

Untersuchungen zur gp130/Jak1-Interaktion

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

vorgelegt von
Diplom-Chemiker
Claude Haan
aus
Luxemburg (Luxemburg)

Berichter: Universitätsprofessor Dr. Peter C. Heinrich
 Universitätsprofessor Dr. Dieter Enders

Tag der mündlichen Prüfung: 2. August 2000

Veröffentlichungen:

Claude Haan, Heike M. Hermanns, Peter C. Heinrich*, and Iris Behrmann

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.

Biochemical Journal (in Druck)

H.M.Hermanns, S.Radtke, C.Haan, H.Schmitz-Van de Leur, J.Tavernier, P.C.Heinrich and I.Behrmann.

Contributions of leukemia inhibitory factor receptor and oncostatin M receptor to signal transduction in heterodimeric complexes with gp130.

J. Immunol., (1999), **163**, 6652-6658.

S.Thiel, U.Sommer, M.Kortylewski, C.Haan, Iris Behrmann, P.C.Heinrich, L.Graeve.

„Termination of IL-6 induced STAT activation is independent of receptor internalization but requires de novo protein synthesis.“

FEBS Lett., (2000), **470**, 15-19.

1	EINLEITUNG.....	1
1.1	FUNKTIONEN VON ZYTOKINEN.....	1
1.2	INTERLEUKIN-6.....	2
1.3	DAS IL-6 REZEPTORSYSTEM.....	4
1.4	IL-6-SIGNALTRANSDUKTION.....	4
1.4.1	<i>Der Jak/STAT-Signaltransduktionsweg.....</i>	4
1.4.2	<i>Die Ras/Raf/MAPK-Kaskade.....</i>	6
1.5	JANUS-KINASEN.....	7
1.5.1	<i>Struktur-Funktionsbeziehungen bei Janus-Kinasen.....</i>	8
1.5.2	<i>Der Aktivierungsmechanismus der Jaks.....</i>	9
1.5.3	<i>Interaktion der Janus-Kinasen mit Zytokinrezeptoren.....</i>	11
1.6	ZIELSETZUNG DER ARBEIT.....	12
2	MATERIAL UND METHODEN.....	13
2.1	VERWENDETE MATERIALIEN.....	13
2.1.1	<i>Chemikalien.....</i>	13
2.1.2	<i>Puffer und Medien.....</i>	13
2.1.3	<i>Verbrauchsmaterialien.....</i>	13
2.1.4	<i>Enzyme.....</i>	13
2.1.5	<i>Bakterienstamm.....</i>	13
2.1.6	<i>Eukaryontische Zelllinien.....</i>	14
2.1.7	<i>Nährmedien für die Zellkultur.....</i>	14
2.1.8	<i>Zytokine.....</i>	14
2.1.9	<i>Antikörper.....</i>	14
2.1.10	<i>Plasmide.....</i>	15
2.2	ALLGEMEINE ZELLBIOLOGISCHE METHODEN.....	15
2.2.1	<i>Anzucht und Lagerung von Bakterienkulturen.....</i>	15
2.2.2	<i>Eukaryontische Zellen.....</i>	16
2.3	MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN.....	16
2.3.1	<i>Isolierung von Plasmid-DNA im kleinen Maßstab.....</i>	16
2.3.2	<i>Isolierung von Plasmid-DNA im großen Maßstab.....</i>	16
2.3.3	<i>Quantitative Bestimmung von Nukleinsäuren.....</i>	16
2.3.4	<i>Spaltung von DNA mit Restriktionsendonucleasen.....</i>	16
2.3.5	<i>Dephosphorylierung linearisierter DNA.....</i>	16
2.3.6	<i>Ligation von DNA.....</i>	17
2.3.7	<i>Auftrennung von Nukleinsäuren durch Agarose-Gelelektrophorese.....</i>	17
2.3.8	<i>Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....</i>	17
2.3.9	<i>Radioaktive Markierung doppelsträngiger DNA-Sonden.....</i>	17
2.3.10	<i>Automatische DNA-Sequenzierung.....</i>	18
2.3.11	<i>Herstellung der gp130-Mutanten.....</i>	18
2.3.12	<i>Herstellung der Jak1-Mutanten.....</i>	19
2.3.13	<i>Konstruktion von pVL 1393/m-Jak2.....</i>	21
2.3.14	<i>Transformation kompetenter Bakterien.....</i>	21
2.3.15	<i>Herstellung rekombinanter Baculoviren.....</i>	21
2.3.16	<i>Transfektion von eukaryontischen Zellen.....</i>	21
2.3.17	<i>Herstellung von Kernextrakten.....</i>	23
2.4	PROTEINCHEMISCHE METHODEN.....	23
2.4.1	<i>Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....</i>	23
2.4.2	<i>Gel-Retentionsanalyse (elektrophoretic mobility shift assay, EMSA).....</i>	23
2.4.3	<i>Proteinmengenbestimmung nach Bradford.....</i>	23
2.4.4	<i>Western-Blot.....</i>	24
2.5	IMMUNOLOGISCHE UND IMMUNHISTOCHEMISCHE METHODEN.....	24
2.5.1	<i>Identifizierung transfizierter Zellen durch Fluoreszenz aktivierte Durchflußzytometrie.....</i>	24
2.5.2	<i>Ko-Immunpräzipitation von Proteinen.....</i>	24
2.5.3	<i>Immunodetektion von Proteinen mit Hilfe des ECL-Systems.....</i>	25
2.6	ENZYMATISCHE METHODEN.....	25
2.6.1	<i>Nachweis der in-vitro-Auto-Kinase-Aktivität von Jak1 durch radioaktive Markierung mit [32P]-ATP.....</i>	25
2.6.2	<i>Nachweis der in-vitro-Kinase-Aktivität von Jak1 durch Fluoreszenz-aktivierten Nachweis phosphorylierter Peptide durch ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay).....</i>	26
2.7	UNTERSUCHUNG DER BIOLOGISCHEN AKTIVITÄT VON GP130-MUTANTEN DURCH ZELLPROLIFERATIONSTEST.....	27

3	ERGEBNISSE.....	29
3.1	MUTATIONSANALYSE DER MEMBRANPROXIMALEN BOX1/2-REGION VON GP130... 29	
3.1.1	<i>Auswahl der in die membranproximale Region von gp130 einzuführenden Mutationen</i>	29
3.1.2	<i>Isolierung stabil transfizierter Ba/F3-Subklone.....</i>	31
3.1.3	<i>Punktmutation von Tryptophan 666 in der Interbox1/2-Region von gp130 verhindert die proliferative Antwort von stabil transfizierten Ba/F3-Zellen nach Zytokinstimulation.....</i>	32
3.1.4	<i>Punktmutation von Tryptophan 666 zu Alanin in gp130 verhindert die Aktivierung von STAT3-Faktoren in stabilen Ba/F3-Transfektanten.....</i>	33
3.1.5	<i>STAT1-Aktivierung in transient transfizierten COS7-Zellen.....</i>	34
3.1.6	<i>Untersuchungen zur Assoziation von endogener Jak1 an den zytoplasmatischen Teil von gp130.....</i>	39
3.1.7	<i>Unterschiede im apparenten Rezeptorassoziationsverhalten von endogener und überexprimierter Jak1.....</i>	41
3.2	MUTATIONSANALYSE DER JH7- UND JH6- DOMÄNEN VON JAK1.....	43
3.2.1	<i>Auswahl der in den N-terminalen Bereich von Jak1 einzuführenden Mutationen.....</i>	43
3.2.2	<i>Untersuchung des Rezeptorbindungsverhaltens der verschiedenen Jak1-Mutanten.....</i>	46
3.2.3	<i>Der Phosphorylierungszustand der Jak1Y107A-Mutante bei Überexpression der Kinase ist drastisch reduziert.....</i>	47
3.3	UNTERSUCHUNGEN ZUR KINASEAKTIVITÄT VON JAK1.....	48
3.3.1	<i>Etablierung eines in-vitro-Auto-Kinase-assays für Jak1 durch radioaktive Markierung mit [(32P)-ATP.....</i>	48
3.3.2	<i>Entwicklung eines nichtradioaktiven in-vitro-Kinase-assays für Jak1 durch Fluoreszenz-aktivierten Nachweis phosphorylierter Peptide im ELISA.....</i>	50
4	DISKUSSION.....	53
4.1	DIE BEDEUTUNG DES ZYTOPLASMATISCHEN TEILES VON GP130 FÜR DIE SIGNALTRANSDUKTION ÜBER DEN JAK/STAT-WEG.....	53
4.2	DIE MUTATIONSANALYSE DER JH7- UND JH6-DOMÄNEN VON JAK1.....	59
4.3	UNTERSUCHUNGEN ZUR KINASEAKTIVITÄT VON JAK1.....	64
5	AUSBLICK.....	67
5.1	FRAGESTELLUNGEN AUS DER GP130-MUTAGENESE.....	67
5.2	PERSPEKTIVEN DER JAK-FORSCHUNG.....	68
5.2.1	<i>Die Jak1/Rezeptor-Interaktion.....</i>	68
5.2.2	<i>Einfluß verschiedener potentieller modularer Domänen in Jaks.....</i>	70
5.2.3	<i>Untersuchungen zur Substratspezifität von Janus-Kinasen.....</i>	71
5.2.4	<i>Die Regulierung der Kinaseaktivität von Jak1.....</i>	72
6	ZUSAMMENFASSUNG.....	75
7	LITERATURVERZEICHNIS.....	77

A	Absorption
Ab	<i>antibody</i>
Abb.	Abbildung
APP	Akutphase-Protein
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	bovines Serumalbumin
Ci	Curie
CNTF	<i>ciliary neurotrophic factor</i>
CT-1	<i>cardiotrophin-1</i>
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Serum
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i>
DTT	1,4-Dithio-DL-treitol
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
ECL	<i>enhanced chemoluminescence</i>
EDTA	ethylenediamine-tetraacetic acid
EMSA	<i>electrophoretic mobility shift assay</i>
ESS	<i>extended SH2 subdomain</i>
FGF	<i>fibroblast growth factor</i>
gp	Glykoprotein
h	Stunde
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N'-2-ethansulfonsäure
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
IR	Insulin-Rezeptor
Jak	Janus-Kinase
JH	<i>Jak homology</i>
JSI	Janus-spezifische Insertion
kDa	Kilodalton
KIR	<i>kinase inhibitory region</i>
FKS	fötales Kälberserum
LB	Luria-Bertani-Medium
LIF	<i>leukemia inhibitory factor</i>
min	Minute
M _r	molare Masse
OSM	<i>oncostatin M</i>
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PIAS	<i>protein inhibitor of activated STAT</i>
PVDF	Polyvinylidendifluorid
YP	Phosphotyrosin
R	Rezeptor
RNA	<i>ribonucleic acid</i>

SDS	<i>sodium-dodecylsulfate</i>
SH	<i>src homology</i>
SHP	<i>SH2-domain-containing tyrosine phosphatase</i>
SOCS	<i>suppressor of cytokine signalling</i>
STAT	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
Tab.	Tabelle
TMEDA	N, N, N', N'- Tetramethyl-ethylen-diamin
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
Tris	Tris(hydroxy)aminomethan
U	<i>unit</i>
upm	Umdrehungen pro Minute

Mutierte Proteine werden im folgenden Text auch als Mutanten bezeichnet.

Fremdsprachliche Fachausdrücke sind kursiv gedruckt.

1 Einleitung

1.1 Funktionen von Zytokinen

Für die Aufrechterhaltung der Funktionen des Organismus bedarf es einer komplizierten Logistik. Zur Regulierung der Zell- und Organfunktionen bedient sich der Körper einer Reihe von Botenstoffen. Humorale Faktoren, die an spezifische Rezeptoren auf der Zelloberfläche binden (z.B. Zytokine) oder direkt in die Zelle eindringen (z.B. Steroidhormone), erfüllen diese Funktion. Die glandulären Hormone (z.B. Insulin, Glucagon, Steroidhormone) werden von endokrinen Drüsen oder Zellgruppen produziert und sezerniert. Sie wirken über den Blutstrom auch auf weit entfernte Organe. Aglanduläre Hormone oder Gewebshormone werden von einzeln liegenden Zellen gebildet. Sie können parakrin, autokrin und endokrin wirken. Gewebshormone können Polypeptide oder andere organische Substanzen (z.B. Prostaglandine, Histamin) sein. Zu den Polypeptid-Gewebshormonen zählt man Wachstumsfaktoren (z.B. *epidermal growth factor* (EGF), *platelet-derived growth factor* (PDGF)), neurotrophe Faktoren (z.B. *nerve growth factor* (NGF)) und die Zytokine. Zytokine sind Gewebshormone, die Zellen des Immunsystems stimulieren können. Dies ist jedoch nicht ihre ausschließliche Aufgabe, vielmehr können sie auch andere Gewebe (z.B. Endothel, Gehirn) beeinflussen. Zytokine haben ein pleiotropes Wirkungsspektrum. Verschiedene Zytokine beeinflussen sich in ihrer Wirkung in additiver, synergistischer oder antagonistischer Weise.

1.2 Interleukin-6

IL-6 ist ein Protein mit einem Molekulargewicht von 26 kDa und besteht aus 184 Aminosäuren [1]. Strukturell kann IL-6 der Gruppe der 4 α -helix bundle-Zytokine zugeordnet werden [2], in welcher es zur Untergruppe der *long chain* Zytokine gehört (etwa 25 Aminosäuren in den α -Helices). Andere *long chain* Zytokine sind LIF (*leukemia inhibitory factor*), OSM (Oncostatin M), IL-10, IL-11, IL-12, CNTF (*ciliary neurotrophic factor*), GH (*growth hormone*), Prolactin, G-CSF (*granulocyte-colony stimulating factor*), TPO (Thrombopoetin), CT-1 (Cardiotrophin-1), IFN α/β (Interferon α/β), Leptin und EPO (Erythropoetin) [2, 3]. Zwei Cysteinreste im IL-6 sind wichtig für die Aufrechterhaltung von Struktur und Aktivität. IL-6 wird N- und O-glycosyliert, wobei die glycosylierte Form eine drei- bis vierfach höhere spezifische Aktivität besitzt [4].

Das Gewebshormon Interleukin-6 (IL-6) wird bei Infektionen und Verletzungen von einer Vielzahl von Zellen wie z.B. Monozyten/Makrophagen, Kupffer-Zellen, Neutrophile, Mastzellen, B-Zellen, T-Zellen, Endothelzellen, Fibroblasten, vaskuläre glatte Muskelzellen, Osteoblasten und intestinale Epithelzellen sezerniert. Wie andere Zytokine zeichnet sich IL-6 durch seine pleiotrope Wirkungsweise aus. IL-6 und die durch IL-6 induzierten Akutphase-Proteine wirken bei der Regulierung von Entzündungsprozessen sowohl pro- als auch antiinflammatorisch [5]. Den proinflammatorischen Eigenschaften von IL-6, wie z.B. der Aktivierung von Leukocyten, stehen effiziente antiinflammatorische Eigenschaften gegenüber. So bewirkt IL-6 eine verminderte Ausschüttung von IL-1 und TNF- α durch Makrophagen [5]. IL-6 führt zusammen mit Akutphase-Proteinen (APP) zur Expression des IL-1-Rezeptor-Antagonisten (IL-1ra) [6] und zur Produktion von löslichen TNF-Rezeptoren (p55 und p75) [5], was ebenfalls zu einer Attenuierung der inflammatorischen Antwort führt. Die Induktion der Glucocorticoidausschüttung durch IL-6, welche zu einer Inhibierung der Zytokin-Genexpression führt, ist ein weiterer wichtiger antiinflammatorischer Prozeß [5].

IL-6 spielt ebenfalls bei verschiedenen Krankheiten eine Rolle z.B. inflammatorischen und Autoimmunkrankheiten (mesangiale proliferative Glomerulonephritis, rheumatoide Arthritis, u.a), AIDS (HIV-Infektion, Kaposi's Sarkom), B-Zell-Neoplasien (Myelom) und bei der Osteoporose [7].

Tabelle 1: Beispiele pleiotroper biologischer Funktionen von IL-6 [5, 7, 8]

Effekte auf B-Zellen	Immunglobulin (IgM, IgG und IgA)-Produktion.
Effekte auf T-Zellen	<ul style="list-style-type: none"> - T-Zell-Proliferation, -Differenzierung und -Aktivierung durch Induktion der IL-2- und IL-2Rα-Expression - Differenzierung zu cytotoxischen T-Zellen - Erhöht die Aktivität von Natürlichen Killerzellen
Effekt auf hämatopoetische Progenitorzellen	Verstärkung der Bildung pluripotenter hämatopoetischer Kolonien
Effekt auf Megakaryozyten	Reifung
Effekte auf Makrophagen	<ul style="list-style-type: none"> - Reifung zu aktivierten Makrophagen (erhöhte Phagozytose; Expression von Fcγ-Rezeptoren, MHC-I- und Adhäsionsmolekülen) - IL-6 bewirkt eine verminderte Ausschüttung von IL-1 und TNF durch Makrophagen - IL-6 führt zusammen mit Akutphase-Proteinen (APP) zur Expression von IL-1-Rezeptor-Antagonist (IL-1ra) und löslichen TNF-Rezeptoren
Effekte auf Hepatozyten	Synthese und Sekretion von Akutphase-Proteinen (APP) vom Typ2 und Synergismus mit IL-1 bei der Synthese und Sekretion von Typ1-APP (z.B. C-reaktives Protein, Serum Amyloid A, Serum Amyloid P, Komplementfaktoren, Koagulationsfaktoren, Proteaseinhibitoren, Metall-bindende Proteine, u.a.)
Effekte auf das Zentralnervensystem	<ul style="list-style-type: none"> - Auslösen von Fieber durch die Induktion von Prostaglandin E₂ (PGE₂). - Neuronale Differenzierung - Sekretion des adrenocorticotrophen Hormons (ACTH) durch die Hypophyse. <ul style="list-style-type: none"> → Synthese von Glukocortikoiden im adrenalen Kortex → 1. Unterstützung der Akutphase-Reaktion durch Verstärkung der Expression von gp130 auf Hepatozyten 2. Glukocortikoide inhibieren die Zytokin-Genexpression (Negativer <i>feedback loop</i>)
Effekte auf den Knochenmetabolismus	<ul style="list-style-type: none"> - Stimulation der Osteoclastenbildung → Induktion der Knochenresorption
Effekte auf Blutgefäße	<ul style="list-style-type: none"> - Proliferation der glatten Gefäßmuskulatur durch Induktion der PDGF-Produktion - Negativer ionotroper Effekt
Effekt auf die Plazenta	Sekretion von chorionischem Gonadotropin aus Trophoblasten

1.3 Das IL-6 Rezeptorsystem

Allen IL-6-Typ-Zytokinen gemeinsam ist die promiskuitive Nutzung der Signaltransduzierenden Rezeptoruntereinheit gp130 (ein 130 kDa Membran-Glykoprotein). IL-6, IL-11 und CNTF binden an einen spezifischen α -Rezeptor. Für CT-1 gibt es ebenfalls Hinweise auf einen α -Rezeptor. Mit Ausnahme des CNTF-Rezeptors, welcher einen Lipidanker besitzt, sind diese Rezeptoren alle über eine Transmembranregion in der Zellmembran verankert. Anschließend wird gp130 -alleine oder in Kombination mit dem LIFR oder OSMR- als signaltransduzierende Untereinheit rekrutiert (Abbildung 1) [3].

Vom IL-6R α existiert sowohl eine membrangebundene als auch eine durch alternatives Spleißen der mRNA oder durch limitierte Proteolyse (*Shedding*) entstehende funktionelle lösliche Form [9], welche im Komplex mit IL-6 eine agonistische Wirkung zeigt [10, 11]. Es gibt ebenfalls eine lösliche Form des gp130, welche antagonistisch wirkt (M Narazaki, Blood 1993).

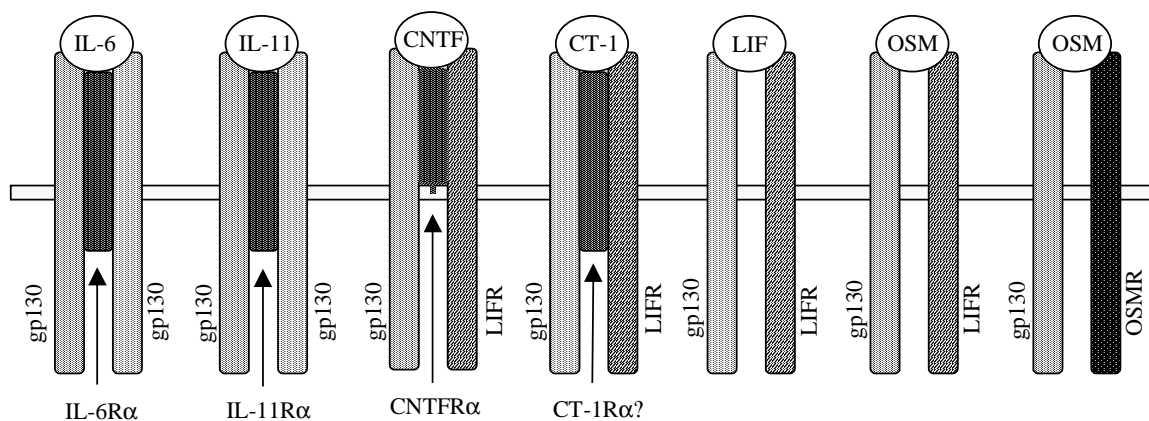


Abbildung 1: Die IL-6-Typ-Zytokine und ihre Rezeptorkomplexe.

1.4 IL-6-Signaltransduktion

1.4.1 Der Jak/STAT-Signaltransduktionsweg

Anders als Rezeptortyrosinkinasen besitzen die zytoplasmatischen Bereiche der Zytokinrezeptoren keine Kinase-Domäne oder andere Sequenzen mit offensichtlichen katalytischen Funktionen [2]. Zytoplasmatische Kinasen der Jak-Familie (Jak=Janus-Kinase), von denen man vier Mitglieder kennt (Jak1, Jak2, Jak3 und Tyk2), sind intrazellulär mit den Zytokinrezeptoren assoziiert. IL-6 löst nach Bindung an seinen spezifischen Rezeptor (IL-6R α , gp80) eine gp130-Homodimerisierung aus, die in verschiedenen Zelllinien zu einer

Aktivierung der Kinasen Jak1, Jak2 und Tyk2 führt [12, 13]. Eine besonders wichtige Rolle für die gp130-Signaltransduktion kommt dabei Jak1 zu, wie mit Hilfe einer Jak1-defizienten Fibroblastenzelllinie gezeigt werden konnte [14, 15]. Die Aktivierung der Jaks geschieht wahrscheinlich durch eine Auto-/Transphosphorylierung. Die aktivierten Jaks phosphorylieren Tyrosinreste am gp130, welche dann Bindungsstellen für die SH2-Domänen der Transkriptionsfaktoren STAT3 und STAT1 sowie für andere SH2-Domänen-enthaltende Proteine wie SHP-2 darstellen [3]. STAT-Faktoren (*signal transducer and activator of transcription*) bestehen aus einer Tetramerisierungsdomäne, einer DNA-bindenden Sequenz, einer SH2-Domäne und einer Transaktivierungsdomäne [3]. STATs werden durch die aktivierten Janus-Kinasen oder andere Kinasen an einem konservierten Tyrosinrest im C-terminalen Bereich des Moleküls phosphoryliert, was zur Homo- oder Heterodimerisierung der STAT-Faktoren führt [3]. Die Translokation der Dimere in den Zellkern ermöglicht deren Bindung an IL-6-responsive *enhancer* in den Promotoren von IL-6-Zielgenen und somit die Regulation der Transkription [3].

