen Transkripts generiert, während p66 ein Produkt alternativ gespleißter mRNA darstellt. Die p46 und p52 Isoformen werden ubiquitär exprimiert, die p66 Isoform ist beschränkt auf Zellen epithelialen Ursprungs (85).

HepG2-Zellen wurden in den zuvor erwähnten Konzentrationen an IL-6, LIF bzw. OSM für verschiedene Zeitintervalle stimuliert. Nach Lyse der Zellen wurde eine Immunpräzipitation mit einem Antikörper gegen Shc durchgeführt. Eine Tyrosinphosphorylierung von Shc war nur nach OSM-Stimulation feststellbar (Abb. 15, obere Reihe). Auch eine Erhöhung der IL-6-

Konzentration auf 200 ng/ml bzw. der LIF-Konzentration auf 500 ng/ml führte nicht zur Phosphorylierung von Shc (nicht gezeigt). Nach 5-minütiger Stimulation mit OSM erreicht die Tyrosinphosphorylierung der Shc-Isoformen p52 und p66 ihr Maximum, bleibt dann bis 30 min auf dem höchsten Aktivierungsniveau, bevor Shc nach 60 min wieder weniger phosphoryliert vorliegt. Die 46 kDa-Isoform konnte in den Immunpräzipitaten nicht detektiert werden, was aber vermutlich auf ihre Komigration mit der schweren Kette der präzipitierenden Antikörper zurückzuführen ist. In Zellysaten sind alle drei Isoformen in nahezu äquivalenten Mengen nachweisbar (nicht gezeigt).

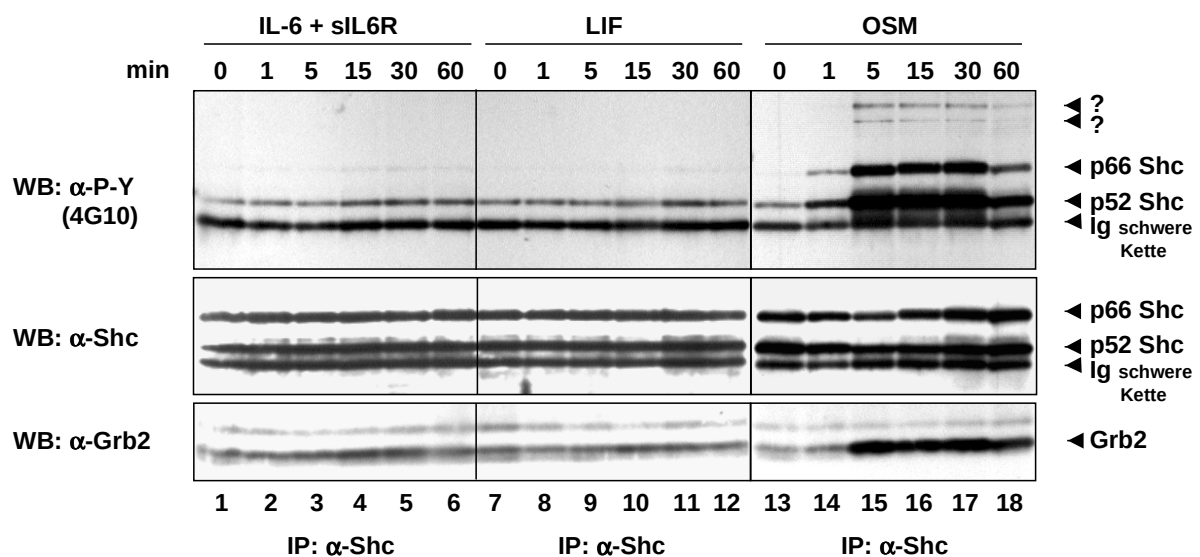


Abb. 15: OSM-Stimulation von HepG2-Zellen führt zur Phosphorylierung von Shc

HepG2-Zellen wurden für die angegebenen Zeiten mit den Zytokinen IL-6 (20 ng/ml, 1 µg/ml sIL-6R), OSM (50 ng/ml) oder LIF (100 ng/ml) stimuliert. Anschließend wurden die Zellen lysiert und Aliquots der Lysate gelelektrophoretisch aufgetrennt. Die Proteine wurden auf eine PVDF-Membran geblottet und auf den Western Blots mit Antikörpern gegen tyrosinphosphorylierte Proteine (α-P-Y), Shc oder Grb2 detektiert.

Ein möglicher Weg, auf dem Shc das Signal weiterleiten kann, verläuft über die Rekrutierung von Grb2 und Sos. Der Guaninnukleotid-Austausch-Faktor Sos überführt dann die inaktive GDP-gebundene Form von Ras in die GTP-gebundene aktive Form. Aktives Ras ist in der Lage, die Signaltransduktion in Richtung Erk1/2 zu starten. In der Tat ist nach Stimulation der HepG2-Zellen mit OSM eine Kopräzipitation von Grb2 mit Shc zu beobachten (Abb. 15, untere Reihe). Diese Kopräzipitation folgt dem Verlauf der Tyrosinphosphorylierung von Shc, was darauf hindeutet, daß die Assoziation von Grb2 mit Shc von dessen Tyrosinphosphorylierung abhängt.

Wie in Abb. 15 (obere Reihe ◀?) zu erkennen ist, konnten weitere tyrosinphosphorylierte Proteine mit Shc koimmunpräzipitiert werden. Da die Shc-Phosphorylierung nur nach OSM-

Stimulation auftritt, könnte man vermuten, daß es sich bei einem dieser Proteine um den OSMR handelt. Dieser hat ein Molekulargewicht von ca. 180 kDa und käme somit durchaus in Frage. Leider sind derzeit keine Antikörper erhältlich, die den denaturierten OSMR in einem Western Blot detektieren könnten, weshalb diese Annahme nicht experimentell überprüft werden konnte. Eine Gegenfärbung des Blots mit einem Antikörper gegen Sos zeigte, daß es sich bei keinem der Proteine um den Guaninnukleotid-Austausch-Faktor handelt (nicht gezeigt). Studien anderer Arbeitsgruppen haben ergeben, daß Shc mit dem Rezeptor ErbB2 interagieren kann, einem Protein von ca. 190 kDa, das vor allem in Krebszelllinien eine wichtige Rolle bei der Transformation der Zellen spielt (106). ErbB2 konnte zwar in den Lysaten nachgewiesen werden, nicht jedoch in den Shc-Immunpräzipitaten (nicht gezeigt). Zukünftige Studien sollen zur Identifikation dieser Proteine führen.

3.2 PP1, ein Src-Kinasen-spezifischer Inhibitor, beeinträchtigt die OSM-vermittelte Shc-Phosphorylierung nicht

Die Phosphorylierung des Adaptorproteins Shc verläuft in verschiedenen Zellen in Abhängigkeit von Tyrosinkinasen der Src-Familie (23, 78, 101, 117). Um zu überprüfen, ob dies auch für die OSM-vermittelte Signaltransduktion der Fall ist, wurden HepG2-Zellen vor der Stimulation zunächst für 30 min mit dem Src-spezifischen Inhibitor PP1 in steigenden Konzentrationen (0 – 5 μ M) inkubiert (46). Diese Konzentrationsspanne erwies sich in früheren Untersuchungen als ausreichend, um Src-Kinasen zu inhibieren, da PP1 bereits im nanomolaren Bereich wirksam ist (23, 101). Janus-Kinasen hingegen werden selbst bei einer 1000-fach höheren Konzentration nicht in ihrer Funktion beeinträchtigt. Nach der Vorinkubation mit PP1 wurden die Zellen für 15 min mit OSM (50 ng/ml) stimuliert. Die vorangegangenen Versuche haben demonstriert, daß nach dieser Zeit eine maximale Shc-Phosphorylierung nachweisbar ist. Ohne Vorbehandlung der Zellen mit PP1 zeigte sich nach OSM-Stimulation eine Phosphorylierung der p52- und p66-Isoformen von Shc (Abb. 16, Spur 3). Diese wird nicht durch das Lösungsmittel DMSO beeinflusst, in dem PP1 aufgenommen ist (Abb. 16, Spur 4). PP1 inhibiert die Shc-Phosphorylierung selbst bei einer Konzentration von 5 μ M nicht (Abb. 16, Spuren 5-7). Es kann deshalb angenommen werden, daß die OSM-vermittelte Shc-Phosphorylierung unabhängig von Tyrosinkinasen der Src-Familie abläuft.

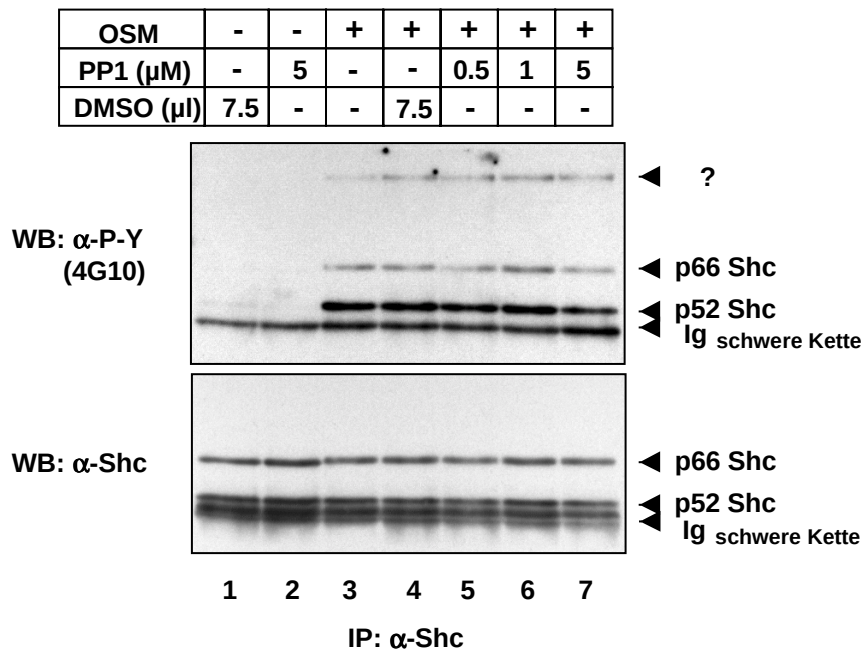


Abb. 16: Die Phosphorylierung von Shc wird nicht von PP1, einem Src-Kinasen-Inhibitor, beeinflusst

HepG2-Zellen wurden vor der Stimulation mit OSM (50 ng/ml, 15 min) für 30 min mit dem Src-Inhibitor PP1 in den angegebenen Konzentrationen oder dem Lösungsmittel DMSO inkubiert. Anschließend wurden die Zellen lysiert und eine Immunpräzipitation mit einem Antikörper gegen Shc durchgeführt. Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung wurden die Proteine auf eine PVDF-Membran geblottet und auf den Western Blots mit Antikörpern gegen tyrosinphosphorylierte Proteine (α -P-Y) oder Shc detektiert.

3.3 Die Phosphorylierung von Shc erfolgt am OSMR

Die bisherigen Experimente zeigen zwar, daß die Aktivierung von Shc ein nur durch OSM induzierbarer Effekt ist, es ist aber unklar, von welcher signaltransduzierenden Rezeptoruntereinheit - gp130, LIFR oder OSMR - dieser Effekt vermittelt wird. OSM kann als einziges der IL-6-Typ Zytokine über zwei Rezeptorkomplexe signalisieren: gp130/LIFR und gp130/OSMR. Da aber weder IL-6, welches über ein gp130/gp130-Dimer signalisiert, noch LIF, welches über ein gp130/LIFR-Dimer signalisiert, in der Lage ist, Shc zu phosphorylieren, liegt die Vermutung nahe, daß es sich um einen OSMR-spezifischen Effekt handelt. Um dies zu überprüfen, wurden A375-Melanomzellen mit IL-6 bzw. OSM stimuliert. Diese Zellen exprimieren nur gp130 und den OSMR, nicht aber den LIFR (2). Wie bereits zuvor in HepG2-Zellen beobachtet - die alle drei Rezeptorketten auf ihrer Oberfläche tragen -, führt die Stimulation mit OSM (50 ng/ml) zu einer Phosphorylierung der Shc-Isoformen p52 und p66. Bereits nach 1 min Stimulation ist eine deutliche Zunahme des Phosphorylierungsgrades feststellbar (Abb. 17, Spur 9). Die Phosphorylierung hält dann, genau wie bei HepG2-Zellen, ungefähr 30 min an (Abb. 17, Spuren 9-13), bevor Shc wieder

dephosphoryliert wird (Abb. 17, Spur 14). Eine IL-6-Stimulation führt in A375-Zellen genauso wenig zu einer Shc-Phosphorylierung wie in HepG2-Zellen (Abb. 17, Spuren 1-7). Die Phosphorylierung von Shc scheint also in der Tat ein OSMR-vermittelter Prozess zu sein.

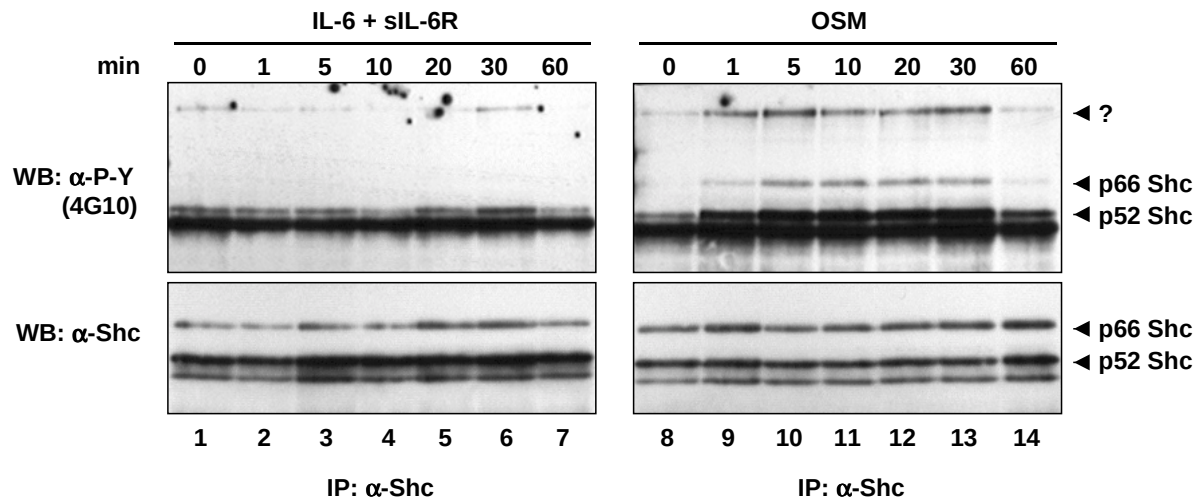


Abb. 17: OSM-Stimulation von A375-Zellen führt zur Shc-Phosphorylierung

A375-Zellen wurden für die angegebenen Zeiten mit IL-6 (20 ng/ml + 1 µg/ml sIL-6R) oder OSM (50 ng/ml) stimuliert. Anschließend wurden die Zellen lysiert und eine Immunpräzipitation mit einem Antikörper gegen Shc durchgeführt. Nach der gelelektrophoretischen Auftrennung wurden die Proteine auf eine PVDF-Membran gebロットet und auf den Western Blots mit Antikörpern gegen tyrosinphosphorylierte Proteine (α-P-Y) oder Shc detektiert.

3.4 Die Region zwischen Asparagin 836 und Serin 866 des OSMR ist essentiell für die Shc-Assoziation

Nachdem gezeigt werden konnte, daß die Shc-Phosphorylierung ein OSMR-vermittelter Prozess ist, wurde untersucht, ob eine direkte Rekrutierung von Shc an den OSMR erfolgt. Diese Versuche wurden in COS-7-Zellen durchgeführt, da diese Zellen effizienter transfiziert werden können als HepG2- und A375-Zellen. COS-7-Zellen exprimieren jedoch neben gp130 auch den OSMR (nicht gezeigt). Daher mußte für die weiteren Versuche auf das im Abschnitt 1 dieser Arbeit beschriebene chimäre Rezeptorsystem zurückgegriffen werden. Wie erwähnt, handelt es sich hierbei um Fusionsproteine aus dem Extrazellulärbereich der IL-5Rα- oder IL-5Rβ-Kette und den Transmembran- und Intrazellulärbereichen der einzelnen signaltransduzierenden Rezeptorketten der IL-6-Typ Zytokine. Außer den im Abschnitt 1 beschriebenen chimären Rezeptoren, die den Transmembran- und intrazellulären Bereich des gp130 und LIFR enthalten, wurden chimäre Konstrukte verwendet, die den Transmembran- und intrazellulären Bereich des OSMR bzw. Deletionsmutanten davon enthielten (107). Diese

chimären Rezeptoren konnten zur Überprüfung einer direkten Bindung von Shc an den OSMR genutzt werden.

Dazu wurden COS-7-Zellen mit β /gp130, β /gp130-B1/2 oder β /OSMR sowie einem Expressionsplasmid für die Janus-Kinase Jak1 kotransfiziert. Die Überexpression der Kinase Jak1 führt zu einer ligandenunabhängigen Phosphorylierung der chimären Rezeptorketten. Nach Lyse der Zellen und Immunpräzipitation der Rezeptorchimären mit Hilfe des monoklonalen α -IL-5R β Antikörpers S-16 konnte eine Kopräzipitation der Shc-Proteine p52 und p66 mit β /OSMR demonstriert werden, nicht aber mit Konstrukten, die zytoplasmatische Bereiche des gp130 besitzen (Abb. 18, erste Reihe, Spur 3 im Vergleich zu Spuren 1 und 2). Im Gegensatz dazu konnte eine Kopräzipitation der Tyrosinphosphatase SHP2 nur mit chimären Konstrukten erreicht werden, die den vollständigen intrazellulären Bereich des gp130 enthalten, nicht aber mit Konstrukten, denen entweder die SHP2-Rekrutierungsstelle Y759 des gp130 fehlt (β /gp130-B1/2), oder die die intrazelluläre Region des OSMR enthalten (Abb. 18, zweite Reihe, Spur 1 im Vergleich zu Spuren 2 und 3). Zur Eingrenzung der Region im OSMR, die für die Rekrutierung der Shc-Proteine verantwortlich ist, wurden C-terminal verkürzte OSMR-Konstrukte genutzt, die intrazellulär noch 153, 105 bzw. 75 Aminosäuren enthalten (β /OSMR Δ 3, β /OSMR Δ 4 und β /OSMR Δ 5 (107)). Diese verkürzten Konstrukte wurden ebenso in COS-7-Zellen zusammen mit der Janus-Kinase Jak1 koexprimiert. Während β /OSMR Δ 3 und β /OSMR Δ 4 noch in der Lage sind, Shc zu binden, besitzt die Chimäre β /OSMR Δ 5 diese Fähigkeit nicht mehr (Abb. 18, erste Reihe, Spuren 4 und 5 im Vergleich zu Spur 6). Alle drei verkürzten Konstrukte -genauso wie die zuvor beschriebenen gp130-Konstrukte- besitzen hingegen noch die Fähigkeit, Jak1 zu binden (Abb. 18, dritte Reihe, Spuren 1-6). Dies bedeutet, daß Shc von der Region zwischen N836 und S866 des OSMR rekrutiert wird (s. Abb. 19). In Abwesenheit der chimären Rezeptorketten ist keine Präzipitation von Shc, SHP2 oder Jak1 möglich (Abb. 18, Spur 7). Folglich binden diese Proteine nicht unspezifisch an den präzipitierenden Antikörper oder die Protein A-Sepharose.

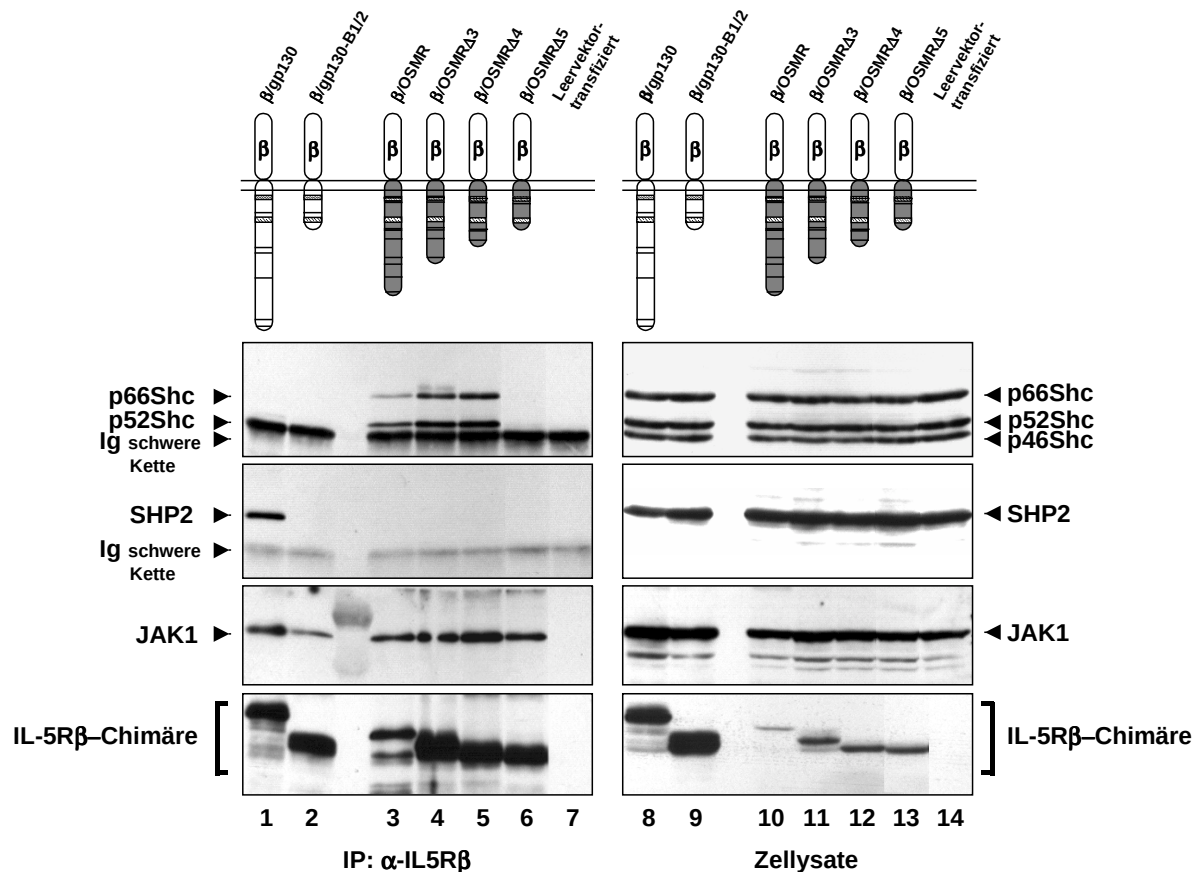


Abb. 18: Die Adaptorproteine SHP2 und Shc binden spezifisch an gp130 bzw. den OSMR

COS-7-Zellen wurden mit Expressionsplasmiden für die dargestellten Rezeptorchimären und die Kinase Jak1 kotransfiziert. Nach Lyse der Zellen wurden Immunpräzipitate oder Aliquots der Lysate gelelektrophoretisch aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran geblottet und die Proteine auf den Western Blots mit Antikörpern gegen Shc, SHP2, Jak1 oder IL-5R β detektiert. Die nicht beschriftete Spur zwischen Spur 2 und 3 enthielt einen Proteingrößenmarker, dessen Proteine teilweise mit den detektierenden Antikörpern kreuzreagieren. Die Spuren 8 bis 14 enthalten je 25 μ l Zellysat, abgenommen vor der Immunpräzipitation zur Überprüfung der gleichmäßigen Expression der Proteine.