Der Jak/STAT-Signaltransduktionsweg wird durch eine Reihe von Faktoren reguliert:

1. Phosphatasen können die Tyrosinreste der Rezeptoren, Janus-Kinasen und STAT-Faktoren dephosphorylieren und so den Signaltransduktionsweg abschalten. Die Dephosphorylierung von Jak2 und Jak3 durch SHP-1 wurde beschrieben [16]. Alle Janus-Kinasen und gp130 assoziieren ebenfalls mit der SHP-2 Proteintyrosinphosphatase, welche wie SHP-1 zwei SH2-Domänen und eine Phosphatasedomäne enthält [17]. Im IL-6-System gibt es auch Hinweise, daß SHP-2 die Zytokinsignaltransduktion über die Phosphataseaktivität unterdrückt [18, 19]. Phosphorylierte STAT-Faktoren können ebenfalls durch Phosphatasen inaktiviert werden [20].
2. Zur Familie der SOCS-Inhibitoren (*suppressors of cytokine signaling*) zählen zur Zeit acht Mitglieder (SOCS1-7 und CIS-1). SOCS-Proteine enthalten eine variable N-terminale Region, eine zentrale SH2-Domäne und eine konservierte C-terminale SOCS-Box [21-23]. Die Expression der SOCS-Proteine wird durch Zytokine induziert. Von einigen Vertretern der SOCS-Familie konnte gezeigt werden, daß sie die Zytokinsignaltransduktion über einen *Feedback*-Mechanismus inhibieren. SOCS-1 (auch JAB, SSI1 genannt) inhibiert z.B. die IL-6-Signaltransduktion. SOCS1 und SOCS3 (auch CIS3, SSI3 genannt) interagieren mit der Kinasedomäne von Jak2 -am Tyrosin 1007 in der Aktivierungsschleife- und inhibieren die Kinaseaktivität. SOCS1 assoziiert auch mit den anderen Janus-Kinasen (Jak1, Jak3, Tyk2) und der Tec-Kinase. Die SH2-Domäne und die ESS-Region (*extended SH2 subdomain*) der SOCS-Proteine sind für die Assoziation

an das phosphorylierte Doppelyrosinmotiv im katalytischen *loop* der Kinasedomäne verantwortlich. Die KIR (*kinase inhibitory region*) soll als Pseudosubstrat das aktive Zentrum der Jak blockieren [24, 25]. Neuere Studien zeigen, daß SOCS3 mit der SH2-Domäne ebenfalls an den Phosphotyrosinrest 759 am gp130 binden muß, um inhibitorische Aktivität entfalten zu können [26]. SOCS3 wird in 293-T-Zellen nach Stimulation mit IL-2 Tyrosin-phosphoryliert, wahrscheinlich von Janus-Kinasen, was eine verstärkte Aktivierung des Ras/Raf/MAPKinase-Weges nach sich zieht [27]. Die SOCS-Box interagiert mit ElonginB/C und könnte somit für den proteolytischen Abbau eine Rolle spielen [28].

3. SH2-B β , ein zytoplasmatisches Protein, welches nach Stimulation mit Wachstumshormon phosphoryliert wird und eine SH2- und eine PH-Domäne enthält, vermag nach Bindung von Jak2 die Kinaseaktivität um das 20-fache zu erhöhen [29]. Die SH2-Domäne von SH2-B β interagiert mit der Janus-Kinase, der Mechanismus dieser Aktivierung ist aber noch unklar.
4. PIAS-Proteine (*protein inhibitors of activated STAT*; fünf Homologe wurden identifiziert) wurden mit Hilfe des *yeast two hybrid screening* entdeckt, binden wahrscheinlich spezifisch an bestimmte Tyrosin-phosphorylierte STAT-Faktoren und unterdrücken so die DNA-Bindung [30]. PIAS-Proteine besitzen keine Phosphotyrosin-bindenden Domänen wie SH2- oder PTB-Domänen. Der Mechanismus der Inhibition ist noch nicht aufgeklärt.
5. Jaks und STATs werden ebenfalls durch Serinphosphorylierung reguliert. Jak2 wird nach PMA-Stimulation von PKC- δ an bisher unbekannt Positionen Serin- und Threonin-phosphoryliert und dadurch inhibiert [31]. Für die transkriptionelle Transaktivierungsfähigkeit von STAT1- und STAT3-Faktoren ist eine Serinphosphorylierung an S727 notwendig [32]. Eine Serinphosphorylierung von STAT3 wirkt einer nachfolgenden Aktivierung durch Tyrosinphosphorylierung entgegen [33-35].
6. Im Falle der Jaks wird auch eine Regulierung über den Redoxzustand diskutiert [36].

1.4.2 Die Ras/Raf/MAPK-Kaskade

Nach der Rezeptor-Oligomerisierung und Phosphorylierung des Tyrosins 759 von gp130 - wahrscheinlich durch die Jaks- bindet die Tyrosinphosphatase SHP-2 an dieses Tyrosin. SHP-2 fungiert hier als Adaptorprotein und assoziiert mit Grb2 (*growth factor receptor bound protein*), einem weiteren Adaptorprotein, welches über SH3-Domänen an den Guaninnucleotid-Austausch-Faktor SOS (*son of sevenless*) gebunden ist. Der jetzt an die

Plasmamembran rekrutierte Grb2/SOS-Komplex überführt GDP-Ras in seine aktive Form, GTP-Ras. Dies induziert die Phosphorylierung und Aktivierung der Serin/Threoninkinase Raf-1. Über eine Kaskade von Serin/Threonin/Tyrosinkinasen (MAPKK) und Serin/Threoninkinasen (MAPK) kommt es zur Phosphorylierung einer Reihe von Transkriptionsfaktoren (c-jun, c-myc, c-fos, NF-IL-6), welche die Expression von Ras-induzierbaren Genen vermitteln [3].

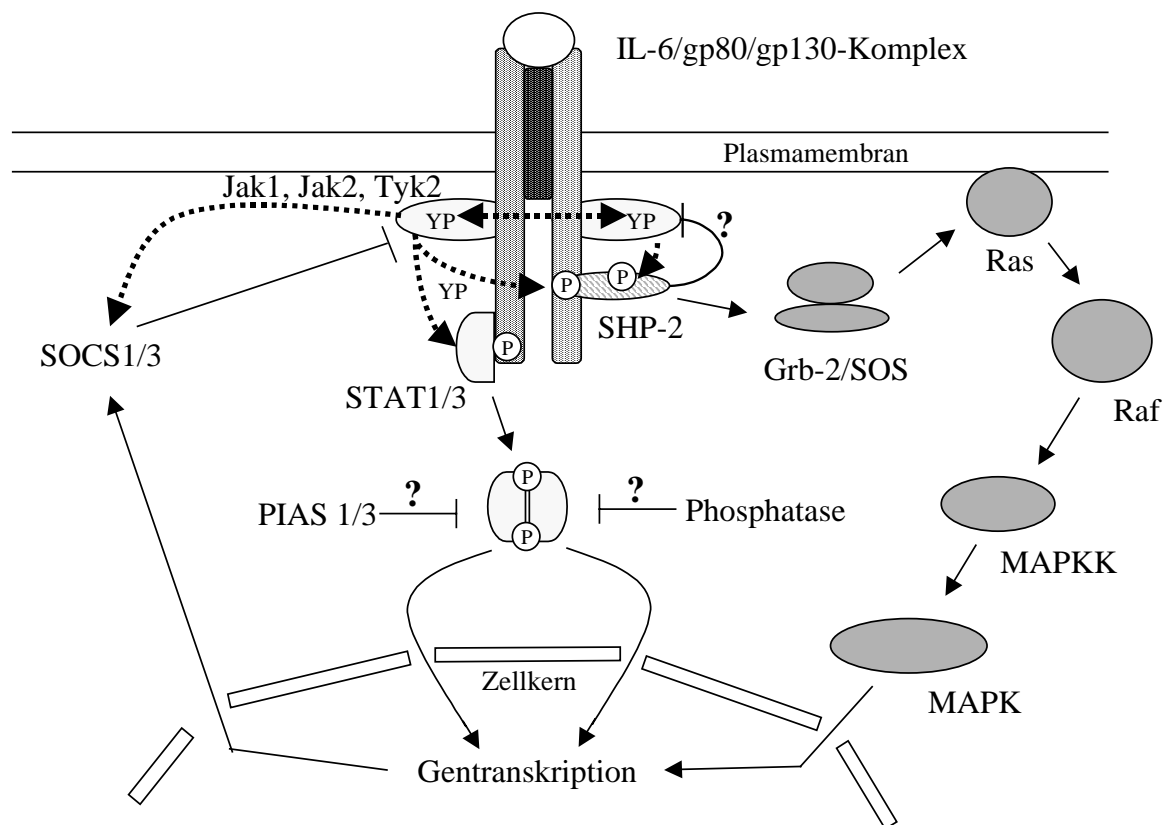


Abbildung 2: IL-6-Signaltransduktion und deren Regulierung.

Gestrichelte Pfeile bezeichnen Phosphorylierungsreaktionen die wahrscheinlich von Jaks vermittelt werden.

1.5 Janus-Kinasen

Janus-Kinasen wurden bisher nur im Tierreich identifiziert [37]. Man findet sie in Wirbeltieren aber auch bereits in Wirbellosen. Die Familie der Janus-Kinasen umfaßt vier Mitglieder: Jak1, Jak2, Jak3 und Tyk2 [37-40]. Jak1, Jak2 und Tyk2 werden in einer Vielzahl von Geweben exprimiert, während die Expression von Jak3 auf Zellen des hämatopoetischen Systems beschränkt ist. Alle Janus-Kinasen spielen eine Rolle bei der Signaltransduktion von Zytokinen.

Das Fehlen von Jaks führt zu schweren Defekten im Mausmodell (für Jak1, Jak2 und Jak3 gezeigt) aber auch beim Menschen (für Jak3 nachgewiesen). Jak1-*knockout*-Mäuse zeigen

eine verringerte Geburtenrate, saugen nicht und sterben perinatal. Sie haben einen verkleinerten Thymus und weisen eine abnormale Lymphozytenentwicklung auf. Zellen von Jak1-defizienten Mäusen zeigen keine biologischen Antworten nach Gabe von IL-6-Typ-Zytokinen [15]. Jak1 bzw. Hop (Jak-homologe Kinase in *Drosophila melanogaster*) sind essentiell für die Zell-Migration und eine korrekte Embryonalentwicklung in *Drosophila* und Zebrafischen [41, 42]. Jak2-*knockout*-Mäuse sterben während der Embryogenese, da sie keine definitive Erythropoese aufweisen. Zellen von Jak2-defizienten Mäusen zeigen keine biologischen Antworten nach Gabe von EPO, IL-3, GM-CSF und IFN- γ [43, 44]. Patienten mit inaktiver Jak3 leiden an immunologischen Defekten. Humanes autosomales rezessives SCID (*severe combined immunodeficiency*) wird durch aberrantes Spleißen, durch Deletionen und/oder Punktmutationen in der Sequenz von Jak3 bewirkt, welche zu einer inaktiven Jak3 führen [45, 46]. Die Phänotypen von Jak3-SCID und X-SCID [47](durch Mutationen in der IL-2R γ -Untereinheit hervorgerufen) sind identisch. Im Menschen ist SCID charakterisiert durch die Abwesenheit zirkulierender T-Zellen und Natürlicher Killerzellen sowie durch normale bis erhöhte Mengen von B-Zellen. Jak3-*knockout*-Mäuse zeigen ebenfalls SCID doch mit unterschiedlichem Phänotyp. Sie weisen große Mengen an T-Zellen aber keine B-Zellen.

1.5.1 Struktur-Funktionsbeziehungen bei Janus-Kinasen

Die Janus-Kinasen werden auf Grundlage von Sequenzhomologien in sieben Jak-Homologiebereiche unterteilt (JH1-7) (Abbildung 3). Die JH1-Domäne am C-Terminus ist eine klassische Kinasedomäne. Durch gezielten Austausch essentieller Aminosäuren wurden Kinase-inaktive Janus-Kinasen hergestellt [48, 49].

N-terminal zu der Kinasedomäne liegt die JH2-Domäne (Pseudokinasedomäne), die hohe Sequenzhomologie zu klassischen Kinasedomänen aufweist. Katalytische Aktivität besitzt die Pseudokinasedomäne nach bisherigen Erkenntnissen nicht. Die JH2-Domäne enthält alle elf Unterdomänen einer typischen Kinasedomäne [50]. Es fehlen jedoch eine Reihe konservierter, für die Kinaseaktivität wichtige Aminosäuren. Besonders hervorzuheben ist das Fehlen eines essentiellen Aspartatrestes in Subdomäne VI, das Fehlen des Doppelyrosinmotivs in der Aktivierungsschleife (*A-loop*) und weitere Sequenzunterschiede in den Subdomänen I, II, VI, VII und VIII. Der Beitrag der Pseudokinasedomäne bezüglich der Regulierung von Jaks ist noch nicht klar. Sowohl positiv- als auch negativ-regulatorische Funktionen werden diskutiert [50].

Die N-terminale Hälfte der Jaks weist fünf weitere konservierte Bereiche (JH3-JH7) auf. Diese Bereiche der Jaks sind für die Assoziation mit den membranproximalen Regionen von Zytokinrezeptoren notwendig [51, 52]. "Klassische" Protein-Interaktionsdomänen wurden im

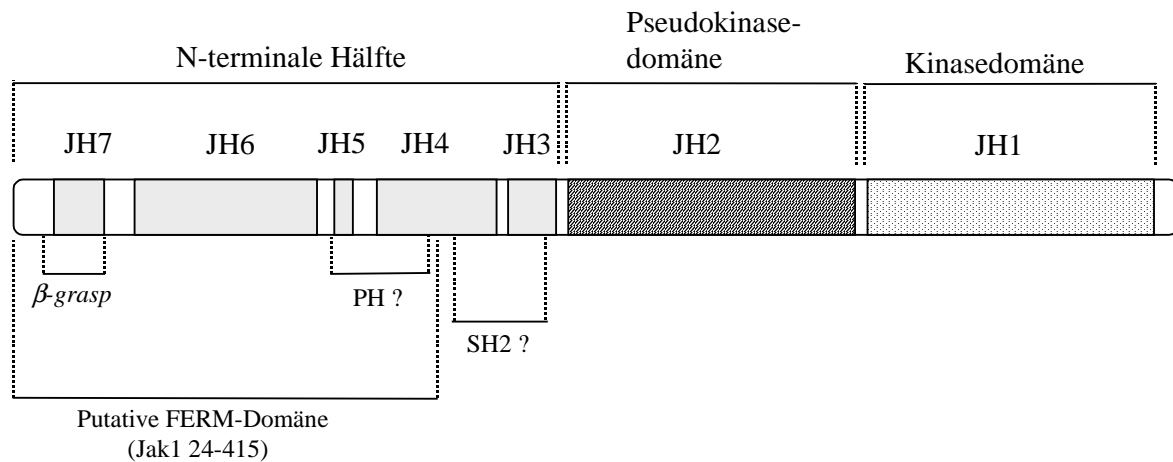


Abbildung 3: Struktur der Janus-Kinasen.

Die Jaks besitzen eine Kinasedomäne, eine Pseudokinasedomäne und eine N-terminale Hälfte, die für die Bindung an den Rezeptor verantwortlich ist. Über die Struktur des N-Terminus ist wenig bekannt. Die Existenz einer Reihe von vermeintlichen Protein-Strukturdomänen, z.B. FERM-, β -grasp-, PH- und SH2-Domänen, wird postuliert.

N-terminalen Bereich der Jaks funktionell noch nicht nachgewiesen. N-terminal zur Pseudokinasedomäne gibt es eine vermeintliche SH2-Domäne, der aber noch keine Funktion zugewiesen werden konnte. Austausch von Arginin 426 durch Alanin in der potentiellen SH2-Domäne von Jak2 blieb ohne detektierbare Effekte auf Jak2-abhängige Signalvorgänge [53]. Die N-Termini der Jaks (bei Jak1 die Region zwischen den Aminosäuren 24-415) weisen Sequenzhomologien zu Bande-4.1.-Domänen (auch FERM-Domäne genannt) auf. Bande-4.1.-Domänen wurde zuerst im Erythrozyten Protein "Bande-4.1" identifiziert. Dies sind Domänen, welche für die Bindung von Protein-4.1 (*Four point-one*), Ezrin, Radixin, Moesin an verschiedene Transmembranproteine (z.B. Glycophorin A und C, CD44, CD43, ICAM-2, ICAM-3) eine wichtige Rolle spielen [54]. Es wurden 19 konservierte Bereiche zwischen den Jaks und FERM-Domänen gefunden. N-terminal zur SH2-Domäne wird das Vorhandensein einer PH-Domäne postuliert (Mitteilung von J.F.Bazan). In Abbildung 3 ist der Aufbau der Jaks schematisch dargestellt.

1.5.2 Der Aktivierungsmechanismus der Jaks

Die Regulation von Kinasen ist oftmals ein komplizierter Prozess, der außer der Kinasedomäne noch weitere Bereiche mit einbezieht. Den Prozess der Regulation kann man

in zwei Ereignisse aufteilen: Erstens die initiale Aktivierung der Kinase und zweitens die eigentliche Regulation. Die initiale Aktivierung erfolgt dabei ebenfalls auf zwei Ebenen:

1. Die Aktivierung durch Auflösung inhibitorischer Wechselwirkungen innerhalb der Kinase.
2. Phosphorylierungsvorgänge, die eine vollständige Aktivierung herbeiführen.

Die initiale Aktivierung wird wahrscheinlich nach Rezeptoraggregation durch das Lösen inhibitorischer Wechselwirkungen innerhalb der Jaks eingeleitet. Ob diese intra- und/oder intermolekular wirken, ist nicht bekannt. Welche Bereiche der Jaks die inhibitorische Wechselwirkung vermitteln, ist ebenfalls unklar. Der Pseudokinasedomäne scheint eine regulatorische Rolle zuzukommen. Deletion der Pseudokinasedomäne führte im Fall von Tyk2 [55] und Jak3 [56] zu einem Verlust der Kinaseaktivität, bei Jak2 jedoch zu einer Zunahme [57]. Studien an Jak3 implizieren auch eine inhibitorische Rolle für den N-Terminus. Hier führte sowohl die Deletion der Pseudokinasedomäne als auch die Deletion des N-Terminus zu einer inaktiven Kinase, wohingegen ein Konstrukt, das nur aus der Kinasedomäne besteht, konstitutiv aktiviert ist.

Ist die inhibitorische Wechselwirkung aufgehoben - und die Kinase somit aktiviert - kommt es zu regulatorischen Phosphorylierungsvorgängen innerhalb der Kinasedomäne. Die Kinaseaktivität aller Jaks wird, wie bei allen anderen Kinasen, durch Phosphorylierungen von Tyrosinresten in der Aktivierungsschleife (*A-loop*) erhöht. Zur Zeit geht man davon aus, daß sich die Jaks nach Zytokinbindung und Rezeptoraggregation auto- bzw. transaktivieren [48, 58, 59]. Innerhalb der Familie der Jaks gibt es aber auch Hinweise auf unterschiedliche Aktivierungsmechanismen. Von Jak1, Jak2 und Tyk2 ist bekannt, daß die Phosphorylierung eines Tyrosins aus dem Doppeltirosinmotiv im *A-loop* der Kinasedomäne nötig ist, um die Kinasen zu aktivieren [59-61]. Jak3 kann jedoch aktiviert vorliegen, ohne daß eines dieser Tyrosine nachträglich phosphoryliert würde [61]. Die Phosphorylierung des ersten Tyrosins (Y980) führte jedoch zu einer Erhöhung der Aktivierung von Jak3, während die Phosphorylierung des Tyrosins 981 die Kinaseaktivität sogar inhibierte [62]. Von den anderen Jaks wurde Ähnliches noch nicht berichtet.

Die Regulation von aktivierten Jaks durch Phosphatasen, SOCS-Proteine, SH2-B β , Serin/Threoninphosphorylierung, Reduktion/Oxidation wurde bereits unter 1.4.1 erwähnt. Eine weitere Möglichkeit der Regulation ergibt sich aus Studien an Jak3: Die Mutationen C759R, E639K und Δ 586-592 innerhalb der Pseudokinasedomäne von Jak3 führten zu hyperphosphorylierten, nicht aber katalytisch aktiven Kinasen. Es wurde auch gezeigt, daß

sich die Phosphorylierung am inhibitorischen Tyrosin 981 im *A-loop* der Kinasedomäne in diesen mutierten Proteinen nicht vom Wild-Typ unterscheidet [56]. Es könnte also weitere Tyrosine geben, welche inhibitorisch wirken, wenn sie phosphoryliert sind.

1.5.3 Interaktion der Janus-Kinasen mit Zytokinrezeptoren

Verschiedene Zytokinrezeptoren assoziieren spezifisch mit nur einer Janus-Kinase (z.B. der EPOR mit Jak2), während andere mehrere Jaks aktivieren. Gp130, die signaltransduzierende Untereinheit der IL-6-Typ-Zytokine, bindet Jak1, Jak2 und Tyk2. Das Jak-Aktivierungsmuster scheint Zelltyp-abhängig zu sein [13]. In welchem Ausmaß die Rekrutierung der verschiedenen Jaks über die jeweiligen Expressionsspiegel der Janus-Kinasen, über verschiedene Affinitäten der Janus-Kinasen zu den Rezeptoren oder andere Faktoren beeinflusst wird, ist noch weitgehend unverstanden.

Janus-Kinasen binden an die membranproximale Region von Zytokinrezeptoren. Diese Region enthält zwei konservierte Motive, Box1 und Box2. Box1 ist eine überwiegend hydrophobe Region, welche konservierte Prolinreste enthält. In einigen untersuchten Rezeptorsystemen ist Box1 [63-68] bzw. sind die konservierten Proline [63, 66, 69-71] nötig für die Bindung von Janus-Kinasen an den Rezeptor. Dies gilt auch für gp130 [63]. Die Funktion der Box2 ist weniger gut untersucht. Bei manchen Rezeptoren ist sie wichtig für die Jak-Bindung und -Aktivierung, bei anderen hingegen nicht [63, 66, 67, 72]. Überexprimierte Janus-Kinasen binden noch an C-terminal verkürzte gp130-Deletionsmutation, denen die Box2 fehlt [71] und an VSV-G-gp130-Fusionsproteine mit deletierter Box2 [63]. Studien mit anderen Rezeptorsystemen implizieren, daß auch weitere Regionen wie zum Beispiel die Region zwischen Box1 und Box2 (die Interbox1/2-Region) [67, 69, 72-75], Regionen C-terminal zur Box2-Region [67, 72] und die direkt an der Membran lokalisierte Region [76] an der Assoziation und Aktivierung der Jaks beteiligt sind.

Die N-terminale Hälfte der Janus-Kinasen ist für die Assoziation mit den membranproximalen Regionen von Zytokinrezeptoren notwendig. Studien an C-terminal verkürzten Deletionsmutanten von Jak2 und Jak3 haben die minimale Bindungsregion der Jaks auf die JH7- und JH6-Domänen eingeschränkt [65, 77, 78]. Verschiedene Punktmutationen in einem Bereich zwischen den Aminosäuren 98-102 von Jak3 verhinderten die Bindung an die IL-2R γ -Kette. Zur Aufrechterhaltung der IL-2-Signaltransduktion waren für eine Jak3/Jak2-Chimäre jedoch noch zusätzliche Aminosäuren des Jak3-N-Terminus -C-terminal zu den JH6- und JH7-Regionen notwendig [78]. Rezeptorbindung ist also wahrscheinlich nicht die einzige Voraussetzung für die Jak-Aktivierung. Für Tyk2 wurde gezeigt, daß die JH7-JH5-Region notwendig für die Assoziation an den IFN α R ist [79]. Zusätzlich ist die JH4-Region nötig für

eine starke Expression des IFN α R [79]. Größere Bereiche der Jaks und der Zytokinrezeptoren scheinen also an der gegenseitigen Bindung beteiligt zu sein.

1.6 Zielsetzung der Arbeit

Aus den bekannten Daten läßt sich noch kein kohärentes Bild der Bindung von Janus-Kinasen an Zytokinrezeptoren gewinnen. Die Box1 stellt eine konservierte Region dar, die sich in den meisten Zytokinrezeptoren wiederfindet, wohingegen Box2 weniger gut konserviert ist. Ansonsten zeichnen sich die membranproximalen Regionen von Zytokinrezeptoren jedoch durch eine mangelnde Sequenzhomologie aus. Berichte über die Struktur von zytoplasmatischen Bereichen von Zytokinrezeptoren gibt es nicht. So ist auch die Spezifität der Jak-Bindung im Ansatz noch nicht verstanden. Erschwerend kommt hinzu, daß über die Interaktionsdomänen der Janus-Kinasen mit Zytokinrezeptoren ebenfalls weder strukturelle noch schlüssige Mutagenese-Studien vorliegen. Gp130, die signaltransduzierende Untereinheit der IL-6-Typ-Zytokine, bindet Jak1, Jak2 und Tyk2. Das Jak-Aktivierungsmuster nach IL-6-Stimulation scheint Zelltyp-abhängig zu sein [13]. Die Rekrutierung der verschiedenen Jaks kann von verschiedenen Faktoren und deren Zusammenspiel abhängen:

- vom jeweiligen Expressionsspiegel der einzelnen Janus-Kinasen,
- von unterschiedlichen Bindungsaffinitäten der Janus-Kinasen an den Rezeptor,
- von zusätzlichen bisher unbekanntem Faktoren (z.B. Interaktion mit anderen Proteinen).

In der vorliegenden Arbeit sollte die Interaktion von gp130 mit Jak1 untersucht werden. Da die hydrophobe Box1- und die Box2-Region die Bindung von Jaks vermitteln sollen, wurden diese beiden Regionen und weitere hydrophobe Reste in der membranproximalen Region von gp130 einer Mutagenese-Studie unterzogen. Für die verschiedenen Mutanten wurden die Jak-Bindung, die STAT-Aktivierung und die proliferative Antwort von Ba/F3-Transfektanten untersucht. In Jak1 konnten Sequenzhomologien zu einer SH3-Domäne und einer FERM-Domäne festgestellt werden. Der Einfluß interessanter Aminosäuren aus diesen beiden potentiellen Domänen auf die Rezeptorbindung wurde durch eine Mutagenese-Studie untersucht.

Außerdem sollte ein Test für die Kinaseaktivität von Jak1 etabliert werden, um in späteren Studien die Substratspezifität untersuchen zu können, über die ebenfalls wenig bekannt ist.

2 Material und Methoden

2.1 Verwendete Materialien

2.1.1 Chemikalien

Alle Chemikalien wurden in p. A.-Qualität eingesetzt und von den Firmen AGS (Heidelberg), BioRad (München), Boehringer (Mannheim), Fluka (Neu-Ulm), Merck (Darmstadt), New England Biolabs (Schwalbach), Pharmacia (Freiburg), Qiagen (Hilden), Sigma (Deisenhofen) und Whatman (Maidstone, England) bezogen. In der Methodenbeschreibung wird näher auf die verwendeten Chemikalien eingegangen.

2.1.2 Puffer und Medien

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

2.1.3 Verbrauchsmaterialien

Die eingesetzten Verbrauchsmaterialien stammten von den Firmen DuPont (Dreieich), Eppendorf (Hamburg), Millipore (Eschborn), Sartorius (Göttingen), Serva (Heidelberg), Sigma (Deisenhofen) und Whatman (Maidstone, England).

2.1.4 Enzyme

Folgende Enzyme wurden gemäß Herstellerangaben eingesetzt:

- RNAse A (Boehringer)
- T4-DNA-Ligase (Boehringer)
- Vent DNA-Polymerase (New England Biolabs)
- Taq DNA-Polymerase (Hybaid)
- Alkalische Phosphatase (Boehringer)

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

2.1.5 Bakterienstamm

JM83, zur Klonierung verwendeter *E. coli*-Stamm

2.1.6 Eukaryontische Zelllinien

COS-7	adhärent wachsende Nierenzellen der grünen Meerkatze (A.T.C.C., CRL 1651)
HepG2	adhärent wachsende humane Hepatomzellen (A.T.C.C., HB 8065)
Ba/F3	nicht adhärent wachsende IL-3-abhängige murine Prä-B-Zellen (DSMZ; Braunschweig)
X63Ag8-653 <u>BPV-mIL-3</u>	nicht adhärent wachsende murine Myelomzelllinie, die murines IL-3 sezerniert; zur Verfügung gestellt von Dr. K. Friedrich (Würzburg)
Sf 158	adhärent wachsende Insektenzelllinie

2.1.7 Nährmedien für die Zellkultur

DMEM-Flüssigmedium mit 4,5 g Glukose/l (Gibco)
DMEM/NUT-MIX-F12-Flüssigmedium (Gibco)
FKS; mycoplasmenfreies fötales Kälberserum (Seromed)
Penicillin / Streptomycin (Gibco)
Trypsin (0,05%) / EDTA (0,02%) –Lösung (Biochrom)
Sf900 Flüssigmedium (Gibco)

2.1.8 Zytokine

IL-6 rekombinantes humanes IL-6 wurde nach der Methode von Arcone *et al.* (1991) [80] hergestellt und freundlicherweise von A. Küster zur Verfügung gestellt. Die spezifische Aktivität betrug 2×10^6 BSF2 (*B-cell stimulatory factor-2*) U/mg Protein.

IL-5 von der Firma Cell Concepts (Umkirch) bezogen

sIL-6R löslicher humaner IL-6-Rezeptor wurde präpariert wie beschrieben [81] und von A. Küster freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

2.1.9 Antikörper

Die benutzten Antikörper werden in Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1: Benutzte Antikörper.

WB: Western-Blot, IP: Immunpräzipitation, DZ: Durchflußzytometrie.

Name	Eigenschaften	Herkunft	Verwendung
Ziege-anti-Maus Ig	Polyklonales Antiserum gegen den konstanten Bereich von Maus-Immunglobulin; Peroxidase-(HRP)-konjugiert	Dako	WB
Ziege-anti-Kaninchen Ig	Polyklonales Antiserum gegen den konstanten Bereich von Kaninchen-Immunglobulin; Peroxidase- (HRP)-konjugiert	Dako	WB
PE-Kaninchen-anti-Maus IgG F(ab') ₂	Polyklonales IgG F(ab') ₂ -Antiserum gegen Maus, R-Phycoerythrin-konjugiert	Dianova	DZ
B-P8	Monoklonaler Antikörper gegen humanes gp130	von J.Wijdenes	DZ
S 16	Monoklonaler Antikörper gegen die humane "common (-chain" des IL-5-/IL-3-/GM-CSF-Rezeptors	Santa Cruz Biotech.	IP; DZ
N 20	Polyklonaler Antikörper gegen die humane "common (-chain" des IL-5-/IL-3-/GM-CSF-Rezeptors	Santa Cruz Biotech.	WB
(IL-5R(Monoklonaler Antikörper gegen IL-5R(von J. Tavernier	DZ
-Jak1 serum	Polyklonales Antiserum gegen Jak1	von A. Ziemiecki	WB; IP
-Jak2 serum	Polyklonales Antiserum gegen Jak2	von A. Ziemiecki	WB; IP
-Tyk2	Monoklonaler Antikörper gegen Tyk2	Transduction Lab.	WB; IP
PY99	Monoklonaler Antikörper gegen Phosphotyrosin	Santa Cruz Biotech.	WB; IP

2.1.10 Plasmide

pSVL	eukaryontischer Expressionsvektor; PenR (Pharmacia)
pBS II KS-	Klonierungsvektor; PenR (Stratagene)
pSVL gp130	pSVL mit der cDNA des humanen gp130; zur Verfügung gestellt von Dr. T. Taga und Dr. T. Kishimoto (Osaka, Japan)
pSV2-Neo	NeoR; zur Verfügung gestellt von Dr. K. Friedrich (Würzburg)

2.2 Allgemeine zellbiologische Methoden

2.2.1 Anzucht und Lagerung von Bakterienkulturen

Die Kultivierung der Bakterien erfolgte in modifiziertem Luria-Bertani-Medium mit 1 mM MgSO₄ und 10 mM Tris/HCl (pH 8) [82] in Gegenwart von 100 µg Ampicillin/ml in einem thermostatisierten Schüttelinkubator bei 200 upm bzw. auf LB-Agar (1,5%) bei 37°C.

Eine dauerhafte Aufbewahrung erfolgte bei -80°C in LB-Medium mit 15% Glycerin.

2.2.2 Eukaryontische Zellen

Die Säugerzellen wurden in DMEM (COS-7, Ba/F3) bzw. DMEM/F12 (HepG2) kultiviert. Den Medien wurden 10% FKS sowie 60 mg Penicillin/l und 100 mg Streptomycin/l zugesetzt. Das Medium für Ba/F3-Zellen enthielt außerdem 5% konditionierten, BPV-mIL-3-Kulturüberstand. Die Zellen wurden bei 37°C in einer wassergesättigten Atmosphäre bei 5% CO₂ inkubiert. Zur Subkultivierung wurden adhärent wachsende Zellen nach Waschen mit PBS (200 mM NaCl; 2,5 mM KCl; 8 mM Na₂HPO₄; 1,5 mM KH₂PO₄) mittels Trypsin/EDTA-Lösung von den Kulturschalen abgelöst.

Sf158 Insektenzellen wurden in SF900 Medium bei 27°C kultiviert. Zur Weiterkultivierung wurden sie mit einem Zellkulturschaber von der Oberfläche gelöst.

Für die Langzeitlagerung wurden die eukaryontischen Zellen in Kulturmedium nach Zusatz von 10% DMSO bei -80 °C eingefroren und bei -196°C in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

2.3 Molekularbiologische Methoden

2.3.1 Isolierung von Plasmid-DNA im kleinen Maßstab

Plasmid-DNA zur Analyse transformierter Bakterien und zur Sequenzierung wurden nach Herstelleranleitung mit Hilfe eines Plasmidminipräparationskits "Qiaprep" (Qiagen) isoliert.

2.3.2 Isolierung von Plasmid-DNA im großen Maßstab

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

2.3.3 Quantitative Bestimmung von Nukleinsäuren

Die quantitative Bestimmung der DNA-Menge erfolgte photometrisch in einem UV-Spektrometer (Pharmacia) über die Extinktion bei 260 nm (E₂₆₀). E₂₆₀ = 1,0 entspricht einer

DNA-Menge von 50 µg doppelsträngiger DNA bzw. 20 µg einzelsträngiger DNA. Die Reinheit der Nukleinsäurepräparationen wurde mit Hilfe der Extinktion bei 280 nm (E280) ermittelt; der Quotient E260:E280 sollte bei 1,8 - 2,0 liegen.

2.3.4 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonucleasen

Die enzymatische Restriktion von DNA erfolgte nach den Angaben der Enzymhersteller. Die Inkubationszeiten betragen 1 h bis zu 3 h bei präparativen Ansätzen. Für einen analytischen Verdau wurden 0,5 bis 1 µg DNA, für eine präparative Restriktion bis zu 4 µg DNA eingesetzt.

2.3.5 Dephosphorylierung linearisierter DNA

Die Abspaltung der 5'-ständigen Phosphatgruppe verhindert die Religation eines linearisierten Vektors. Die zur Dephosphorylierung eingesetzte alkalische Phosphatase (Orthophosphorsäure Monoester-Phosphohydrolase) spaltet in einem pH-Bereich von 9,5-10,5 die 5'-Phosphatgruppen von DNA, RNA, Ribo- und Desoxyribonucleosiden ab. Phosphodiesterbindungen innerhalb von Nucleinsäuremolekülen werden nicht hydrolysiert. 100-200 ng DNA wurden mit 1 U alkalischer Phosphatase (Boehringer Mannheim) 1 Stunde bei 37°C nach Herstellerangaben inkubiert. Die Abtrennung des Enzyms erfolgte anschließend über Phenolextraktion [82].

2.3.6 Ligation von DNA.

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

2.3.7 Auftrennung von Nukleinsäuren durch Agarose-Gelelektrophorese

Den DNA-Fragmenten wurde in entsprechender Menge der 10-fach konzentrierte DNA-Probenpuffer zugesetzt. Mit Hilfe von 1 bis 2 %-igen Agarosegelen (SEAKEM LE Agarose, Biozym) wurden die Fragmente in TAE-Puffer elektrophoretisch (120V) der Größe nach aufgetrennt [82]. Als Referenz diente die mit EcoRI / HindIII geschnittene DNA des Lambda-Phagen. Den Agarosegelen wurde Ethidiumbromid in einer Endkonzentration von 0,1 µg/ml zugesetzt, um die DNA-Banden auf einem UV-Leuchttisch ($\lambda=366\text{nm}$) sichtbar zu machen

und so eine Fotodokumentation und grobe Mengenabschätzung zu ermöglichen. Zur Fotodokumentation diente ein Gel print 2000i-Gerät (MWG Biotech).

2.3.8 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Die gewünschte DNA-Bande wurde aus dem Agarosegel ausgeschnitten. Die Isolierung von DNA aus Agarosegelfragmenten erfolgte mit Hilfe von GenElute™ Agarose Spin Columns der Firma Supelco oder mit Hilfe des Qiaquick-Kits von Qiagen nach den Anleitungen der Hersteller.

2.3.9 Radioaktive Markierung doppelsträngiger DNA-Sonden

Zur Bestimmung der STAT-1/3 Aktivierung in Kernextrakten wurde eine radioaktiv markierte doppelsträngige m67SIE-DNA-Sonde verwendet. Diese synthetische DNA-Sequenz enthält das sis-induzierbare Element (SIE) des humanen c-fos-Promotors. Die Einführung einer Mutation (m67) bewirkt, daß STAT-1 und STAT-3 mit gleich hoher Affinität binden können [75]. Die radioaktive Markierung doppelsträngiger DNA erfolgte durch Auffüllen 5'-überhängender Enden mit dem Klenow-Enzym (Boehringer) unter Verwendung von [³²P]α-dATP. Der Reaktionsansatz wurde 30 min bei 37°C inkubiert. Die freien Nukleotide wurden mit Hilfe des Qiaquick Nucleotide Removal Kits der Firma Qiagen (Hilden) abgetrennt. Die eingebaute Radioaktivität wurde im β-Counter bestimmt.

m67SIE: 5'-GATTGACGGGAACTG-3' (die STAT-Bindungsregion ist unterstrichen)

2.3.10 Automatische DNA-Sequenzierung

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

2.3.11 Herstellung der gp130-Mutanten

Zur Einführung der Punkt- und Deletionsmutationen in den zytoplasmatischen Bereich von gp130 wurden Standard-Klonierungstechniken eingesetzt [82, 83]. Als Matrize wurde pSVLΔEcoRI-gp130-myc [18] verwendet. Folgende Oligonukleotide wurden für die Durchführung der PCR eingesetzt:

5'-ATTGTCCTCTTTGACTA-3' (*sense*)

5'-CTGGGCAAAATACCATCAC-3' (*antisense*).

Die Oligonukleotide die zur Einführung der Punktmutanten benutzt wurden:

ΔBox1: 5'-AAAAAACACTCAAAGAGTCATATTGCC-3' (*sense*),

5'-ACTCTTTGAGTGTTTTTTAATTAGGTCTCG-3' (*antisense*).

ΔBox2: 5'-TGGAAAAGGATCAGTGAAATTGCCATC-3' (*sense*),

5'-TTCAGTATCCTTTTCCAGAGGATCTGAAATTATTGGAC-3' (*antisense*).

W₆₅₂A: 5'-AAACACATCGCGCCTAATGTTCCAGATCCTTC-3' (*sense*),

5'-AACATTAGGCGCGATGTGTTTTTAATTAGGTC-3' (*antisense*).

W₆₆₆A: 5'-TTGCCCAGGCGTCACCTCACACTCCTCC-3' (*sense*),

5'-TGAGGTGACGCCTGGGCAATATGACTCTTTG-3' (*antisense*).

P₆₇₁P₆₇₂AA: 5'-ACACTGCTGCAAGGCACAATTTAATTC-3' (*sense*),

5'-TGCCTTGCGAGCAGTGTGAGGTGACCAC-3' (*antisense*).

F₆₇₆A: 5'-GGCACAATGCGAATTCAAAAGATCAAATGTATTC-3' (*sense*),

5'-CTTTTGAATTCGCATTGTGCCTTGGAGGAG-3' (*antisense*).

Die zur Einführung der Mutationen benötigten Nukleotide sind unterstrichen.

Folgende Restriktionsenzyme wurden benutzt, um die PCR-Fragmente in den eucaryontischen Expressionsvektor pSVLΔEcoRI-gp130-myc [18] zu inserieren:

EcoRI/BstEII für die Konstrukte gp130-ΔBox1 und gp130-W₆₅₂A,

BstEII/Kpn2I für die Konstrukte gp130-ΔBox2 und gp130-P₆₇₁P₆₇₂AA,

EcoRI/AspI für die Konstrukte gp130-W₆₆₆A und gp130-F₆₇₆A.

Die Sequenz aller Konstrukte wurde, über den ganzen Bereich, der durch PCR hergestellt wurde, überprüft. Folgende Oligonukleotide wurden für die Durchführung der Sequenzierung verwendet:

5'-CAGATCTTCTGGAAAAGGC-3' (*antisense*).

5'-CTGGGCAAAATACCATCAC-3' (*antisense*).

Gp130-Y683F wurde hergestellt indem das *EcoRI/XhoI* Fragment aus pSVLΔEcoRI-gp130-myc in den ebenso geschnittenen Vektor pSVLΔEcoRI-EPOR_{ext}-gp130_{tm,cyt}-Y683F-myc [18] eingesetzt wurde.

Die Umklonierung zu den entsprechenden IL5Rα_{ext}/gp130_{tm,cyt}-, IL5Rβ_{ext}/gp130_{tm,cyt}- und gp130_{fl}-Mutanten erfolgte durch Austausch der Extrazellulärdomänen von IL-5Rα und IL-5Rβ aus dem entsprechenden pSVLΔEcoRI-IL-5Rα/β/gp130-Konstrukt mit Hilfe der Restriktionsenzyme *EcoRI* und *XhoI*. Alle Konstrukte wurden mit Hilfe eines *EcoRI/XhoI* Restriktionsverdau und durch automatische Sequenzierung überprüft.

2.3.12 Herstellung der Jak1-Mutanten

Zur Einführung der Punktmutationen in den N-terminalen Bereich von Jak1 wurden Standard-Klonierungstechniken eingesetzt [82, 83]. Als Matrize wurde pBS-Jak1 verwendet. Folgende Oligonukleotide wurden für die Durchführung der PCR eingesetzt:

5'-GAAACAGCTATGACCATG-3' (*sense*)

5'-GGATCCCGAGATTTCCAGTC-3' (*antisense*).

Die Oligonukleotide die zur Einführung der Punktmutanten benutzt wurden:

L₈₀A: 5'-CTTCGCCGCGTACGATGAGAGCACCAAG-3' (*sense*),

5'-CTCATCGTACGCGGCGAAGAGGTTGTGAC-3' (*antisense*).

L₈₀A/Y₈₁A: 5'-CCTCTTCGCCGCGGCCGATGAGAGCACCAAGCTCTGG-3' (*sense*),

5'-GTGCTCTCATCGGCGGCGGCGAAGAGGTTGTGACAGAG-3' (*antisense*).

Y₈₁A: 5'-CGCCCTGGCCGATGAGAGCACCAACCTC-3' (*sense*),

5'-CTCTCATCGGCGGGCGAAGAGGTTGTG-3' (*antisense*).

Y₈₉A: 5'-GCTCTGGGCCGCTCGAACCGAATCATC-3' (*sense*),

5'-CGGAGCGGCCCAAGCTTGGTGCTCTC-3' (*antisense*).

R₁₀₄E: 5'-GTCTCTCGAGCTCCACTACCGCATGAGG-3' (*sense*),

5'-GTGGAGCTCGAGAGAGTTTTGTCATCC-3' (*antisense*).

Y₁₀₇A: 5'-CTCCACGCCCGCATGAGGTTCTACTTTAC-3' (*sense*),

5'-CATGCGGGCGTGGAGCCGGAGAGACG-3' (*antisense*).

Y₁₁₂A: 5'-ATGAGGTTCGCCTTTACCAACTGGCACGG-3' (*sense*),

5'-GTTGGTAAAGGCGACCTCATGCGGTAGTG-3' (*antisense*).

W₁₁₆A: 5'-CCGCATGAGGTTCTACTTTACCAACGCGCACGGAACC-3' (*sense*),

5'-GGTTCCGTGCGCGTGGTAAAGTAGAACCTCATGCGG-3' (*antisense*).

L₁₅₈A/F₁₅₉A: 5'-CTGGAGTATGCGGCTGCACAGGGACAGTATG-3' (*sense*),

5'-CCCTGTGCAGCCGCATACTCCAGTGAACCTGGC-3' (*antisense*).

L₁₆₆A/V₁₆₇A: 5'-CAGTATGATGCGGCCAAATGCCTGGCTCCC-3' (*sense*),

5'-GGCATTTCGCGGCCATCATACTGTCCCTGTGC-3' (*antisense*).

Y₂₆₈A: 5'-AAGGTGAAAGCCCTGGCTACCTTGAAAC-3' (*sense*),

5'-GTAGCCAGGGCTTTCACCTTCAGGTCATG-3' (*antisense*).

Y₂₈₁A: 5'-GACAAAACATGCTGGAGCTGAAATATTTGAG-3' (*sense*),

5'-CAGCTCCAGCATGTTTTGTCAATGTTTCC-3' (*antisense*).

Die zur Einführung der Mutationen benötigten Nukleotide sind unterstrichen.

Die Restriktionsenzyme *EcoRV* und *Bsp119I* wurden benutzt, um die PCR-Fragmente zur Herstellung der Mutanten L₈₀A, L₈₀A/Y₈₁A, Y₈₁A, Y₈₉A, R₁₀₄E, Y₁₀₇A und Y₁₁₂A in den Vektor pBS-Jak1 zu inserieren. Die Umklonierung aus pBS-Jak1 in den mit *XbaI* restringierten, eukaryontischen Expressionsvektor pSVLΔEcoRI-Jak1 erfolgte mit Hilfe der Restriktionsenzyme *EcoRV* und *XbaI*. Die PCR-Fragmente zur Herstellung der Mutanten W₁₁₆A, L₁₅₈A/F₁₅₉A, L₁₆₆A/V₁₆₇A, Y₂₆₈A, Y₂₈₁A konnten direkt, über *Esp3I* und *Bsp119I* Restriktionsschnittstellen in pSVLΔEcoRI-Jak1 einkloniert werden.

Die Doppelmutante Y₈₁A/W₁₁₆A wurde durch Ligation des *Esp3I/Bsp119I* Fragmentes von pSVLΔEcoRI-Jak1W₁₁₆A mit dem *Esp3I/Bsp119I* restringierten Vectorfragmenten von pSVLΔEcoRI-Jak1Y₈₁A generiert. Die Mutationen K₁₃₃E entstand durch PCR-Fehler. Da diese Mutation sich aber in einer interessanten Regionen von Jak1 befand, wurde das entsprechende *Esp3I/Bsp119I*-Fragment in pSVLΔEcoRI-Jak1 inseriert.

Alle Konstrukte wurden über den ganzen Bereich, der durch PCR hergestellt wurde, durch automatische Sequenzierung überprüft. Folgende Oligonukleotide wurden bei der Durchführung der Sequenzierung verwendet:

5'-TGTTTCTGGAACCCTTTTC-3' (*antisense*).

5'-GGATCCCGAGATTTCCAGTC-3' (*antisense*).

2.3.13 Konstruktion von pVL 1393/m-Jak2

Der für m-Jak2 codierende Bereich aus pRK5/m-Jak2 wurde durch einen partiellen Eco RI-Restriktionsansatz aus dem pRK5-Vektor herausgeschnitten und anschließend in den über die Schnittstelle *EcoRI* geöffneten und dephosphorylierten Vektor pVL1393 inseriert.

2.3.14 Transformation kompetenter Bakterien

Die Herstellung kompetenter Bakterien erfolgte wie beschrieben. [82]. 1-10 ng Ligationsansatz und 100 µl kompetente Bakterien wurden 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz eine Minute lang im Wasserbad auf 42 °C erwärmt. Nach zweiminütigem Abkühlen auf Eis wurde 1 ml LB-Medium zugesetzt und 45 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die sedimentierten Bakterien wurden in 100µl Medium resuspendiert, auf einer LB-Platte mit geeignetem Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37 °C kultiviert. Da das eingesetzte Plasmid ein Resistenzgen trug wurden nur solche Bakterien selektiert, die das Plasmid aufgenommen hatten.

2.3.15 Herstellung rekombinanter Baculoviren

Die Herstellung rekombinanter Baculoviren, welche die cDNA von Jak1, Jak2 und Tyk2 in

ihr Genom integriert haben, erfolgte mit Hilfe der Vektoren pSV1393-Jak1, pSV1393-Jak2 und pSV1393-Tyk2 unter Verwendung des BaculoGold-Systems (Pharmingen) nach Herstellerangaben.

2.3.16 Transfektion von eukaryontischen Zellen

2.3.16.1 Transfektion von COS-Zellen

Verwendet wurde eine modifizierte Methode der Transfektion mit DEAE-Dextran. COS7-Zellen wurden bei einer Konfluenz von 80-100% in einer mittleren Zellkulturflasche mit PBS gewaschen und dann mit dem Transfektionsgemisch für 90 Minuten bei 37°C in luftdicht verschlossenen Zellkulturflasche inkubiert. Im Anschluß wurden die Zellen mit PBS gewaschen, 1 min mit 10% DMSO in PBS geschockt und wieder mit PBS gewaschen. Die Zellen wurden über Nacht mit DMEM + 10%FCS inkubiert und nach 12-24 Stunden passagiert.

Transfektionsgemisch

7,5 ml DMEM ohne FCS

2-30 µg DNA

6 µl Chloroquin (100mM)

60 µl DEAE-Dextran (50mg/ml)

2.3.16.2 Transfektion von Ba/F3-Zellen

Die Transfektion von Ba/F3-Zellen mit gp130-Expressionskonstrukten erfolgte durch Elektroporation. $3,5 \times 10^6$ Zellen wurden mit insgesamt 30 µg DNA gemischt und mit einem Puls bei 200 V und 70 msec im *elektro square porator* T820 (BTX) elektroporiert. Zur Selektion transfizierter Zellen wurden 2 µg des Plasmids pSV2Neo, das für eine Neomycinresistenz kodiert, kotransfiziert. Nach der Elektroporation wurden die Ba/F3-Zellen zunächst 24 h ohne Selektionsdruck in DMEM mit 10% FCS und 5% BPV-Überstand kultiviert. Anschließend wurden die Zellen im gleichen Medium, jedoch zusätzlich mit 1,0 mg Geneticin G418/ml, in 24-well-Zellkulturplatten ausgesät. 16-28 Tage später waren erste G418-resistente Klone erkennbar, die in frischem G418-haltigem Medium aufgenommen und amplifiziert wurden. Die Identifikation von gp130 exprimierenden Klonen erfolgte mit Antikörpern gegen den Extrazellulärbereich von gp130 (B-P8) und fluoreszenzmarkierten Zweitantikörpern mit Hilfe der Durchflußzytometrie im FACScalibur-Durchflußzytometer der Firma Becton Dickinson.