3.5 Die Shc-Rekrutierung an den OSMR ist auf den Tyrosinrest 861 angewiesen

Shc-Proteine sind reine Adaptorproteine, d.h. sie besitzen keine katalytische Funktion, jedoch sowohl eine SH2- als auch eine PTB-Domäne, die der Rekrutierung weiterer zytoplasmatischer Proteine dienen. Für andere Rezeptorsysteme wurde gezeigt, daß die Shc-Proteine normalerweise über ihre SH2- und/oder PTB-Domäne an verschiedene Rezeptoren binden. Dabei erkennen beide Domänen phosphorylierte Tyrosinreste im Kontext definierter Konsensussequenzen. Die SH2-Domäne von Shc erkennt eine Sequenz pY-[I/E/Y/L]-X-[I/L/M] (126), während für eine Bindung der PTB-Domäne an einen Rezeptor die N-terminal zum Tyrosinrest gelegenen Aminosäuren von Bedeutung sind und die Anforderungen Φ -

[D/E]-N-X-X-pY erfüllen müssen (66). Bei Φ handelt es sich um eine hydrophobe Aminosäure. Eine Überprüfung des zytoplasmatischen Bereiches des OSMR ergab, daß der zuvor eingegrenzte Abschnitt zwischen N836 und S866 zwei Tyrosinreste im Kontext der geforderten Konsensussequenzen enthält: Y837 mit den umgebenden Aminosäuren Y837-L-Y-L könnte der Bindung der SH2-Domäne von Shc dienen, Y861 mit den vorangehenden Aminosäuren F-E-N-L-T-Y861 könnte die PTB-Domäne von Shc rekrutieren (Abb. 19).

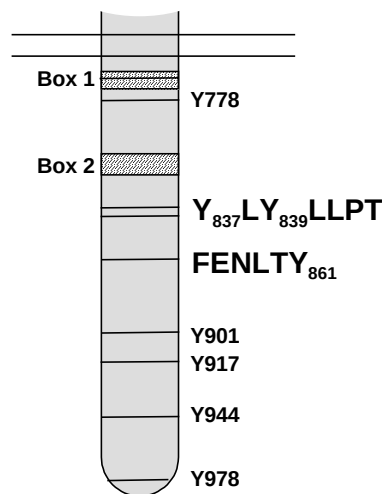


Abb. 19: Der zytoplasmatische Bereich des OSMR mit möglichen Shc-Rekrutierungsstellen

Der zytoplasmatische Bereich des OSMR enthält acht Tyrosinreste, von denen sieben mit der entsprechenden Positionsnummer gezeigt sind, ein weiterer Tyrosinrest befindet sich in der Box1-Region. Für Y837 und Y861 sind jeweils die flankierenden Aminosäuren aufgeführt, die für die Shc-Bindung notwendig sein könnten. Die konservierten Box1- und Box2-Regionen sind schraffiert dargestellt.

Um die Bedeutung beider Tyrosinreste für die Shc-Bindung zu überprüfen, wurden sie einzeln gegen Phenylalanin ausgetauscht. Die so entstandenen chimären Rezeptoren β /OSMRY837F oder β /OSMRY861F wurden gemeinsam mit Jak1 in COS-7-Zellen exprimiert. Als Kontrolle wurde β /OSMR transfiziert, von dem bereits zuvor gezeigt worden war, daß er Shc p52 und p66 binden kann (Abb. 18). Wie in Abb. 20 (oberste Reihe) zu erkennen ist, sind beide Mutanten des OSMR nicht mehr in der Lage, Shc zu rekrutieren. Exponiert man den Western Blot jedoch etwas länger, so wird deutlich, daß nur die Mutation des Tyrosinrestes 861 zu einem vollständigen Verlust der Shc-Bindung führt, während das Konstrukt β /OSMRY837F durchaus noch in der Lage ist, Shc zu rekrutieren, wenn auch in einem deutlich geringeren Ausmaß als der „Wildtyp“-Rezeptor β /OSMR (Abb. 20, zweite Reihe). Eine Analyse der Zelllysate zeigte, daß in allen Reaktionsansätzen äquivalente Mengen Shc vorhanden waren (Abb. 20, dritte Reihe). Die Bindung der Janus-Kinase Jak1 hingegen bleibt von beiden

Punktmutationen unbeeinflusst (Abb. 20, vierte Reihe). Es ist daher sehr wahrscheinlich, daß die Shc-Proteine über ihre PTB-Domäne an den Rezeptor binden. Die gleichzeitige Rekrutierung der SH2-Domäne verstärkt zwar deutlich die Assoziation der Shc-Proteine, ist aber alleine für die Bindung nicht ausreichend.

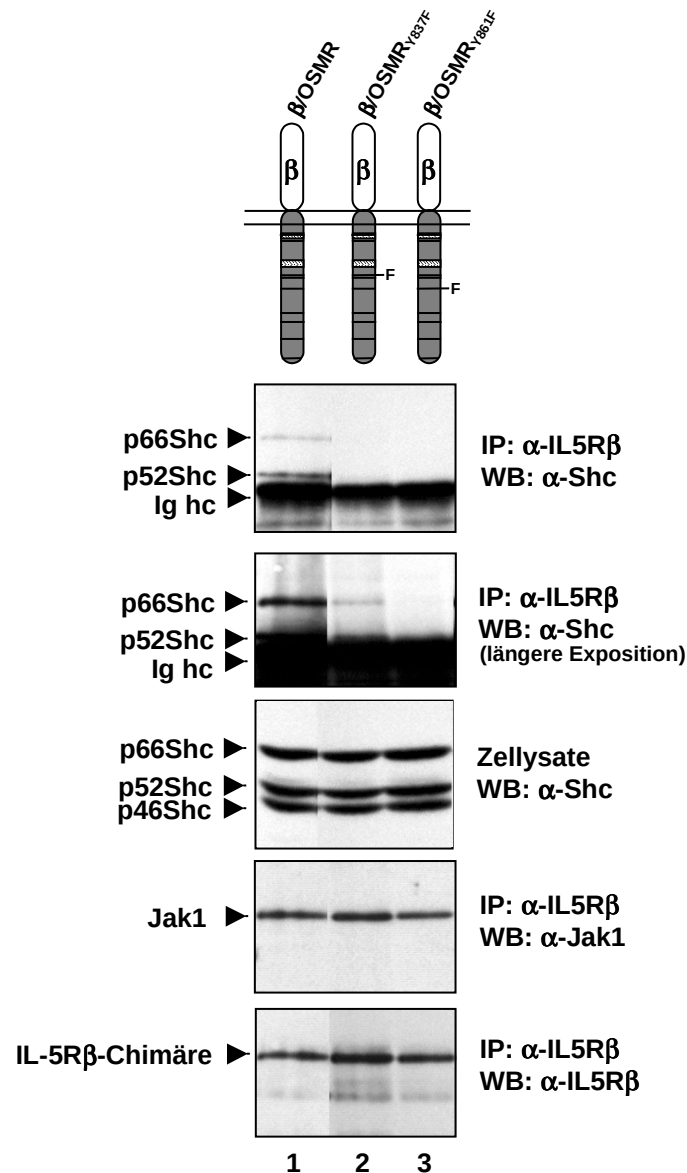


Abb. 20: Die Tyrosinreste 837 und 861 sind an der Rekrutierung des Adaptorproteins Shc beteiligt

COS-7-Zellen wurden mit Expressionsplasmiden für die dargestellten Rezeptorchimären und die Kinase Jak1 kotransfiziert. Nach Lyse der Zellen wurden Immunpräzipitate oder Aliquots der Lysate gelelektrophoretisch aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran geblottet und die Proteine mit Antikörpern gegen Shc, Jak1 oder IL-5R β gefärbt.

3.6 Die Aktivierung der MAP-Kinasen Erk1 und Erk2 benötigt den Tyrosinrest 861 des OSMR

Wie zuvor nachgewiesen, besitzt OSM ein deutlich größeres Potential zur Aktivierung der MAP-Kinasen Erk1 und Erk2 als IL-6 oder LIF (Abb. 14). Nachdem gezeigt werden konnte, daß der OSMR über den Tyrosinrest 861 spezifisch Shc rekrutiert (Abb. 20), liegt die Vermutung nahe, daß dieser Prozess für die Aktivierung der MAP-Kinasen von Bedeutung ist. Um dieser Annahme nachzugehen, wurden COS-7-Zellen mit chimären Konstrukten transfiziert, die die Bildung eines Heterodimers aus α /gp130YFFFFF und verschiedenen β /OSMR-Konstrukten erlaubt. Das Konstrukt α /gp130YFFFFF stellt eine Chimäre aus dem extrazellulären Bereich des IL-5R α sowie dem Transmembran- und intrazellulären Bereich des gp130 dar, wobei im intrazellulären Bereich alle fünf Tyrosinreste C-terminal zur Box2-Region durch Phenylalanine ersetzt sind. Dies soll die Aktivierung des Ras/Raf/MAPK-Signalweges über gp130 unterbinden, da der Tyrosinrest 759, der SHP2 an den Rezeptor rekrutiert und so die Verbindung zu Grb2 und Sos ermöglicht, durch Phenylalanin ersetzt ist. Auch eine STAT-Aktivierung ist von dieser gp130-Mutante nicht zu erwarten. Um eine höhere Oberflächenexpression der OSMR-Konstrukte zu erzielen, wurden die Punktmutationen Y837F und Y861F in die Rezeptorchimäre β /OSMR Δ 1 eingeführt, der die letzten C-terminalen 27 Aminosäuren fehlen. Nach Koexpression von α /gp130YFFFFF mit den verschiedenen β /OSMR Δ 1-Konstrukten und Stimulation mit IL-5 für 30 min zeigte sich, daß der Tyrosinrest 861 auch für die Aktivierung von Erk1/2 von entscheidender Bedeutung ist. Dimerisiert man α /gp130YFFFFF mit β /OSMR Δ 1 oder β /OSMR Δ 1Y837F, so ist eine Phosphorylierung von Erk1/2 nachweisbar (Abb. 21, obere Reihe, Spuren 2 und 4), während dies mit β /OSMR Δ 1Y861F nicht mehr der Fall ist (Abb. 21, obere Reihe, Spur 6). STAT3 hingegen kann nach Stimulation aller drei Rezeptorkombinationen tyrosinphosphoryliert werden, was vermuten läßt, daß der Jak/STAT-Signalweg unbeeinflusst von der Mutation Y861F bleibt (Abb. 21, obere Reihe, Spuren 8, 10 und 12). Eine Gegenfärbung der Western Blots mit Antikörpern gegen die Erk1/2- und STAT3-Proteine unabhängig von ihrer Phosphorylierung zeigte eine gleichmäßige Beladung aller Spuren (Abb. 21, untere Reihe). Der Ras/Raf/MAPK-Weg ist also offensichtlich ein von Shc vermittelter Signalweg.

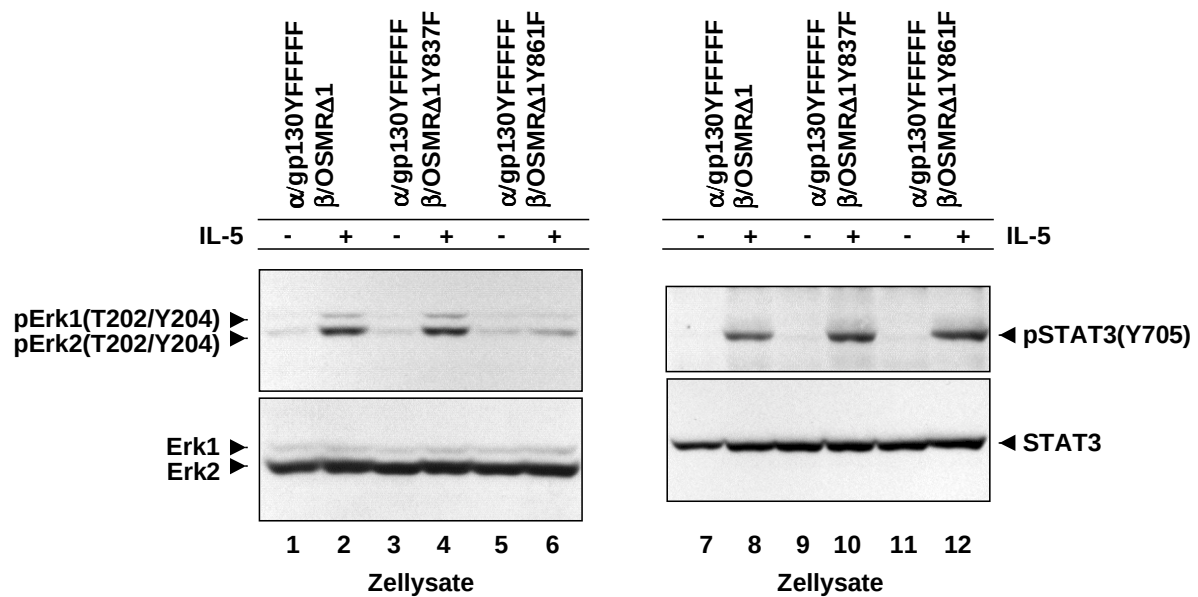


Abb. 21: Der Tyrosinrest 861 des OSMR ist an der Aktivierung der MAP-Kinasen Erk1/2 beteiligt

COS-7-Zellen wurden mit Expressionsplasmiden für die dargestellten Rezeptorkombinationen transfiziert. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen für 20 min mit IL-5 (20 ng/ml) stimuliert. Nach Lyse der Zellen wurden Aliquots der Lysate gelelektrophoretisch aufgetrennt, auf eine PVDF-Membran geblottet und die Proteine mit Antikörpern gegen Phospho-Erk1/2 (T202/Y204), gegen Erk1 und Erk2 (als Gemisch eingesetzt) (Spuren 1-6) oder gegen Phospho-STAT3 (Y705) und STAT3 (Spuren 7-12) detektiert.

3.7 Tyrosin 861 des OSMR ist an einer effizienten Aktivierung des α 2M-Gens beteiligt

In der Literatur ist immer noch umstritten, inwiefern die MAP-Kinasen an der Transkriptionsinduktion Zytokin-regulierter Zielgene beteiligt sind. Da der Rezeptor β /OSMR Δ 1Y861F nicht in der Lage ist, die Aktivierung der MAP-Kinasen Erk1/2 zu vermitteln, aber noch zu einer Tyrosinphosphorylierung von STAT3 führt, kann die Beteiligung dieser Kinasen an der Geninduktion überprüft werden. Hauptzielgene der IL-6-Typ Zytokine sind die Akutphase-Proteine in der Leber. Aus diesem Grund wurden die folgenden Untersuchungen in HepG2-Hepatoma-Zellen durchgeführt. Die Zellen wurden mit Expressionsplasmiden für die Rezeptorkombinationen α /gp130YFFFFF mit β /OSMR, β /OSMR Δ 1Y837F oder β /OSMR Δ 1Y861F sowie einem unter der Kontrolle des α 2-Makroglobulin-Promotors stehenden Luziferasegen-Konstrukt kotransfiziert. Eine IL-5-Stimulation des Rezeptorkomplexes α /gp130YFFFFF + β /OSMR führt zu einer 25-fachen Induktion des α 2M-Promotor-regulierten Reportergens. Die Mutation des Tyrosinrestes 837 im OSMR zu Phenylalanin hat keinen Einfluß auf die Reportergenaktivität, während die Mutation Y861F zu einer deutlichen Reduktion der Luziferase-Aktivität führt (Abb. 22). Diese Beobachtung zeigt, daß der Tyrosinrest 861, wahrscheinlich über Aktivierung von

Erk1/2, an der Induktion eines Zielgens beteiligt ist. Der α 2M-Promotor enthält Bindungsstellen für STAT-Faktoren und es ist bekannt, daß er sowohl durch STAT1 als auch durch STAT3 aktiviert werden kann. Da die STAT3-Tyrosinphosphorylierung unbeeinträchtigt von der Mutation des Tyrosinrestes 861 ist, muß der genaue Mechanismus, über den Erks die Aktivierung des α 2M-Promotor beeinflussen, in zukünftigen Untersuchungen aufgeklärt werden.

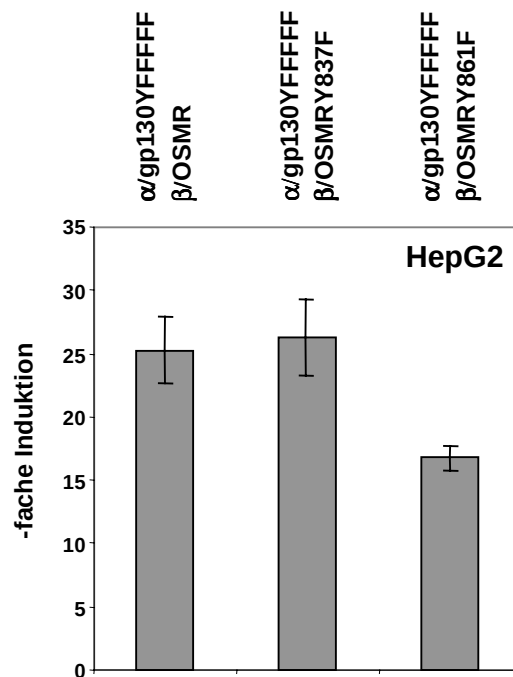


Abb. 22: Mutation von Y861 im OSMR führt zur Reduktion einer α 2M-Promotor-regulierten Gen-expression

HepG2-Zellen wurden mit Expressionsplasmiden für die dargestellten Rezeptorkombinationen sowie einem α 2-Macroglobulin-Promotor-regulierten Luziferase-Reportergenkonstrukt transfiziert. Einen Tag nach Transfektion wurden die Zellen für 18 h mit IL-5 (20 ng/ml) stimuliert. Nach Lyse der Zellen wurde ein Luziferase-Assay durchgeführt. Die Luziferase-Aktivität wurde gegen die Aktivität der koexprimierten β -Galaktosidase abgeglichen. Aufgetragen ist die in drei unabhängigen Versuchen gemessene -fache Luziferase-Induktion (relativ zu unstimulierten Zellen).

4. Die Bedeutung der Transmembranregion für die Signaltransduktion

In den letzten Jahren wurden große Fortschritte im Verständnis der Zytokinrezeptor-vermittelten Signaltransduktion erzielt. Intensive Studien betrafen den Extrazellulärbereich der Zytokinrezeptoren - im besonderen die Ligandenbindungsstellen - und den Intrazellulärbereich mit seinen signaltransduzierenden Funktionen. Wenige Untersuchungen beschäftigten sich mit dem Transmembranbereich (TM) der Zytokinrezeptoren. Dabei zeigte sich vor allem an den 7-Transmembranrezeptoren und den Rezeptortyrosinkinasen, daß diese Region von großer Bedeutung für die Aktivierung der Rezeptoren ist.

4.1 Die gp130-Transmembranregion ist nicht essentiell für eine gp130-vermittelte Signaltransduktion

Da gp130 als signaltransduzierende Rezeptoruntereinheit von allen sieben IL-6-Typ Zytokinen genutzt wird, wurde dieser Rezeptor ausgewählt, um die Bedeutung der Transmembranregion für die Signaltransduktion zu analysieren. Dazu wurden neben den bereits beschriebenen Rezeptorchimären α /gp130 und β /gp130, die die Transmembrandomäne des gp130 enthalten, zwei weitere Chimären mit den Transmembranbereichen der IL-5R-Ketten genutzt: α (TM)/gp130 und β (TM)/gp130 (s. Abb. 23). Diese Chimären erlauben zunächst die Beantwortung der Frage, ob die gp130-vermittelte Signaltransduktion auf die Anwesenheit der gp130-TM-Region angewiesen ist oder ob sie durch die TM-Region anderer Zytokinrezeptoren ersetzt werden kann.

COS-7-Zellen wurden mit den Expressionsplasmiden für α /gp130 und β /gp130 oder α (TM)/gp130 und β (TM)/gp130 kotransfiziert. Eine Analyse der Kernextrakte stimulierter Zellen ergab, daß ein Heterodimer, welches die Transmembranregion der IL-5-Rezeptoren enthält, genauso in der Lage ist, STAT1 zu aktivieren (Abb. 23, Spur 4) wie ein Heterodimer, welches die Transmembranregion von gp130 enthält (Abb. 23, Spur 2).

Zusätzlich wurden Rezeptorkombinationen transfiziert, bei denen die eine Rezeptorkette die TM-Region von gp130, die andere die des IL-5-Rezeptors enthält (Abb. 23, rechts). Induziert man ein solches Transmembran-„Heterodimer“, so führt dies zu einer geringeren, aber doch nachweisbaren STAT1-Aktivierung (Abb. 23, Spuren 8 und 10). Das legt nahe, daß für eine hocheffiziente Signaltransduktion über gp130 nicht unbedingt die gp130-TM-Region vorhanden sein muß, wohl aber Transmembranbereiche von physiologisch miteinander interagierenden Rezeptoren. Die unphysiologische Kombination von gp130- und IL-5R-TM-Regionen führt zu einer wenig effizienten STAT-Aktivierung. Diese Beobachtung unterstützt

die Vermutung, daß es innerhalb der Transmembranregionen Interaktionsbereiche oder sogar Dimerisierungsstellen geben könnte, die einen Beitrag zur Signalweiterleitung leisten.

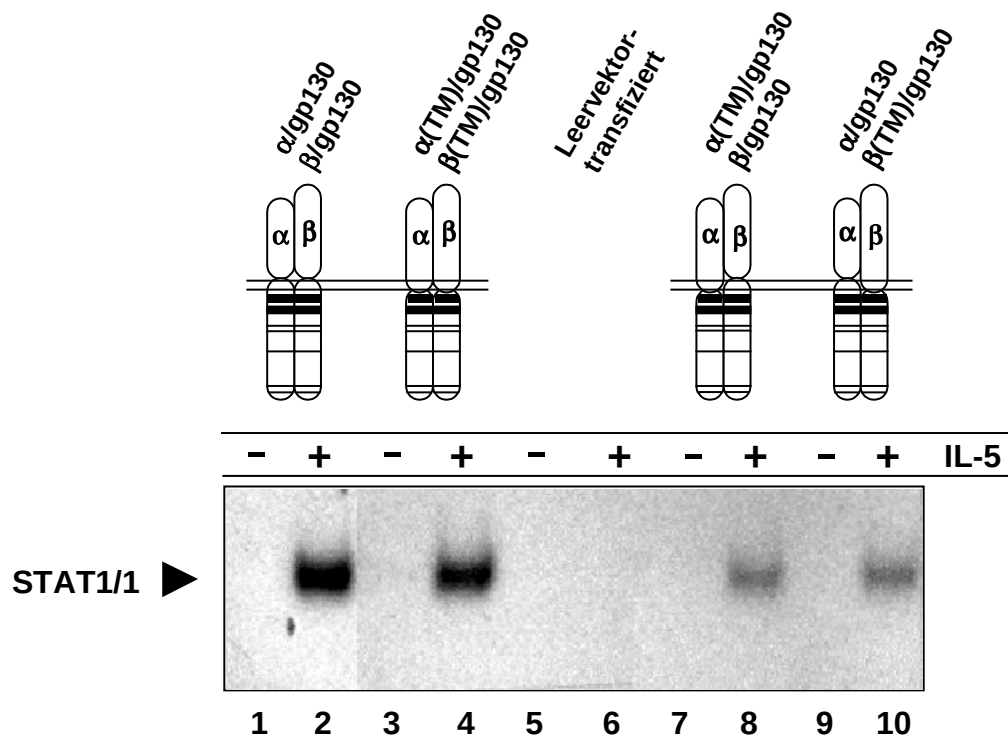


Abb. 23: Zur effizienten Signaltransduktion über gp130 ist eine Dimerisierung physiologisch interagierender Transmembrandomänen erforderlich

COS-7-Zellen wurden mit Expressionsplasmiden für die dargestellten IL-5Rα- und IL-5Rβ-Konstrukte transfiziert. Drei Tage nach der Transfektion wurden die Zellen für 30 min mit IL-5 (80 ng/ml) stimuliert und anschließend Kernextrakte hergestellt. Der EMSA wurde mit der SIE-Probe durchgeführt. Die Position der an die SIE-Probe gebundenen STAT1-Homodimere ist markiert.