2.3.16.3 Expression von Jak1, Jak2 und Tyk2 in Sf158-Zellen

Sf158 (*Spodoptera frugiperda*) Zellen in Sf 900 SFM Medium in zu 75 % Konfluenz bewachsenen mittleren Kulturflaschen wurden mit 1 ml einer hochtitrigen Lösung rekombinanter Baculoviren infiziert. Die Zellen wurden 3 Tage bei 27 °C inkubiert. Nach dem Ernten wurden die Zellen mit Brij-Lysispuffer 45 Minuten auf Eis lysiert. Nach dem Abtrennen der Zellbestandteile durch Zentrifugation befanden sich die exprimierten Jak-Kinasen im Überstand

2.3.17 Herstellung von Kernextrakten

Transient transfizierte COS-7-Zellen, die chimäre IL-5R α - bzw. IL-5R β /gp130 Rezeptoren exprimierten, wurden mit 10 ng/ml IL-5 bei 37°C für 30 Minuten stimuliert. Stabil transfizierte Ba/F3-Zellen, welche gp130-Mutanten exprimierten wurden mit 20 ng/ml IL-6 und 500 ng/ml löslichem gp80 stimuliert. Danach wurden die Zellen mit kaltem PBS/Vanadat (1 mM) gewaschen von der Platte abgenommen und in ein Eppendorfgefäß überführt. Die Kernextraktion erfolgte nach der Schnellmethode [84].

2.4 Proteinchemische Methoden

2.4.1 Diskontinuierliche SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen unter denaturierenden und reduzierenden Bedingungen erfolgt proportional zur Masse, da sich SDS in einem konstanten Verhältnis der Ladung zur Masse an Proteine anlagert und Mercaptoethanol die Reduktion von Disulfidbrücken zu den entsprechenden Thiolen verursacht. Die hier angewendete Methode der diskontinuierlichen Elektrophorese nach Laemmli erfolgte in einer vertikalen Flachgelkammer von Biometra nach Herstellerangaben.

2.4.2 Gel-Retentionsanalyse (*elektrophoretic mobility shift assay*, EMSA)

Das Prinzip der Gel-Retentionsanalyse beruht auf der Interaktion von DNA-bindenden Proteinen mit den entsprechenden spezifischen radioaktiv (^{32}P) markierten DNA-Sequenzen. Auf einem nativen Gel und unter Verwendung von Puffern niedriger Ionenstärke können die DNA-Protein-Komplexe ohne zu dissoziieren bei der Elektrophorese erhalten werden. Bis zu 15 μg Kernextrakt und 10000 cpm der radioaktiven m67-SIE-Sonde wurden für den EMSA

eingesetzt [85].

2.4.3 Proteinmengenbestimmung nach Bradford

Die Proteinmengenbestimmung wurde mit Hilfe des BioRad-„Protein-Assay“ durchgeführt. 200 µl BioRad-Reagenz wurden mit 800µl Wasser und 3-5 µl der Kernextraktprobe gemischt. In Plastik-Mikroküvetten wurde die optische Dichte bei 595 nm im Photometer Ultraspec Plus (Pharmacia Biotechnology) bestimmt. Mit Hilfe einer Eichkurve, die für BSA aufgestellt wurde, konnte der Faktor zur genauen Berechnung der Proteinmengen ermittelt werden (0,063).

2.4.4 Western-Blot

Die elektrophoretisch getrennten Proteine wurden aus einem SDS-Polyacrylamidgel mit Hilfe einer semi-trockenen Elektrophoretikammer (Biorad) nach Herstellerangaben bei 0,8 mA/cm² auf eine PVDF-Membran transferiert.

2.5 Immunologische und Immunhistochemische Methoden

2.5.1 Identifizierung transfizierter Zellen durch Fluoreszenz aktivierte Durchflußzytometrie

Das Prinzip beruht auf der Detektion fluoreszenzmarkierter Antikörper gegen exogen exprimierte Transmembranproteine auf der Oberfläche von vereinzelter Zellen nach Anregung der Fluoreszenz durch eingestrahlt Laserlicht.

Transient transfizierte COS7-Zellen oder stabil transfizierte Ba/F3-gp130 Zellen wurden geerntet, gewaschen, in kaltem PBS/Azid (5% FKS, 0,1% NaN₃ in PBS) resuspendiert und 20 min in 2% Paraformaldehyd fixiert. 1×10^6 Zellen wurden 30 min mit 1 µg eines monoklonalen Antikörpers inkubiert, gewaschen und die Erst-Antikörper mit einem PE-konjugierten anti-Maus-Serum gebunden. Nach erneutem Waschen in PBS/Azid wurden die Zellen im FACScalibur Durchflußzytometer mit einem 488nm Argon Laser, (Beckton Dickinson) analysiert. So konnte die Transfektionseffizienz von COS-7-Zellen überprüft und positive Ba/F-gp130 Klone identifiziert werden.

2.5.2 Ko-Immunpräzipitation von Proteinen

Zelllysate (Brij-Lysispuffer: 20 mM Tris/HCl pH 7,4; 150 mM NaCl; 10 mM NaF; 1% Brij; 1 mM Na-Orthovanadat; 0,5 mM EDTA; 5 mg/ml Pepstatin; 5 mg/ml Aprotinin; 1 mg/ml Leupeptin) wurden mit 1 µg Antikörper über Nacht inkubiert. Zur Immunpräzipitation von IL-5R β -gp130-Konstrukten wurde der monoclonale S16-Antikörper (Santa Cruz Biotech.) und zur Immunpräzipitation von Jak1 wurde das Jak1-Antiserum von A. Ziemiecki verwendet. Anschließend wurden die Immunkomplexe mit Hilfe von Protein-A-Sepharose (Pharmacia) präzipitiert. Nach dreimaligem Waschen wurden die Immunkomplexe mit Lämmli Puffer von der Sepharose gelöst und mit Hilfe einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese der Masse nach aufgetrennt und anschließend durch Western-*blotting* auf eine PVDF-Membran übertragen. Koräzipitierte Proteine konnten durch Immundetektion nachgewiesen werden.

2.5.3 Immunodetektion von Proteinen mit Hilfe des ECL-Systems

Das Prinzip der ECL-Detektion von Amersham beruht auf der Oxidation von cyclischen Diacylhydraziden wie Luminol (5-Amino-2,3-phtalalazin-1,4-dion) in Gegenwart von Wasserstoffperoxid und der Meerrettichperoxidase (HRP = *Horseradish peroxidase*) unter alkalischen Bedingungen. Das nach der Oxidation entstandene Radikal (3-Aminophthalat) kehrt unter Lichtemission (425 nm) mit einer Reaktionseffizienz von ca. 1% in den energetischen Grundzustand zurück. Durch die Anwesenheit von chemischen Aktivatoren wie Phenolen wird die Lichtemission verstärkt und die Chemilumineszenzphase verlängert.

Zur Unterdrückung unspezifischer Bindungen wurde die mit Proteinen beladene PVDF-Membran 10 Minuten mit einer 10%igen Rinderserum-Albumin-Lösung in TBS-N (20 mM Tris-HCl pH 7,4, 137 mM NaCl, 0,1% Nonidet P-40) geblockt. Die Membran wurde unter gleichmäßigem Schaukeln mit der jeweiligen Antikörperlösung (1 µg/ml in TBS-N) 1 h inkubiert, viermal für je 5 min mit TBS-N gewaschen und mit der entsprechenden Lösung eines *HRP*-konjugierten Sekundär-Antikörpers behandelt. Die entstandenen Immunkomplexe konnten mit Hilfe des ECL-Detektionssystems auf Röntgenfilmen visualisiert werden (ECL = *enhanced chemiluminescence*, Amersham Pharmacia Biotech).

2.6 Enzymatische Methoden

2.6.1 Nachweis der *in-vitro*-Auto-Kinase-Aktivität von Jak1 durch radioaktive Markierung mit [³²P]-ATP.

Jak1 wurde aus Sf158 Zellysaten, welche mit Lysispuffer K hergestellt wurden, mit dem anti-Jak1-spezifischen Antiserum von A. Ziemiecki immunpräzipitiert. Die Immunpräzipitate wurden jeweils dreimal mit Waschpuffer K und Kinasepuffer gewaschen. Die Kinase-Reaktion wurde in einem Gesamtvolumen von 30 µl Kinase-Puffer mit 100 mM ATP und 0,4 µM [³²P]-ATP (10 µCi/µl) bei 37°C für 30 min durchgeführt. Der gesamte Ansatz wurde elektrophoretisch über ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Das Gel wurde getrocknet und einer Autoradiographie unterzogen.

<u>Lysispuffer K</u>	<u>Waschpuffer K</u>	<u>Kinasepuffer</u>
50 mM Tris /HCl pH7,5	50 mM Tris /HCl pH7,5	20 mM Tris /HCl pH7,5
150 mM NaCl	150 mM NaCl	10 mM MgCl ₂
20 mM Glycerophosphat	20 mM Glycerophosphat	20 mM Glycerophosphat
15 % Glycerol	15 % Glycerol	100 mM ATP
1mM NaF	1mM NaF	0,4 µM [³² P]-ATP
0,5 % NP-40	0,05 % NP-40	0,5 mM DTT
1 mM Na-Orthovanadate	1 mM Na-Orthovanadate	1mM Na-Orthovanadate
0,5 mM EDTA	0,5 mM EDTA	
1 mM PefaBlock	1 mM PefaBlock	
5 µg/ml Pepstatin	5 µg/ml Pepstatin	
5 µg/ml Aprotinin	5 µg/ml Aprotinin	
1 µg/ml Leupeptin	1 µg/ml Leupeptin	

2.6.2 Nachweis der *in-vitro*-Kinase-Aktivität von Jak1 durch Fluoreszenz-aktivierten Nachweis phosphorylierter Peptide durch ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay*)

Zur Etablierung eines ELISAs zum Nachweis der Jak1-Kinaseaktivität wurde die Phosphorylierung biotinylierter Phosphopeptide durch *in-vitro*-Kinase-*assay* untersucht. HepG2-Zellen wurden mit 20 ng/ml IL-6 und 1 µg/mL löslichem gp80 5 Minuten lang stimuliert. Die Zellen wurden mit Lysispuffer K (siehe 2.6.1) lysiert, und Jak1 wurde aus den Zellysaten mit dem Jak1 spezifischen Antiserum von A. Ziemiecki immunpräzipitiert. Die Immunpräzipitate wurden jeweils zweimal mit Waschpuffer K und Kinasepuffer gewaschen. Die Kinase-Reaktion wurde in einem Gesamtvolumen von 500 µl Kinasepuffer (siehe 2.6.1.)

mit 1 mM Peptid und 0,125–2 mM ATP bei 37°C für 12 h durchgeführt. Die an der Sepharose immobilisierten Kinasen wurden durch Zentrifugation bei 6000 upm sedimentiert. Zuvor wurde eine 96-Well-ELISA-Maxisorb-Platte (NUNC, Roskilde, Denmark) mit 2,5 µg/ml Streptavidin beschichtet (100 µl/Well; 16 h bei RT). Die restlichen Bindungsstellen wurden mit 2% BSA in PBS (10 mM Na₂HPO₄/KH₂PO₄, pH7,4; 200 mM NaCl; 2,5 mM KCl) abgesättigt (200 µl/Well; 2 h bei RT). Nach viermaligem Waschen mit PBS/0.02% Tween (200 µl/Well) wurden je 150 µl des Überstandes des Kinaseansatzes in drei Schächte verteilt und 1 h bei RT inkubiert wobei die biotinylierten Peptide an die Oberfläche banden. Nach erneutem Waschen (4×) mit PBS/0.02% Tween (200 µl/Well) wurde die Oberfläche mit TBS-N äquilibriert. Die Phosphotyrosinreste der an die Strptavidinoberfläche gebundenen biotinylierten Peptide wurden durch Inkubation mit dem Phosphotyrosin-spezifischen Antikörper PY99 (Santa Cruz Biotechnologies; 1:2000, 100 µl/Well; 45 min bei RT) detektiert. Nach erneutem Waschen (4×; PBS/0.02% Tween) wurde der gebundene PY99 Antikörper mit einem polyklonalen Ziege anti-Maus HPR-konjugierten Antikörper (DAKO, Hamburg, 1:2000, 100 µl/Well, 45 min bei RT) nachgewiesen. Als Färbereagenz diente eine Lösung von 0.1 mg/ml 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin in 0.1 M Acetatpuffer pH5,5 mit 0,003 vol% H₂O₂. Die Farbreaktion wurde durch Zugabe von 2 M Schwefelsäure gestoppt. Der Versuch wurde spektralphotometrisch bei 495 nm im Mikrotiterplatten-Reader (SpektraMax 340 PC, Molecular Dynamics) gemessen.

2.7 Untersuchung der biologischen Aktivität von gp130-Mutanten durch Zellproliferationstest

Stabil transfizierte Ba/F3-Zellen wurden zweimal mit DMEM ohne IL-3 gewaschen. Je 2 x 10⁴ Zellen in 50 µL DMEM wurden in einer 96-Well-Zellkulturplatte ausgesät. Zur Induktion des Zellwachstums wurden die Zellen mit 0,1-150 ng/ml IL-6 und 1µg/ml sIL-6Rα drei Tage inkubiert. Anschließend wurden die metabolisch aktiven Zellen mit dem Zell Proliferations Kit-II (XTT) (Beohringer Mannheim, Mannheim) nachgewiesen. Die Umsetzung des Tetrazoliumsalzes XTT wurde nach 4-12 Stunden Inkubation spektralphotometrisch bei 450 nm im Mikrotiterplatten-Reader (SpektraMax 340 PC, Molecular Dynamics) gemessen.

3 Ergebnisse

3.1 Mutationsanalyse der membranproximalen Box1/2-Region von gp130

3.1.1 Auswahl der in die membranproximale Region von gp130 einzuführenden Mutationen

Protein/Protein-Interaktionen und auch die strukturelle Integrität von Proteinen werden oft durch hydrophobe Wechselwirkungen vermittelt. Da die Box1 ebenfalls eine hauptsächlich hydrophobe Region ist, wurden weitere sperrige hydrophobe Aminosäuren in der membranproximalen Region mutiert. Tryptophan 652 in der Box1 sowie Tryptophan 666, die Proline 671 und 672 und Phenylalanin 676 in der Interbox1/2-Region wurden zu Alanin mutiert. Eine Doppelpunktmutante der beiden Proline 656 und 658 in der Box1 zu Alanin diente als Negativkontrolle, da von entsprechenden Mutanten bereits bekannt war, daß sie Jaks schlechter binden [63], keine Jak2-Aktivierung mehr erlauben [86] und eine Induktion der proliferativen Antwort von Ba/F3-Transfektanten fehlt [87].

Zusätzlich zu den Punktmutanten wurde eine Reihe von Deletionsmutanten hergestellt. Box2, welche die Aminosäuren 691 bis 702 umfaßt, wurde deletiert, um die Effekte der Box2 im Kontext des ansonsten vollständig erhaltenen Rezeptors zu untersuchen. Die Deletionsmutanten Δ MP und Δ Box1 dienten -wie die weiter oben beschriebene Doppelmutante P656A/P658A- als Negativkontrollen, die keine Signaltransduktion mehr ermöglichen. Die Mutante Δ MP enthält eine Deletion von 24 Aminosäuren, welche einen Teil der membranproximalen Region (Aminosäuren 643 bis 666) einschließlich der Box1 umfaßt. Die Δ Box1-Mutante ist eine Deletion der 8 Aminosäuren der Box1-Region (Aminosäuren 651 bis 658) (Abbildung 4).

Um die Relevanz einer möglichen Phosphorylierung von Tyrosin 683 auf die STAT-Aktivierung zu untersuchen, wurde diese Aminosäure zu Phenylalanin mutiert (Y683F). Zusätzlich wurde die C-terminale Deletionsmutante Δ B, welche nur die 68 membranproximalen Aminosäuren 642 bis 710 aufweist, in die Studie aufgenommen, um zu überprüfen, ob Regionen C-Terminal zur Box2 an der Jak-Bindung beteiligt sind [67, 72]. Die Mutanten des zytoplasmatischen Teils von gp130 sind in Abbildung 4 schematisch dargestellt.

Die gp130-Mutanten sollten hinsichtlich ihrer proliferationsinduzierenden Eigenschaften von Ba/F3-Transfektanten, ihrer Fähigkeit zur Aktivierung von STAT-Faktoren und hinsichtlich

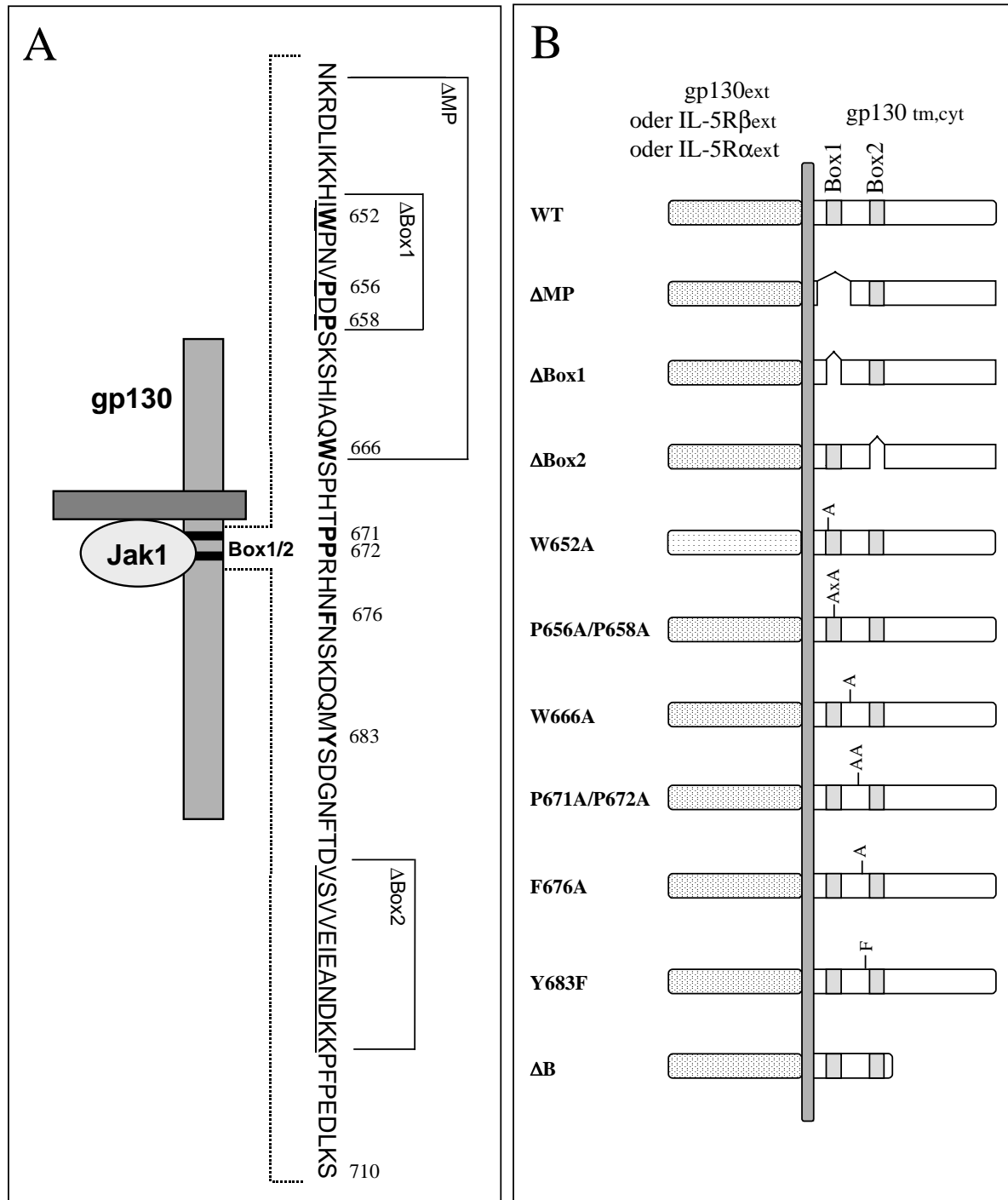


Abbildung 4: Schematische Darstellung der gp130-Mutanten.

(A) Dargestellt ist die Sequenz der membranproximalen zytoplasmatischen Box1/2-Region des gp130 von Aminosäure 642 bis 710. Die mutierten Aminosäuren sind durch Fettdruck hervorgehoben, und ihre Position im gp130 ist angegeben. Auch die deletierten Bereiche sind markiert. (B) Schematische Darstellung aller Mutanten von gp130 (Δ MP, Δ Box1, Δ Box2, W652A, P656A/P658A, W666A, P671A/P672A, F676A, Y683F und Δ B). Alle Mutanten wurden als vollständige gp130-Konstrukte sowie als chimäre Rezeptoren hergestellt, welche aus dem Extrazellulärteil der IL-5R α - oder der IL-5R β -Kette sowie der Transmembran- und der zytoplasmatischen Region von gp130 bestehen.

ihrer Bindung von Jak1 untersucht werden. Die entsprechend mutierten cDNAs wurden in den Expressionsvektor pSVL Δ EcoRI inseriert. Die Mutationen wurden jeweils in die vollständigen gp130-Konstrukte sowie in chimäre Rezeptoren eingefügt, welche aus dem Extrazellulärteil der IL-5R α - oder der IL-5R β -Kette und der Transmembran- und der zytoplasmatischen Region von gp130 bestanden.

3.1.2 Isolierung stabil transfizierter Ba/F3-Subklone

Ba/F3-Zellen sind murine Pro-B-Zellen. Da sie im Gegensatz zu praktisch allen anderen Zellen über kein endogenes gp130 verfügen, sind sie die Zelllinie der Wahl, um den Einfluß von Mutationen auf die gp130-vermittelte Signaltransduktion zu untersuchen. Ein Ausbleiben der Jak-Assoziation verhindert die proliferative Antwort nach Stimulation mit IL-6/sIL-6R-Komplexen [63, 86, 87].

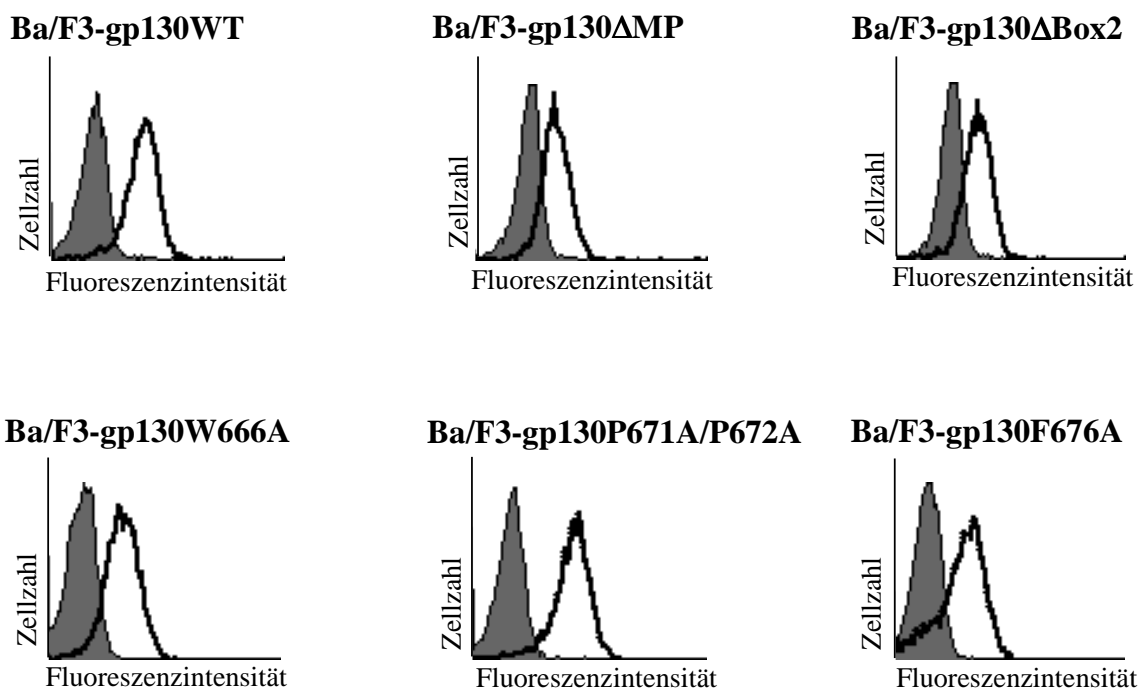


Abbildung 5: Durchflußzytometrischer Nachweis der Expression von gp130-Mutanten auf der Zelloberfläche stabil transfizierter Ba/F3-Subklone.

1×10^6 stabil transfizierte Ba/F3-Zellen wurden mit dem monoklonalen anti-gp130-Antikörper B-P8 inkubiert. Der Nachweis gebundener Antikörper erfolgte durch Inkubation mit einem R-Phycoerythrin-konjugierten anti-Maus-IgG. Im Histogramm werden die nur mit Zweitantikörper inkubierten Zellen als Kurve mit grau ausgefülltem Flächenintegral und die gefärbten Zellen durch eine schwarze Linie dargestellt.

Ba/F3-Zellen wurden mit Expressionsvektoren für gp130, gp130 Δ MP, gp130W666A, gp130P671A/P672A, gp130F676A und gp130 Δ Box2 transfiziert. Zusätzlich wurde pSV-Neo

in die Zellen eingeführt, was eine Selektion stabil transfizierter Zellen über die G418-Resistenz ermöglichte. Geneticin-resistente Ba/F3-Subklone wurden durchflußzytometrisch mit Hilfe des extrazellulär bindenden monoklonalen anti-gp130-Antikörpers B-P8 hinsichtlich der gp130-Expression untersucht. Für jede gp130-Mutation wurden jeweils 2 bis 6 unabhängige Klone isoliert. In Abbildung 5 ist die Oberflächenexpression jeweils eines repräsentativen Klones gezeigt, der für die nachfolgenden Untersuchungen herangezogen wurde.

3.1.3 Punktmutation von Tryptophan 666 in der Interbox1/2-Region von gp130 verhindert die proliferative Antwort von stabil transfizierten Ba/F3-Zellen nach Zytokinstimulation

Die Ba/F3-Transfektanten, welche gp130 oder die gp130-Mutanten gp130ΔMP, gp130W666A, gp130P671A/P672A, gp130F676A oder gp130ΔBox2 exprimierten, wurden in Anwesenheit zunehmender Mengen von IL-6/sIL-6R-Komplexen 72 Stunden lang kultiviert. Als Negativkontrolle wurde die Mutante gp130ΔMP benutzt, bei welcher ein Teil der membranproximalen Region -einschließlich der Box1- deletiert ist. Frühere Studien haben gezeigt, daß Box1-Deletionsmutanten keine Jaks binden [63].

Die Zellen, die gp130 oder gp130P671A/P672A exprimieren, proliferierten bereits bei IL-6-Konzentrationen von 3,3 ng/ml, während die Transfektanten, welche gp130W666A oder gp130ΔMP exprimieren, auch bei der höchsten getesteten Konzentration von IL-6 (210 ng/ml) keine Proliferation zeigten (Abbildung 6). Alle Ba/F3-Klone, die gp130 oder gp130-Mutanten exprimieren, proliferierten IL-3-abhängig, was zeigt, daß Zellwachstum in allen Klonen noch möglich war. Tryptophan 666 in der membranproximalen Region des zytoplasmatischen Teils von gp130 ist also notwendig für die Proliferation von Ba/F3-Transfektanten nach Stimulation mit IL-6/sIL-6R.

Die Transfektanten, welche gp130F676A oder gp130ΔBox2 exprimierten, verhielten sich uneinheitlich (divergierende Daten von jeweils zwei Klonen nicht gezeigt), so daß noch keine Schlüsse bezüglich dieser Mutanten gezogen werden konnten. Hier wäre eine Untersuchung weiterer Klone notwendig.

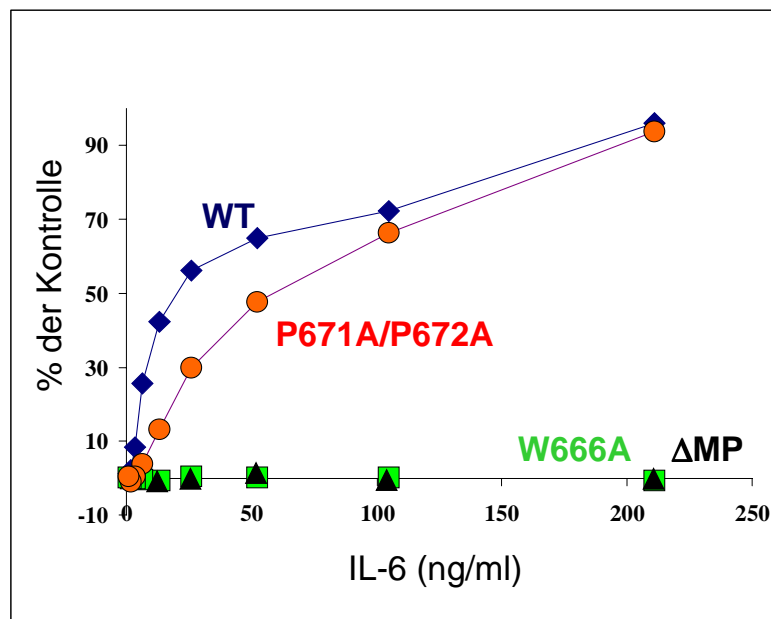


Abbildung 6: Proliferation von stabilen Ba/F3-Transfektanten, welche gp130 bzw. die gp130-Mutanten gp130 Δ MP, gp130W666A oder gp130P671A/P672A exprimieren.

2×10^4 Ba/F3-Transfektanten wurden für 3 Tage mit den angegebenen Konzentrationen an IL-6 und einer konstanten Menge sIL-6R ($1 \mu\text{g/ml}$) kultiviert. Die Proliferation der Zellen wurde mit Hilfe des colorimetrischen XTT-Testes gemessen. Das Wachstum nach IL-6-Stimulation ist in % des Wachstums nach IL-3-Stimulation dargestellt.

3.1.4 Punktmutation von Tryptophan 666 zu Alanin in gp130 verhindert die Aktivierung von STAT3-Faktoren in stabilen Ba/F3-Transfektanten

Nach dem Befund, daß die gp130W666A- und gp130 Δ MP-Mutanten die Proliferation von stabilen Ba/F3-Transfektanten nach IL-6-Stimulation nicht vermitteln konnten, wurde untersucht, ob eine Aktivierung von STAT-Faktoren nach Stimulation mit IL-6 noch möglich ist. Zwei verschiedene Klone wurden mit 20 ng/ml IL-6 und $1 \mu\text{g/ml}$ löslichem IL-6R α 30 Minuten lang stimuliert. Anschließend wurden Kernextrakte hergestellt und durch *Gelshift*-Analyse untersucht. Dazu wurde eine radioaktiv markierte SIE-Sonde benutzt, welche STAT1 und STAT3 spezifisch bindet. Im Gegensatz zu gp130 waren die Mutanten gp130W666A und gp130 Δ MP nicht in der Lage, eine STAT3-Aktivierung nach Stimulation mit IL-6/sIL-6R zu vermitteln. Transfektanten, welche gp130P671A/P672A exprimierten, zeigten noch eine STAT3-Aktivierung (Abbildung 7). Die STAT-Aktivierung ist bekanntermaßen wichtig für die gp130-vermittelte Proliferation von Ba/F3-Transfektanten [88].

Die Transfektanten, welche gp130F676A oder gp130 Δ Box2 exprimierten, verhielten sich -

wie schon bei der Untersuchung der proliferativen Antwort beschrieben- uneinheitlich (Daten nicht gezeigt), so daß die Analyse weiterer Klone nötig wäre, um Schlußfolgerungen zu ermöglichen.

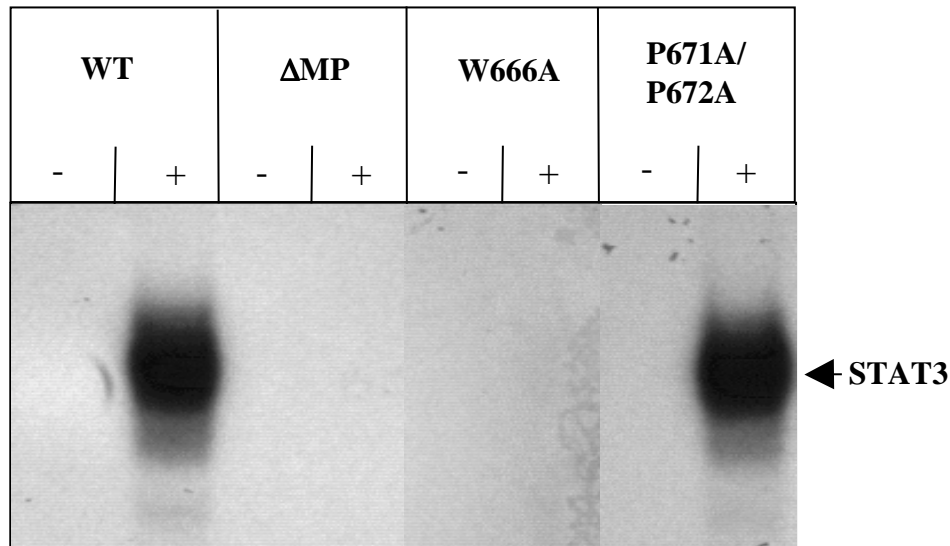


Abbildung 7: EMSA (Electrophoretic mobility shift assay) mit Kernextrakten von stabil transfizierten Ba/F3-Zellen, welche gp130 bzw. gp130-Mutanten exprimieren.

Stabile Ba/F3-Transfektanten wurden mit IL-6 und sIL-6R stimuliert. Kernextrakte wurden hergestellt und mit einer doppelstängigen [³²P]-markierten m67SIE-Sonde inkubiert. Die STAT3-DNA-Komplexe wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und durch Autoradiographie sichtbar gemacht.

3.1.5 STAT1-Aktivierung in transient transfizierten COS7-Zellen

Da nicht alle Mutanten erfolgreich stabil in Ba/F3-Zellen exprimiert werden konnten, wurden die gp130-Mutanten in COS7-Zellen untersucht. Diese Zelllinie ist sehr gut transient transfizierbar. Da COS7-Zellen endogen gp130 exprimieren, wurden chimäre Rezeptoren exprimiert, die aus dem Extrazellulärteil der IL-5R α - oder β -Kette und dem Transmembran- und zytoplasmatischen Teil von gp130 oder den verschiedenen Mutanten bestanden. Zusätzlich zu den bisher verwendeten Mutanten (Δ MP, W666A, P671A/P672A, F676A und Δ Box2) wurden im COS7-System noch weitere Konstrukte untersucht, die folgende Mutationen enthielten: W652A, Δ Box1, P656A/P658A und Y683F. Abbildung 8 zeigt, daß alle Mutanten sehr gut und in vergleichbarer Menge auf der Oberfläche von COS7-Zellen exprimiert werden.

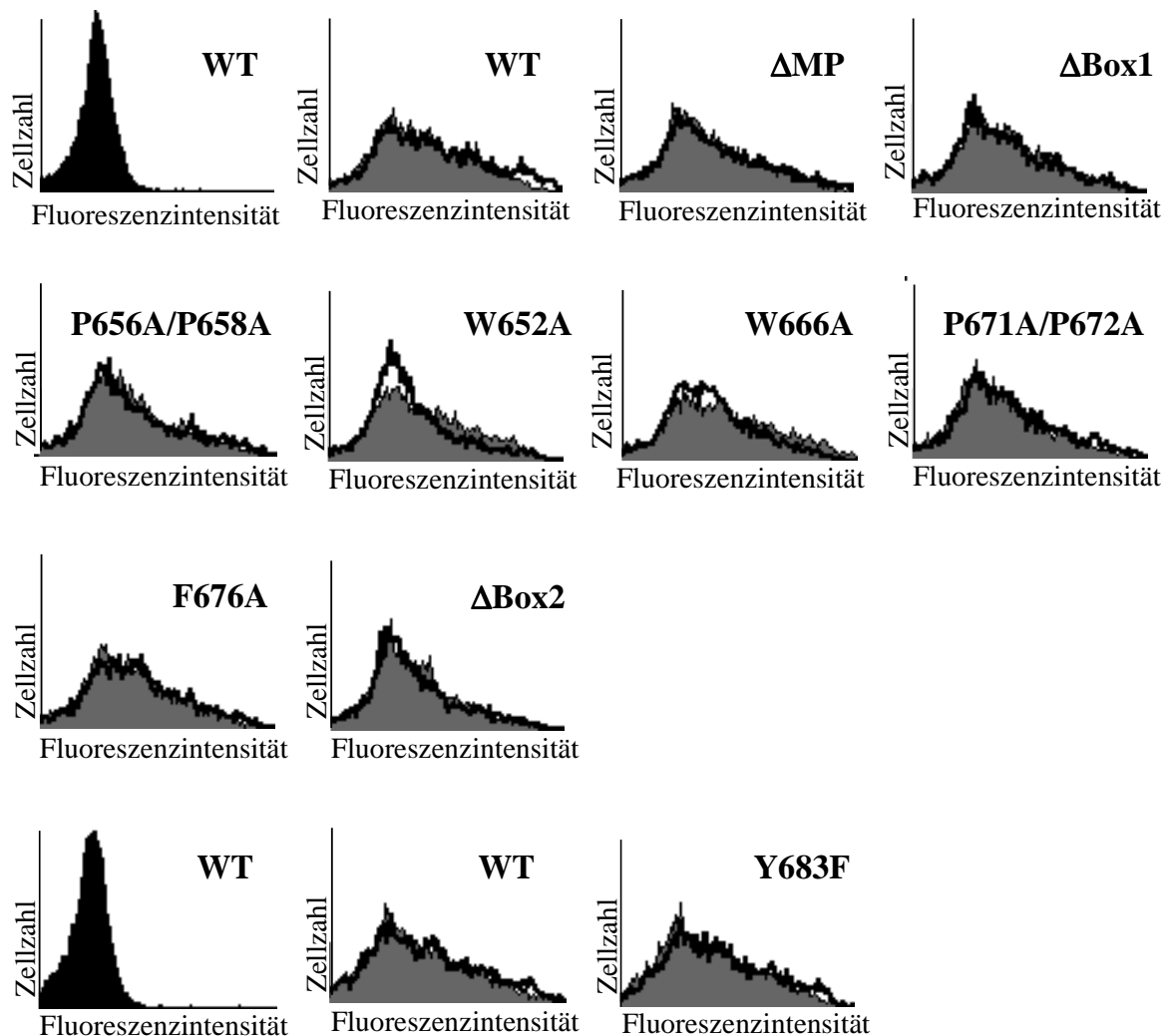


Abbildung 8: Durchflußzytometrischer Nachweis der Oberflächenexpression von IL-5R α - bzw. IL-5R β /gp130-Konstrukten auf der Oberfläche transient transfizierter COS7-Zellen.

0,5 - 1 x 10⁶ COS7-Zellen wurden mit den Expressionsvektoren für die verschiedenen IL-5R α - bzw. IL-5R β /gp130-Konstrukte transfiziert und mit dem monoklonalen IL-5R β -spezifischen Antikörper S16 oder einem monoklonalen IL-5R α -spezifischen Antikörper (16-4) inkubiert. Da die Y683F-Konstrukte nicht im selben Experiment wie alle anderen Mutanten vorlagen, sind die entsprechenden Daten für Y683F im Vergleich zu den entsprechenden WT-Konstrukten getrennt dargestellt. Der Nachweis gebundener Antikörper erfolgte nach Inkubation mit R-Phycoerythrin-konjugiertem anti-Maus-IgG. Die Verschiebung des Histogramms in Richtung höherer Fluoreszenzintensitäten ist auf die Bindung des anti-IL-5R β - bzw. des anti-IL-5R α -Antikörpers an heterolog exprimierte IL-5R α - bzw. IL-5R β /gp130-Konstrukte zurückzuführen. Im Histogramm erscheinen die mit anti-IL-5R α gefärbten Zellen als Kurve mit hellgrau ausgefülltem Flächenintegral und die mit anti-IL-5R β gefärbten Zellen als schwarze Linien. Die Fluoreszenz nach unspezifischer Bindung des Zweitantikörpers auf IL-5R α - und IL-5R β /gp130-exprimierenden Zellen ist als Kurve mit schwarz ausgefülltem Flächenintegral dargestellt.

3.1.5.1 Punktmutationen von Tryptophan 652 und Tryptophan 666 zu Alanin sowie die Deletion der Box2-Region von gp130 verhindern die stimulationsabhängige Aktivierung von STAT1 in transient transfizierten COS7-Zellen

COS7-Zellen wurden transient mit Expressionsvektoren für die verschiedenen IL-5R α - und IL-5R β /gp130-Konstrukte transfiziert (Abbildung 9A). 48 Stunden nach der Transfektion stimulierte man die Zellen mit 10 ng/ml IL-5. Anschließend wurden Kernextrakte hergestellt und im *Gelshift* mit Hilfe der radioaktiv markierten SIE-Sonde, die STAT1 und STAT3 spezifisch bindet, untersucht. Entsprechend den Resultaten der EMSAs von Ba/F3-

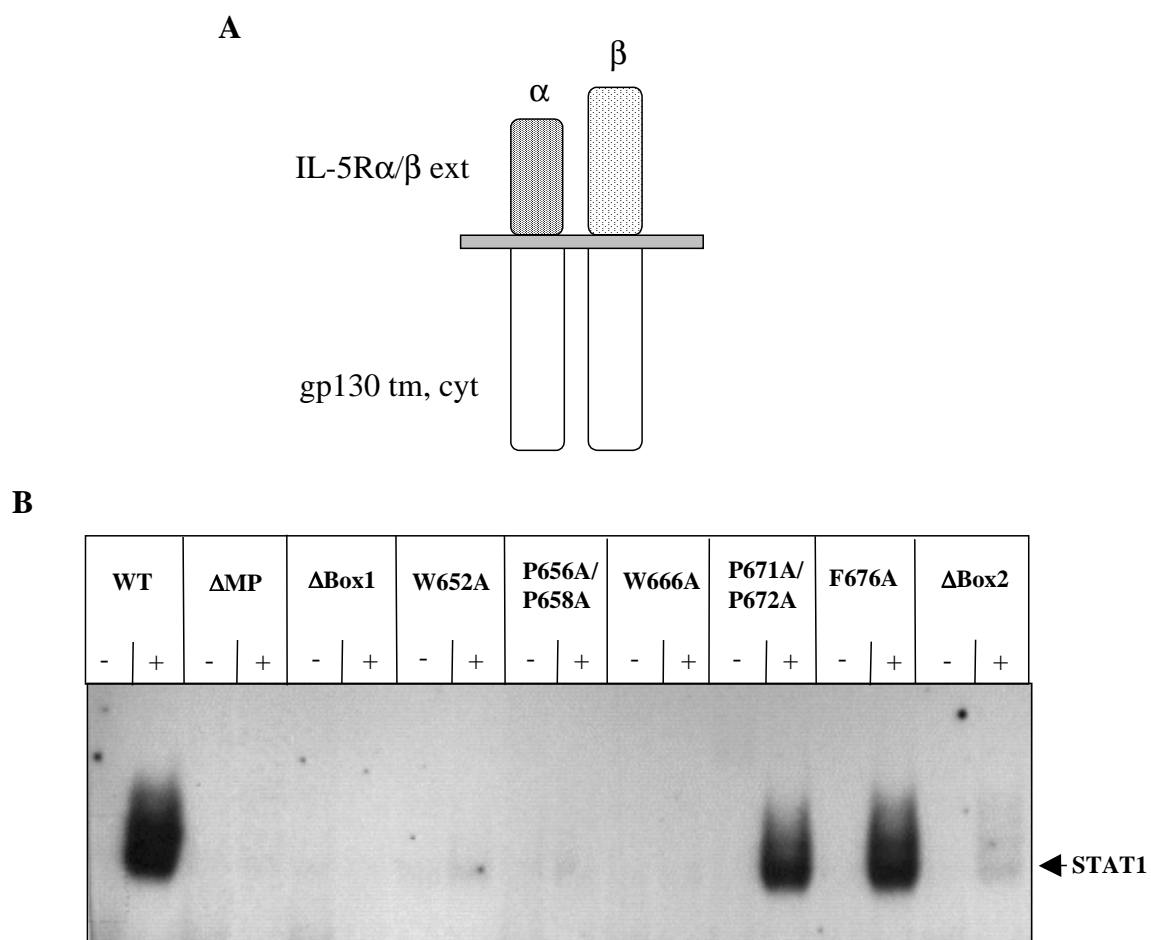


Abbildung 9: Einfluß verschiedener gp130-Mutationen auf die Signaltransduktion chimärer Rezeptoren.

(A) Schematische Darstellung der chimären Rezeptoren, welche aus dem Extrazellulärteil der IL-5R α - oder β -Kette und dem Transmembran- und zytoplasmatischen Teilen von gp130 bestehen. (B) EMSA mit Kernextrakten aus transient transfizierten COS7-Zellen, die die IL-5R α - bzw. IL-5R β /gp130-Konstrukte mit jeweils gleichen Mutationen exprimieren. Transient transfizierte COS7-Zellen wurden mit IL-5 stimuliert. Kernextrakte wurden hergestellt und mit einer doppelsträngigen [32 P]-markierten m67SIE-Sonde inkubiert. Die STAT1-DNA-Komplexe wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und durch

Transfektanten (Abbildung 7) waren die chimären Rezeptoren, welche die Mutationen W666A und Δ MP besaßen, nicht in der Lage, eine STAT1-Aktivierung nach Stimulation mit IL-5 zu vermitteln (Abbildung 9B). Die Mutationen P671A/P672A und F676A führten zu einer verringerten STAT1-Aktivierung im Vergleich zum Wild-Typ. Erwartungsgemäß blieb die STAT1-Aktivierung auch bei der Mutante Δ Box1 aus. Interessanterweise führte aber auch der Austausch von Tryptophan 652 zu Alanin und die Deletion von Box2 zu einer nahezu kompletten Inhibierung der STAT1-Aktivierung in COS7-Zellen (Abbildung 9B).

3.1.5.2 Die Mutationen Δ Box1 und W666A unterdrücken die STAT1-Aktivierung effizient, auch wenn die Mutation sich nur in einer Kette eines zytoplasmatischen gp130-Dimers befindet

Das System der IL-5R α / β -Chimären erlaubt die Dimerisierung beliebiger Mutanten des gp130 nach IL-5-Stimulation. Wie im letzten Abschnitt gezeigt, kann eine STAT1-Aktivierung nach gezielter Dimerisierung der zytoplasmatischen Bereiche von gp130 durch Einführung der Mutationen Δ MP, Δ Box1, P656A/P658A, W666A, W652A und Δ Box2 in beide Ketten des gp130-Dimers verhindert werden. Es sollte nun untersucht werden, ob diese Mutationen auch dann die Signaltransduktion verhindern, wenn sie nur in einer Kette des Dimers vorhanden sind. Dies würde bedeuten, daß entsprechende gp130-Moleküle dominant negativ auf die Signaltransduktion des WT-gp130 wirken.

COS7-Zellen wurden transient mit den entsprechenden Konstrukten transfiziert und, wie unter 3.1.5.1. beschrieben, aufgearbeitet. Kombinationen von IL-5R β /gp130-Konstrukten mit den Mutationen W666A und Δ Box1 mit IL-5R α /gp130WT verhinderten die STAT1-Aktivierung genauso gut wie die Kombination zweier mutierter Chimären (Abbildung 10A). Da bekannt ist, daß die Mutante Δ Box1 keine Jaks bindet, ist dies ein Hinweis dafür, daß die Mutation von Tryptophan 666 zu Alanin die Bindung von Jak1 stört. Die Mutation von Y683 hatte keinen Einfluß auf die STAT1-Aktivierung (Abbildung 10B). Kombinationen von IL-5R β /gp130-Konstrukten mit den Mutationen W652A, Δ Box2, P671A/P672A und F676A mit IL-5R α /gp130 zeigten eine Zunahme der STAT1-Aktivierung im Vergleich zu einer Kombination zweier mutierter Chimären. Komplexe mit nur einem mutierten chimären Rezeptor, der die Mutationen W652A oder Δ Box2 trägt, zeigen eine wesentlich schwächere Zunahme der STAT1-Aktivierung als solche mit einem mutierten chimären Rezeptor, der die Mutationen P671A/P672A oder F676A trägt (Abbildung 10C).