4.2 Die Mutation einzelner Aminosäuren in der Transmembranregion verringert die Signalstärke des Rezeptors

Zwischen den TM-Regionen von Transmembranrezeptoren finden Interaktionen unterschiedlichster Art statt. So werden sowohl van der Waals-Kräfte für deren Dimerisierung verantwortlich gemacht (80) als auch Interaktionen von hydrophilen Aminosäuren (18). Die TM-Region des gp130 (s. Abb. 26A) enthält mit T632 und T633 zwei hydrophile Aminosäuren, die für solche Interaktionen in Frage kämen. Zur Analyse ihrer Funktion wurden sie mittels PCR gegen Alanine ausgetauscht. Desweiteren besitzt gp130 an Position 626 und 640 Cysteinreste, von denen C640 innerhalb der signaltransduzierenden Ketten der IL-6-Typ Zytokine konserviert ist. Es tritt auch im LIFR und OSMR auf. Die Funktion der Cysteine ist noch ungeklärt. Um zu überprüfen, ob sie möglicherweise über die Bildung einer Disulfidbrücke an der Rezeptordimerisierung beteiligt sind, wurden sie mittels PCR gegen Serine ausgetauscht. Außerdem wurde der Prolinrest 624 gegen Leucin ausgetauscht, da

Proline in der Literatur zum einen als Helixbrecher beschrieben sind, d.h. dieser Rest könnte für einen Knick innerhalb der TM-Helix sorgen, zum anderen können sie im hydrophoben Milieu aber auch Helices stabilisieren (69).

Die Punktmutationen wurden mittels PCR-Technik sowohl in das α /gp130- als auch in das β /gp130-Konstrukt eingeführt. Nach Kotransfektion von Expressionsplasmiden für α /gp130T632/633A + β /gp130T632/633A, α /gp130C626S + β /gp130C626S, α /gp130P624L + β /gp130P624L und α /gp130C640S + β /gp130C640S in COS-7-Zellen und IL-5-Stimulation konnte im EMSA die STAT-Aktivierung durch die einzelnen Rezeptorkombinationen nachgewiesen werden (Abb. 24). Während der Austausch P624L nahezu keine Auswirkung auf die STAT1-Phosphorylierung hat (Abb. 24, Spur 6), bewirken die weiteren Mutationen eine mehr oder weniger deutliche Reduktion der IL-5-induzierten STAT1-Aktivierung. Den deutlichsten Rückgang gegenüber der unmutierten TM-Region (Abb. 24, Spur 2) verursacht der Austausch C640S (Abb. 24, Spur 10), was die Vermutung bestätigt, daß dieser Rest eine besondere Rolle für die Aktivierung des Rezeptors spielt. Weiterhin unterstützen diese Befunde die Überlegung, daß es bei Dimerisierung der Rezeptorketten zu Interaktionen zwischen den TM-Regionen von gp130 kommt.

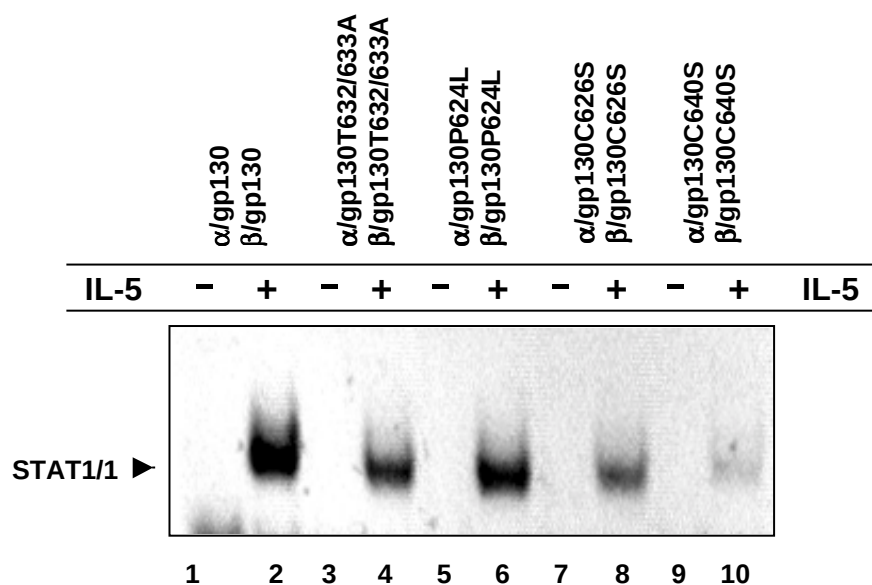


Abb. 24: Die Mutation einzelner Aminosäuren innerhalb der TM-Region von gp130 bewirkt einen Rückgang in der Signaleffizienz

COS-7-Zellen wurden mit Expressionsplasmiden für die dargestellten IL-5R α - und IL-5R β -Konstrukte transfiziert. Drei Tage nach der Transfektion wurden die Zellen für 30 min mit IL-5 (80 ng/ml) stimuliert und anschließend Kernextrakte hergestellt. Der EMSA wurde mit der SIE-Probe durchgeführt. Die Position der an die SIE-Probe gebundenen STAT1-Homodimere ist markiert.

4.3 Die Anzahl von Aminosäuren in der Transmembranregion ist wichtig für die Signaltransduktion durch gp130

Für Zytokinrezeptoren wie z.B. für den EpoR (74) oder den TGF β RI bzw. II (41) wird diskutiert, daß diese Rezeptoren bereits vor der Ligandenbindung als präformierte Dimere vorliegen. Da beide Rezeptoren über signalkompetente zytoplasmatische Bereiche verfügen, stellt sich die Frage, warum sie nicht konstitutiv signalisieren. Die einfachste und wahrscheinlichste Erklärung ist, daß die Rezeptoren zunächst in einer signalinkompetenten Konformation vorliegen. Nach Ligandenbindung erfolgt eine Konformationsänderung, die die Rezeptoren erst zu einer effizienten Signaltransduktion befähigt. Besonders gut beschrieben ist dieser Vorgang für die Aktivierung des EpoR. Studien mit synthetischen Peptiden haben Hinweise geliefert, daß die Signaltransduktion nicht nur von der bloßen Dimerisierung zweier signaltransduzierender Rezeptorketten abhängt, sondern daß die richtige Orientierung dieser Ketten zueinander essentiell ist (57). Das bedeutet, daß die Information der Orientierung der Extrazellulärbereiche ins Zytoplasma weitergeleitet werden muß. Leider sind derzeit noch keine Strukturdaten zu den Transmembrandomänen der Zytokinrezeptoren vorhanden. Strukturvorhersagen sowie die gelöste Kristallstruktur des Rhodopsins (119) und des Proteins Glycophorin A (80) deuten jedoch darauf hin, daß die TM-Region eine α -helikale und damit starre Struktur annimmt. Damit sind zwei Mechanismen einer Beteiligung der Transmembranregion an der Signaltransduktion möglich. Erstens könnten sich die für eine Aktivierung des Rezeptors notwendigen Janus-Kinasen vor Ligandenbindung in einer räumlichen Distanz zueinander befinden, die ihre wechselseitige Phosphorylierung nicht erlaubt. Eine Konformationsänderung im Extrazellulärbereich könnte zu einer Annäherung der TM- und intrazellulären Bereiche führen, wobei eine Dimerisierung über Interaktionen innerhalb der TM-Region stabilisiert werden könnte (Abb. 25A). Zweitens wäre denkbar, daß im inaktiven Rezeptorkomplex die zytoplasmatischen Regionen in einer ungünstigen Orientierung zueinander vorliegen, wodurch eine Aktivierung der assoziierten Kinasen unmöglich gemacht wird. Nach Ligandenbindung könnte - unter der Voraussetzung, daß sich die Starrheit der TM- α -Helix in das Zytoplasma fortsetzt - eine Rotation der zytoplasmatischen Bereiche erfolgen, die die Aktivierung der Kinasen ermöglicht (Abb. 25B). Es ist aber auch eine Kombination der beiden Möglichkeiten denkbar.

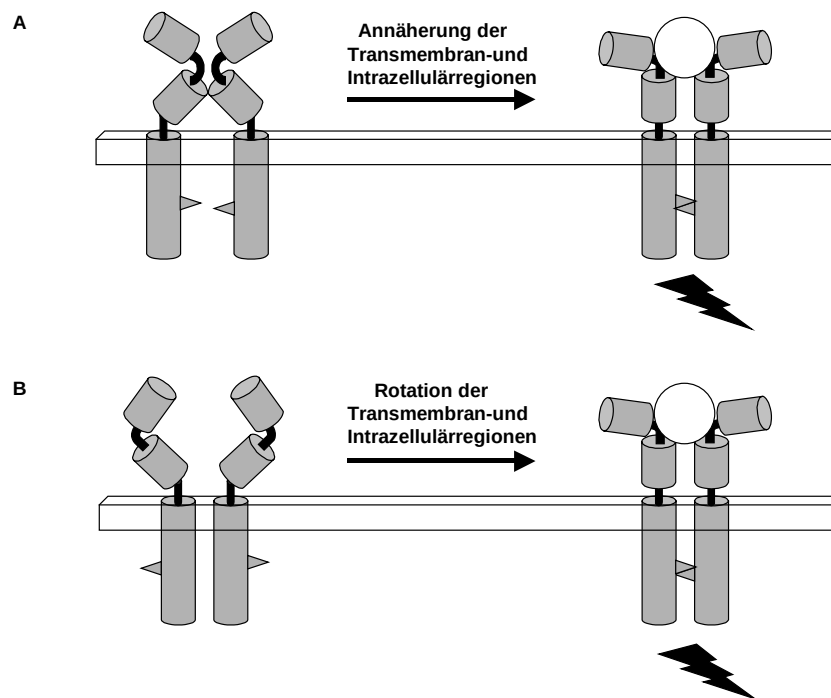


Abb. 25: Modelle zur Aktivierung von Zytokinrezeptoren (nach (57))

A. Die inaktiven Rezeptorketten befinden sich in einer Konformation, bei der die intrazellulären Regionen zu weit voneinander entfernt sind, um eine Aktivierung der assoziierten Kinasen zu erlauben. Nach Ligandenbindung erfolgt eine Konformationsänderung durch die sich die zytoplasmatischen Bereiche annähern.

B. Die inaktiven Rezeptorketten befinden sich in einer Konformation, bei der die intrazellulären Regionen relativ zueinander so orientiert vorliegen, daß keine Aktivierung der assoziierten Kinasen möglich ist. Nach Ligandenbindung erfolgt eine Rotation der zytoplasmatischen Bereiche, wodurch die Kinasen in eine Position gebracht werden, die ihre Aktivierung erlaubt.

Wie im Abschnitt 4.2 beschrieben konnten erste Hinweise erbracht werden, die auf eine Interaktionsfläche der Transmembranregionen hindeuten, da der Austausch einzelner Aminosäuren in einer Reduktion der STAT1-Aktivierung resultierte (Abb. 24).

Um die Bedeutung der TM-Regionen des gp130 weiter zu untersuchen, wurden Aminosäuren in diese Region eingefügt bzw. daraus deletiert. Die Transmembranregionen der Zytokinrezeptoren weisen unterschiedliche Längen auf und oft sind die Übergänge in die Membran hinein bzw. aus der Membran heraus nicht genau definiert. Aufgrund der postulierten Membrandicke sollte die TM-Region nicht weniger als 20 Aminosäuren enthalten (110). Unter Berücksichtigung der Hydrophobizität der Aminosäuren besitzt die Transmembranregion des gp130 vermutlich 22 Aminosäuren. Zur Gewährleistung der erforderlichen Anzahl an Aminosäuren konnten somit eine oder maximal zwei Aminosäuren deletiert werden, umgekehrt wurden auch eine oder zwei Aminosäuren in die Region eingefügt (s. Abb. 26). Unter der Voraussetzung der Starrheit der α -Helix wäre zu erwarten, daß hierdurch eine Rotation der folgenden Aminosäuren relativ zur vorherigen Peptidsequenz

erfolgt. Bei einer angenommenen Ganghöhe von 3,9 Aminosäuren/Windung (14) wäre davon auszugehen, daß die Positionierung der Nachfolgesequenzen dann gleich sein sollte, wenn zwei Helices sich in vier Aminosäuren unterscheiden.

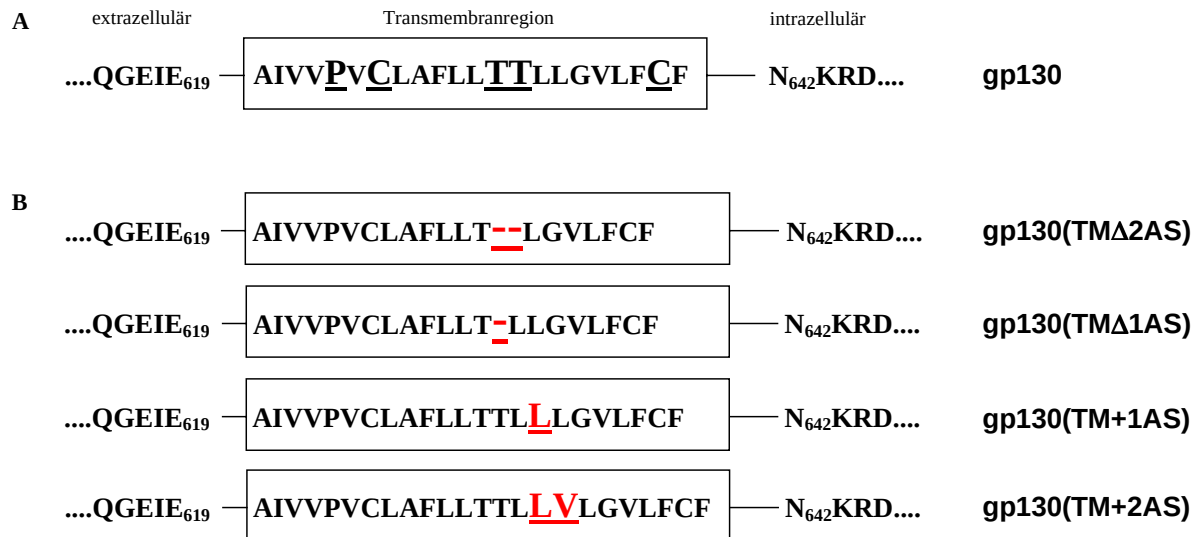


Abb. 26: Schematische Darstellung der gp130-Transmembranregion (A) (die größer gedruckten, unterstrichenen Aminosäuren wurden -wie im Kapitel 4.2 beschrieben- mutiert) sowie Darstellung der Positionen von Aminosäureinsertionen bzw. -deletionen zur Herstellung der gp130-Konstrukte TMΔ2AS, TMΔ1AS, TM+1AS, TM+2AS (B)

4.3.1 Chimäre IL-5R/gp130-Konstrukte mit unterschiedlich langen Transmembranregionen erlauben unterschiedlich starke Signale

Zunächst wurden mittels PCR-Technik Aminosäuren in die Transmembrandomäne eingefügt (+1: Leucin, +2: Leucin, Valin) oder aus dieser Region deletiert (-1: Threonin 633, -2: Threonin 633, Leucin 634) (Abb. 26). Die verschiedenen PCR-Fragmente wurden einem *EcoRI/BspTI*-Verdau unterzogen und anschließend in das mit den gleichen Enzymen verdaute Expressionsplasmid β /gp130(*BspTI*) eingesetzt. Bei dem Konstrukt β /gp130(*BspTI*) handelt es sich um einen chimären Rezeptor, der bis auf eine Aminosäure dem Konstrukt β /gp130 entspricht. Zur Herstellung einer *BspTI*-Schnittstelle wurde das Codon für I647 an einer Position verändert, was zum Austausch dieser Aminosäure gegen Leucin führte sowie in das Codon für K648 eine stille Mutation eingeführt.

Die so entstandenen Konstrukte β /gp130(TM+1AS), β /gp130(TM+2AS), β /gp130(TMΔ1AS) und β /gp130(TMΔ2AS) wurden mittels eines *EcoRI/BamHI*-Verdaus in den Rezeptor α /gp130 eingesetzt, so daß alle Konstrukte mit dem extrazellulären Bereich der IL-5R α - und IL-5R β -Kette vorlagen.

Über das IL-5R-System konnten nun Rezeptorchimären mit einer veränderten Transmembranregion mit der komplementären „Wildtyp-TM“-Rezeptorchimäre dimerisiert werden oder Rezeptoren mit veränderten TM-Regionen „homodimerisiert“ werden. Dazu wurden COS-7-Zellen mit Expressionsplasmiden für die in Abb. 27 dargestellten Rezeptorkombinationen transfiziert und nach IL-5-Stimulation die Kernextrakte auf aktivierte STAT-Faktoren hin analysiert. Um die aktivierten STAT1-Dimere zu quantifizieren, wurden die EMSAs (Abb. 27A) mit Hilfe eines Phosphorimagers ausgewertet. Die STAT1-Aktivierung durch α /gp130 + β /gp130 (somit die „Wildtyp-TM“-Kombination) wurde gleich 100% gesetzt und alle anderen STAT-Signale relativ dazu bewertet. Wie in Abb. 27B zu erkennen ist, hat eine Deletion von zwei Aminosäuren innerhalb der Transmembranregion des gp130 keine großen Auswirkungen auf die Signalkompetenz des Rezeptors (Abb. 27B, Spuren 2, 3 und 4), während vor allem die Kombination α /gp130(TM+2AS) + β /gp130(TM+2AS) nach IL-5-Stimulation nur noch etwa 40% der STAT1-Aktivität relativ zum „Wildtyp“-Dimer zeigt (Abb. 27B, Spur 7). Nach Deletion einer Aminosäure (TM Δ 1AS) kann - bei einer Berücksichtigung von drei unabhängigen Experimenten - ein deutlich stärkeres STAT1-Signal festgestellt werden (Abb. 27B, Spuren 11, 12 und 13) als nach Stimulation des „Wildtyp-TM“-Dimers (Abb. 27B, Spur 1). Die verringerte STAT-Aktivität nach IL-5-Stimulation der (TM+1AS)-Kombinationen ist wahrscheinlich zu einem großen Teil auf die geringere Oberflächenexpression des α /gp130(TM+1AS)-Konstruktes zurückzuführen.

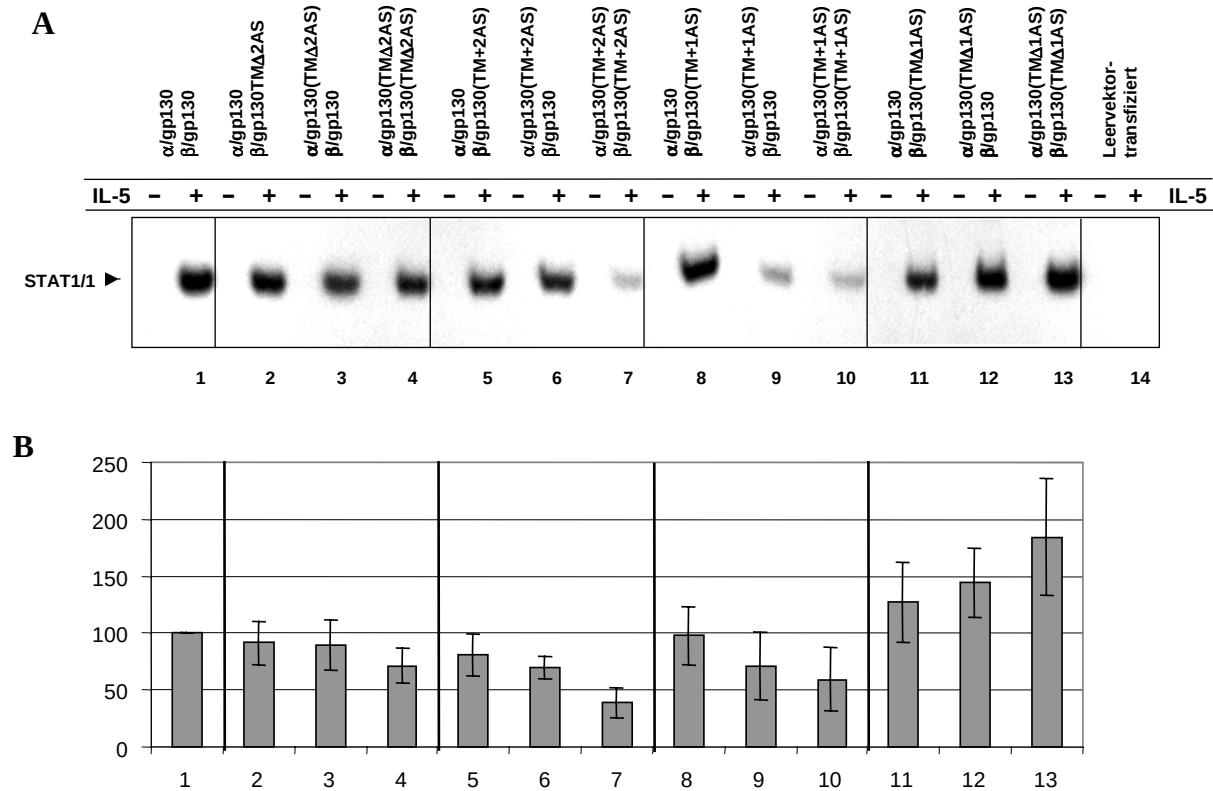


Abb. 27: Einfluß einer Verlängerung oder Verkürzung der TM-Region von gp130 auf die Signaltransduktion

A. COS-7-Zellen wurden mit Expressionsplasmiden für die dargestellten IL-5R α - und IL-5R β -Konstrukte transfiziert. Drei Tage nach der Transfektion wurden die Zellen für 30 min mit IL-5 (80 ng/ml) stimuliert und anschließend Kernextrakte hergestellt. Der EMSA wurde mit der SIE-Probe durchgeführt. Die Position der STAT1-Homodimere ist markiert.

B. Auswertung der STAT-Signale mit Hilfe eines Phosphorimagers (Molecular Dynamics).

4.3.2 Insertionen bzw. Deletionen von Aminosäuren im Transmembranbereich von gp130 demonstrieren die Beteiligung der TM-Region an der Signaltransduktion in stabil transfizierten Ba/F3-Zellen

Da sich die quantitative Auswertung der STAT-Signale transient transfizierter COS-7-Zellen als schwierig herausstellte und sich signifikante Unterschiede nur teilweise nachweisen ließen, wurden die Mutationen innerhalb der TM-Region (TMA2AS, TMA1AS, TM+1AS, TM+2AS) auch in das Wildtyp-gp130-Molekül eingeführt und in stabil transfizierten Ba/F3-Zellen untersucht. Diese Zellen exprimieren kein endogenes gp130, so daß der Effekt von Mutationen im Transmembranbereich des gp130 im Kontext des *full-length*-Rezeptors untersucht werden kann. Die verschiedenen Ba/F3-Klone wurden über eine FACS-Analyse selektiert und einzelne Klone, die ungefähr gleiche Mengen von gp130 auf ihrer Zelloberfläche exprimierten für die Versuche ausgewählt (Abb. 28A).