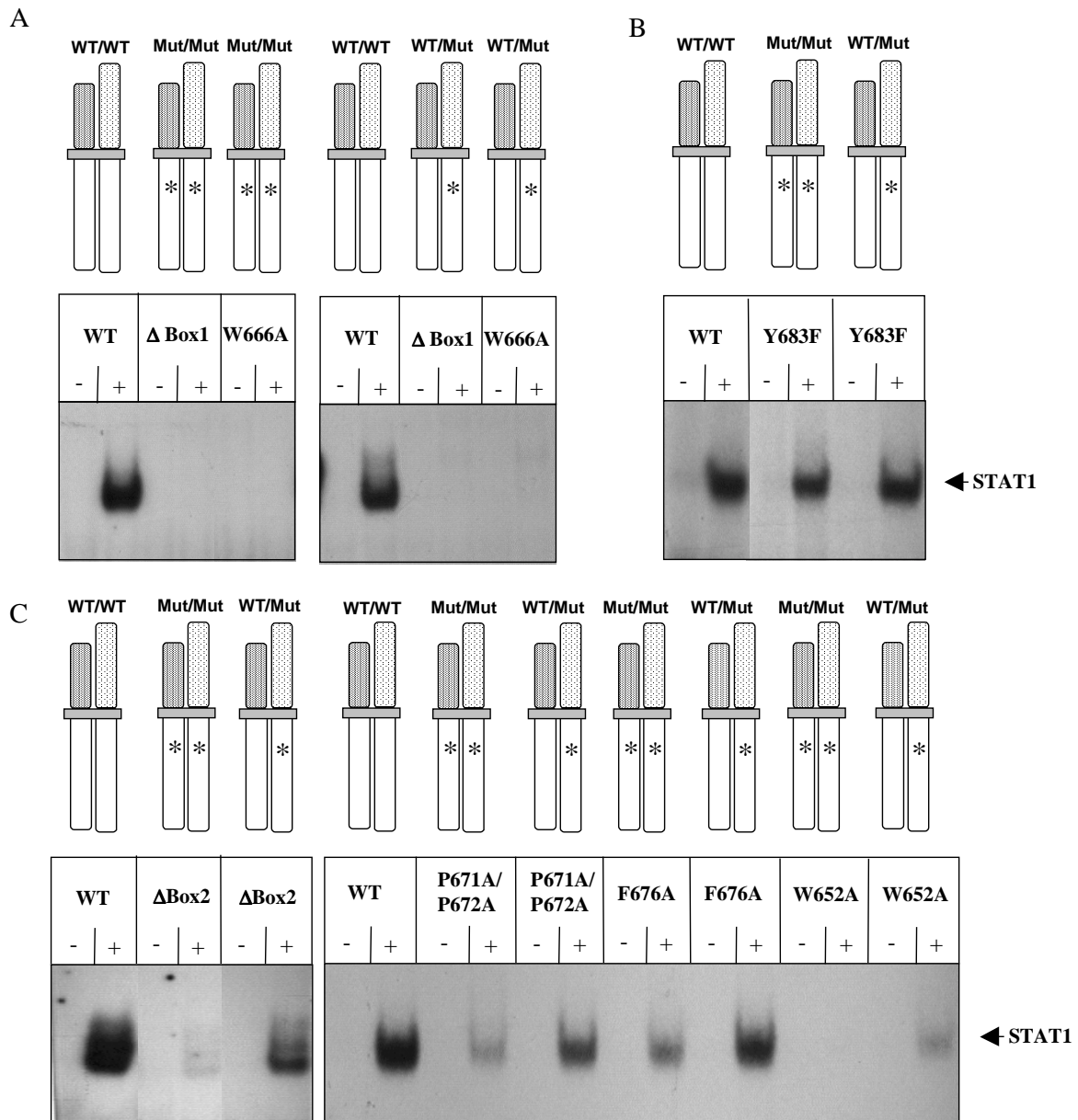


Abbildung 10: Analyse der verschiedenen gp130-Mutanten bezüglich ihres Potentials, dominant negativ zu wirken.

Die Chimärenkombinationen (WT/WT, Mut/Mut, WT/Mut) sind jeweils schematisch über den dazugehörigen *Gelshift*-Spuren dargestellt. (A) Transient in COS7-Zellen exprimierte chimäre Δ Box1- und W666A-Konstrukte wurden mit IL-5 stimuliert. Kernextrakte wurden hergestellt und mit einer doppelstängigen [32 P]-markierten m67SIE-Sonde inkubiert. Die STAT1-DNA-Komplexe wurden gelelektrophoretisch aufgetrennt und in der Autoradiographie sichtbar gemacht. (B) Chimäre mit der Mutation Y683F wurden transient in COS7-Zellen exprimiert, und wie unter (A) beschrieben aufgearbeitet. (C) Chimäre mit den Mutationen Δ Box2, W652A, P671A/P672A und F676A wurden transient in COS7-Zellen exprimiert. Die Aufarbeitung erfolgte wie unter (A) beschrieben.

3.1.6 Untersuchungen zur Assoziation von endogener Jak1 an den zytoplasmatischen Teil von gp130

Da Jaks an die membranproximalen Bereiche der Zytokinrezeptoren binden, könnte der Grund für das Ausbleiben der proliferativen Antwort und der STAT3-Aktivierung in stabil transfizierten Ba/F3-Transfektanten sowie der STAT1-Aktivierung in transient transfizierten COS7-Zellen darauf zurückzuführen sein, daß Jaks nicht mit den entsprechenden gp130-Mutanten assoziieren. Wegen der niedrigen Expressionsspiegel von gp130 und der gp130-Mutanten erbrachten Kopräzipitationsexperimente aus Ba/F3-Transfektanten nur unbefriedigende Resultate (nicht gezeigt). Da im COS7-System außerdem eine größere Anzahl Mutanten bezüglich ihrer Kompetenz, STAT1 zu aktivieren, untersucht worden war, wurde für die Kopräzipitationsexperimente auch auf das COS7-System zurückgegriffen. Diese Zelllinie ist -wie unter 3.1.5.1. gezeigt- sehr gut transient transfizierbar und liefert große Mengen heterolog exprimierter Proteine. Zusätzlich zu den bisher untersuchten Mutationen (Δ MP, Δ Box1, P656A/P658A, W652A, W666A, P671A/P672A, F676A, Y683F und Δ Box2) wurde die C-terminal verkürzte Mutante Δ B, welche nur die 68 membranproximalen Aminosäuren 642 bis 710 aufweist, in die Studie aufgenommen, da Regionen C-terminal zur Box2 in anderen Rezeptorsystemen durchaus an der Jak-Bindung beteiligt sind [67, 72].

COS7-Zellen wurden mit Expressionsvektoren für die verschiedenen IL-5R β /gp130-Konstrukte transfiziert. 48 Stunden nach der Transfektion konnten die Zellen geerntet und lysiert werden. Die chimären Rezeptoren wurden mit dem IL-5R β -spezifischen Antikörper S16 immunpräzipitiert, gelelektrophoretisch mit Hilfe der SDS-PAGE aufgetrennt und durch Western-blotting auf eine PVDF-Membran transferiert. Die kopräzipitierte endogene Jak1 wurde durch Detektion der Membran mit anti-Jak1-Serum nachgewiesen.

Anhand der erhaltenen Kopräzipitationsergebnisse (Abbildung 11) und der vorangegangenen Untersuchungen (EMSA, Abbildungen 9 und 10) kann man die Mutationen in verschiedene Gruppen unterteilen:

1. Wie aus den bisherigen Resultaten (EMSA) zu erwarten war, hatte die Mutation Y683F keinen Einfluß auf die Bindung von Jak1 (Abbildung 11, Spur 10).
2. Deletion der Box1 sowie Mutation der Proline 656 und 658 verhindert –wie erwartet [63]- die Kopräzipitation von Jak1 (Abbildung 11, Spuren 2 und 4). Interessanterweise bindet Jak1 auch nicht, wenn Tryptophan 666 zu Alanin mutiert wurde (Abbildung 11, Spur 5). Der Austausch einer einzelnen Aminosäure hat also die gleichen drastischen Konsequenzen auf die Jak1-Assoziation wie die Deletion der gesamten Box1 oder wie

Mutationen der Proline in der Box1. Auch die Deletionsmutante Δ MP bindet kein Jak1 mehr (Daten nicht gezeigt).

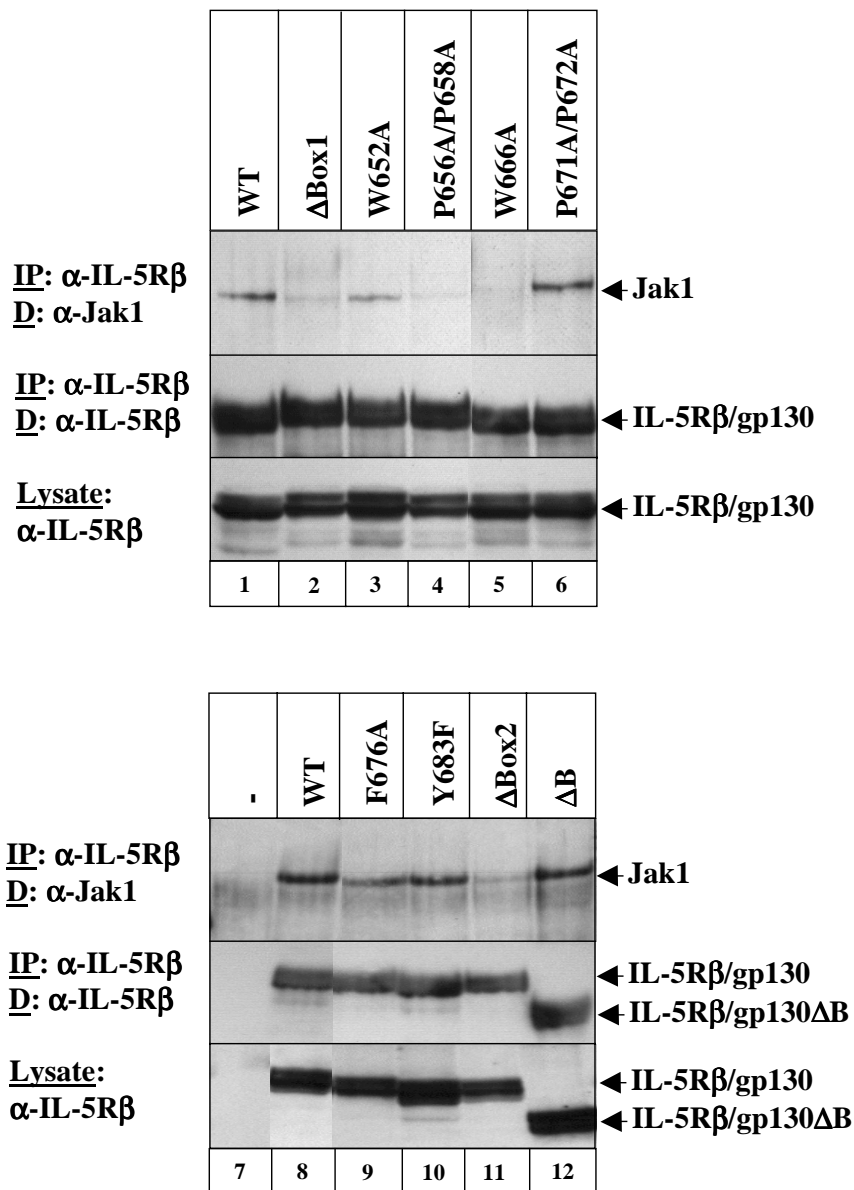


Abbildung 11: Kopräzipitation von endogener Jak1 mit IL-5R β /gp130 oder den entsprechenden Rezeptor-Mutanten.

Transient transfizierte COS7-Zellen, welche IL-5R β /gp130 oder mutierte IL-5R β /gp130-Konstrukte exprimieren, wurden lysiert und einer Immunpräzipitation mit dem IL-5R β -spezifischen Antikörper S16 unterzogen. Die Immunpräzipitate wurden gelelektrophoretisch mit Hilfe von SDS-PAGE aufgetrennt und durch Western-blotting auf eine PVDF-Membran transferiert. Die kopräzipitierte endogene Jak1 wurde durch Inkubation der Membran mit anti-Jak1-Serum und nachfolgender Detektion mit Hilfe des ECL-Systems nachgewiesen. Die Beladungskontrolle erfolgte durch Neuanfärben des Blots mit dem polyklonalen anti-IL-5R β Antikörper N-20. Zur Kontrolle der Expressionsspiegel der IL-5R β /gp130-Chimären wurden Aliquots der entsprechenden Zellysate ebenfalls gelelektrophoretisch aufgetrennt und durch Western-blotting auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Detektion der Chimären erfolgte mit anti-IL-5R β -Antikörper N-20. Die chimären Rezeptoren sind als Doppelbande sichtbar, was wahrscheinlich auf unterschiedlich glycosilierte Formen zurückzuführen ist.

3. Deletion der Box2 führt zu einer verminderten Jak1-Bindung im Vergleich zum Wild-Typ-Konstrukt, was auch die verringerte STAT-Aktivierung erklärt (Abbildung 11, Spur 11). Dies steht im Gegensatz zu publizierten Studien [63, 71].
4. Das Konstrukt IL-5R β /gp130W652A, welches keine STAT1-Aktivierung in COS7 induzierte, und die Konstrukte IL-5R β /gp130P671A/P672A und IL-5R β /gp130F676A, die eine verringerte STAT1-Aktivierung in COS7-Zellen aufwiesen, sind noch in der Lage endogene Jak1 zu binden (Abbildung 11, Spuren 3, 6 und 9). Die Bindung von Jak1 ist also notwendig, aber nicht ausreichend für eine STAT-Aktivierung.
5. Auch das IL-5R β /gp130 Δ B-Konstrukt zeigte keinen Rückgang in der Bindung im Vergleich zu IL-5R β /gp130 (Abbildung 11, Spur 12 im Vergleich zu Spur 8). Regionen C-terminal von Aminosäure 710 spielen also keine Rolle für die Bindung von Jak1 an den Rezeptor.

3.1.7 Unterschiede im apparenten Rezeptorassoziationsverhalten von endogener und überexprimierter Jak1

Die erstaunliche Diskrepanz zwischen den in der Literatur beschriebenen Ergebnissen und den hier präsentierten Daten bezüglich des Bindungsverhaltens von Jak1 an gp130-Konstrukte mit deletierter Box2-Region könnte auf unterschiedliche experimentelle Bedingungen zurückzuführen sein. Tanner et al. [63] arbeiteten mit Vaccinia-infizierten Zellen, wodurch ein sehr hoher Spiegel der heterolog exprimierten Jak2-Konstrukte erzielt wurde. Deshalb habe ich die unter 3.1.6. beschriebenen Experimente in analoger Weise mit koexprimierter Jak1 durchgeführt.

COS7-Zellen wurden mit Expressionsvektoren für IL-5R β /gp130 bzw. für die mutierten IL-5R β /gp130-Konstrukte sowie für Jak1 kotransfiziert. Parallel wurden Transfektanten hergestellt, die nur die IL-5R β -Konstrukte heterolog exprimierten. Alle Transfektanten wurden wie unter 3.1.6 beschrieben, aufgearbeitet.

Abbildung 12 zeigt, daß die Bindung der überexprimierten Jak1 an die Konstrukte IL-5R β /gp130P656A/P658A und IL-5R β /gp130 Δ Box2 im Vergleich zur Assoziation der endogenen Jak1 (Abbildung 12, Spuren 10 und 12 im Vergleich zu den Spuren 4 und 6) deutlich erhöht war. Wie Wiederholungsexperimente zeigten, ist die stärkere Kopräzipitation der Jak1 mit dem P656A/P658A-Konstrukt nicht darauf zurückzuführen, daß in dem gezeigten Experiment Jak1 stärker als in den anderen Transfektionen exprimiert wurde. Alle anderen Mutanten zeigten kein verändertes Verhalten (Daten zum Teil nicht gezeigt).

3.2 Mutationsanalyse der JH7- und JH6- Domänen von Jak1

Die N-terminale Hälfte der Janus-Kinasen ist für die Assoziation mit den membranproximalen Regionen von Zytokinrezeptoren notwendig. Durch sukzessive Deletionen wurde die minimale Rezeptor-Bindungsregion von Jak2 und Jak3 auf die JH7- und JH6-Domänen eingegrenzt [65, 77, 78]. Auch eine natürlich vorkommende Punktmutation in der JH7-Domäne von Jak3, Y100C, verhindert die Bindung dieser Kinase an die IL-2R γ -Kette und ruft im Menschen SCID (*severe combined immunodeficiency*) hervor. Verschiedene andere Punktmutationen in diesem Bereich zwischen den Aminosäuren 98-102 von Jak3 verhinderten ebenfalls die Assoziation an die IL-2R γ -Kette [78]. Die Rezeptor-Interaktionsbereiche von Jak1, der wichtigsten Janus-Kinase für die Signaltransduktion von IL-6-Typ-Zytokinen, waren bislang völlig unbekannt. Aus diesem Grund wurde der N-Terminus der Jak1 einer Mutationsanalyse unterzogen.

3.2.1 Auswahl der in den N-terminalen Bereich von Jak1 einzuführenden Mutationen

Die N-Termini der Jaks –in Jak1 die Region zwischen den Aminosäuren 24-415- weisen eine bemerkenswerte Sequenzhomologie zu FERM-Domänen auf [54]. Es wurden 19 konservierte Bereiche zwischen den Jaks und FERM-Domänen gefunden. Konservierte Aminosäuren aus den entsprechenden Konsensusbereichen der vermeintlichen FERM-Domäne der Jak1 wurden mutiert, um die Auswirkungen auf die Bindung an gp130 zu untersuchen. Es wurden hauptsächlich hydrophobe oder aromatische Aminosäuren mutiert, weil die Interaktion mit der Box1/2-Region von gp130 wahrscheinlich durch hydrophobe Wechselwirkungen vermittelt wird, und weil diese oftmals auch wichtig für die Ausbildung eines hydrophoben *core* innerhalb einer Domäne sind. So war die Wahrscheinlichkeit relativ hoch, die Interaktionsstelle oder die strukturelle Integrität der Domäne zu stören. Tabelle 2 zeigt die konservierten Bereiche in der vermeintlichen FERM-Domäne, in die die Mutationen eingeführt wurden, sowie die Art und den Grad der Konservierung der einzelnen Aminosäuren in FERM-Domänen.

Im 4. Konsensusbereich der putativen FERM-Domäne wurde L80 zu Alanin mutiert. Y89, im 5. Konsensusbereich der potentiellen FERM-Domäne, wurde ebenfalls gegen Alanin ausgetauscht. In Konsensusbereich 6 wurden Y107 und Y112 einzeln zu Alanin mutiert, und R104 wurde gegen Glutaminsäure ausgetauscht. Y107 von Jak1 entspricht Y100 in Jak3, welches bei Austausch gegen Cystein SCID im Menschen verursacht.

Im Konsensusbereich 7 wurden zwei Doppelmutanten hergestellt. L158 und F159 sowie L166 und V167 wurden gegen Alaninreste ausgetauscht. Y268 und Y281 wurden jeweils einzeln im 12. Konsensusbereich gegen Alanin ausgetauscht (Tabelle 3; Abbildung 13).

Da die Box1-Region der Zytokinrezeptoren Ähnlichkeit mit prolinreichen Sequenzen besitzt, welche an SH3-Domänen binden, wurde im N-Terminus der Jaks nach potentiellen SH3-Domänen gefahndet. Ein konservierter Bereich in SH3-Domänen zeigte große Übereinstimmung mit der Jak1-Sequenz zwischen den Aminosäuren 77-82. Diese Region entspricht teilweise dem 4. Konsensusbereich der putativen FERM-Domäne. Es wurden einige Punktmutanten der putativen SH3-Domäne hergestellt. Y81 und W116, die in einer vermeintlichen SH3-Domäne mit der prolinreichen Sequenz interagieren sollten, wurden jeweils gegen Alanin ausgetauscht. Neben den Einzelmutanten wurde auch eine Doppelmutante hergestellt.

Tabelle 2: Konsensusbereiche von Jak1 und FERM-Domänen, in die Mutationen eingeführt wurden [Girault, 1998 #466].

h: Hydrophobe Reste. l: Aminosäuren, welche oft in *loop*-Regionen vorkommen (P, G, D, N, S und A, C, T, E). Ø: Aromatische Reste. 0: Kleine Aminosäuren. +: Positiv geladene Reste. -: Negativ geladene Reste. x: kein konservierter Rest. \$: S oder T. Buchstaben in Großschrift bezeichnen die entsprechende Aminosäure (im Einbuchstaben-Code). Fettgedruckte Symbole bezeichnen Reste, welche in über 90% der FERM-Domänen konserviert sind.

Konsensusbereich in FERM-Domänen	Jak1-Sequenz in der Konsensusregion	Konsensussequenz
4	LFAL	hØ0h
5	WYAPNR-T	Whxx-xxh
6	LRLHYRMRFYFTN	hxlhxØ+h+ØØxl-
7	LLDASSLEYLFAQQQYDLVKCLA	xx-lx\$xxhhØhQx+x-hhxlxh
12	LKVKYLATLETTLTKHYGAEIFET	hxh+ØhxxhxxhlxxØGx-xØxh

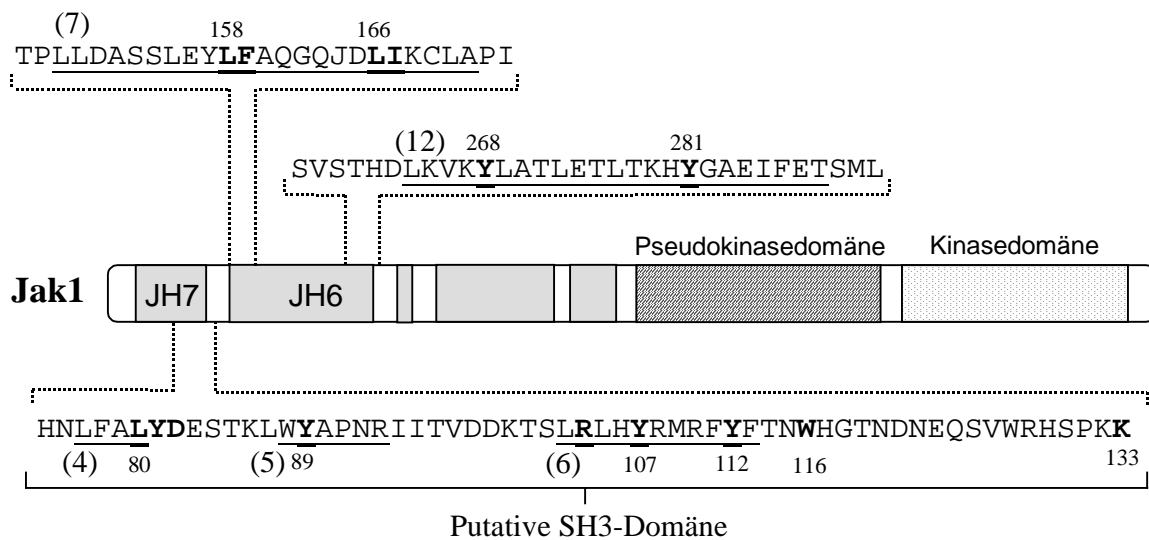
Der Austausch von K133 durch Glutaminsäure entstand zufällig (durch PCR-Fehler) und befindet sich in einer Lysin-reichen Region von Jak1.

Eine Kinase-inaktive Jak1 (Jak1K907E), in der Lysin 907 aus der Kinasedomäne gegen Glutaminsäure ausgetauscht ist, wurde ebenfalls in die Studie einbezogen. Eine Übersicht aller Jak1-Mutanten und die genaue Position der eingeführten Mutationen ergibt sich aus Tabelle 3 und Abbildung 13.

Tabelle 3: Tabellarische Darstellung aller Jak1-Mutanten.

Alle Mutanten wurden als vollständige Jak1-Konstrukte hergestellt. Die ausgetauschten Aminosäuren sind durch Fettdruck hervorgehoben.

Eingeführte Mutationen	Konservierte FERM-Motive in Jak1	Andere Gesichtspunkte
L80A	LFAL (4)	
L80A, Y81A	LFAL (4)	
Y81A		Putative SH3
Y81A, D82A		
Y89A	WYAPNR-T(5)	
R104E	LRLHYRMRFYFTN (6)	
Y107A	LRLHYRMRFYFTN(6)	
Y112A	LRLHYRMRFYFTN(6)	
W116A		Putative SH3
Y81A, W116A		Putative SH3
K133E		Lysin-reich
L158A, F159A	LLDASSLEYLFAQGQYDLIKCLA (7)	
L166A, V167A	LLDASSLEYLFAQGQYDLIKCLA (7)	
Y268A	LKVKYLATLETTLTKHYGAEIFET (12)	
Y281A	LKVKYLATLETTLTKHYGAEIFET (12)	
K907E		Kinase-inaktiv

**Abbildung 13: Schematische Darstellung der Jak1-Mutanten.**

Dargestellt ist die Sequenz verschiedener Bereiche von Jak1 (Aminosäuren 75 bis 133, Aminosäuren 147 bis 173 und Aminosäuren 258 bis 291). Die ausgetauschten Aminosäuren sind durch Fettdruck hervorgehoben, und ihre Position in Jak1 ist angegeben. Die unterstrichenen Bereiche entsprechen konservierten Bereichen aus FERM-Domänen. Die Zahlen in Klammern bezeichnen Konsensusbereiche der FERM-Domäne.

3.2.2 Untersuchung des Rezeptorbindungsverhaltens der verschiedenen Jak1-Mutanten

Die Assoziation der Jak1-Mutanten an den zytoplasmatischen Teil von gp130 wurde durch Kopräzipitationsexperimente untersucht. Hierfür wurde auf das COS7-System zurückgegriffen. Diese Zelllinie ist -wie unter 3.1.5.1. gezeigt- sehr gut transient transfizierbar. Die endogen in COS7-Zellen vorhandene Jak1 störte in diesen Studien nicht, da das COS-System eine Überexpression der Jak1-Mutanten sowie der IL-5R β /gp130- Rezeptorchimäre erlaubt. Jak1WT und die Jak1-Mutanten L80A, L80A/Y81A, Y81A, Y81A/D82A, Y89A, R104E, Y107A, Y112A, W116A, Y81A/W116A, K133E, L158A/F159A, L166A/V167A und KE wurden mit IL-5R β /gp130 in COS-Zellen koexprimiert. 48 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen geerntet und lysiert. Die Jak1-Mutanten wurden mit dem anti-Jak1-Serum immunpräzipitiert, wie unter 3.1.6 beschrieben, aufgearbeitet.

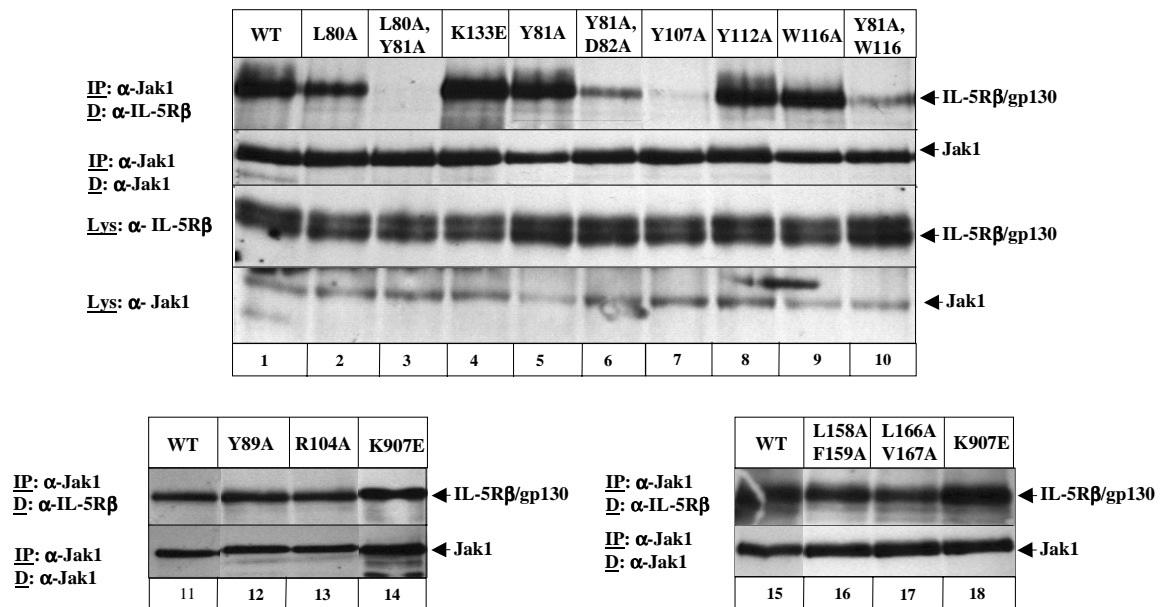


Abbildung 14: Analyse des Rezeptorbindungsverhaltens der verschiedenen Jak1-Mutanten.

Transient transfizierte COS7-Zellen, die IL-5R β /gp130 und Jak1 oder die Jak1-Mutanten exprimieren, wurden lysiert und einer Immunpräzipitation mit dem anti-Jak1-Serum unterzogen. Die Immunpräzipitate wurden gelelektrophoretisch mit Hilfe der SDS-PAGE aufgetrennt und durch Western-*blotting* auf eine PVDF-Membran transferiert. Kopräzipitiertes IL-5R β /gp130 wurde durch Inkubation der Membran mit dem anti-IL-5R β -Antikörper N-20 und nachfolgender Detektion mit Hilfe des ECL-Systems nachgewiesen. Die Expressionskontrolle erfolgte durch Neuanfärben des Blots mit dem anti-Jak1-Serum. Um auszuschließen, daß eine reduzierte Kopräzipitation auf eine geringere Expression der Jak1-Mutanten oder der IL-5R β /gp130-Chimären zurückzuführen ist, wurden Aliquots der jeweiligen Zellysate ebenfalls im Western-Blot analysiert. Die Detektion der Chimären erfolgte mit anti-IL-5R β -Antikörper N-20, die der Jak1-Mutanten mit dem anti-Jak1-Serum.

Obschon die Jak1-Konstrukte mit den Einzelmutationen Y81A und W116A keinen Rückgang der Assoziation zeigten, band ein Jak1-Konstrukt mit der Doppelmutation Y81A/W116A nur noch schwach an IL-5R β /gp130 (Abbildung 14; Spuren 5 und 9 im Vergleich zu Spur 10).

Im sechsten Konsensusbereich der potentiellen FERM-Domäne führte nur Y107A zu einem kompletten Bindungsrückgang des IL-5R β /gp130-Konstruktes. Dieser Tyrosinrest spielt also in Jak1 -wie auch in Jak3- eine essentielle Rolle für die Ausbildung einer Rezeptor-Interaktion-vermittelnden Struktur (Abbildung 14; Spur 7).

Der Bereich um die vierte konservierte Region der potentiellen FERM-Domäne scheint eine bedeutende Rolle zu spielen. Mutation von L80 zu Alanin führte zu einem schwachen, aber reproduzierbaren Rückgang der Bindung an IL-5R β /gp130 (Abbildung 14; Spur 2). Jak1-Konstrukte mit beiden Doppelmutationen L80A/Y81A und Y81A/D82A banden nicht mehr an IL-5R β /gp130 (Abbildung 14; Spuren 3 und 6).

Alle anderen eingeführten Mutationen zeigten keinen Effekt auf die Bindung des chimären IL-5R β /gp130-Konstruktes.

Die Jak1-Konstrukte mit den Mutationen Y268A und Y281A konnten nicht erfolgreich getestet werden.

3.2.3 Der Phosphorylierungszustand der Jak1Y107A-Mutante bei Überexpression der Kinase ist drastisch reduziert.

Bei Jak-Überexpression beobachtet man eine verstärkte Tyrosinphosphorylierung der Kinasen. Vermutlich kommt es aufgrund der räumlichen Nähe der Jaks zueinander zu ihrer gegenseitigen Phosphorylierung und Aktivierung (siehe auch 3.3.1.). Erstaunlicherweise war die überexpressionsvermittelte Phosphorylierung der Jak-Mutante Y107A jedoch vermindert (Abbildung 15).

Jak1 und die Jak1-Mutanten Y81A, Y89A, Y107A, K907E wurden in COS7-Zellen exprimiert wie unter 3.1.6 beschrieben, aufgearbeitet. Der Tyrosinphosphorylierungszustand der Jak1-Mutanten wurde mit Hilfe des anti-Phosphotyrosin-spezifischen Antikörpers PY99 detektiert. Eine vergleichbare Expression der verschiedenen Jak1-Mutanten wurde mit dem anti-Jak1-Serum nachgewiesen. Die Y107A-Mutante zeigt bei etwa gleicher Expressionsrate reproduzierbar einen völligen Rückgang ihrer Phosphorylierung (Abbildung 15; Spur 3) wie auch –erwartungsgemäß- die Kinase-inaktive Mutante Jak1K907E (Abbildung 15; Spur 5). Tyrosin 107 scheint also nicht nur für die Rezeptorbindung, sondern auch für die Fähigkeit zur Auto- oder Transphosphorylierung der Kinasen essentiell zu sein.

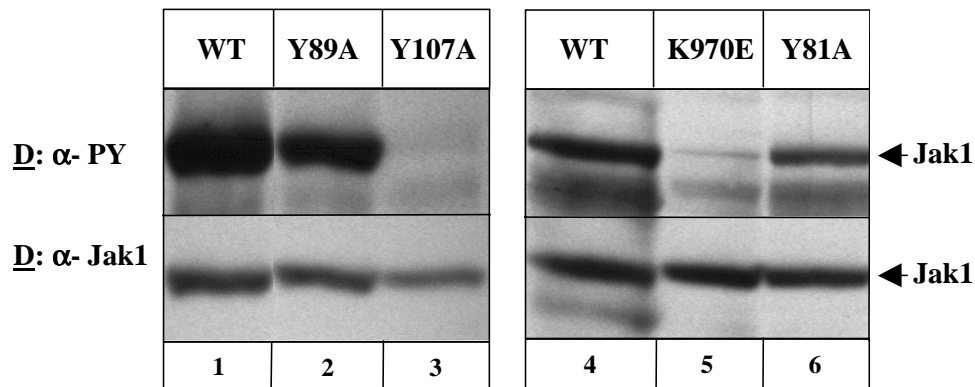


Abbildung 15: Der Phosphorylierungszustand der überexprimierten Jak1Y107A-Mutante ist reduziert.

COS7-Zellen wurden mit je einem Expressionsvektor für verschiedene Jak1-Mutanten transfiziert. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung der Lysate und Western-blotting wurde die Phosphorylierung der Jak1-Mutanten durch Detektion mit dem anti-Phosphotyrosin-spezifischen Antikörper PY99 untersucht. Die Expressionskontrolle der Jak1-Mutanten erfolgte mit Hilfe des anti-Jak1-Serums.

3.3 Untersuchungen zur Kinaseaktivität von Jak1.

Um den Nachweis enzymatisch aktiver Jak1 zu ermöglichen, wurde ein radioaktiver und nicht-radioaktiver *in-vitro*-Kinase-*assay* etabliert.

3.3.1 Etablierung eines *in-vitro*-Auto-Kinase-*assays* für Jak1 durch radioaktive Markierung mit $[\gamma^{32}\text{P}]\text{-ATP}$.

3.3.1.1 Expression von Jak1, Jak2 und Tyk2 in Sf158-Zellen.

Sf158-Zellen (*Spodoptera frugiperda*) können zu fast 100% mit Baculoviren infiziert werden. Unter der Kontrolle des starken viralen Polyhedrinpromotors können heterologe Gene zur Expression gebracht werden. Sf158-Zellen wurden mit einer hochtitrigen Lösung rekombinanter Baculoviren infiziert. Nach Lyse der Zellen befanden sich die löslichen Jaks im zytosolischen Überstand. Die Expression und der Phosphorylierungszustand der Jaks wurden durch Western-blotting überprüft (Abbildung 16). Alle drei Jaks werden exprimiert und sind Tyrosin-phosphoryliert - wahrscheinlich bedingt durch starke Überexpression.

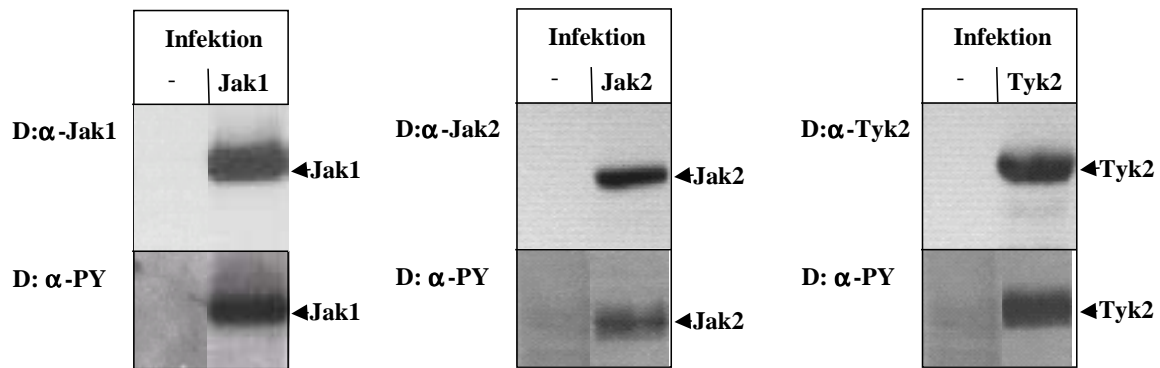


Abbildung 16: Expressionskontrolle und Phosphorylierungszustand der in Sf158-Zellen exprimierten Jaks.

Drei Tage nach Infektion wurden Zellysate hergestellt, die Proteine gelelektrophoretisch mit Hilfe der SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Detektion der Jaks erfolgte mit den jeweiligen spezifischen Antikörpern (Jak1: anti-Jak1-Serum; Jak2: anti-Jak2-Serum ; Tyk2: monoklonaler anti-Tyk2-Antikörper). Die Detektion der Phosphotyrosine erfolgte mit Hilfe des anti- Phosphotyrosin-Antikörpers PY99 von Santa Cruz Biotech.

3.3.1.2 *In-vitro*-Auto-Kinase-assay für Jak1.

Sf158-Zellen wurden mit einer hochtitrigen Lösung von Baculoviren infiziert und jeweils 1 bis 4 Tage nach Infektion lysiert. Jak1 wurde mit Hilfe des anti-Jak1-Serums präzipitiert und wie unter 3.1.6 beschrieben, aufgearbeitet. Der Phosphorylierungszustand von Jak1 wurde für die verschiedenen Zeitpunkte ermittelt (Abbildung 17). Der Großteil (75%) der immunpräzipitierten Jak1 wurde in einen *in-vitro*-Auto-Kinase-assay eingesetzt. Anschließend erfolgte eine elektrophoretische Auftrennung der Proteine; das Gel wurde getrocknet und einer Autoradiographie unterzogen.

Am ersten Tag nach der Infektion war praktisch kein Jak1 nachweisbar. Nach zwei Tagen wurde jedoch eine massive Expression beobachtet. Nach dem dritten Tag stieg die Menge in den Lysaten nicht mehr an. Jedoch war bis zum vierten Tag eine Verstärkung der Tyrosinphosphorylierung der Jak1 zu beobachten (Abbildung 17B). Auch die Kinaseaktivität der präzipitierten Jak1 stieg vom zweiten bis zum vierten Tag an (Abbildung 17A). Bei Überexpression von Jak1 in Insektenzellen gibt es also eine Korrelation zwischen der Kinaseaktivität und dem Phosphorylierungszustand.

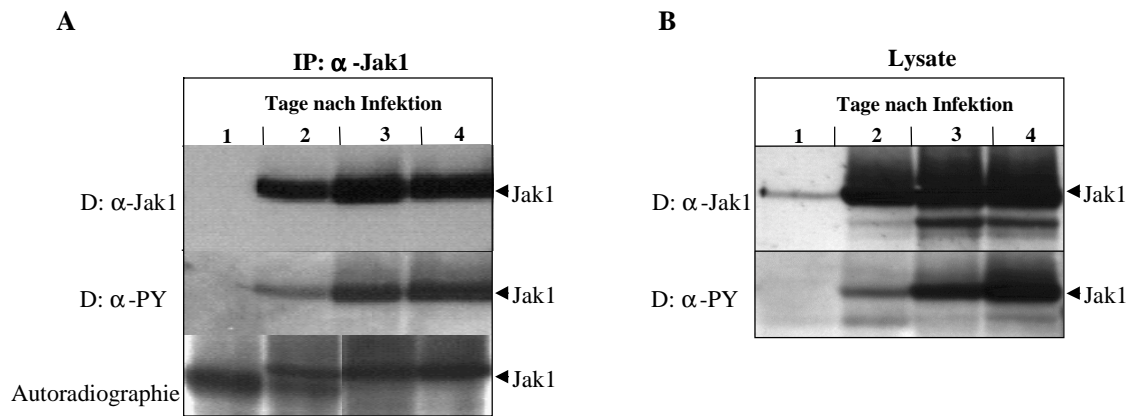


Abbildung 17: Nachweis der Kinaseaktivität der in Sf158-Zellen exprimierten Jak1.

(A) Mit Jak1-Baculoviren infizierte Sf158-Zellen wurden 1 bis 4 Tage nach Infektion lysiert. Jak1 wurde mit Hilfe eines anti-Jak1-Serums präzipitiert. Ein Aliquot des Ansatzes (25%) wurde gelelektrophoretisch mit Hilfe der SDS-PAGE aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Expressionskontrolle von Jak1 erfolgte durch Detektion mit anti-Jak1-Serum (oben). Die Kontrolle des Phosphorylierungszustandes erfolgte durch Phosphotyrosin-Detektion mit Hilfe eines anti-Phosphotyrosin-Antikörpers (Mitte). Der Großteil des Ansatzes (75%) wurde in einen *in-vitro*-Auto-Kinase-assay eingesetzt. Die Auto-Kinaseaktivität der Jak1 wurde nach gelelektrophoretischer Auftrennung durch Autoradiographie des ins Protein inkorporierten [³²P] im getrockneten Gel nachgewiesen (unten). (B) Western-Blots der Insektenzellsylate wurden wie in (A) beschrieben entwickelt.

3.3.2 Entwicklung eines nichtradioaktiven *in-vitro*-Kinase-assays für Jak1 durch Fluoreszenz-aktivierten Nachweis phosphorylierter Peptide im ELISA

Um die Aktivität und Spezifität der Jak1 Kinase zu untersuchen, wurde ein ELISA entwickelt. Abbildung 18 zeigt ein Schema des Assays. Zunächst erfolgt die Immunpräzipitation der Jak1

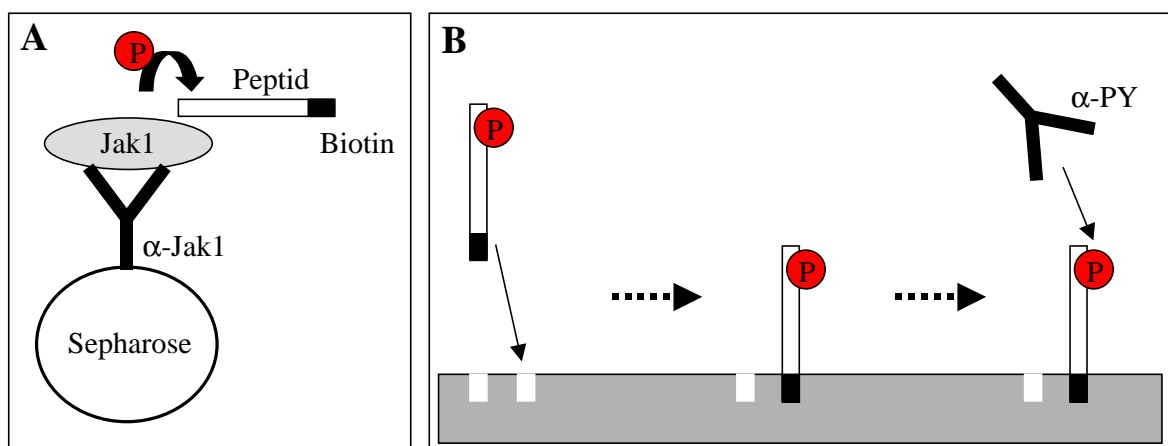


Abbildung 18: Schematische Darstellung des Kinaseaktivitäts-ELISA.

(A) Im *in-vitro*-Kinase-assay wird ein lösliches biotinyliertes Peptid von der an Sepharose gekoppelten immunpräzipitierten Jak1 phosphoryliert. (B) Nach Abtrennen der Jak1 wird das Peptid an die Streptavidinbeschichtete Oberfläche einer 96-well-ELISA-Platte gebunden und anschließend mit einem anti-Phosphotyrosin-Antikörper detektiert.

aus Lysaten von IL-6-stimulierten bzw. unstimulierten HepG2-Zellen. Im *in-vitro*-Kinase-*assay* werden die Tyrosinreste von löslichen biotinylierten Peptiden durch Jak1 phosphoryliert. Nach Abtrennung der an Sepharose gebundenen Jak1 wird das biotinylierte Peptid auf einer zuvor mit Streptavidin beschichteten ELISA-Platte immobilisiert. Die Phosphotyrosinreste der an die Streptavidinoberfläche gebundenen biotinylierten Peptide werden durch Inkubation mit dem Phosphotyrosin-spezifischen Antikörper PY99 detektiert. Die gebundenen Antikörper lassen sich nun mit einem HRP (*horse raddish peroxidase*)-konjugierten Zweitantikörper nachweisen. Als Färbereagenz dient eine 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin/H₂O₂-Lösung in Acetatpuffer. Die Farbreaktion wird durch Messung der Absorption bei 495 nm quantifiziert.

Um die optimale Konzentration von einzusetzendem ATP zu bestimmen, wurde das Peptid Y966 aus Jak2, welches sich in Vorversuchen bereits effizient phosphorylieren ließ, im *in-vitro*-Kinase-*assay* in Gegenwart von 0,125-2 mM ATP phosphoryliert. Die besten Phosphorylierungsraten wurden mit ATP-Konzentrationen zwischen 0,5 - 1 mM erreicht (Abbildung 19).

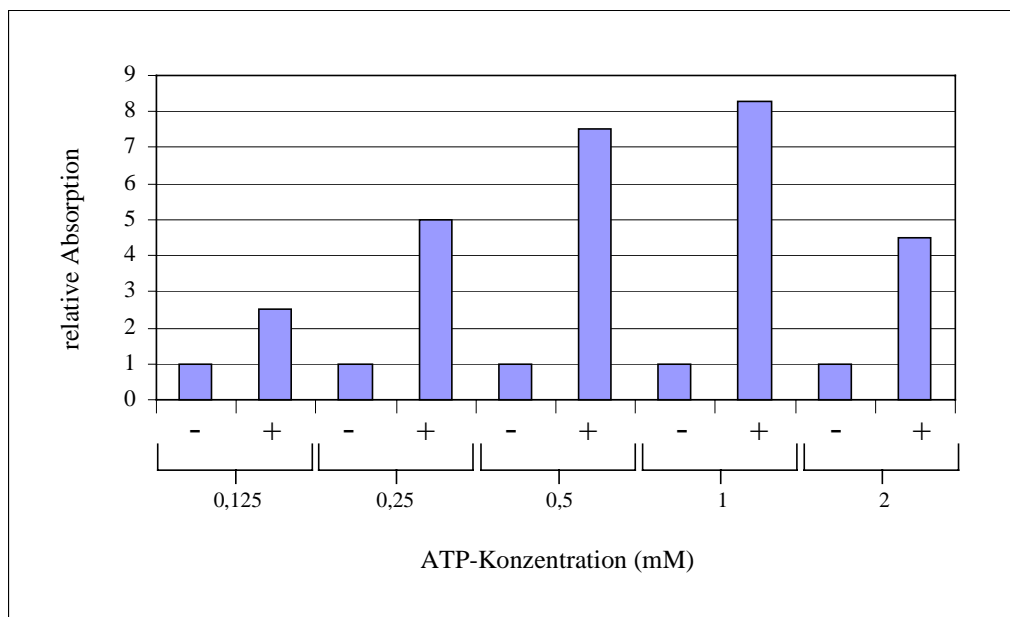


Abbildung 19: Phosphorylierung des Peptids Y966 aus Jak2 (Biotin- β A-QDKEYYKVKEPGES) im *in-vitro*-Kinase-*assay* bei Variation der ATP-Konzentration in einem Bereich von 0,125 mM bis 2 mM.

Aus einer Doppelbestimmung wurde für jede Konzentration der Mittelwert der gemessenen Absorption berechnet. Damit die Absorption für die verschiedenen ATP-Konzentrationen direkt verglichen werden kann, wurden die gemessenen Absorptionen der jeweiligen unstimulierten Proben auf 1 normiert.

4 Diskussion

4.1 Die Bedeutung des zytoplasmatischen Teiles von gp130 für die Signaltransduktion über den Jak/STAT-Weg

Die membranproximale Region von Zytokinrezeptoren enthält zwei konservierte Motive, Box1 und Box2. Box1 ist eine überwiegend hydrophobe Region mit konservierten Prolinresten, welche wichtig für die Assoziation von Janus-Kinasen mit Zytokinrezeptoren sind [51, 63, 64, 66-72]. Die Funktion der Box2 ist weniger gut untersucht. Bei manchen Rezeptoren ist Box2 wichtig für die Jak-Bindung und -Aktivierung, bei anderen hingegen nicht [63, 66, 67]. Die Regionen zwischen Box1 und Box2 (die Interbox1/2-Region) [69, 73-75], der C-terminal zur Box2 gelegene Bereich [67, 72] und die direkt an der Membran lokalisierte Region (c-mlp) [76] sind bei einigen Zytokinrezeptoren auch an der Assoziation und Aktivierung der Jaks beteiligt.