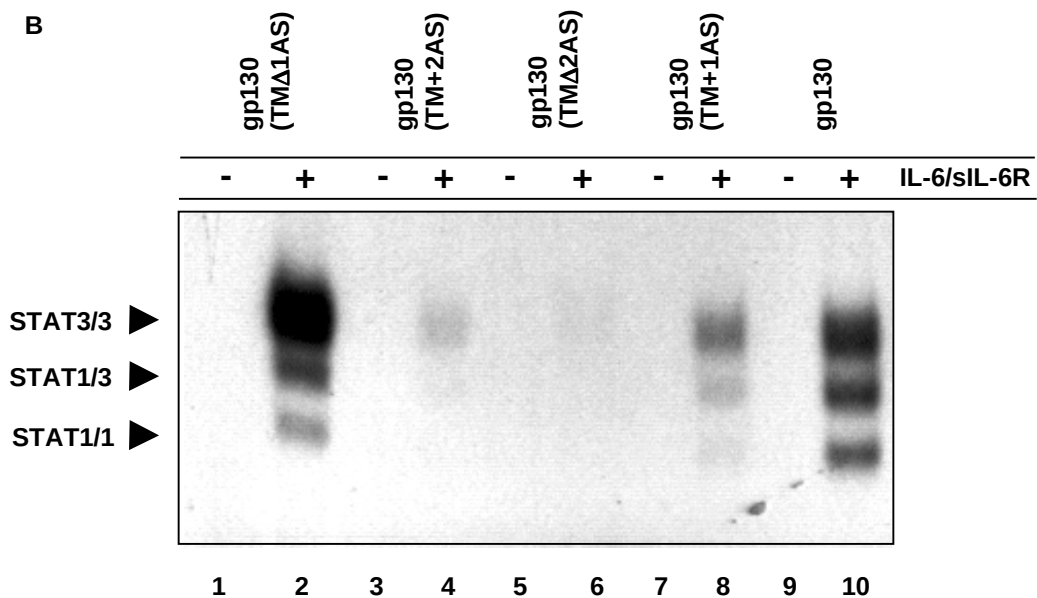
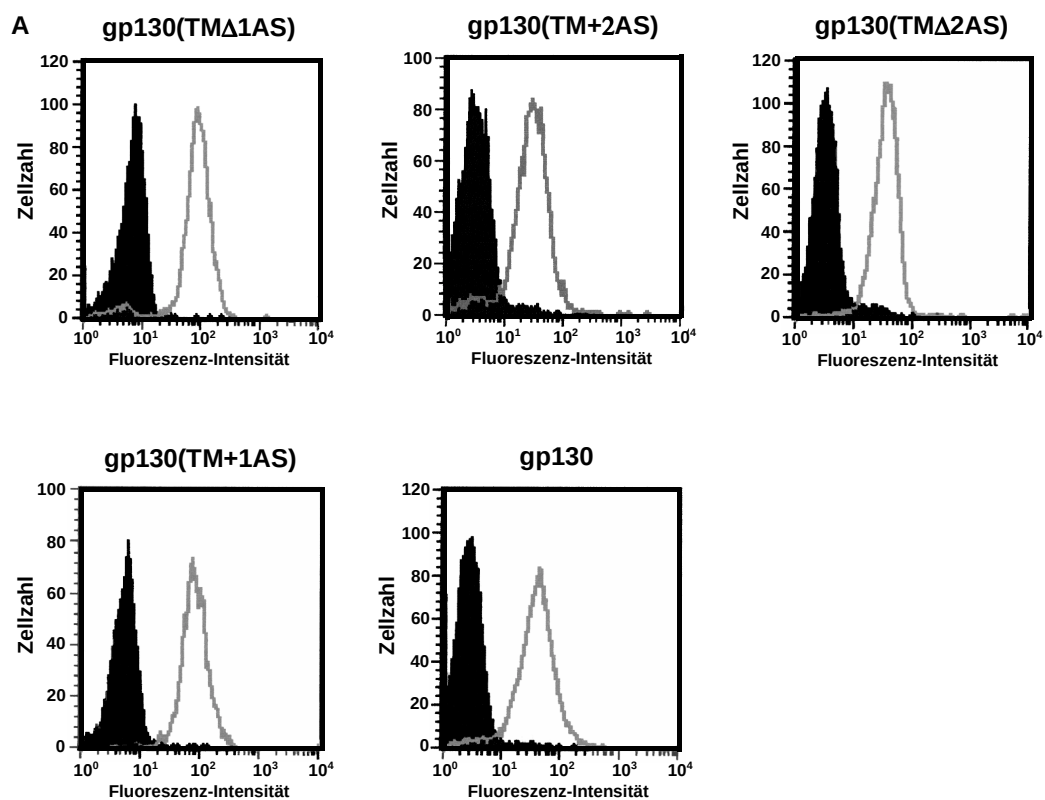
Die Ba/F3-Klone wurden mit IL-6 und einem Überschuß an löslichem IL-6-Rezeptor stimuliert und die Kernextrakte auf aktivierte STAT-Faktoren hin analysiert. Interessanterweise ist eine deutlich voneinander abweichende STAT-Aktivierung der einzelnen Klone nachweisbar, die nicht auf die unterschiedliche Oberflächenexpression der gp130-Mutanten zurückzuführen ist. So führt die Deletion einer Aminosäure im TM-Bereich des gp130 zu einer deutlichen Verstärkung des STAT-Signals im Vergleich zum Wildtyp-gp130 (Abb. 28B, Spur 2 und 10), während die Insertion einer Aminosäure die Rezeptoraktivität herabsetzt (Abb. 28B, Spur 8). Die Deletion bzw. Insertion von zwei Aminosäuren resultiert in nahezu signalinkompetenten Rezeptorkonstrukten (Abb. 28B, Spuren 4 und 6).

Nächste Seite:

Abb. 28: Eine Verlängerung oder Verkürzung der TM-Region von gp130 um eine oder zwei Aminosäuren führt zu unterschiedlichen Signaleffizienzen

A. FACS-Analysen von stabil mit Expressionsplasmiden für die dargestellten Rezeptoren transfizierten Ba/F3-Zellen. Die weißen Histogramme repräsentieren Zellen, die die mutierten gp130-Moleküle exprimieren, während die schwarzen Histogramme Zellen darstellen, die nur mit dem PE-konjugierten Zweitantikörper angefärbt wurden.

B. Stabil transfizierte Ba/F3-Zellen, die die dargestellten gp130-Konstrukte exprimieren, wurden mit IL-6 und löslichem IL-6R für 15 min stimuliert. Anschließend wurden Kernextrakte präpariert und im EMSA unter Verwendung der SIE-Probe analysiert. Die Positionen der STAT1- und STAT3-Homodimere sowie die Position des STAT1/3-Heterodimers sind markiert.



Da sich die Rezeptoren nur in einer oder zwei Aminosäuren vom Wildtyp-Rezeptor unterscheiden, kann aus diesem Experiment die Schlußfolgerung gezogen werden, daß die Transmembranregion des gp130 an der Signaltransduktion teilnimmt.

4.4 Eine Verlängerung oder Verkürzung der gp130-Transmembranregion beeinflusst die Signaltransduktion eines gp130/LIFR-Heterodimers

Um zu überprüfen, ob eine Verlängerung oder Verkürzung der TM-Region des gp130 auch Auswirkungen auf die Signaltransduktion eines gp130/LIFR-Heterodimers haben könnte, wurden die Chimären α /gp130, α /gp130(TM Δ 2AS), α /gp130(TM+2AS) und α /gp130(TM+1AS) gemeinsam mit dem β /LIFR-Konstrukt in COS-7-Zellen koexprimiert. Wie bereits zuvor beobachtet, fällt die Signaltransduktion durch ein α /gp130 + β /LIFR-Dimer schwächer aus als durch ein α /gp130 + β /gp130-Dimer (Abb. 29, Spur 4 im Vergleich zu Spur 2). Ein α /LIFR + β /LIFR-Dimer signalisiert - wie schon in Abb. 9 gezeigt - in COS-7-Zellen nicht (Abb. 29, Spur 12). Interessanterweise wirkt sich eine Verlängerung oder Verkürzung der gp130-TM-Region auch in einer verminderten STAT1-Aktivierung aus, wenn diese mutierten Bereiche mit der LIFR-TM-Region dimerisiert werden (Abb. 29, Spuren 6, 8 und 10).

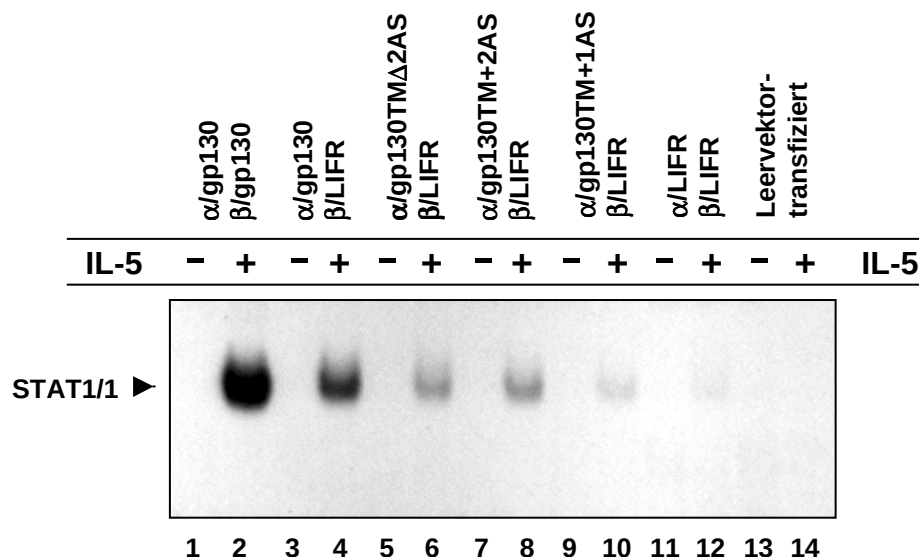


Abb. 29: Die Signaltransduktion des gp130/LIFR-Komplexes wird durch Verlängerung oder Verkürzung der gp130-Transmembranregion negativ beeinflusst

COS-7-Zellen wurden mit Expressionsplasmiden für die dargestellten IL-5R α - und IL-5R β -Konstrukte transfiziert. Drei Tage nach der Transfektion wurden die Zellen für 30 min mit IL-5 (80 ng/ml) stimuliert und anschließend Kernextrakte hergestellt. Der EMSA wurde mit der SIE-Probe durchgeführt. Die Position der an die SIE-Probe gebundenen STAT1-Homodimere ist markiert.

IV Diskussion

1. Gp130 und der LIFR sind in ihrer signaltransduzierenden Fähigkeit hoch redundant

Die Familie der IL-6-Typ Zytokine verfügt über drei signaltransduzierende Rezeptorketten: gp130, welches von allen sieben Mitgliedern der Familie als Rezeptoruntereinheit genutzt wird sowie den LIFR und den OSMR, die nur von einigen der Zytokine benötigt werden. Im ersten Teil dieser Arbeit wurden die Rezeptorketten gp130 und LIFR hinsichtlich spezifischer und redundanter Funktionen untersucht. Um das Problem der ubiquitären Expression von gp130 zu umgehen, wurde mit chimären Rezeptoren gearbeitet, die im extrazellulären Bereich aus den beiden Ketten des IL-5-Rezeptors bestehen und den Transmembranbereich sowie die intrazelluläre Region des gp130 enthalten. Die Funktionalität dieses Rezeptorsystems war bereits früher demonstriert worden (10). Es konnte für COS-7-Transfektanten gezeigt werden, daß eine Aktivierung der Rezeptoren abhängig von der Anwesenheit beider IL-5-Rezeptorketten ist: weder α /gp130 noch β /gp130 alleine ist in der Lage, STAT1 zu aktivieren. Außerdem legten die Studien nahe, daß die beobachtete STAT-Aktivierung eher von Dimeren aus IL-5R α - und IL-5R β -Rezeptoren resultierte als von höheren Rezeptoraggregaten. Das System erschien somit geeignet, um daran die Signaltransduktion von heterodimeren Rezeptorkomplexen wie gp130/LIFR zu untersuchen.

Aus der Literatur ist bekannt, daß die Stimulation verschiedener Zellen sowohl mit IL-6 als auch mit LIF zu einer Aktivierung der Transkriptionsfaktoren STAT1 und STAT3 führt, wobei IL-6 nach Bindung an seinen α -Rezeptor über ein gp130/gp130-Homodimer signalisiert (91), LIF aber über ein gp130/LIFR-Heterodimer (39). In einem EMSA konnte demonstriert werden, daß die beiden entsprechenden chimären Rezeptorkomplexe STAT1 und STAT3 aktivieren (Abb. 4A), auch wenn der heterodimerisierte Rezeptorkomplex α /gp130 + β /LIFR ein schwächeres Signal vermittelt als α /gp130 + β /gp130. Eine geringere Oberflächenexpression der IL-5R/LIFR-Chimären konnte nach durchflußzytometrischen Analysen als Grund für die schwächere STAT-Aktivierung ebenso ausgeschlossen werden wie eine unterschiedliche Zeitkinetik der Phosphorylierung: gp130- und LIFR-Chimären werden ungefähr gleich gut exprimiert, die LIFR-Sequenzen enthaltenden Rezeptoren sogar geringfügig besser (Abb. 4B), und beide Rezeptorkomplexe zeigen ein Maximum der STAT1-Aktivierung nach 30 min IL-5-Stimulation (Abb. 4C). Ebenso unwahrscheinlich ist es, daß der Rezeptorkomplex aus α /gp130 + β /LIFR (oder α /LIFR + β /gp130) IL-5 mit niedrigerer

Affinität bindet, da gezeigt wurde, daß die Affinität von IL-5 zu seinem Rezeptor nicht vom zytoplasmatischen Bereich beeinflusst zu sein scheint. So führte selbst der Verlust des gesamten intrazellulären Bereiches an einer der Rezeptoruntereinheiten nicht zum Affinitätsrückgang (10). Möglicherweise liegt die schwächere STAT-Aktivierung eines gp130/LIFR-Heterodimers im Vergleich zum gp130/gp130-Homodimer in einer fehlenden Signaltransduktionsfähigkeit des LIFR begründet. Sollte der LIFR nicht in der Lage sein, STAT-Faktoren zu rekrutieren, sondern nur die zur Rezeptoraktivierung notwendigen Janus-Kinasen in den Komplex einbringen, wäre zu erwarten, daß die Signalstärke eines gp130/LIFR-Heterodimers um 50% geringer wäre als die eines gp130/gp130-Homodimers, welches über beide zytoplasmatischen Bereiche STATs rekrutieren kann. In den folgenden Experimenten sollte die signaltransduzierende Kapazität des LIFR näher untersucht werden. Dazu wurde eine Rezeptorchimäre generiert, die nur die membranproximalen 72 Aminosäuren der LIFR-Sequenz enthält, β /LIFR-B1/2. Diese Region umfaßt die Box1/2-Region, von der bereits für andere Zytokinrezeptoren beschrieben wurde, daß sie zur Rekrutierung der Janus-Kinasen ausreicht. Da ein Dimer aus α /gp130 + β /LIFR-B1/2 eine STAT1-Aktivierung erlaubt, ein Dimer aus α /gp130 + β / Δ cyt (einer Chimäre, der der zytoplasmatische Bereich bis auf drei Aminosäuren fehlt) hingegen nicht (Abb. 5), kann die Schlußfolgerung gezogen werden, daß der membranproximale Bereich des LIFR notwendig für die Signaltransduktion des Heterodimers ist. Experimente, in denen β /LIFR mit den drei Kinasen Jak1, Jak2 und Tyk2 koexprimiert wurde, zeigten, daß der zytoplasmatische Bereich des LIFR - genau wie gp130 - in der Lage ist, alle drei Kinasen zu binden (Abb. 6). Der membranproximale Bereich ist für diese Rekrutierung ausreichend (Abb. 7). Ist der LIFR aber auch befähigt, STAT-Faktoren zu rekrutieren und damit deren Aktivierung zu erlauben? Um diese Frage zu beantworten, wurden COS-7-Zellen mit α /gp130-B1/2 + β /LIFR transfiziert, einer Kombination, bei der nur der LIFR über Box2-C-terminale Tyrosinreste verfügt. Tatsächlich konnten in den so transfizierten Zellen aktivierte STAT-Faktoren nachgewiesen werden (Abb. 5), was nahelegt, daß der LIFR über Tyrosinreste verfügt, die STAT1 und STAT3 rekrutieren können. Analysiert man die zytoplasmatische Sequenz des LIFR, so fallen drei Tyrosinreste auf, deren umgebende Sequenzen einer STAT1- sowie einer STAT3-Konsensussequenz (40) entsprechen: Y981 (YQPQ), Y1001 (YKPK) und Y1028 (YRPQ). Gp130 besitzt dagegen vier STAT-Rekrutierungsstellen (40), was die schwächere Aktivierung dieser Faktoren am LIFR im Vergleich zum gp130 erklären könnte.

Bisherige Studien zur Signaltransduktion des LIFR beschränken sich auf physiologisch bislang nicht beschriebene homodimerisierte Rezeptorketten. Da der LIFR - wie zuvor

erwähnt - in der Lage ist, sowohl Jaks als auch STATs zu rekrutieren, sollte aber theoretisch auch ein in homodimerer Weise vorliegender LIFR signalisieren können. In COS-7-Zellen war jedoch keine STAT1-Aktivierung eines α /LIFR + β /LIFR-Dimers nachweisbar (Abb. 9A). Durch Austausch der IL-5R-Extrazellulärregion der verwendeten chimären Rezeptoren gegen den entsprechenden Bereich des EpoR konnte ausgeschlossen werden, daß die fehlende Signaltransduktion auf den Extrazellulärbereich zurückzuführen ist (Abb. 9B). Im Gegensatz dazu haben andere Arbeitsgruppen beobachtet, daß chimäre LIFR-Homodimere sehr wohl in der Lage waren, STAT-Faktoren zu aktivieren (7, 31, 128). Eine mögliche Erklärung dieser Diskrepanz liefern Ergebnisse von Starr *et al.* (129), die zeigen konnten, daß ein zytoplasmatisch homodimerisierter LIFR zwar in embryonalen Stammzellen signalisieren kann, nicht jedoch in M1 promyeloiden Zellen oder Ba/F3 prä-B-Zellen. Ähnliche Befunde liefert diese Arbeit: wie bereits erwähnt, ist ein α /LIFR + β /LIFR-Dimer in COS-7-Zellen nicht in der Lage, STAT-Faktoren zu aktivieren (Abb. 9A), in MCF-7-Zellen hingegen aktiviert es ein α 2M-Promotor-reguliertes Reportergen nur unwesentlich schlechter als ein zytoplasmatisch homodimerisiertes gp130 (Abb. 11). Der LIFR scheint also - in Abhängigkeit vom Zelltyp - auch in homodimerisierter Form zur Signaltransduktion fähig zu sein.

2. Spezifität und Aktivierung der Janus-Kinasen

2.1 Die Janus-Kinasen Jak1, Jak2 und Tyk2 zeigen unterschiedliche Phosphorylierungspotentiale

Wie bereits zuvor erwähnt, ist gp130 in der Lage, die Janus-Kinasen Jak1, Jak2 und Tyk2 zu rekrutieren (Abb. 6, (62)). Ob tatsächlich auch alle drei Kinasen aktiv an einer gp130-vermittelten Signaltransduktion teilnehmen ist aber noch unklar. In Studien mit Jak-defizienten Fibrosarkomzellen konnte gezeigt werden, daß die Kinase Jak1 absolut notwendig für eine IL-6-induzierte Signaltransduktion ist. Fehlt diesen Zellen Jak1, so ist keine STAT-Aktivierung mehr nachweisbar. Das Fehlen von Jak2 oder Tyk2 hingegen hat weniger dramatische Auswirkungen; die STAT-Aktivierung und Induktion von Zielgenen bleibt unbeeinträchtigt (45). Aus diesen Ergebnissen läßt sich aber nicht schlußfolgern, daß keine weitere Kinase außer Jak1 für die IL-6-vermittelte Signaltransduktion notwendig ist. Es könnte vielmehr so sein, daß Jak2 und Tyk2 sich gegenseitig ersetzen können. In Studien von Kohlhuber *et al.* (63) konnte gezeigt werden, daß für das IFN- α/β und IFN- γ -System die Kinasedomäne von Jak1 durch die von Jak2 ersetzt werden kann. Ob ähnliches auch für eine

gp130-vermittelte Signaltransduktion gilt und welche Tyrosinreste des gp130 von welcher Kinase phosphoryliert werden, ist jedoch noch unklar.

Um dieser Frage nachzugehen, wurde die Rezeptorchimäre β /gp130 mit einer der Kinasen Jak1, Jak2 oder Tyk2 in COS-7-Zellen koexprimiert. Diese Überexpression von Janus-Kinasen führt zu einer ligandenunabhängigen Phosphorylierung von Zytokinrezeptoren (105). Es konnte festgestellt werden, daß die Koexpression von β /gp130 mit Jak1 oder mit Jak2 ein vergleichbares Koimmunpräzipitationsmuster von STAT1, STAT3 und SHP2 erlaubt. Diese Kinasen sind also in der Lage, gp130 an Tyrosinresten zu phosphorylieren, die diese Proteine binden. Die für STAT3, STAT1 und SHP2 festgestellte geringere Koimmunpräzipitation nach Überexpression von Jak2 könnte auf eine geringere Expression dieser Kinase im Vergleich zu Jak1 zurückzuführen sein. Aufgrund der unterschiedlichen Antikörper gegen die einzelnen Kinasen kann aber deren Expressionsmenge nicht direkt miteinander verglichen werden. Interessanterweise weist die Koexpression von Tyk2 mit β /gp130 ein von den anderen Kinasen verschiedenes Koimmunpräzipitationsmuster auf. Sowohl in Versuchsansätzen mit Jak1 als auch mit Jak2 werden STAT3 und SHP2 in vergleichbaren Mengen präzipitiert, STAT1 hingegen deutlich geringer. Nach Tyk2-Koexpression wird SHP2 dagegen kaum nachweisbar mit gp130 koimmunpräzipitiert, was vermuten läßt, daß Tyk2 nicht oder kaum in der Lage ist, den Tyrosinrest 759 des gp130 zu phosphorylieren. Dies könnte ein erster Hinweis darauf sein, daß die Janus-Kinasen eine Spezifität hinsichtlich bestimmter Tyrosinmotive besitzen.

Da STAT3 mit höherer Affinität von gp130 gebunden wird als STAT1 - vergleicht man die immunpräzipitierte Menge mit der im Lysat vorhandenen Menge - bleibt ungeklärt, warum in COS-7-Zellen keine STAT3-Dimere in Gelshift-Experimenten nachgewiesen werden können. Vielleicht benötigt STAT3 einen weiteren akzessorischen Transkriptionsfaktor, um an DNA-Elemente binden zu können, der den COS-7-Zellen fehlt, in anderen Zellen wie HepG2-Zellen aber vorhanden ist. Weiterhin wäre durchaus denkbar, daß das STAT3-Protein in COS-7-Zellen eine Mutation in der DNA-Bindungsdomäne enthält, wodurch zwar seine Phosphorylierung, nicht aber die DNA-Bindung ermöglicht wird.

2.2 Die Positionierung der Box1/2-Region erscheint kritisch für die Jak-Aktivierung

Untersuchungen der Aktivierung von STAT-Proteinen haben gezeigt, daß die Positionen der rekrutierenden Tyrosinreste im Kontext ihrer Konsensussequenzen innerhalb des gp130-Moleküls relativ unkritisch sind (40). Die Box1/2-Region scheint hingegen keinen

Modulcharakter zu besitzen. Ein Transfer dieses Bereiches von der Membran in Richtung C-Terminus führte zu einem Verlust der Rezeptoraktivierbarkeit (Abb. 13B). Erste Versuche deuten darauf hin, daß nicht erst die Aktivierung der Kinasen, sondern schon deren Rekrutierung an gp130 verhindert wird. Ein Sequenzvergleich der verschiedenen Zytokinrezeptoren zeigt, daß die Box1/2-Region generell in Membrannähe lokalisiert ist. Wäre es möglich, daß Jaks nur mit Proteinen in Membrannähe interagieren können, weil sie selbst über einen bislang nicht identifizierten Membrananker dort fixiert sind? Für verschiedene, an der Signaltransduktion beteiligte Proteine ist bereits nachgewiesen, daß sie entweder über Lipidanker (z.B. p21 Ras-Proteine (109), Src-Kinasen (21)) oder Pleckstrin-Homologie-Domänen (68) an die Membran binden. Sequenzanalysen der Janus-Kinasen weisen Konsensussequenzen auf, die eine Myristylierung des Proteins erlauben würden. Bislang konnte aber keine solche Modifikation der Janus-Kinasen beobachtet werden. Andererseits wäre es natürlich durchaus denkbar, daß der membranproximale Bereich der Zytokinrezeptoren eine dreidimensionale Struktur einnimmt - was aber aufgrund der Anwesenheit vieler Prolinreste eher unwahrscheinlich ist -, die durch den Transfer in Richtung C-Terminus zerstört wird. Da aber bislang keine Daten zur Struktur des intrazellulären Bereichs von Zytokinrezeptoren vorliegen, bleibt auch diese Erklärung eine Hypothese. Erste Versuche mit chimären Rezeptoren, bei denen nur drei Aminosäuren in die Region zwischen Membran und Box1 von gp130 eingefügt wurden, bestätigen die Anfälligkeit dieses Bereiches gegenüber Mutationen; dieser Einschub reicht aus, um die Signalfähigkeit des Rezeptors deutlich herabzusetzen. Die Box1/2-Region des gp130 muß also membrannah vorhanden sein, um die Aktivierung und wahrscheinlich auch die Bindung der Janus-Kinasen zu erlauben.

3. Der OSMR rekrutiert spezifisch das Adaptorprotein Shc

Im ersten Teil dieser Arbeit wurde festgestellt, daß der LIFR und gp130 hochgradig redundante Fähigkeiten besitzen, d.h. beide sind in der Lage, die drei Janus-Kinasen Jak1, Jak2 und Tyk2 zu binden und beide können die Transkriptionsfaktoren STAT1 und STAT3 aktivieren (wenn auch in unterschiedlichem Ausmaß). Dies erklärt, warum nach IL-6- oder LIF-Stimulation überwiegend gleiche Signalwege aktiviert werden. In HepG2-Hepatomzellen konnte nach IL-6- bzw. LIF-Stimulation eine äquivalente STAT3- und Erk1/2-Aktivierung nachgewiesen werden (Abb. 14). Interessanterweise unterscheidet sich OSM hinsichtlich der Intensität seiner induzierten Signale von IL-6 und LIF: eine OSM-Stimulation führt zu einer stärkeren Aktivierung von STAT3 und Erk1/2 als eine Stimulation mit IL-6 oder LIF (Abb.

14, (139)). Der Mechanismus, über den OSM eine so starke Aktivierung der Erks bewirkt, war bislang noch ungeklärt. In der hier vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß OSM eine deutlich bessere Phosphorylierung des Adaptorproteins Shc induziert als IL-6 und LIF (Abb. 15). Shc wiederum kann die Aktivierung des Ras/Raf/MAPK-Weges vermitteln, der zur Phosphorylierung von Erk1/2 führt. Die besonders effiziente Aktivierung von Shc nach OSM-Stimulation konnte auf eine spezifische Rekrutierung des Proteins an den OSMR zurückgeführt werden (Abb. 18).

Das Adaptorprotein Shc tritt in drei Isoformen auf: p46, p52 und p66. Die 46 kDa- und 52 kDa-Isoformen entstehen aufgrund alternativ genutzter Translationsinitiationsstellen des gleichen Transkripts, während p66 ein Produkt alternativ gespleißter mRNA darstellt. P46 und p52 werden ubiquitär exprimiert, die p66-Isoform ist beschränkt auf Zellen epithelialen Ursprungs (85). Als reine Adaptorproteine besitzen sie keine katalytische Funktion, sondern Domänen, die der Rekrutierung anderer Proteine dienen, in ihrem speziellen Fall eine SH2- und eine PTB-Domäne. Beide Domänen binden phosphorylierte Tyrosinreste anderer Proteine.

Die Rekrutierung von Shc ist bereits für Rezeptoren unterschiedlicher Familien beschrieben worden. Dabei werden für die Bindung sowohl die PTB-Domäne von Shc (6, 26, 67) als auch seine SH2-Domäne (22, 102, 108, 148) verantwortlich gemacht. Das Vorhandensein zweier Rekrutierungsstellen innerhalb einer Rezeptorkette könnte aufgrund einer kooperativen Bindung zu einer stabileren Interaktion von Shc mit dem Rezeptor führen (114). Mit Hilfe von Rezeptordeletionen konnte gezeigt werden, daß der OSMR in der Lage ist, die Shc-Proteine p52 und p66 über eine Region zwischen Aminosäure 836 und 866 seines zytoplasmatischen Bereichs zu binden (Abb. 18). Eine Rekrutierung von p46 konnte in der Immunpräzipitation aufgrund der Komigration dieses Proteins mit der schweren Kette des präzipitierenden Antikörpers weder bestätigt noch ausgeschlossen werden. Durch Punktmutationen der Tyrosinreste 837 und 861 des OSMR wurde deren Beteiligung an der Bindung von Shc demonstriert. Da Y837 innerhalb einer Konsensussequenz zur Erkennung der Shc-SH2-Domäne liegt (pY-[I/L/E/Y]-X-[I/L/M]) (126) und Y861 die Bedingungen für eine Rekrutierung der PTB-Domäne von Shc erfüllt (Φ -[D/E]-N-X-X-pY) (66), kann auch für den OSMR angenommen werden, daß Shc über beide Domänen an den Rezeptor bindet. Der Tyrosinrest 861 stellte sich in Koimmunpräzipitationsstudien als der kritischere Interaktionspartner heraus, da seine Mutation zu Phenylalanin (Y861F) zu einem vollständigen Verlust der Shc-Bindung führte, während die Mutation Y837F noch eine minimale Bindung von Shc an den OSMR (Abb. 20) zuließ. Diese Ergebnisse deuten darauf

hin, daß Shc zunächst über seine PTB-Domäne an den OSMR bindet und anschließend durch Bindung der SH2-Domäne die Affinität erhöht wird.

Nachdem demonstriert werden konnte, daß eine Mutation des Y861 die Fähigkeit des OSMR zur Assoziation mit Shc verhindert, wurde untersucht, ob dieser Aminosäurerest auch an der Aktivierung der MAP-Kinasen Erk1/2 beteiligt ist. Dazu wurden die β /OSMR-Konstrukte gemeinsam mit dem Rezeptor α /gp130YFFFFFF in COS-7-Zellen koexprimiert. In diesem Rezeptorkonstrukt α /gp130YFFFFFF sind alle Tyrosinreste C-terminal zur Box2-Region gegen Phenylalanin ausgetauscht, was eine Aktivierung des Ras/Raf/MAPK-Weges über gp130 verhindert, da auch der Tyrosinrest 759, der SHP2 bindet, mutiert ist (36, 118). Eine Mutation des Y861 im OSMR, die einen vollständigen Verlust der Shc-Bindung zur Folge hat, führte zu einer starken Reduzierung der Phosphorylierung von Erk1/2, während der Austausch von Y837 einen geringeren Einfluß auf die Shc-Rekrutierung und keinen Einfluß auf die Erk1/2-Aktivierung hat (Abb. 21). Die Shc-Rekrutierung könnte somit an der Aktivierung der MAP-Kinasen beteiligt sein. Weiterhin konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, daß Shc nach OSM-Stimulation das Adaptorprotein Grb2 rekrutiert (Abb. 15). Der Weg einer Shc-vermittelten Erk1/2-Aktivierung könnte somit folgendermaßen skizziert werden: Shc bindet über seine PTB- und SH2-Domäne an den OSMR, wird dort von noch nicht identifizierten Tyrosinkinasen phosphoryliert und assoziiert so mit dem Adaptorprotein Grb2. Eine Beteiligung der Src-Kinasen an der Phosphorylierung von Shc, die von mehreren Studien vorgeschlagen wurde (78, 101, 117), stellte sich nach Versuchen mit einem Src-Kinase-spezifischen Inhibitor als eher unwahrscheinlich heraus (Abb. 16). Grb2 rekrutiert seinerseits den Guaninnukleotid-Austausch-Faktor Sos, der dann Ras aktiviert. Der weitere Verlauf der Signalkaskade von Ras zu MEK-1 und damit den Erks ist sehr gut beschrieben (3).

Für die Signaltransduktion des EGFR liegen bereits eindeutige Beweise für einen solchen Ablauf der Signaltransduktion vor. Nach EGF-Stimulation bindet Shc an den EGFR und es erfolgt eine Phosphorylierung der Tyrosinreste 239, 240 und 317 von Shc. Mutiert man Y317 zu Phenylalanin, so ist ein Rückgang der Assoziation von Shc mit Grb2 und der Aktivierung der MAP-Kinasen Erk1/2 beobachtbar. Interessanterweise hat die Mutation Y239/240F keine Auswirkung auf die Erk1/2-Aktivierung. Sie führt aber zu einer Reduktion der EGF-induzierten mRNA-Menge für *c-myc* (44). Dies deutet bereits darauf hin, daß die Shc-Proteine - nach spezifischer Phosphorylierung ihrer Tyrosinreste - Signale in verschiedene Richtungen lenken können, was mit Hinblick auf eine Spezifität einer OSM-vermittelten Signaltransduktion von besonderem Interesse ist.

Hinzu kommt, daß die unterschiedlichen Isoformen von Shc auch verschiedene Signalfunktionen übernehmen können. So wird die p66-Isoform zwar nach EGF-Stimulation phosphoryliert und bildet stabile Komplexe mit Grb2, induziert aber im Gegensatz zu den p46/p52-Isoformen nicht die Erhöhung der MAP-Kinasen-Aktivität (85). Diese Ergebnisse wurden erweitert durch Daten von Okada *et al.*, die zeigten, daß die p66- und p46/p52-Isoformen um eine limitierte Menge von Grb2-Proteinen konkurrieren und daß eine Überexpression der p66-Isoform die Inaktivierung von Erks nach EGF-Stimulation beschleunigt (99). Zusätzlich wurde p66 Shc als Sensor oxidativen Stresses beschrieben und scheint an der Determination der Lebensspanne von Säugetieren beteiligt zu sein (84).

Interessanterweise scheinen sowohl die Bindung von Shc an den OSMR als auch die Aktivierung von Erk1/2 nicht die Tyrosinphosphorylierung der STAT-Proteine zu beeinflussen. Sowohl nach Austausch von Y837 als auch von Y861 im OSMR gegen Phenylalanin konnte eine effiziente Tyrosinphosphorylierung von STAT3 nachgewiesen werden. Diese ist notwendig für eine Dimerisierung der STATs, deren Kernlokalisation und DNA-Bindung. Dennoch führt ein Verlust der Fähigkeit zur Erk-Aktivierung zu einem deutlichen Rückgang der induzierten Transkription eines α 2M-induzierten Reportergens (Abb. 22). Wenn die MAP-Kinasen keinen -indirekten- Einfluß auf die Tyrosinphosphorylierung von STAT3 haben, welche Rolle spielen sie dann? Da es sich bei den MAP-Kinasen um Serin-/Threoninkinasen handelt und die Serinreste 727 von STAT1 und STAT3 innerhalb einer MAPK-Phosphorylierungs-Konsensussequenz liegen (P-X-S-P), werden sie immer noch als mögliche Serinkinasen der STATs diskutiert. Studien von Chung *et al.* haben jedoch gezeigt, daß die STAT3-Serinphosphorylierung zwar nach Stimulation mit Wachstumsfaktoren wie EGF Erk1/2-abhängig verläuft, nach IL-6-Stimulation jedoch eindeutig unabhängig von den Kinasen dieser Familie ist. Es konnte schließlich gezeigt werden, daß die Proteinkinase C-Isoform δ (PKC δ) IL-6-abhängig mit STAT3 assoziiert und dieses an S727 phosphoryliert (56). Doch bevor PKC δ STAT3 serinphosphorylieren kann, muß die Kinase selbst aktiviert werden. Wie dies geschieht und ob Shc oder Erk1/2 eventuell an diesem Mechanismus beteiligt sind, ist noch unklar. Eine weitere Möglichkeit, wie Erk1/2 an der effizienten Genaktivierung beteiligt sein könnten, läge in der Aktivierung eines Transkriptionsfaktors, der kooperativ mit STAT1/3 an der Induktion des α 2M-Promotors beteiligt ist.

4. Der Einfluß der Transmembrandomäne auf die Signaltransduktion durch gp130

4.1 Die gp130-Transmembranregion kann durch die entsprechende Region der IL-5-Rezeptoren ersetzt werden

Mit Hilfe von chimären Rezeptorkonstrukten, deren Transmembranregion nicht die gp130-Sequenz, sondern die entsprechende Sequenz der IL-5-Rezeptoren enthält, konnte gezeigt werden, daß eine gp130-vermittelte Signaltransduktion nicht essentiell von dessen TM-Region abhängt. Ein Dimer aus $\alpha(\text{TM})/\text{gp130} + \beta(\text{TM})/\text{gp130}$ konnte nach IL-5-Stimulation eine ebenso effiziente Signaltransduktion induzieren, wie ein entsprechendes Dimer, das die TM-Region des gp130 enthält ($\alpha/\text{gp130} + \beta/\text{gp130}$) (Abb. 23). Diese Ergebnisse stehen im Kontrast zu einer Studie von Kim *et al.*, in der postuliert wurde, daß die gp130-Transmembranregion kritisch für eine Signaltransduktion ist (61). In besagter Studie wurden Fusionsproteine aus BCR und gp130 hergestellt, die entweder den Transmembranbereich des gp130 enthielten oder nicht. Die Proteine wurden zytoplasmatisch exprimiert und tetramerisierten über eine N-terminale Domäne des BCR. Nur ein Fusionsprotein, welches die gp130-Transmembranregion enthielt, war in der Lage, eine Geninduktion von IL-6-responsiven Elementen zu induzieren. Zum einen blieb in dieser Arbeit die Frage völlig ungeklärt, wie ein Protein, welches eine TM-Region besitzt, sich im Zytoplasma verhält, zum anderen wird im Kontrollfusionsprotein die gp130-Transmembranregion nicht durch einen äquivalent langen *Linker* ersetzt, sondern lediglich deletiert. Die Signalinkompetenz des BCR/gp130(ΔTM)-Konstruktes könnte also auch darin begründet liegen, daß sich der gp130-Anteil zu nah am BCR-Anteil befindet, um wichtige Proteine zu rekrutieren.

Nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit ist die gp130-Transmembranregion durch entsprechende Bereiche der IL-5-Rezeptoren ersetzbar. Für eine effiziente Signaltransduktion ist es jedoch unerlässlich, daß beide Rezeptorketten physiologisch miteinander dimerisierende TM-Bereiche besitzen. So konnten zwar Dimere aus $\alpha(\text{TM})/\text{gp130} + \beta(\text{TM})/\text{gp130}$ und aus $\alpha/\text{gp130} + \beta/\text{gp130}$ effizient STAT1 aktivieren, wurden aber Rezeptorkonstrukte eingesetzt, die zu einer Heterodimerisierung einer IL-5R- und einer gp130-Transmembranregion führten, war nur eine deutlich verminderte Signaltransduktion möglich. Diese Beobachtung läßt die Hypothese zu, daß es innerhalb der TM-Regionen Interaktionsbereiche oder eventuell sogar Dimerisierungsstellen geben könnte, die einen Beitrag zur Signalweiterleitung leisten.

Diese Hypothese konnte durch Einführung von Punktmutationen in die Transmembranregion des gp130-Moleküls untermauert werden. Eine Punktmutation der Threoninreste 632 und 633

sowie der Cysteinreste 626 und 640 führte zu einer Abschwächung der Signaltransduktion (Abb. 24). Dabei zeigte die Mutation C640S den stärksten Effekt. Ein Sequenzvergleich von gp130, LIFR und OSMR zeigte, daß dieser Aminosäurerest in allen drei Rezeptor-transmembranregionen konserviert ist, was darauf hindeuten könnte, daß er eine besondere Rolle spielt. Auf welche Art die Aminosäuren an einer möglichen Interaktion der TM-Regionen beteiligt sind, ist noch unklar. Es wäre denkbar, daß die Threoninreste über Wasserstoffbrücken miteinander wechselwirken und somit eine Dimerisierung zweier Rezeptorketten stabilisieren. Ein ähnlicher Mechanismus wurde für eine onkogene Form des ErbB2-Rezeptors vorgeschlagen, bei der ein Valinrest in der TM-Region gegen Glutaminsäure ausgetauscht ist (V664E). Diese liegt in der Membran protoniert vor und könnte somit Wasserstoffbrücken ausbilden (18). Für die Cysteinreste kann ausgeschlossen werden, daß sie ebenfalls über hydrophile Wechselwirkungen an einer effizienten Signaltransduktion beteiligt sind, da sie gegen Serinreste ausgetauscht wurden. Diese sollten in der Lage sein, die hydrophilen Attribute von Cysteinen zu übernehmen. Ob die Cysteinreste an der Ausbildung von Disulfidbrücken beteiligt sein könnten, ist aufgrund des chemischen Umfeldes in der Membran umstritten. Vielleicht ist auch eine Interaktion mit anderen an der Signalweiterleitung beteiligten Proteinen gestört. Zukünftige Studien sollen den Mechanismus der Beteiligung der Threonine und Cysteine an der Signaltransduktion klären.

4.2 Die Anzahl der Aminosäuren innerhalb der Transmembranregion beeinflusst die Signaltransduktion

In der Literatur ist bislang umstritten, ob die bloße Dimerisierung von Rezeptormolekülen ausreicht, um die Signaltransduktion einzuleiten oder ob die Ligandenbindung auch die Information einer Orientierungsänderung in Richtung Zytoplasma übermittelt. Erste eindeutige Hinweise lieferten Studien mit monoklonalen Antikörpern. Diese sind über ihre Bivalenz befähigt, Rezeptoren zu dimerisieren. Dennoch sind bisher nur wenige monoklonale Antikörper bekannt, die auch zu einer Rezeptoraktivierung führen können. Für gp130 wurde in früheren Studien der monoklonale Antikörper B-S12 als agonistischer Antikörper beschrieben (142). Mittlerweile ist jedoch klar, daß dieser nicht in reiner Form vorlag, sondern ein Gemisch zweier Antikörper repräsentierte. Nach Aufreinigung der beiden Fraktionen konnte demonstriert werden, daß eine gp130-Aktivierung nur von einer Kombination aus zwei monoklonalen Antikörpern – von denen einer auch als Fab-Fragment vorliegen kann - erzielt werden kann (90). Das könnte bedeuten, daß ein Antikörper die

Dimerisierung bewirkt und der zweite die Konformationsänderung, die die zytoplasmatischen Bereiche in eine Orientierung zueinander bringt, die für die effektive Signalweiterleitung von Nöten ist. Auch Studien an den Rezeptortyrosinkinasen legen nahe, daß die zytoplasmatischen Bereiche eine definierte Orientierung relativ zueinander haben müssen, um signalkompetent zu sein (14). Doch wie übermittelt der Extrazellulärbereich nach Ligandenbindung seine Informationen ins Zytoplasma? Jede Information zur Orientierungsänderung setzt voraus, daß der intrazelluläre Bereich eine Struktur annehmen muß, die erkennt was „außen“ vorgeht. Das würde bedeuten, daß die Flexibilität im Übergang extrazellulär-transmembran und transmembran-intrazellulär nicht so groß sein darf, daß Konformationsänderungen aufgefangen werden. Befunde in Studien der Rezeptortyrosinkinasen, die vorschlugen, daß die Transmembranregion dieser Rezeptoren eine α -helikale, starre Struktur annehmen, boten eine erste Erklärung für die Weiterleitung einer Orientierungsänderung (14).

Betrachtet man die Transmembranregion des gp130 als α -Helix, so könnten Deletionen/Insertionen von Aminosäuren in diese Helix eine Rotation bewirken und damit möglicherweise eine veränderte Signaltransduktion. In der Tat konnte mit Hilfe der Konstrukte gp130(TM Δ 1AS), gp130(TM Δ 2AS), gp130(TM+1AS) und gp130(TM+2AS) gezeigt werden, daß die Deletion einer Aminosäure (T633) in der Transmembrandomäne ein gp130-Molekül erzeugte, das im Vergleich zum Wildtyp-gp130 sogar noch signalkompetenter war, während die Deletion einer weiteren Aminosäure (T633/L634) einen nahezu signalinkompetenten Rezeptor generierte. Nun ist dies noch kein Beweis für eine tatsächliche Umorientierung des zytoplasmatischen Bereiches, es zeigt jedoch, daß dieser Bereich der gp130-Transmembranregion sehr kritisch für eine effiziente Signaltransduktion ist.

Die Auflösung der Kristallstruktur von Epo im Komplex mit zwei Molekülen der Extrazellulärregion seines Rezeptors (131) und des synthetischen Peptids EMP33 (*Epo mimetic peptide*), welches Epo nachahmen soll, gebunden an zwei EpoR-Fragmente (73), erzielte einen großen Fortschritt im Verständnis der Zytokin-induzierten Rezeptoraktivierung. Obwohl EMP33 den EpoR dimerisiert, ist es nicht in der Lage, eine effiziente Signaltransduktion auszulösen. Es stellte sich heraus, daß die relative Orientierung der Rezeptorketten zueinander sich nach Dimerisierung über Epo oder EMP33 unterscheidet. Der Winkel der N-Termini beider Rezeptorketten zueinander betrug nach Epo-Bindung 120°, nach EMP33-Bindung 165°. Die Autoren postulierten, daß die unterschiedliche geometrische Anordnung der beiden Rezeptorketten zueinander Auswirkungen auf die Aktivierung der intrazellulären Kinasen, die Phosphorylierung des Rezeptors durch die Kinasen oder die Rekrutierung und Aktivierung weiterer Signalproteine wie z.B. der STATs haben kann. Die

Untersuchungen von Ba/F3-Zellen, die stabil mit gp130-Konstrukten mit unterschiedlich langen Transmembranregionen transfiziert worden sind, sollten die Möglichkeit bieten die drei zuvor genannten Ebenen einer Signalbeeinflussung näher zu untersuchen.

5. Ausblick

5.1 Welche spezifische Aufgabe übernimmt der LIFR?

Die vorliegenden Ergebnisse deuten darauf hin, daß der LIFR hochgradig redundante Funktionen im Vergleich zu gp130 besitzt. So aktiviert er die Transkriptionsfaktoren STAT1 und STAT3 und rekrutiert die Kinasen Jak1, Jak2 und Tyk2. Es sollte jedoch berücksichtigt werden, daß die Koimmunpräzipitationen der verschiedenen Kinasen mit dem Rezeptorkonstrukt β /LIFR mit überexprimierten Kinasen durchgeführt wurden. Neuere Studien am gp130 haben aber gezeigt, daß es durchaus Diskrepanzen bei der Bindung überexprimierter oder endogener Kinasen gibt (C. Haan, persönliche Mitteilung). Da durch die Verwendung der DEAE-Dextran-Transfektionsmethode mittlerweile eine deutlich höhere Effizienz in der Transfektion von COS-7-Zellen erzielt werden kann, sollten diese Versuche in jedem Fall mit endogenen Kinasen wiederholt werden.

Erste Versuche deuten darauf hin, daß auch die Tyrosinphosphatase SHP2 an den LIFR bindet. Diese Ergebnisse sollen bestätigt werden und der Zweck der SHP2-Rekrutierung an den LIFR geklärt werden. Vermittelt SHP2 - wie für gp130 bereits beschrieben - die Aktivierung des Ras/Raf/MAPK-Weges oder kann sie in Ausübung ihrer Phosphatase-Aktivität negativ auf den gp130/LIFR-Komplex wirken?

Schiemann *et al.* konnten zeigen, daß die Phosphorylierung des Serinrestes S1044 im LIFR durch MAP-Kinasen einen negativ-regulatorischen Effekt auf die Signalfähigkeit des LIFR hat (120). Könnte es also sein, daß in einem gp130/LIFR-Heterodimer der LIFR selbst über die gp130/SHP2-vermittelte Erk-Aktivierung an S1044 phosphoryliert und somit das Signal *down*-reguliert wird und wäre dies eine mögliche Erklärung für die eher schwachen Signale, die von gp130/LIFR-Komplexen vermittelt werden? Antwort auf diese Frage könnte die Untersuchung einer S1044A-Mutation des LIFR im chimären Rezeptorsystem geben.

Außerdem wäre es möglich, die „Güte“ der putativen STAT-Rekrutierungsmotive des LIFR mit Hilfe eines experimentellen Ansatzes zu testen, der bereits für gp130 erfolgreich durchgeführt wurde, d.h. man könnte die einzelnen Tyrosinmotive des LIFR unmittelbar hinter die Box1/2-Region des gp130 setzen. Damit wären alle eventuell vorhandenen negativen Einflüsse des LIFR ausgeschlossen und die Rekrutierungsleistungsfähigkeit der einzelnen Tyrosinreste ließe sich evaluieren.

5.2 Gibt es eine Spezifität der Janus-Kinasen bei der Phosphorylierung der Tyrosinreste im gp130, LIFR oder OSMR?

Im zweiten Teil dieser Arbeit konnten erste Hinweise dafür geliefert werden, daß die Janus-Kinasen eine unterschiedliche Spezifität bei der Phosphorylierung der Tyrosinreste des gp130 besitzen. Es wäre daher interessant, die beschriebenen Experimente mit Mutanten des gp130 durchzuführen, die jeweils nur noch einen zytoplasmatischen Tyrosinrest enthalten; alle anderen sind gegen Phenylalanine ausgetauscht. Diese veränderten gp130-Moleküle liegen zum großen Teil schon als IL-5R-Chimäre vor. Es könnte also direkt untersucht werden, ob nach Überexpression einer Janus-Kinase ein bestimmter Tyrosinrest phosphoryliert wird und ob Proteine wie STATs oder SHP2 daran binden können. Da auch der LIFR und der OSMR als IL-5R-Chimäre vorliegen, sollten diese Studien auch auf diese Rezeptoren ausgedehnt werden.

Diese Versuche würden zwar keinen unanfechtbaren Beweis für eine Spezifität liefern, würden aber einen Fortschritt im Verständnis der Janus-Kinasen erzielen, von deren Spezifität bislang noch sehr wenig bekannt ist.

5.3 Wie empfindlich ist die Positionierung der Box1/2-Region für die gp130-vermittelte Signaltransduktion?

Die Box1/2-Region des gp130 scheint keinen Modulcharakter zu besitzen, d.h. ihre Position innerhalb des zytoplasmatischen Bereiches ist nicht beliebig. Im Gegenteil, erste Experimente zeigen, daß ein Einschub von drei Alaninresten in den membrannahen Bereich N-terminal zur Box1/2-Region ausreicht, um die Signaleffizienz des gp130-Moleküls deutlich zu reduzieren. In weiteren Experimenten soll untersucht werden, ob schon eine einzelne eingesetzte Aminosäure ausreicht, um diesen Effekt zu erzielen.

Die Analyse der Sequenzen der membrannahen intrazellulären Bereiche verschiedener Zytokinrezeptoren weist eine Ansammlung positiv geladener Aminosäuren auf. Könnten diese Aminosäuren eventuell auf eine noch ungeklärte Weise mit der Membran wechselwirken und so den Box1/2-Bereich in einer bestimmten Orientierung fixieren? Würde somit der Einschub von Alaninen einen Verlust der geometrisch korrekten Anordnung der zytoplasmatischen Bereiche nach sich ziehen? Um der Antwort auf diese Frage näher zu kommen, sollten nicht nur ein, zwei oder drei Alaninreste in den membrannahen Bereich eingefügt werden, sondern auch ein, zwei oder drei Lysinreste, die - anders als Alanine - mit der Membran interagieren können. Um eine Veränderung einer eventuell vorliegenden

dreidimensionalen Struktur des zytoplasmatischen Bereiches möglichst weitgehend auszuschließen, sollten die Aminosäuren in einen unmittelbar C-terminal zur Membran liegenden Exon-Übergang eingesetzt werden.

5.4 Wie wird Shc über den OSMR aktiviert und wohin führt der weitere Signalweg?

In der vorliegenden Arbeit konnte zum ersten Mal demonstriert werden, daß ein IL-6-Typ Zytokin, nämlich OSM, ein Protein aktiviert, welches von keinem anderen Mitglied der Familie annähernd effizient phosphoryliert wird: das Adaptorprotein Shc. Es konnte weiterhin in einer - zum ersten Mal vergleichenden - Studie gezeigt werden, daß Shc spezifisch vom phosphorylierten OSMR gebunden werden kann.

Um die Phosphorylierung des OSMR zu erreichen, wurden die β /OSMR-Konstrukte mit Jak1 koexprimiert. Da dieser Versuchsansatz zum Erfolg führte und Shc-Proteine mit dem Rezeptor koimmunpräzipitiert werden konnten, spricht einiges dafür, daß die Kinase Jak1 an der Phosphorylierung des OSMR beteiligt ist. Erhärtet wurde diese Theorie in ersten Versuchen mit einer Kinase-inaktiven Form von Jak1 (K907E). Koexprimiert man diese Kinase mit β /OSMR, so ist keine Bindung von Shc an den Rezeptor nachweisbar. Diese Ergebnisse müssen in weiteren Versuchen bestätigt werden.

Um zu überprüfen, ob Jak1 auch unter physiologischen Bedingungen an der OSMR-Phosphorylierung und der anschließenden Shc-Bindung beteiligt ist oder ob andere Mitglieder der Janus-Familie Jak1 ersetzen können, können Fibrosarkomzellen genutzt werden, die entweder für Jak1, Jak2 oder Tyk2 defizient sind. Diese Zellen signalisieren nach einer OSM-Stimulation, nicht aber nach einer LIF-Stimulation (13), d.h. sie müssen neben gp130 auch den OSMR exprimieren. Zunächst müßte man überprüfen, ob in unmutierten „Wildtyp“-Zellen (2fTGH) die OSM-Stimulation eine Rezeptorphosphorylierung bewirkt, die anschließend die Rekrutierung von Shc erlaubt. Wäre dies möglich, könnte mit den Jak1- (U4A, U4C), Jak2- (γ 2A) oder Tyk2- (U1D) defizienten Zellen die Bedeutung dieser Kinasen für eine Shc-bindungsrelevante Rezeptorphosphorylierung aufgezeigt werden.

In der Literatur wurden oft Mitglieder der Src-Kinasen für die Phosphorylierung von Shc verantwortlich gemacht. Eigene Befunde mit dem Src-spezifischen Inhibitor PP1 deuten jedoch darauf hin, daß diese Kinasen für die OSM-vermittelte Shc-Aktivierung keine Rolle spielen. Wird Shc von den Janus-Kinasen phosphoryliert?

Erste Versuche deuten darauf hin, daß diese Kinasen bereits am Prozess der Rezeptor-phosphorylierung essentiell beteiligt sind. Somit kann die Shc-Phosphorylierung nicht in Jak-defizienten Zellen untersucht werden, da der für eine Aktivierung notwendige Schritt der Rezeptorbindung bereits unterbrochen ist. Da derzeit für Jaks - anders als für die Src-Kinasen - keine wirklich spezifischen Inhibitoren erhältlich sind, bleibt nur die Möglichkeit, die Shc-Proteine als GST-Fusionsproteine nach Aufreinigung in einen *in vitro*-Kinase-Assay mit verschiedenen Jaks einzusetzen. Zur Zeit wird an der Etablierung eines solchen Assays gearbeitet, so daß die Versuche in Zukunft durchgeführt werden könnten.

Nach Phosphorylierung von Shc koimmunpräzipitierten verschiedene hochmolekulare Proteine mit diesem (Abb. 15), die bislang noch nicht identifiziert werden konnten. Ausgeschlossen werden konnte lediglich, daß es sich dabei um ErbB2 oder Sos handelt. Da für den OSMR in Zukunft Antikörper vorhanden sein sollten (in Zusammenarbeit mit Dr. W. Müller-Esterl), kann überprüft werden, ob es sich bei einem dieser Proteine um den endogenen OSMR handelt. Hochmolekulare Proteine, von denen bereits beschrieben wurde, daß sie mit Shc interagieren, sind z.B. Jak2, IRS-1 und SHIP. Es soll daher überprüft werden, ob auch nach OSM-Stimulation in HepG2-Zellen eines dieser Proteine mit Shc koimmunpräzipitierbar ist.

Wie in Abb. 15 dargestellt, werden nach OSM-Stimulation die Shc-Isoformen p52 und p66 tyrosinphosphoryliert und beide können an den OSMR zu binden (Abb. 18). Für diese beiden Isoformen sind jedoch gegensätzliche Effekte auf die Signaltransduktion beschrieben, was für die OSM-vermittelte Signaltransduktion von Bedeutung sein könnte. Studien von Okada *et al.* zeigten, daß die p66-Isoform auch in serinphosphorylierter Form auftritt. Diese Serinphosphorylierung erfolgt in Abhängigkeit von MEK und erst im Anschluß an die Tyrosinphosphorylierung. Interessanterweise assoziiert nur tyrosin- und serinphosphoryliertes p66 mit Grb2, während p52 und p46 allem Anschein nach an Grb2 binden, auch wenn keine Serin-, sondern nur eine Tyrosinphosphorylierung vorliegt. Die Expression der p66-Isoform beschleunigt die Inaktivierung von Erks nach EGF-Stimulation (99). Es wäre also denkbar, daß p66Shc in einer Art *Feedback-loop* die Aktivierung der MAP-Kinasen Erk1/2 inhibiert, indem es nach seiner Serinphosphorylierung entweder durch MEK oder die Erks selbst an Grb2 bindet und damit mit p52/p46 um dieses limitierend vorliegende Adaptorprotein konkurriert. Es wäre daher interessant zu überprüfen, ob auch nach OSM-Stimulation eine p66-Serinphosphorylierung erfolgt.

Die Shc-Proteine werden nach Zytokin- oder Wachstumsfaktorstimulation an den Tyrosinresten 239, 240 und 317 phosphoryliert. Gotoh *et al.* (44) lieferten den interessanten Befund, daß nach EGF-Stimulation ausgehend vom pY317 andere Signale in die Zelle weitergeleitet werden als durch die Phosphotyrosinreste 239/240. Während Y317 an der Signaltransduktion in Richtung Erk1/2 beteiligt zu sein scheint, induzieren die Phosphotyrosine 239/240 die Transkription des *c-myc*-Gens führt. Über welchen Weg dies verläuft, ist noch ungeklärt. Da seit kurzem Expressionsplasmide für an den besagten Tyrosinresten mutierte Shc-Proteine vorliegen (Y317F, Y239/240/317F), kann nach Überexpression einer dieser Mutanten zunächst in COS-7-Zellen überprüft werden, ob bestimmte Signalwege dominant negativ beeinflusst werden.

Da nicht alle weiteren Signalwege, an denen Shc beteiligt sein könnte, hier beschrieben werden können, wurden sie in Abbildung 30 kurz skizziert. Es wird deutlich, daß die Rekrutierung von Shc an den OSMR zahlreiche neue Signaltransduktionswege durch diesen Rezeptor ermöglicht (6, 12, 22, 42-44, 48, 60, 72, 98, 102, 114, 148).

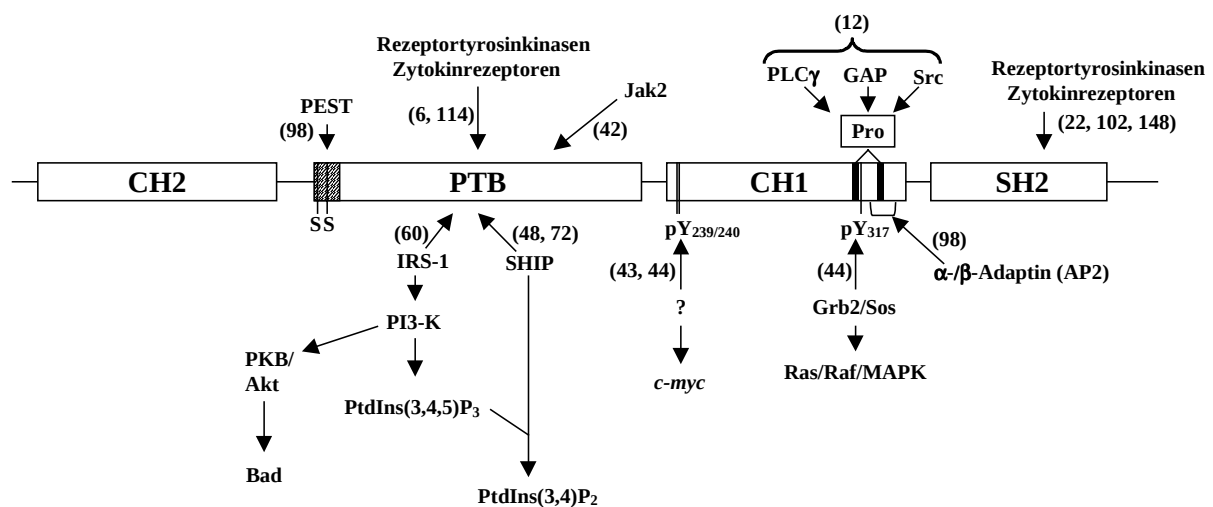


Abb. 30: Schematische Darstellung des Shc-Adaptorproteins und seiner möglichen Bindungspartner, die von Shc ausgehend verschiedene Signaltransduktionswege aktivieren können (in Klammern sind die Referenzen angegeben)

5.5 Welchen Einfluß hat die Transmembrandomäne auf die Signaltransduktion?

Mit Hilfe der chimären Rezeptorkonstrukte $\alpha/\text{gp130} + \beta/\text{gp130}$ sowie $\alpha(\text{TM})/\text{gp130} + \beta(\text{TM})/\text{gp130}$ konnte demonstriert werden, daß die TM-Region des gp130 nicht essentiell für die Vermittlung eines Signales zur STAT1-Aktivierung ist. Ihre Funktion kann von den IL-5R α - und IL-5R β -Transmembranregionen übernommen werden. Analoge Studien mit chimären Rezeptorkonstrukten aus EGFR/c-Ros, die sich nur in der Transmembranregion unterscheiden (EGFR jeweils extrazellulär, c-Ros jeweils intrazellulär), zeigten, daß die Rezeptoren nach EGF-Stimulation ein großes Spektrum an gleichen Signalen vermitteln. Dennoch gibt es hinsichtlich bestimmter Signaltransduktionswege Unterschiede, und zwar das Adaptorprotein Shc betreffend. Sowohl die p66Shc-Phosphorylierung als auch die p66Shc-Koimmunpräzipitation mit einem nicht näher identifizierten 190 kDa-Protein (p190) ist essentiell auf die Transmembranregion des c-Ros angewiesen. Enthielt das chimäre Rezeptorkonstrukt die Transmembranregion des EGFR, so war keine Shc-Phosphorylierung oder p190-Bindung nachweisbar (144).

Es wäre also interessant, mit Hilfe der IL-5R(TM)/gp130-Konstrukte andere Signalwege als den Jak/STAT-Weg zu untersuchen. Wird z.B. der Ras/Raf/MAPK-Weg gleich gut von Rezeptoren aktiviert, die nicht die Transmembranregion des gp130, sondern der IL-5R enthalten?

Außerdem könnten auch vom OSMR chimäre Konstrukte hergestellt werden, die nicht die Transmembranregion des OSMR, sondern die der IL-5-Rezeptoren enthalten. Dies böte die Möglichkeit festzustellen, ob die Beteiligung der TM-Region an der p66Shc-Aktivierung ein c-Ros spezifischer Effekt ist oder ob es ein eher genereller Mechanismus ist, der auch auf den OSMR zutrifft.

Ein anderer interessanter Befund von Xiong *et al.* sind die unterschiedlichen Internalisierungsraten der beiden chimären EGFR/c-Ros-Rezeptorkonstrukte, die sich nur hinsichtlich der TM-Region unterscheiden. Während das chimäre Rezeptorkonstrukt mit der TM-Region von c-Ros nach 2 h EGF-Stimulation nahezu vollständig internalisiert worden war, befand sich das andere noch zu 50% auf der Zelloberfläche; d.h. die Rezeptorchimäre, die nicht mehr in der Lage ist p66Shc zu phosphorylieren, weist auch eine schlechtere Internalisierung auf (144). Wäre es also möglich, daß es einen kausalen Zusammenhang zwischen p66Shc und der Internalisierung gibt?

Über eine Heterodimerisierung einer gp130- mit einer IL-5R-Transmembranregion konnte demonstriert werden, daß für eine effiziente Signaltransduktion zwei physiologisch miteinander interagierende TM-Regionen vorhanden sein müssen. Gilt dies auch für den LIFR und den OSMR? Da diese Rezeptoren ebenfalls als IL-5R-Chimäre vorliegen, könnte auch für diese Rezeptoren überprüft werden, ob sie in der Lage sind, nach Heterodimerisierung ihrer TM-Region mit der eines IL-5-Rezeptors zu signalisieren.

Die Einführung von Punktmutationen in die Transmembranregion von gp130 zeigte, daß vor allem der Austausch des Cysteinrestes 640 gegen Serin zu einer deutlichen Verminderung der STAT-Aktivierbarkeit nach IL-5-Stimulation der entsprechenden Rezeptorchimären führt. In welcher Art und Weise dieser Aminosäurerest an der Rezeptoraktivierung beteiligt ist, konnte noch nicht geklärt werden. Es wäre denkbar, daß diese Mutation zu einem Verlust der Dimerisierungsfähigkeit der TM-Regionen führt, wodurch die intrazellulären Bereiche eventuell zu weit voneinander entfernt bleiben, um eine Signaltransduktion zu ermöglichen. Diese Hypothese könnte mit Hilfe der FRET-Technik (Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer) überprüft werden. Im Labor existieren bereits mit unterschiedlichen Fluoreszenzproteinen markierte gp130-Proteine. Durch Ersetzen der „Wildtyp“-Transmembranregion durch die mutierte TM-Region könnten diese Proteine für Untersuchungen zur Bedeutung verschiedener Aminosäurereste der TM-Region für die Rezeptoraktivierung genutzt werden.

Weiterhin ist immer noch die Frage offen, ob über die Transmembranregion die Information einer Orientierungsänderung ins Zytoplasma vermittelt wird. Studien mit gp130-Molekülen, deren TM-Region entweder Aminosäuren zugefügt oder entnommen wurden, deuten darauf hin, daß es innerhalb der Membran eine bevorzugte Orientierung der beiden postulierten Helices zueinander geben könnte. Die stabil mit den Rezeptorkonstrukten gp130(TMΔ2AS), gp130(TMΔ1AS), gp130(TM+1AS) und gp130(TM+2AS) transfizierten Ba/F3-Zellen wurden bislang nur hinsichtlich ihrer Fähigkeit zur STAT-Aktivierung untersucht. Es wäre interessant, auch die Jak1- und Rezeptoraktivierung zu analysieren. Liegt die unterschiedliche STAT-Aktivierung der verschiedenen mutierten Konstrukte an einer verschieden starken Bindung der Janus-Kinasen, oder können die Kinasen noch mit gleicher Affinität binden, sich danach aber nicht mehr gegenseitig aktivieren?

Wenn man postuliert, daß durch das Einfügen oder Deletieren von Aminosäuren innerhalb der TM-Region eine Konformationsänderung in Richtung Zytoplasma bewirkt wird, wäre es dann

nicht auch umgekehrt möglich, daß die Affinität des Liganden zum Rezeptor verändert wird? Scatchard-Analysen mit stabil transfizierten Ba/F3-Zellen würden hierüber Aufschluß geben.

In einer Studie von Burke *et al.* wurden ErbB2-Rezeptoren bezüglich ihrer Signalkompetenz untersucht, deren membrannähe extrazelluläre Aminosäuren sukzessive gegen Cysteine ausgetauscht wurden. Obwohl alle Rezeptoren über Disulfidbrücken dimerisierten, signalisierten nur diejenigen, bei denen sich die Cysteine auf den einander zugewandten „Seiten“ der beiden vorhergesagten α -Helices befanden. Bemerkenswert war, daß die aktivierende Mutation V664E auf derselben „Seite“ der Helices lag (14). Diese Experimente zeigen, daß nur solche Rezeptordimere signalisieren, bei denen die Transmembranhelices in der richtigen Orientierung zueinander vorliegen. Es wäre denkbar, juxtamembrane Aminosäuren des gp130 gegen Cysteine auszutauschen, um analoge Studien auch mit diesem Rezeptor durchzuführen.

V Zusammenfassung

Die Familie der IL-6-Typ Zytokine ist für die Übertragung ihrer Signale ins Zellinnere auf drei signaltransduzierende Rezeptoruntereinheiten angewiesen: gp130, LIFR und OSMR. Während gp130 von allen sieben Familienmitgliedern (IL-6, IL-11, LIF, OSM, CNTF, CT-1 und NNT-1/BSF3) genutzt wird, benötigen LIF, CNTF, CT-1 und NNT-1/BSF3 den LIFR als zweite signaltransduzierende Rezeptorkomponente. Humanes OSM ist das einzige IL-6-Typ Zytokin, das über zwei verschiedene Rezeptorkomplexe - gp130/LIFR und gp130/OSMR - signalisieren kann. Die Signalweiterleitung über gp130 ist relativ gut erforscht, über die Fähigkeiten des LIFR und OSMR war weniger bekannt.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß die signaltransduzierenden Funktionen von LIFR und gp130 hochgradig redundant sind. Mit Hilfe chimärer Rezeptormoleküle, die die Untersuchung der LIFR-vermittelten Signaltransduktion im heterodimeren Komplex mit gp130 ermöglichten, konnte demonstriert werden, daß der membranproximale Box1/2-Bereich des LIFR für eine Signaltransduktion über das gp130/LIFR-Heterodimers notwendig ist. Dieser Bereich ist für eine Bindung der Janus-Kinasen Jak1, Jak2 oder Tyk2 an den LIFR essentiell. Weiterhin ist der membrandistale Bereich des LIFR im gp130/LIFR-Heterodimer auch ohne die C-terminal zur Box2-Region gelegenen Tyrosinmotive des gp130 in der Lage, eine Aktivierung der STAT-Faktoren STAT1 und STAT3 zu vermitteln. In homodimerisierter Form ist der LIFR nur in manchen Zellen aktiv: während er in MCF-7-Zellen in der Lage ist, ein α 2M-Promotor-reguliertes Reportergen ähnlich effizient zu induzieren wie ein gp130-Homodimer, erwies er sich in COS-7- und HepG2-Zellen als eher signalinkompetent.

Für den OSMR konnte gezeigt werden, daß er über seine Tyrosinreste 837 und 861 spezifisch das Adaptorprotein Shc rekrutiert. Der Tyrosinrest 861 erwies sich dabei als der kritischere für die Shc-Bindung, da seine Mutation zu Phenylalanin (Y861F) eine Rekrutierung von Shc vollständig verhinderte, während die Mutation Y837F noch eine minimale Bindung von Shc zuließ. Y861 ist für eine effiziente Aktivierung der MAP-Kinasen Erk1/2 und eines α 2M-Promotor-regulierten Reportergens wichtig. Die STAT3-Tyrosinphosphorylierung durch ein gp130/OSMR-Heterodimer bleibt jedoch sowohl durch die Mutation Y837F als auch Y861F unbeeinflusst.

Die Box1/2-Region des gp130 hat – anders als die Tyrosinmotive – keinen Modulcharakter, d.h. sie kann nicht innerhalb der zytoplasmatischen Region als eigenständige, funktionsfähige Einheit an einer beliebigen Stelle positioniert werden: der Transfer dieses Bereiches von

seiner membranproximalen Position in die C-terminale Region des gp130 führte zum Verlust der gp130-vermittelten Signaltransduktion.

Mit Hilfe des chimären IL-5R-System wurde demonstriert, daß die Transmembranregion des gp130 nicht essentiell für eine vom zytoplasmatischen Bereich des gp130-vermittelte Signaltransduktion ist. Ihre Funktion kann von den IL-5R-TM-Regionen übernommen werden. Für eine effiziente Signalweiterleitung scheint es jedoch unerlässlich zu sein, daß beide Rezeptorketten des induzierten Dimers physiologisch miteinander interagierende TM-Regionen enthalten. Eine Heterodimerisierung von gp130- und IL-5R-TM-Regionen erlaubt nur noch eine reduzierte STAT1-Aktivierung.

Mit Hilfe von Punktmutationen wurde gezeigt, daß einzelne Aminosäurereste innerhalb der TM-Region für die Signaltransduktion von Bedeutung sind, besonders der Cysteinrest 640, dessen Austausch gegen Serin zu einer deutlichen Abnahme der Signalstärke führte. Auch Insertionen bzw. Deletionen von Aminosäuren innerhalb der TM-Region resultierten in einer veränderten Rezeptoraktivität, was die Bedeutung dieses Bereiches für die Signaltransduktion unterstreicht.

VI Literatur

1. **Arcone, R., P. Pucci, F. Zappacosta, V. Fontaine, A. Malorni, G. Marino, and G. Ciliberto.** 1991. Single-step purification and structural characterization of human interleukin-6 produced in *Escherichia coli* from a T7 RNA polymerase expression vector. *Eur J Biochem* **198**:541-7.
2. **Auguste, P., C. Guillet, M. Fourcin, C. Olivier, J. Veziers, A. Pouplard-Barthelaix, and H. Gascan.** 1997. Signaling of type II oncostatin M receptor. *J Biol Chem* **272**:15760-4.
3. **Avruch, J., X. F. Zhang, and J. M. Kyriakis.** 1994. Raf meets Ras: completing the framework of a signal transduction pathway. *Trends Biochem Sci* **19**:279-83.
4. **Bamber, B., R. A. Reife, H. S. Haugen, and C. H. Clegg.** 1998. Oncostatin M stimulates excessive extracellular matrix accumulation in a transgenic mouse model of connective tissue disease. *J Mol Med* **76**:61-9.
5. **Barge, R. M., J. P. de Koning, K. Pouwels, F. Dong, B. Lowenberg, and I. P. Touw.** 1996. Tryptophan 650 of human granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) receptor, implicated in the activation of JAK2, is also required for G-CSF-mediated activation of signaling complexes of the p21ras route. *Blood* **87**:2148-53.
6. **Batzer, A. G., P. Blaikie, K. Nelson, J. Schlessinger, and B. Margolis.** 1995. The phosphotyrosine interaction domain of Shc binds an LXNPXY motif on the epidermal growth factor receptor. *Mol Cell Biol* **15**:4403-9.
7. **Baumann, H., A. J. Symes, M. R. Comeau, K. K. Morella, Y. Wang, D. Friend, S. F. Ziegler, J. S. Fink, and D. P. Gearing.** 1994. Multiple regions within the cytoplasmic domains of the leukemia inhibitory factor receptor and gp130 cooperate in signal transduction in hepatic and neuronal cells. *Mol Cell Biol* **14**:138-46.
8. **Baumann, H., and G. G. Wong.** 1989. Hepatocyte-stimulating factor III shares structural and functional identity with leukemia-inhibitory factor. *J Immunol* **143**:1163-7.
9. **Bazan, J. F.** 1990. Structural design and molecular evolution of a cytokine receptor superfamily. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**:6934-8.
10. **Behrmann, I., C. Janzen, C. Gerhartz, H. Schmitz-Van de Leur, H. Hermanns, B. Heesel, L. Graeve, F. Horn, J. Tavernier, and P. C. Heinrich.** 1997. A single STAT recruitment module in a chimeric cytokine receptor complex is sufficient for STAT activation. *J Biol Chem* **272**:5269-74.
11. **Binari, R., and N. Perrimon.** 1994. Stripe-specific regulation of pair-rule genes by hopscotch, a putative Jak family tyrosine kinase in *Drosophila*. *Genes Dev* **8**:300-12.
12. **Bonfini, L., E. Migliaccio, G. Pelicci, L. Lanfrancone, and P. G. Pelicci.** 1996. Not all Shc's roads lead to Ras. *Trends Biochem Sci* **21**:257-61.
13. **Burfoot, M. S., N. C. Rogers, D. Watling, J. M. Smith, S. Pons, G. Paonessaw, S. Pellegrini, M. F. White, and I. M. Kerr.** 1997. Janus kinase-dependent activation of insulin receptor substrate 1 in response to interleukin-4, oncostatin M, and the interferons. *J Biol Chem* **272**:24183-90.
14. **Burke, C. L., and D. F. Stern.** 1998. Activation of Neu (ErbB-2) mediated by disulfide bond-induced dimerization reveals a receptor tyrosine kinase dimer interface. *Mol Cell Biol* **18**:5371-9.
15. **Cacalano, N. A., T. S. Migone, F. Bazan, E. P. Hanson, M. Chen, F. Candotti, J. J. O'Shea, and J. A. Johnston.** 1999. Autosomal SCID caused by a point mutation in the N-terminus of Jak3: mapping of the Jak3-receptor interaction domain. *Embo J* **18**:1549-58.
16. **Castell, J. V., M. J. Gomez-Lechon, M. David, R. Fabra, R. Trullenque, and P. C. Heinrich.** 1990. Acute-phase response of human hepatocytes: regulation of acute-phase protein synthesis by interleukin-6. *Hepatology* **12**:1179-86.
17. **Chen, L., Y. Mory, A. Zilberstein, and M. Revel.** 1988. Growth inhibition of human breast carcinoma and leukemia/lymphoma cell lines by recombinant interferon-beta 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85**:8037-41.
18. **Chen, L. I., M. K. Webster, A. N. Meyer, and D. J. Donoghue.** 1997. Transmembrane domain sequence requirements for activation of the p185c-neu receptor tyrosine kinase. *J Cell Biol* **137**:619-31.

19. **Chen, M., A. Cheng, Y. Q. Chen, A. Hymel, E. P. Hanson, L. Kimmel, Y. Minami, T. Taniguchi, P. S. Changelian, and J. J. O'Shea.** 1997. The amino terminus of JAK3 is necessary and sufficient for binding to the common gamma chain and confers the ability to transmit interleukin 2-mediated signals. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**:6910-5.
20. **Chung, C. D., J. Liao, B. Liu, X. Rao, P. Jay, P. Berta, and K. Shuai.** 1997. Specific inhibition of Stat3 signal transduction by PIAS3. *Science* **278**:1803-5.
21. **Corey, S. J., and S. M. Anderson.** 1999. Src-related protein tyrosine kinases in hematopoiesis. *Blood* **93**:1-14.
22. **D'Ambrosio, D., K. L. Hippen, and J. C. Cambier.** 1996. Distinct mechanisms mediate SHC association with the activated and resting B cell antigen receptor. *Eur J Immunol* **26**:1960-5.
23. **Daub, H., C. Wallasch, A. Lankenau, A. Herrlich, and A. Ullrich.** 1997. Signal characteristics of G protein-transactivated EGF receptor. *Embo J* **16**:7032-44.
24. **Davis, S., T. H. Aldrich, N. Stahl, L. Pan, T. Taga, T. Kishimoto, N. Y. Ip, and G. D. Yancopoulos.** 1993. LIFR beta and gp130 as heterodimerizing signal transducers of the tripartite CNTF receptor. *Science* **260**:1805-8.
25. **Davis, S., T. H. Aldrich, D. M. Valenzuela, V. V. Wong, M. E. Furth, S. P. Squinto, and G. D. Yancopoulos.** 1991. The receptor for ciliary neurotrophic factor. *Science* **253**:59-63.
26. **Dikic, I., A. G. Batzer, P. Blaikie, A. Obermeier, A. Ullrich, J. Schlessinger, and B. Margolis.** 1995. Shc binding to nerve growth factor receptor is mediated by the phosphotyrosine interaction domain. *J Biol Chem* **270**:15125-9.
27. **Dittrich, E., C. Renfrew Haft, L. Muys, P. C. Heinrich, and L. Graeve.** 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.
28. **Duhe, R. J., and W. L. Farrar.** 1998. Structural and mechanistic aspects of Janus kinases: how the two-faced god wields a double-edged sword. *J Interferon Cytokine Res* **18**:1-15.
29. **Endo, T. A., M. Masuhara, M. Yokouchi, R. Suzuki, H. Sakamoto, K. Mitsui, A. Matsumoto, S. Tanimura, M. Ohtsubo, H. Misawa, T. Miyazaki, N. Leonor, T. Taniguchi, T. Fujita, Y. Kanakura, S. Komiya, and A. Yoshimura.** 1997. A new protein containing an SH2 domain that inhibits JAK kinases. *Nature* **387**:921-4.
30. **Ernst, M., D. P. Gearing, and A. R. Dunn.** 1994. Functional and biochemical association of Hck with the LIF/IL-6 receptor signal transducing subunit gp130 in embryonic stem cells. *Embo J* **13**:1574-84.
31. **Ernst, M., U. Novak, S. E. Nicholson, J. E. Layton, and A. R. Dunn.** 1999. The carboxyl-terminal domains of gp130-related cytokine receptors are necessary for suppressing embryonic stem cell differentiation. Involvement of STAT3. *J Biol Chem* **274**:9729-37.
32. **Estrov, Z., B. Samal, R. Lapushin, P. Kellokumpu-Lehtinen, A. A. Sahin, R. Kurzrock, M. Talpaz, and B. B. Aggarwal.** 1995. Leukemia inhibitory factor binds to human breast cancer cells and stimulates their proliferation. *J Interferon Cytokine Res* **15**:905-13.
33. **Feng, J., B. A. Witthuhn, T. Matsuda, F. Kohlhuber, I. M. Kerr, and J. N. Ihle.** 1997. Activation of Jak2 catalytic activity requires phosphorylation of Y1007 in the kinase activation loop. *Mol Cell Biol* **17**:2497-501.
34. **Firmbach-Kraft, I., M. Byers, T. Shows, R. Dalla-Favera, and J. J. Krolewski.** 1990. tyk2, prototype of a novel class of non-receptor tyrosine kinase genes. *Oncogene* **5**:1329-36.
35. **Fuhrer, D. K., G. S. Feng, and Y. C. Yang.** 1995. Syp associates with gp130 and Janus kinase 2 in response to interleukin- 11 in 3T3-L1 mouse preadipocytes. *J Biol Chem* **270**:24826-30.
36. **Fukada, T., M. Hibi, Y. Yamanaka, M. Takahashi-Tezuka, Y. Fujitani, T. Yamaguchi, K. Nakajima, and T. Hirano.** 1996. Two signals are necessary for cell proliferation induced by a cytokine receptor gp130: involvement of STAT3 in anti-apoptosis. *Immunity* **5**:449-60.
37. **Gatsios, P., H. D. Haubeck, E. Van de Leur, W. Frisch, S. S. Apte, H. Greiling, P. C. Heinrich, and L. Graeve.** 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.

38. **Gauzzi, M. C., L. Velazquez, R. McKendry, K. E. Mogensen, M. Fellous, and S. Pellegrini.** 1996. Interferon-alpha-dependent activation of Tyk2 requires phosphorylation of positive regulatory tyrosines by another kinase. *J Biol Chem* **271**:20494-500.
39. **Gearing, D. P., M. R. Comeau, D. J. Friend, S. D. Gimpel, C. J. Thut, J. McGourty, K. K. Brasher, J. A. King, S. Gillis, B. Mosley, S. F. Ziegler, and D. Cosman.** 1992. The IL-6 signal transducer, gp130: an oncostatin M receptor and affinity converter for the LIF receptor. *Science* **255**:1434-7.
40. **Gerhartz, C., B. Heesel, J. Sasse, U. Hemmann, C. Landgraf, J. Schneider-Mergener, F. Horn, P. C. Heinrich, and L. Graeve.** 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.
41. **Gilboa, L., R. G. Wells, H. F. Lodish, and Y. I. Henis.** 1998. Oligomeric structure of type I and type II transforming growth factor beta receptors: homodimers form in the ER and persist at the plasma membrane. *J Cell Biol* **140**:767-77.
42. **Giordano, V., G. De Falco, R. Chiari, I. Quinto, P. G. Pelicci, L. Bartholomew, P. Delmastro, M. Gadina, and G. Scala.** 1997. Shc mediates IL-6 signaling by interacting with gp130 and Jak2 kinase. *J Immunol* **158**:4097-103.
43. **Gotoh, N., A. Tojo, and M. Shibuya.** 1996. A novel pathway from phosphorylation of tyrosine residues 239/240 of Shc, contributing to suppress apoptosis by IL-3. *Embo J* **15**:6197-204.
44. **Gotoh, N., M. Toyoda, and M. Shibuya.** 1997. Tyrosine phosphorylation sites at amino acids 239 and 240 of Shc are involved in epidermal growth factor-induced mitogenic signaling that is distinct from Ras/mitogen-activated protein kinase activation. *Mol Cell Biol* **17**:1824-31.
45. **Guschin, D., N. Rogers, J. Briscoe, B. Witthuhn, D. Watling, F. Horn, S. Pellegrini, K. Yasukawa, P. Heinrich, G. R. Stark, and et al.** 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.
46. **Hanke, J. H., J. P. Gardner, R. L. Dow, P. S. Changelian, W. H. Brissette, E. J. Weringer, B. A. Pollok, and P. A. Connelly.** 1996. Discovery of a novel, potent, and Src family-selective tyrosine kinase inhibitor. Study of Lck- and FynT-dependent T cell activation. *J Biol Chem* **271**:695-701.
47. **Hanratty, W. P., and C. R. Dearolf.** 1993. The Drosophila Tumorous-lethal hematopoietic oncogene is a dominant mutation in the hopscotch locus. *Mol Gen Genet* **238**:33-7.
48. **Harmer, S. L., and A. L. DeFranco.** 1999. The src homology domain 2-containing inositol phosphatase SHIP forms a ternary complex with Shc and Grb2 in antigen receptor-stimulated B lymphocytes. *J Biol Chem* **274**:12183-91.
49. **Harpur, A. G., A. C. Andres, A. Ziemiecki, R. R. Aston, and A. F. Wilks.** 1992. JAK2, a third member of the JAK family of protein tyrosine kinases. *Oncogene* **7**:1347-53.
50. **Heinrich, P. C., I. Behrmann, G. Muller-Newen, F. Schaper, and L. Graeve.** 1998. Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. *Biochem J* **334**:297-314.
51. **Hemmann, U., C. Gerhartz, B. Heesel, J. Sasse, G. Kurapkat, J. Grötzinger, A. Wollmer, Z. Zhong, J. E. Darnell, Jr., L. Graeve, P. C. Heinrich, and F. Horn.** 1996. Differential activation of acute phase response factor/Stat3 and Stat1 via the cytoplasmic domain of the interleukin 6 signal transducer gp130. II. Src homology SH2 domains define the specificity of stat factor activation. *J Biol Chem* **271**:12999-3007.
52. **Hibi, M., M. Murakami, M. Saito, T. Hirano, T. Taga, and T. Kishimoto.** 1990. Molecular cloning and expression of an IL-6 signal transducer, gp130. *Cell* **63**:1149-57.
53. **Hilton, D. J., A. A. Hilton, A. Raicevic, S. Rakar, M. Harrison-Smith, N. M. Gough, C. G. Begley, D. Metcalf, N. A. Nicola, and T. A. Willson.** 1994. Cloning of a murine IL-11 receptor alpha-chain; requirement for gp130 for high affinity binding and signal transduction. *Embo J* **13**:4765-75.
54. **Ichihara, M., T. Hara, H. Kim, T. Murate, and A. Miyajima.** 1997. Oncostatin M and leukemia inhibitory factor do not use the same functional receptor in mice [published erratum appears in *Blood* 1997 Sep 1;90(5):2120]. *Blood* **90**:165-73.

55. **Ihle, J. N.** 1995. The Janus protein tyrosine kinases in hematopoietic cytokine signaling. *Semin Immunol* **7**:247-54.
56. **Jain, N., T. Zhang, W. H. Kee, W. Li, and X. Cao.** 1999. Protein kinase C delta associates with and phosphorylates Stat3 in an interleukin-6-dependent manner. *J Biol Chem* **274**:24392-400.
57. **Jiang, G., and T. Hunter.** 1999. Receptor signaling: when dimerization is not enough. *Curr Biol* **9**:R568-71.
58. **Johnson, L. N., M. E. Noble, and D. J. Owen.** 1996. Active and inactive protein kinases: structural basis for regulation. *Cell* **85**:149-58.
59. **Kaptein, A., V. Paillard, and M. Saunders.** 1996. Dominant negative stat3 mutant inhibits interleukin-6-induced Jak-STAT signal transduction. *J Biol Chem* **271**:5961-4.
60. **Kasus-Jacobi, A., D. Perdereau, S. Tartare-Deckert, E. Van Obberghen, J. Girard, and A. F. Burnol.** 1997. Evidence for a direct interaction between insulin receptor substrate-1 and Shc. *J Biol Chem* **272**:17166-70.
61. **Kim, H., and H. Baumann.** 1997. Transmembrane domain of gp130 contributes to intracellular signal transduction in hepatic cells. *J Biol Chem* **272**:30741-7.
62. **Kishimoto, T., S. Akira, M. Narazaki, and T. Taga.** 1995. Interleukin-6 family of cytokines and gp130. *Blood* **86**:1243-54.
63. **Kohlhuber, F., N. C. Rogers, D. Watling, J. Feng, D. Guschin, J. Briscoe, B. A. Witthuhn, S. V. Kotenko, S. Pestka, G. R. Stark, J. N. Ihle, and I. M. Kerr.** 1997. A JAK1/JAK2 chimera can sustain alpha and gamma interferon responses. *Mol Cell Biol* **17**:695-706.
64. **Kuropatwinski, K. K., C. De Imus, D. Gearing, H. Baumann, and B. Mosley.** 1997. Influence of subunit combinations on signaling by receptors for oncostatin M, leukemia inhibitory factor, and interleukin-6. *J Biol Chem* **272**:15135-44.
65. **Kurth, I., U. Horsten, S. Pflanz, A. Timmermann, A. Kuster, H. Dahmen, I. Tacke, P. C. Heinrich, and G. Muller-Newen.** 2000. Importance of the membrane-proximal extracellular domains for activation of the signal transducer glycoprotein 130 [In Process Citation]. *J Immunol* **164**:273-82.
66. **Lamiet, A. A., G. Apell, L. Conroy, and W. M. Kavanaugh.** 1996. Affinity, specificity, and kinetics of the interaction of the SHC phosphotyrosine binding domain with asparagine-X-X-phosphotyrosine motifs of growth factor receptors. *J Biol Chem* **271**:264-9.
67. **Lanfrancone, L., G. Pelicci, M. F. Brizzi, M. G. Aronica, C. Casciari, S. Giuli, L. Pegoraro, T. Pawson, P. G. Pelicci, and M. G. Arouica.** 1995. Overexpression of Shc proteins potentiates the proliferative response to the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and recruitment of Grb2/SoS and Grb2/p140 complexes to the beta receptor subunit [published erratum appears in *Oncogene* 1995 Aug 3;11(3):607]. *Oncogene* **10**:907-17.
68. **Lemmon, M. A., K. M. Ferguson, and J. Schlessinger.** 1996. PH domains: diverse sequences with a common fold recruit signaling molecules to the cell surface. *Cell* **85**:621-4.
69. **Li, S. C., N. K. Goto, K. A. Williams, and C. M. Deber.** 1996. Alpha-helical, but not beta-sheet, propensity of proline is determined by peptide environment. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**:6676-81.
70. **Liu, B., J. Liao, X. Rao, S. A. Kushner, C. D. Chung, D. D. Chang, and K. Shuai.** 1998. Inhibition of Stat1-mediated gene activation by PIAS1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**:10626-31.
71. **Liu, J., M. J. Spence, P. M. Wallace, K. Forcier, I. Hellstrom, and R. E. Vestal.** 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. **Liu, L., J. E. Damen, M. R. Hughes, I. Babic, F. R. Jirik, and G. Krystal.** 1997. The Src homology 2 (SH2) domain of SH2-containing inositol phosphatase (SHIP) is essential for tyrosine phosphorylation of SHIP, its association with Shc, and its induction of apoptosis. *J Biol Chem* **272**:8983-8.
73. **Livnah, O., D. L. Johnson, E. A. Stura, F. X. Farrell, F. P. Barbone, Y. You, K. D. Liu, M. A. Goldsmith, W. He, C. D. Krause, S. Pestka, L. K. Jolliffe, and I. A. Wilson.** 1998. An antagonist peptide-EPO receptor complex suggests that receptor dimerization is not sufficient for activation [see comments]. *Nat Struct Biol* **5**:993-1004.

74. **Livnah, O., E. A. Stura, S. A. Middleton, D. L. Johnson, L. K. Jolliffe, and I. A. Wilson.** 1999. Crystallographic evidence for preformed dimers of erythropoietin receptor before ligand activation. *Science* **283**:987-90.
75. **Luo, H., P. Rose, D. Barber, W. P. Hanratty, S. Lee, T. M. Roberts, A. D. D'Andrea, and C. R. Dearolf.** 1997. Mutation in the Jak kinase JH2 domain hyperactivates Drosophila and mammalian Jak-Stat pathways. *Mol Cell Biol* **17**:1562-71.
76. **Lutticken, C., P. Coffey, J. Yuan, C. Schwartz, E. Caldenhoven, C. Schindler, W. Kruijer, P. C. Heinrich, and F. Horn.** 1995. Interleukin-6-induced serine phosphorylation of transcription factor APRF: evidence for a role in interleukin-6 target gene induction. *FEBS Lett* **360**:137-43.
77. **Lütticken, C., U. M. Wegenka, J. Yuan, J. Buschmann, C. Schindler, A. Ziemiecki, A. G. Harpur, A. F. Wilks, K. Yasukawa, T. Taga, T. Kishimoto, G. Barbieri, S. Pellegrini, M. Sendtner, P. C. Heinrich, and F. Horn.** 1994. Association of transcription factor APRF and protein kinase Jak1 with the interleukin-6 signal transducer gp130. *Science* **263**:89-92.
78. **Luttrell, L. M., B. E. Hawes, T. van Biesen, D. K. Luttrell, T. J. Lansing, and R. J. Lefkowitz.** 1996. Role of c-Src tyrosine kinase in G protein-coupled receptor- and Gbetagamma subunit-mediated activation of mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem* **271**:19443-50.
79. **Macchi, P., A. Villa, S. Giliani, M. G. Sacco, A. Frattini, F. Porta, A. G. Ugazio, J. A. Johnston, F. Candotti, J. J. O'Shea, and et al.** 1995. Mutations of Jak-3 gene in patients with autosomal severe combined immune deficiency (SCID). *Nature* **377**:65-8.
80. **MacKenzie, K. R., J. H. Prestegard, and D. M. Engelman.** 1997. A transmembrane helix dimer: structure and implications. *Science* **276**:131-3.
81. **Matsuda, T., T. Fukada, M. Takahashi-Tezuka, Y. Okuyama, Y. Fujitani, Y. Hanazono, H. Hirai, and T. Hirano.** 1995. Activation of Fes tyrosine kinase by gp130, an interleukin-6 family cytokine signal transducer, and their association. *J Biol Chem* **270**:11037-9.
82. **Matsuda, T., M. Takahashi-Tezuka, T. Fukada, Y. Okuyama, Y. Fujitani, S. Tsukada, H. Mano, H. Hirai, O. N. Witte, and T. Hirano.** 1995. Association and activation of Btk and Tec tyrosine kinases by gp130, a signal transducer of the interleukin-6 family of cytokines. *Blood* **85**:627-33.
83. **Matsuda, T., Y. Yamanaka, and T. Hirano.** 1994. Interleukin-6-induced tyrosine phosphorylation of multiple proteins in murine hematopoietic lineage cells. *Biochem Biophys Res Commun* **200**:821-8.
84. **Migliaccio, E., M. Giorgio, S. Mele, G. Pelicci, P. Reboldi, P. P. Pandolfi, L. Lanfrancone, and P. G. Pelicci.** 1999. The p66shc adaptor protein controls oxidative stress response and life span in mammals [see comments]. *Nature* **402**:309-13.
85. **Migliaccio, E., S. Mele, A. E. Salcini, G. Pelicci, K. M. Lai, G. Superti-Furga, T. Pawson, P. P. Di Fiore, L. Lanfrancone, and P. G. Pelicci.** 1997. Opposite effects of the p52shc/p46shc and p66shc splicing isoforms on the EGF receptor-MAP kinase-fos signalling pathway. *Embo J* **16**:706-16.
86. **Miura, O., J. L. Cleveland, and J. N. Ihle.** 1993. Inactivation of erythropoietin receptor function by point mutations in a region having homology with other cytokine receptors. *Mol Cell Biol* **13**:1788-95.
87. **Müllberg, J., H. Schooltink, T. Stoyan, M. Günther, L. Graeve, G. Buse, A. Mackiewicz, P. C. Heinrich, and S. Rose-John.** 1993. The soluble interleukin-6 receptor is generated by shedding. *Eur J Immunol* **23**:473-80.
88. **Müller-Newen, G., C. Köhne, R. Keul, U. Hemmann, W. Müller-Esterl, J. Wijdenes, J. P. Brakenhoff, M. H. Hart, and P. C. Heinrich.** 1996. Purification and characterization of the soluble interleukin-6 receptor from human plasma and identification of an isoform generated through alternative splicing. *Eur J Biochem* **236**:837-42.
89. **Muller-Newen, G., A. Kuster, U. Hemmann, R. Keul, U. Horsten, A. Martens, L. Graeve, J. Wijdenes, and P. C. Heinrich.** 1998. Soluble IL-6 receptor potentiates the antagonistic activity of soluble gp130 on IL-6 responses. *J Immunol* **161**:6347-55.
90. **Muller-Newen, G., A. Kuster, J. Wijdenes, F. Schaper, and P. C. Heinrich.** 2000. Studies on the interleukin-6-type cytokine signal transducer gp130 reveal a novel mechanism of receptor activation by monoclonal antibodies [In Process Citation]. *J Biol Chem* **275**:4579-86.

91. **Murakami, M., M. Hibi, N. Nakagawa, T. Nakagawa, K. Yasukawa, K. Yamanishi, T. Taga, and T. Kishimoto.** 1993. IL-6-induced homodimerization of gp130 and associated activation of a tyrosine kinase. *Science* **260**:1808-10.
92. **Murakami, M., M. Narazaki, M. Hibi, H. Yawata, K. Yasukawa, M. Hamaguchi, T. Taga, and T. Kishimoto.** 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.
93. **Narazaki, M., M. Fujimoto, T. Matsumoto, Y. Morita, H. Saito, T. Kajita, K. Yoshizaki, T. Naka, and T. Kishimoto.** 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.
94. **Narazaki, M., B. A. Witthuhn, K. Yoshida, O. Silvennoinen, K. Yasukawa, J. N. Ihle, T. Kishimoto, and T. Taga.** 1994. Activation of JAK2 kinase mediated by the interleukin 6 signal transducer gp130. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**:2285-9.
95. **Narazaki, M., K. Yasukawa, T. Saito, Y. Ohsugi, H. Fukui, Y. Koishihara, G. D. Yancopoulos, T. Taga, and T. Kishimoto.** 1993. Soluble forms of the interleukin-6 signal-transducing receptor component gp130 in human serum possessing a potential to inhibit signals through membrane-anchored gp130. *Blood* **82**:1120-6.
96. **Neubauer, H., A. Cumano, M. Muller, H. Wu, U. Huffstadt, and K. Pfeffer.** 1998. Jak2 deficiency defines an essential developmental checkpoint in definitive hematopoiesis. *Cell* **93**:397-409.
97. **Nicola, N. A.** 1994. *Guidebook to Cytokines and their Receptors*. Oxford University Press, Oxford.
98. **Okabayashi, Y., Y. Sugimoto, N. F. Totty, J. Hsuan, Y. Kido, K. Sakaguchi, I. Gout, M. D. Waterfield, and M. Kasuga.** 1996. Interaction of Shc with adaptor protein adaptins. *J Biol Chem* **271**:5265-9.
99. **Okada, S., A. W. Kao, B. P. Ceresa, P. Blaikie, B. Margolis, and J. E. Pessin.** 1997. The 66-kDa Shc isoform is a negative regulator of the epidermal growth factor-stimulated mitogen-activated protein kinase pathway. *J Biol Chem* **272**:28042-9.
100. **O'Neal, K. D., and L. Y. Yu-Lee.** 1993. The proline-rich motif (PRM): a novel feature of the cytokine/hematopoietin receptor superfamily. *Lymphokine Cytokine Res* **12**:309-12.
101. **Park, R. K., A. Erdreich-Epstein, M. Liu, K. D. Izadi, and D. L. Durden.** 1999. High affinity IgG receptor activation of Src family kinases is required for modulation of the Shc-Grb2-Sos complex and the downstream activation of the nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (reduced) oxidase. *J Immunol* **163**:6023-34.
102. **Pellicci, G., L. Lanfranccone, F. Grignani, J. McGlade, F. Cavallo, G. Forni, I. Nicoletti, T. Pawson, and P. G. Pellicci.** 1992. A novel transforming protein (SHC) with an SH2 domain is implicated in mitogenic signal transduction. *Cell* **70**:93-104.
103. **Pennica, D., K. J. Shaw, T. A. Swanson, M. W. Moore, D. L. Shelton, K. A. Zioncheck, A. Rosenthal, T. Taga, N. F. Paoni, and W. I. Wood.** 1995. Cardiotrophin-1. Biological activities and binding to the leukemia inhibitory factor receptor/gp130 signaling complex. *J Biol Chem* **270**:10915-22.
104. **Peters, M., E. Roeb, D. Pennica, K. H. Meyer zum Buschenfelde, and S. Rose-John.** 1995. A new hepatocyte stimulating factor: cardiotrophin-1 (CT-1). *FEBS Lett* **372**:177-80.
105. **Pratt, J. C., M. Weiss, C. A. Sieff, S. E. Shoelson, S. J. Burakoff, and K. S. Ravichandran.** 1996. Evidence for a physical association between the Shc-PTB domain and the beta c chain of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor. *J Biol Chem* **271**:12137-40.
106. **Qiu, Y., L. Ravi, and H. J. Kung.** 1998. Requirement of ErbB2 for signalling by interleukin-6 in prostate carcinoma cells. *Nature* **393**:83-5.
107. **Radtke, S.** 1999. Diplomarbeit. RWTH Aachen, Aachen.
108. **Ravichandran, K. S., K. K. Lee, Z. Songyang, L. C. Cantley, P. Burn, and S. J. Burakoff.** 1993. Interaction of Shc with the zeta chain of the T cell receptor upon T cell activation. *Science* **262**:902-5.
109. **Rebollo, A., and A. C. Martinez.** 1999. Ras proteins: recent advances and new functions. *Blood* **94**:2971-80.

110. **Reithmeier, R. A.** 1995. Characterization and modeling of membrane proteins using sequence analysis. *Curr Opin Struct Biol* **5**:491-500.
111. **Richards, C. D., T. J. Brown, M. Shoyab, H. Baumann, and J. Gauldie.** 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.
112. **Robledo, O., M. Fourcin, S. Chevalier, C. Guillet, P. Auguste, A. Pouplard-Barthelaix, D. Pennica, and H. Gascan.** 1997. Signaling of the cardiotrophin-1 receptor. Evidence for a third receptor component. *J Biol Chem* **272**:4855-63.
113. **Rodig, S. J., M. A. Meraz, J. M. White, P. A. Lampe, J. K. Riley, C. D. Arthur, K. L. King, K. C. Sheehan, L. Yin, D. Pennica, E. M. Johnson, Jr., and R. D. Schreiber.** 1998. Disruption of the Jak1 gene demonstrates obligatory and nonredundant roles of the Jaks in cytokine-induced biologic responses. *Cell* **93**:373-83.
114. **Sakaguchi, K., Y. Okabayashi, Y. Kido, S. Kimura, Y. Matsumura, K. Inushima, and M. Kasuga.** 1998. Shc phosphotyrosine-binding domain dominantly interacts with epidermal growth factor receptors and mediates Ras activation in intact cells. *Mol Endocrinol* **12**:536-43.
115. **Sakai, I., L. Nabell, and A. S. Kraft.** 1995. Signal transduction by a CD16/CD7/Jak2 fusion protein. *J Biol Chem* **270**:18420-7.
116. **Sambrook, J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis.** 1989. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
117. **Sato, K., H. Yamamoto, T. Otsuki, M. Aoto, A. A. Tokmakov, F. Hayashi, and Y. Fukami.** 1997. Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate stimulates phosphorylation of the adaptor protein Shc by c-Src. *FEBS Lett* **410**:136-40.
118. **Schaper, F., C. Gendo, M. Eck, J. Schmitz, C. Grimm, D. Anhof, I. M. Kerr, and P. C. Heinrich.** 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.
119. **Schertler, G. F., C. Villa, and R. Henderson.** 1993. Projection structure of rhodopsin. *Nature* **362**:770-2.
120. **Schiemann, W. P., L. M. Graves, H. Baumann, K. K. Morella, D. P. Gearing, M. D. Nielsen, E. G. Krebs, and N. M. Nathanson.** 1995. Phosphorylation of the human leukemia inhibitory factor (LIF) receptor by mitogen-activated protein kinase and the regulation of LIF receptor function by heterologous receptor activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**:5361-5.
121. **Schmitz, J., M. Weißenbach, S. Haan, P. C. Heinrich, and F. Schaper.** SOCS3 exerts its inhibitory function on interleukin-6 signal transduction through the SHP2 recruitment site of gp130. *J. Biol. Chem.* **in press**.
122. **Schooltink, H., T. Stoyan, E. Roeb, P. C. Heinrich, and S. Rose-John.** 1992. Ciliary neurotrophic factor induces acute-phase protein expression in hepatocytes. *FEBS Lett* **314**:280-4.
123. **Senaldi, G., B. C. Varnum, U. Sarmiento, C. Starnes, J. Lile, S. Scully, J. Guo, G. Elliott, J. McNinch, C. L. Shaklee, D. Freeman, F. Manu, W. S. Simonet, T. Boone, and M. S. Chang.** 1999. Novel neurotrophin-1/B cell-stimulating factor-3: a cytokine of the IL- 6 family. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**:11458-63.
124. **Shuai, K.** 1999. The STAT family of proteins in cytokine signaling. *Prog Biophys Mol Biol* **71**:405-22.
125. **Shuai, K., G. R. Stark, I. M. Kerr, and J. E. Darnell, Jr.** 1993. A single phosphotyrosine residue of Stat91 required for gene activation by interferon-gamma [see comments]. *Science* **261**:1744-6.
126. **Songyang, Z., S. E. Shoelson, J. McGlade, P. Olivier, T. Pawson, X. R. Bustelo, M. Barbacid, H. Sabe, H. Hanafusa, T. Yi, and et al.** 1994. Specific motifs recognized by the SH2 domains of Csk, 3BP2, fps/fes, GRB-2, HCP, SHC, Syk, and Vav. *Mol Cell Biol* **14**:2777-85.
127. **Stahl, N., T. G. Boulton, T. Farruggella, N. Y. Ip, S. Davis, B. A. Witthuhn, F. W. Quelle, O. Silvennoinen, G. Barbieri, S. Pellegrini, J. N. Ihle, and G. D. Yancopoulos.** 1994. Association and activation of Jak-Tyk kinases by CNTF-LIF-OSM-IL-6 beta receptor components. *Science* **263**:92-5.

128. **Stahl, N., T. J. Farruggella, T. G. Boulton, Z. Zhong, J. E. Darnell, Jr., and G. D. Yancopoulos.** 1995. Choice of STATs and other substrates specified by modular tyrosine-based motifs in cytokine receptors. *Science* **267**:1349-53.
129. **Starr, R., U. Novak, T. A. Willson, M. Inglese, V. Murphy, W. S. Alexander, D. Metcalf, N. A. Nicola, D. J. Hilton, and M. Ernst.** 1997. Distinct roles for leukemia inhibitory factor receptor alpha-chain and gp130 in cell type-specific signal transduction. *J Biol Chem* **272**:19982-6.
130. **Starr, R., T. A. Willson, E. M. Viney, L. J. Murray, J. R. Rayner, B. J. Jenkins, T. J. Gonda, W. S. Alexander, D. Metcalf, N. A. Nicola, and D. J. Hilton.** 1997. A family of cytokine-inducible inhibitors of signalling. *Nature* **387**:917-21.
131. **Syed, R. S., S. W. Reid, C. Li, J. C. Cheetham, K. H. Aoki, B. Liu, H. Zhan, T. D. Osslund, A. J. Chirino, J. Zhang, J. Finer-Moore, S. Elliott, K. Sitney, B. A. Katz, D. J. Matthews, J. J. Wendoloski, J. Egrie, and R. M. Stroud.** 1998. Efficiency of signalling through cytokine receptors depends critically on receptor orientation. *Nature* **395**:511-6.
132. **Taga, T., M. Hibi, Y. Hirata, K. Yamasaki, K. Yasukawa, T. Matsuda, T. Hirano, and T. Kishimoto.** 1989. Interleukin-6 triggers the association of its receptor with a possible signal transducer, gp130. *Cell* **58**:573-81.
133. **Takahashi, T., and T. Shirasawa.** 1994. Molecular cloning of rat JAK3, a novel member of the JAK family of protein tyrosine kinases. *FEBS Lett* **342**:124-8.
134. **Tanigawa, T., N. Nicola, G. A. McArthur, A. Strasser, and C. G. Begley.** 1995. Differential regulation of macrophage differentiation in response to leukemia inhibitory factor/oncostatin-M/interleukin-6: the effect of enforced expression of the SCL transcription factor. *Blood* **85**:379-90.
135. **Tavernier, J., R. Devos, J. Van der Heyden, G. Hauquier, R. Bauden, I. Fache, E. Kawashima, J. Vandekerckhove, R. Contreras, and W. Fiers.** 1989. Expression of human and murine interleukin-5 in eukaryotic systems. *Dna* **8**:491-501.
136. **Thiel, S., I. Behrmann, A. Timmermann, H. Dahmen, G. Muller-Newen, F. Schaper, J. Tavernier, V. Pitard, P. C. Heinrich, and L. Graeve.** 1999. Identification of a Leu-1le internalization motif within the cytoplasmic domain of the leukaemia inhibitory factor receptor. *Biochem J* **339**:15-9.
137. **Thiel, S., H. Dahmen, A. Martens, G. Muller-Newen, F. Schaper, P. C. Heinrich, and L. Graeve.** 1998. Constitutive internalization and association with adaptor protein-2 of the interleukin-6 signal transducer gp130. *FEBS Lett* **441**:231-4.
138. **Thiel, S., U. Sommer, M. Kortylewski, C. Haan, I. Behrmann, P. C. Heinrich, and L. Graeve.** 2000. Termination of IL-6-induced STAT activation is independent of receptor internalization but requires de novo protein synthesis. *FEBS Lett.* **in press**
139. **Thoma, B., T. A. Bird, D. J. Friend, D. P. Gearing, and S. K. Dower.** 1994. Oncostatin M and leukemia inhibitory factor trigger overlapping and different signals through partially shared receptor complexes. *J Biol Chem* **269**:6215-22.
140. **Velazquez, L., K. E. Mogensen, G. Barbieri, M. Fellous, G. Uze, and S. Pellegrini.** 1995. Distinct domains of the protein tyrosine kinase tyk2 required for binding of interferon-alpha/beta and for signal transduction. *J Biol Chem* **270**:3327-34.
141. **Weiergraber, O., U. Hemmann, A. Kuster, G. Muller-Newen, J. Schneider, S. Rose-John, P. Kurschat, J. P. Brakenhoff, M. H. Hart, S. Stabel, and et al.** 1995. Soluble human interleukin-6 receptor. Expression in insect cells, purification and characterization. *Eur J Biochem* **234**:661-9.
142. **Wijdenes, J., P. C. Heinrich, G. Muller-Newen, C. Roche, Z. J. Gu, C. Clement, and B. Klein.** 1995. Interleukin-6 signal transducer gp130 has specific binding sites for different cytokines as determined by antagonistic and agonistic anti- gp130 monoclonal antibodies. *Eur J Immunol* **25**:3474-81.
143. **Wilks, A. F., A. G. Harpur, R. R. Kurban, S. J. Ralph, G. Zurcher, and A. Ziemiecki.** 1991. Two novel protein-tyrosine kinases, each with a second phosphotransferase-related catalytic domain, define a new class of protein kinase. *Mol Cell Biol* **11**:2057-65.
144. **Xiong, Q., J. L. Chan, C. S. Zong, and L. H. Wang.** 1996. Two chimeric receptors of epidermal growth factor receptor and c-Ros that differ in their transmembrane domains have opposite effects on cell growth. *Mol Cell Biol* **16**:1509-18.

145. **Yamasaki, K., T. Taga, Y. Hirata, H. Yawata, Y. Kawanishi, B. Seed, T. Taniguchi, T. Hirano, and T. Kishimoto.** 1988. Cloning and expression of the human interleukin-6 (BSF-2/IFN beta 2) receptor. *Science* **241**:825-8.
146. **Yan, H., F. Piazza, K. Krishnan, R. Pine, and J. J. Krolewski.** 1998. Definition of the interferon-alpha receptor-binding domain on the TYK2 kinase. *J Biol Chem* **273**:4046-51.
147. **Yin, T., T. Taga, M. L. Tsang, K. Yasukawa, T. Kishimoto, and Y. C. Yang.** 1993. Involvement of IL-6 signal transducer gp130 in IL-11-mediated signal transduction. *J Immunol* **151**:2555-61.
148. **Yokote, K., S. Mori, K. Hansen, J. McGlade, T. Pawson, C. H. Heldin, and L. Claesson-Welsh.** 1994. Direct interaction between Shc and the platelet-derived growth factor beta-receptor. *J Biol Chem* **269**:15337-43.
149. **Zhang, X., J. Blenis, H. C. Li, C. Schindler, and S. Chen-Kiang.** 1995. Requirement of serine phosphorylation for formation of STAT-promoter complexes. *Science* **267**:1990-4.
150. **Zhang, X. F., J. Settleman, J. M. Kyriakis, E. Takeuchi-Suzuki, S. J. Elledge, M. S. Marshall, J. T. Bruder, U. R. Rapp, and J. Avruch.** 1993. Normal and oncogenic p21ras proteins bind to the amino-terminal regulatory domain of c-Raf-1. *Nature* **364**:308-13.
151. **Zohlnhöfer, D., L. Graeve, S. Rose-John, H. Schooltink, E. Dittrich, and P. C. Heinrich.** 1992. The hepatic interleukin-6 receptor. Down-regulation of the interleukin- 6 binding subunit (gp80) by its ligand. *FEBS Lett* **306**:219-22.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. Peter C. Heinrich danke ich herzlich dafür, daß er diese Arbeit ermöglicht hat, sein stetes Interesse am Fortgang der Experimente sowie seine Unterstützung und sein Verständnis bei mancherlei Schwierigkeiten.

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

Weiterer Dank gilt Frau Dr. Iris Behrmann für die Betreuung der vorliegenden Arbeit, ihre zahlreichen Bemühungen immer wieder neue unerklärliche Phänomene zu diskutieren und für das Korrekturlesen des Manuskripts.

Weiterhin möchte ich mich bei unseren TA's bedanken: Bettina Breuer, Christa Gerlach, Sonja Linnemann, Marlies Kauffmann, Andrea Küster und Hildegard Schmitz-Van de Leur für die vielen kleinen und großen Unterstützungen, die sie mir während der letzten vier Jahre zukommen ließen.

Ich danke meinen Mit-Forschern in Labor 13: Jens Greiser, Andreas Herrmann, Marcin Kortylewski, Ingo Kurth und Stefan Pflanz für die nette Arbeitsatmosphäre. Besonderer Dank gebührt Claude und Serge Haan für die gute Zusammenarbeit, die gemeinsam durchlittenen Höhen und Tiefen und die vielen interessanten Diskussionen.

Ein ganz herzliches Dankeschön gilt Simone Radtke für ihre OSMR's, die wertvolle Zusammenarbeit bei der Erforschung der Geheimnisse dieses merkwürdigen Proteins, das Korrekturlesen dieser Arbeit und nicht zuletzt für ihre Freundschaft, die auch durch kleinere Laborkonflikte nicht zu erschüttern ist.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Ursula Horsten, die mich während der ersten drei Jahre stets mit Rat und Tat unterstützte, mich unzählige Male wieder aufbauen mußte und auch heute noch trotz der großen räumlichen Distanz einen wertvollen Beitrag zum Gelingen dieser Arbeit leistet. Außerdem danke ich Frederik Horsten dafür, daß er während der Zeit des Korrekturlesens seine Mama tatkräftig unterstützt hat, indem er so lieb und leise war.

Ebenso danke ich auch allen übrigen Mitarbeitern des Instituts für die kollegiale Hilfe bei allen möglichen Problemen.

Meinen Eltern, Guido und meinen Freunden gilt mein herzlichster Dank – für alles....

Lebenslauf

Angaben zur Person

Name, Vorname:	Hermanns, Heike Margarete
Geburtsdatum:	11.05.1971
Geburtsort:	Simmerath
Nationalität:	deutsch
Familienstand:	ledig

Schulbildung und Studium

1977-1981	Besuch der Katholischen Grundschule Simmerath
1981-1990	Besuch des Franziskus-Gymnasiums Vossenack
Juni 1990	Abitur
1990-1996	Studium der Biologie an der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen
Juli – Nov. 1993	Forschungsaufenthalt an der <i>University of Sydney</i> , Institut für Mikrobiologie (Prof. P. R. Reeves) Forschungsthema: „Studies on the verification of promoters in the <i>rfb</i> gene cluster“
Feb. 1995 – Feb. 1996	Diplomarbeit am Institut für Biochemie der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen (Prof. Dr. P. C. Heinrich) Thema: „IL-6 Signaltransduktion“
20. Feb. 1996	Diplom
seit März 1996	Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Biochemie der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen (Prof. Dr. P. C. Heinrich)