Vom gp130 war bisher bekannt, daß die Mutation von zwei Prolinen in der Box1 zur Unterdrückung der Jak-Bindung [63] und der Jak-Aktivierung [86, 87] führten. Außerdem wurde die IL-6-abhängige proliferative Antwort von stabil transfizierten Ba/F3 proB-Zellen durch Mutation der beiden Proline unterbunden [87]. Kombinierte Mutationen von einem Isoleucin, Tryptophan und Valin in Box1 sowie der Austausch von fünf positiv geladenen Aminosäuren in der Interbox1/2-Region von gp130 unterbunden ebenfalls die proliferative Antwort von Ba/F3-Transfektanten. Eine C-terminale Deletionsmutante von gp130 der die Box2 fehlt, konnte die IL-6-abhängige proliferative Antwort stabil transfizierter Ba/F3-Zellen nicht mehr vermitteln. Überexprimierte Jak1, Jak2 und Tyk2 banden jedoch noch an dieses Konstrukt [71]. Deletion der Box2 im Kontext eines VSVG-gp130 Fusionsproteins führte ebenfalls noch zur Bindung eines überexprimierten Jak2-Konstruktes [63].

Wenn man die existierenden Studien über gp130 heranzieht, fällt auf, daß bisher noch nicht alle Regionen, die eventuell in die Jak-Bindung involviert sein könnten, untersucht wurden. Die Bereiche, die untersucht wurden, sind wiederum nur unvollständig definiert; so wird in den meisten Studien entweder die Jak-Bindung an den Rezeptor oder die STAT-Aktivierung oder die proliferative Antwort untersucht, nie wurden alle Ereignisse miteinander verglichen. Auch wurde nie analysiert, ob die Jaks bei Überexpression unterschiedlich an Zytokinrezeptoren binden, obschon bekannt ist, daß Jaks sich bei Überexpression unphysiologisch verhalten können; sie zeigen dann z.B. eine konstitutive Aktivierung.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluß der Mutationen Δ MP, Δ Box1, P656A/P658A, W652A, W666A, P671A/P672A, F676A, Y683F und Δ B in gp130 auf folgende Ereignisse untersucht:

- die Fähigkeit zur Bindung von Jak1,
- die Fähigkeit STAT-Faktoren zu aktivieren,
- die Fähigkeit eine IL-6-abhängige proliferative Antwort von Ba/F3-Zellen zu vermitteln.

Gp130, die signaltransduzierende Untereinheit der IL-6-Typ-Zytokine, bindet Jak1, Jak2 und Tyk2. Das Jak-Aktivierungsmuster scheint Zelltyp-abhängig zu sein [13]. In welchem Ausmaß die Rekrutierung der verschiedenen Jaks über ihre jeweiligen Expressionsspiegel, über verschiedene Affinitäten zu den Rezeptoren oder andere Faktoren beeinflusst wird, ist noch nicht untersucht worden. In Kopräzipitationsstudien mit endogenen Jaks in COS7-Zellen konnte nur die endogene Jak1 –nicht jedoch Jak2 oder Tyk2- mit IL-5R β /gp130 chimären Rezeptoren kopräzipitiert werden (Daten nicht gezeigt). Auch wurde nach IL-6-Stimulation nur Jak1 in dieser Zelllinie nachweisbar aktiviert (Daten nicht gezeigt). Deshalb habe ich in der vorliegenden Arbeit auf die Untersuchung der endogenen Jak2 und Tyk2 in COS7-Zellen verzichtet.

Die membranproximale Region von Aminosäure 642 bis710 des zytoplasmatischen Teiles von gp130 ist essentiell für die Bindung endogener Jak1

In Kopräzipitationsversuchen von endogener Jak1 mit heterolog in COS7-Zellen exprimierten mutierten IL-5R β /gp130 chimären Rezeptoren konnte anhand der Deletionsmutation Δ B gezeigt werden, daß der Bereich C-terminal zur Box2, von Aminosäure 710 bis 918 keine Rolle für die Bindung endogener Jak1 spielt (Abbildung 11). Im Gegensatz zu früheren Studien [63] führte eine Deletion der Box2 zu einer signifikanten Abnahme der Bindung von endogener Jak1. Ein Kontrollexperiment mit überexprimierter Jak1 zeigte, daß die Diskrepanz zu den in der Literatur beschriebenen Daten auf die Überexpression der Jaks in den früheren Studien zurückzuführen ist (Abbildungen 11 und 12; siehe auch nächster Abschnitt). Damit wurde gezeigt, daß Box2 die Bindung endogener Jak1 beeinflusst, Bereiche C-terminal zur Box2 jedoch nicht mehr. Somit ist die minimal nötige Bindungsregion von Jak1 an gp130 klar eingegrenzt; Es handelt sich um die membranproximalen 68 Aminosäuren, die Box1/2-Region.

Überexpression von Jak1 führt zu einem veränderten Bindungsverhalten an verschiedene mutierte IL-5R β /gp130-Konstrukte

Kopräzipitationsversuche von endogener und überexprimierter Jak1 mit heterolog in COS7-Zellen exprimierten mutierten IL-5R β /gp130-Konstrukten haben ergeben, daß die Assoziation der überexprimierten Jak1 an die Konstrukte IL-5R β /gp130P656A/P658A und IL-5R β /gp130 Δ Box2 im Vergleich zur Assoziation der endogenen Jak1 deutlich erhöht war (Abbildung 12). Überexpression der Jak1 hatte jedoch keinen Einfluß auf deren Bindung an die Konstrukte mit den Mutationen Δ Box1, Δ MP oder W666A. Überexpression von Jaks kann also zu einem veränderten apparenten Bindungsverhalten der Jaks führen. Die Verwendung überexprimierter Jaks in Interaktionsstudien ist also nur bedingt aussagekräftig. Mutationen, welche die Bindung weniger effektiv unterdrücken, könnten bei Überexpression von Jaks übersehen werden.

Die Phosphorylierung von Y683 ist nicht nötig für die Jak/STAT-Signaltransduktion

Die Mutation Y683F hat weder einen Einfluß auf die STAT1-Aktivierung in COS7-Zellen (Abbildung 10B) noch auf die Kopräzipitation von Jak1 (Abbildung 11). Die Phosphorylierung von Y683 ist also nicht notwendig für die Signaltransduktion über den Jak/STAT-Weg. Sollte Y683 eine strukturelle Funktion haben, so sollte diese durch den Austausch zu Phenylalanin nicht gestört werden.

Diskrepanzen der Resultate mit Ba/F3- und COS7-Zellen

In Ba/F3-Zellen induzierte das gp130P671A/P672A-Konstrukt eine dem Wild-Typ bezüglich der Signalstärke vergleichbare STAT3-Aktivierung (Abbildung 7), während das entsprechende Konstrukt in COS7-Zellen eine deutlich erniedrigte STAT1-Aktivierung bewirkte (Abbildungen 9 und 10). Man kann nicht sicher ausschließen, daß die IL-5R α -, IL-5R β /gp130-Chimären sich hier anders verhalten als ein komplettes gp130. Das würde bisher allerdings eine einmalige Beobachtung darstellen, da sich die IL-5R-Chimären-Konstrukte in unserem Labor stets wie die entsprechenden gp130-Konstrukte verhielten. Der im Vergleich zur Ba/F3-gp130WT-Zelllinie höhere Expressionsspiegel der Rezeptormutante P671A/P672A in allen Ba/F3-gp130P671A/P672A-Klonen könnte ebenfalls für die Wild-Typ-ähnlichen STAT3-Aktivierungsspiegel und die proliferative Antwort (Abbildung 6) in Ba/F3-Zelllinien verantwortlich sein.

Die Mutationen W666A, P656A/P658A, Δ Box1 und Δ MP unterdrücken die Bindung von Jak1 an gp130 vollständig

In dieser Arbeit wurde gezeigt, daß die Mutationen W666A und Δ MP die proliferative Antwort (Abbildung 6) und die STAT3-Aktivierung in Ba/F3-Transfektanten (Abbildung 7) nach IL-6-Stimulation verhindern. Die STAT1-Aktivierung von IL-5R-gp130 Konstrukten, welche die Mutationen Δ MP, Δ Box1, P656A/P658A oder W666A tragen, wurde nach IL-5-Stimulation ebenfalls nicht beobachtet (Abbildung 9), auch wenn die Mutation sich nur in einer Kette eines zytoplasmatischen gp130-Dimers befand (Abbildung 10). Kopräzipitationsversuche von endogener Jak1 mit den entsprechenden heterolog in COS-7-Zellen exprimierten mutierten IL-5R β /gp130-Konstrukten zeigten, daß die Mutanten Δ MP (Daten nicht gezeigt), Δ Box1, P656A/P658A und W666A die Jak1-Assoziation stören. Aus diesen Ergebnissen kann man einige Schlußfolgerungen ableiten, die im folgenden diskutiert werden:

- Die Interbox1/2 Region ist möglicherweise an der Jak1-Bindung oder an der Ausbildung einer für die Jak-Bindung wichtigen Struktur beteiligt.
- Die Rekrutierung der Jaks durch nur eine zytoplasmatische gp130-Rezeptorkette ist nicht ausreichend, um die Signaltransduktion -und damit auch die proliferative Antwort einzuleiten.

Die Bedeutung der Box1 und der Proline in der Box1 für die Jak1-Bindung und die weitere Signaltransduktion durch den Jak/STAT-Weg -die schon aus der Literatur bekannt war [63, 71, 86, 87] - wurde in dieser Studie bestätigt. Die Mutationen Δ MP, Δ Box1 und P656A/P658A verhinderten die Jak-Bindung und STAT-Aktivierung. Die Mutante Δ MP wurde zusätzlich hinsichtlich einer proliferativen Antwort von Ba/F3-Transfektanten nach IL-6 Stimulation hin untersucht, konnte diese aber nicht mehr vermitteln.

W666A stellt den ersten Einzelaminosäureaustausch im zytoplasmatischen Teil von gp130 dar, welcher den Rezeptor funktionell inaktiviert. Außerdem ist W666 der erste identifizierte Rest im membranproximalen Bereich von gp130 außerhalb der Box1- und der Box2-Region, der die Jak1-Bindung unterdrückt. Ob W666 direkt mit Jak1 interagiert, oder ob die Mutation eine eventuelle, für die Jak-Bindung relevante Sekundärstruktur des zytoplasmatischen Bereiches stört, ist bisher unklar. Der Einfluß von Tryptophan-Resten auf die Signaltransduktion ist für andere Rezeptoren bereits untersucht worden. Mutation von W650 im humanen G-CSFR und von W282 im EPOR resultierte in einem Verlust der Rezeptor-Funktion, gemessen durch Jak-Aktivierung und Proliferation [73, 74, 89]. An dem mutierten EOPR-W282R wurde eine Jak2-Assoziation in zwei Studien beobachtet [74, 90], in einer

dritten jedoch nicht [91]. Mutation von W272 zu Glycin im IL-2R β führte zu einem starken Rückgang der Jak1- und Jak3-Bindung [72] und verhinderte die Vermittlung der proliferativen Antwort nach IL-2-Stimulation [72, 92]. Der Austausch von W272 des IL-2R β durch Alanin [75] oder zu Arginin [73] beeinflusste die Rezeptorfunktionen nicht. Der Einfluß von Tryptophan-Resten in der Interbox1/2-Region ist also schwer abzuschätzen.

Hervorzuheben ist auch die Tatsache, daß die Mutationen Δ Box1, P656A/P658A und W666A die Rezeptorfunktion störten, auch wenn diese sich nur in einer Kette eines zytoplasmatischen gp130-Dimers befand. Die Rekrutierung der Jaks durch nur eine zytoplasmatische gp130-Rezeptorkette ist nicht ausreichend, um die Signaltransduktion einzuleiten. Die Konstrukte Δ Box1, P656A/P658A und W666A sollten allesamt dominant negativ wirken können. Bekannt war bereits, daß die Kombination eines IL-5R β /gp130 mit IL-5R α /gp130 Δ cyt -einer Deletionsmutante, der der gesamte zytoplasmatische Teil von gp130 fehlt- inaktiv ist, während die Kombination von IL-5R β /gp130 mit IL-5R α /gp130 Δ B (welche nur die membranproximalen 68 Aminosäuren besitzt und noch mit Jaks assoziiert) noch IL-5-abhängig eine STAT1-Aktivierung vermittelt [93, 94]. Die Mutation W282R im EPOR kann auch dominant negativ wirken [95]. Für Studien mit dominant negativem gp130 wären Konstrukte mit den Mutationen W666A und P656A/P658A besonders geeignet, da bei Punktmutanten die Wahrscheinlichkeit geringer ist, ein eventuell vorhandenes Sortierungssignal oder eine Struktur zu zerstören, wodurch der potentiell dominant-negativ wirkende Rezeptor in der Zelle falsch sortiert oder abgebaut würde.

Deletion von Box2 führt zu einer verminderten Jak-Bindung an gp130 und zu einer reduzierten STAT-Aktivierung

Die reduzierte STAT1-Aktivierung durch die Deletion von Box2 ist auf die stark verminderte Jak1-Bindung dieses mutierten Konstruktes zurückzuführen. Ob die Box2 ebenfalls eine Rolle bei der Jak-Aktivierung –wie aus anderen Rezeptorsystemen bekannt- spielen könnte, ist zur Zeit nicht klar. Es kann nicht unterschieden werden, ob die beobachtete reduzierte STAT-Aktivierung durch die verminderte Bindungsfähigkeit der Jak1, oder anteilig durch zwei überlagerte Effekte -einer schwächeren Bindung und einer verminderten Aktivierung der Jak1- vermittelt wird.

Die Bindung von Jak1 für die STAT-Aktivierung ist notwendig, aber nicht ausreichend

IL-5R β /gp130-Konstrukte mit den entsprechenden Mutationen W652A, P671A/P672A und F676A banden Jak1 noch ähnlich gut wie die Wild-Typ-Chimäre, bewirkten jedoch eine

reduzierte STAT1-Aktivierung in mit IL-5R/gp130-Konstrukten transfizierten COS7-Zellen (Abbildung 10C).

Die STAT1-Aktivierung der P671A/P672A- und F676A-Konstrukte war nach IL-5-Stimulation im Vergleich zum Wild-Typ deutlich reduziert. Kombination der mutierten IL-5R β /gp130-Konstrukte mit IL-5R α /gp130WT führte jedoch zu einer Revertierung der geringen Aktivierung (Abbildung 10C). Der Effekt kann also durch die Anwesenheit eines unmutierten zytoplasmatischen Teiles im gp130 Dimer wieder fast vollständig aufgehoben werden. Diese Mutanten zeigen somit im Gegensatz zu W666A, P656A/P658A und Δ Box1 keinen dominant negativen Effekt. Was die Mutationen P671A/P672A und F676A bewirken, kann nur schwer ermittelt werden. Es könnte sich um eine Beeinflussung der Struktur des membranproximalen Bereiches von gp130 handeln, der die Bindung oder Aktivierbarkeit von Jaks geringfügig beeinflusst.

Mutation von W652 zu Alanin beeinflusst die Bindung der Jak1 nur wenig (Abbildung 11), verhindert die STAT1-Aktivierung in COS7-Zellen jedoch nahezu vollständig und in dominanter Weise (Abbildung 10C), d.h. wenn sich die Mutation nur an einer Rezeptorkette eines zytoplasmatischen gp130-Dimers befindet, kommt es praktisch zu keiner STAT1-Aktivierung mehr. Die Bindung von Jak1 ist also notwendig, aber nicht ausreichend für eine STAT-Aktivierung. W652 spielt wahrscheinlich eine wichtige Rolle bei der Jak-Aktivierung am gp130-Dimer. Erstaunlich ist, daß sich W652 in der Box1 befindet, welche bisher nur für die Jak1-Bindung verantwortlich gemacht wurde. Box1 könnte also neben der Vermittlung der Bindung noch andere wichtige Funktionen für die Jak-Aktivierung ausüben. Die Regulierung der Jaks als konstitutiv an Zytokinrezeptoren assoziierte Kinasen könnte Bereiche des Rezeptors involvieren. In diesem Sinn ist der Rezeptor/Kinase-Komplex als die eigentliche bei der Signaltransduktion zu aktivierende Einheit anzusehen.

Hier gibt es eine Parallele zu Regulationsmechanismen anderer Kinase-Familien: Im Fall der Src-Kinase Hck befinden sich prolinreiche Bereiche, die die intramolekulare Bindung der SH3-Domäne vermitteln, und ein Tryptophan, welches die Aktivierung beeinflusst, ebenfalls in direkter Nachbarschaft. Bei Src-Kinasen handelt es sich aber nicht um die Vermittlung der Aktivierung sondern um einen Autoinhibitionsmechanismus. In der Nähe der inhibitorischen Bindungsstelle der eigenen SH3-Domäne in Src-Kinasen befindet sich ein Tryptophan, welches nicht an dieser Interaktion beteiligt ist, aber Bereiche in der Kinasedomäne kontaktiert und letztere so in einem inaktiven Zustand hält [96]. Da die Jak-Aktivierung im IL-5R/gp130-System nicht untersucht werden konnte, kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, daß W652 nicht für die Aktivierung, sondern für die korrekte Präsentation der Jaks

an den Rezeptor, zu sich selbst oder zu den Substraten nötig ist.

4.2 Die Mutationsanalyse der JH7- und JH6-Domänen von Jak1.

Die JH7- und JH6-Domänen der N-terminalen Hälfte von Jak2 und Jak3 sind für die Assoziation mit den membranproximalen Regionen von Zytokinrezeptoren notwendig [65, 77, 78]. In dieser Studie wurde die Bindung von Jak1 an gp130 untersucht indem erstmals Aminosäureaustausche im N-Terminus der Jak1 vorgenommen wurden.

Der N-Terminus der Jak1 zeigt eine geringe Ähnlichkeit zu SH3-Domänen. Um die Existenz einer möglichen SH3-Domäne zu prüfen, wurden Y81 und W116, die als potentiell mit dem Bindungspartner gp130 interagierenden Aminosäuren in Frage kommen, zu Alanin mutiert. Jak1-Konstrukte mit den Mutationen Y81A oder W116A zeigten keinen Rückgang der Bindung, aber ein Jak1-Konstrukt mit der Doppelmutation Y81A/W116A band nur noch schwach an IL-5R β /gp130. Da in dieser Studie mit überexprimierten Jak1-Konstrukten gearbeitet wurde, kann nicht ausgeschlossen werden, daß die Einzelmutationen die Interaktion mit gp130 nicht auch stören könnten, wenn der Expressionsspiegel der Jak1-Konstrukte niedriger wäre (vergl. 4.1.2). Die Ergebnisse dieser Mutationen ließen keinen klaren Schluß bezüglich der Existenz einer SH3-Domäne im N-terminalen Bereich von Jak1 zu.

Inzwischen wurden Strukturhomologien von N-terminalen Bereichen der Jaks mit sogenannten FERM-Domänen vorgeschlagen [54]. FERM-Domänen sind sehr groß (Aminosäuren 24-415 in Jak1) und bestehen wahrscheinlich aus einer Anzahl kleinerer Domänen. Studien zur Eingrenzung der Rezeptorbindungsregion von Tyk2 und Jak3 [78, 79] sind mit der postulierten Existenz einer FERM-Domäne in Einklang zu bringen. Auch die Punktmutationen, die in dieser Arbeit in Jak1 eingefügt wurden, können im Lichte einer vermeintlichen FERM-Domäne interpretiert werden: Die Mutationen wurden in konservierte Bereiche der FERM-Domäne eingeführt (vergleiche Tabelle 3).

Die überzeugendste Interpretation der in der Literatur beschriebenen sowie der in dieser Studie präsentierten Daten lieferte jedoch ein neues Strukturmodell von Dr. J. Grötzinger (Institut für Biochemie Aachen). Er identifizierte eine Region in Jak1 zwischen den Aminosäuren 36 und 112 als potentielle β -grasp-Domäne. β -grasp-Domänen sind aus der Struktur von Ubiquitin, rap1 und aus der Faltung von Superantigenen bekannt. Die β -grasp-Domäne umfaßt exakt die Konsensusregionen 1 bis 6 (Aminosäuren 36-112 in Jak1) der vermeintlichen FERM-Domäne in Jak1. Bemerkenswerterweise entsprechen die im Modell postulierten Bereiche, in denen sich β -Faltblattstrukturen und die α -Helix ausbilden, den konservierten FERM-Konsensusbereiche (Abbildung 20). Ob β -grasp-Domänen integrale

Bestandteile aller FERM-Domänen sind, ist damit jedoch noch nicht klar, zumal die Jak1-FERM-Domäne erhebliche Divergenzen zu anderen FERM-Domänen aufweist, und die Existenz der potentiellen der β -grasp-Domäne noch experimentell bestätigt werden muß. In Abbildung 20 ist ein *Alignment* der verschiedenen Janus-Kinasen mit den β -grasp-Domänen des Ubiquitins und von rap1 dargestellt.

```

rap1:          PSKTSNT IRVFLPNK.. QR..TVVNVNR
Ubi:          MQ IFVKTLTG.. KT..ITLEVE
mJak1:  ...MQYLNLIK EDCNAMAFCA KMRSFKKTEV KQVVPEPGVE VTFYLLDR.. EP..LRLGS.
                                      $\beta_1$        $l_1$        $\beta_2$ 

mJak1:  ...MQYLNLIK EDCNAMAFCA KMRSFKKTEV KQVVPEPGVE VTFYLLDR.. EP..LRLGS.
hJak1:  .....      .....MAFCA KMRSSKKTEV NLEAPEPGVE VIFYLSDR.. EP..LRLGS.
hJak2:  MGMACLTMTE MEGTSTSSIIY QNGDISGNAN SMKQIDPVLQ VYLYHSLGKS EADYLKFFPS.
hJak3:  .....      .....MAPPSE ETPLIPQRSC SLLSTEAGAL HVLLPARAPG PPQ.RLSFSF
hTyk2:  .....      ..MPLRHWGM ARGSKPVG DG AQPMAAMGGL KVLLHWAGPG GGEPWVTFSE
FERM-Subd. NR:          1          2

rap1:  NGMSLHDCLM KALKVIRGLQP ECCAVFRLH EH.....KG KKAR...LDW NTDAASLIGE
Ubi:  PSDTIENVKA KIQDKEGIPP DQQRLLIF... ..AGKQLEDG RTLSDYNIQK ESTLHLVLRL
mJak1:  GEYTAEEELCI RAAQECSISP LCHNLFALYD ESTKLWYAPN RIIT...VDD KTSLRLHYRM
           $l_2$        $\alpha_1$        $l_3$        $\beta_3$        $l_4$        $\beta_4$        $l_5$        $\alpha_2$        $\beta_5$ 

mJak1:  GEYTAEEELCI RAAQECSISP LCHNLFALYD ESTKLWYAPN RIIT...VDD KTSLRLHYRM
hJak1:  GEYTAEEELCI RAAQACRISP LCHNLFALYD ENTKLWYAPN RTIT...VDD KMSLRLHYRM
hJak2:  GEYVAEEICI AASKACGITP VYHNMFALMS ETERIWYPPN HVFH...IDE STRHNVLYRI
hJak3:  GDHLAEDLCV QAAKASGILP VYHSLFALAT EDLSCWFPPS HIFS...VED ASTQVLLYRI
hTyk2:  SSLTAAEVCI HIAHKVGITP PCFNLFALFD AQAQVWLPPN HILE...IPR DASLMLYFRI
FERM-Subd. NR:          3          4          5          6

rap1:  ELQVDFL...
Ubi:  RGG.....
mJak1:  RFYFTNWHGT

mJak1:  RFYFTNWHGT NDNEQSVWRH SPKKQKNGYE KKRVPDATPL LDASSLEYLF AQQQYDLVKC
hJak1:  RFYFTNWHGT NDNEQSVWRH SPKKQKNGYE KKKIPDATPL LDASSLEYLF AQQQYDLIKC
hJak2:  RFYFPRWYCS GSNRA..YRH GISR..... ..GAEAPL LDDFVMSYLF AQRWRFDFVHG
hJak3:  RFYFPNWFGL EKCH...RF GLRK..... ..DLASAI LDLPVLEHLF AQHRSDLVSG
hTyk2:  RFYFRNWHGM NPREPAVYRC GPPGTEASSD QTA..QGMQL LDPASFEYLF EQGKHEFVND
FERM-Subd. NR:          7

```

Abbildung 20: *Alignment* der rap1 und Ubiquitin (Ubi) β -grasp-Domänen mit muriner Jak1 (mJak1) sowie den Sequenzen der humanen (h) Jak1, Jak2, Jak3 und Tyk2.

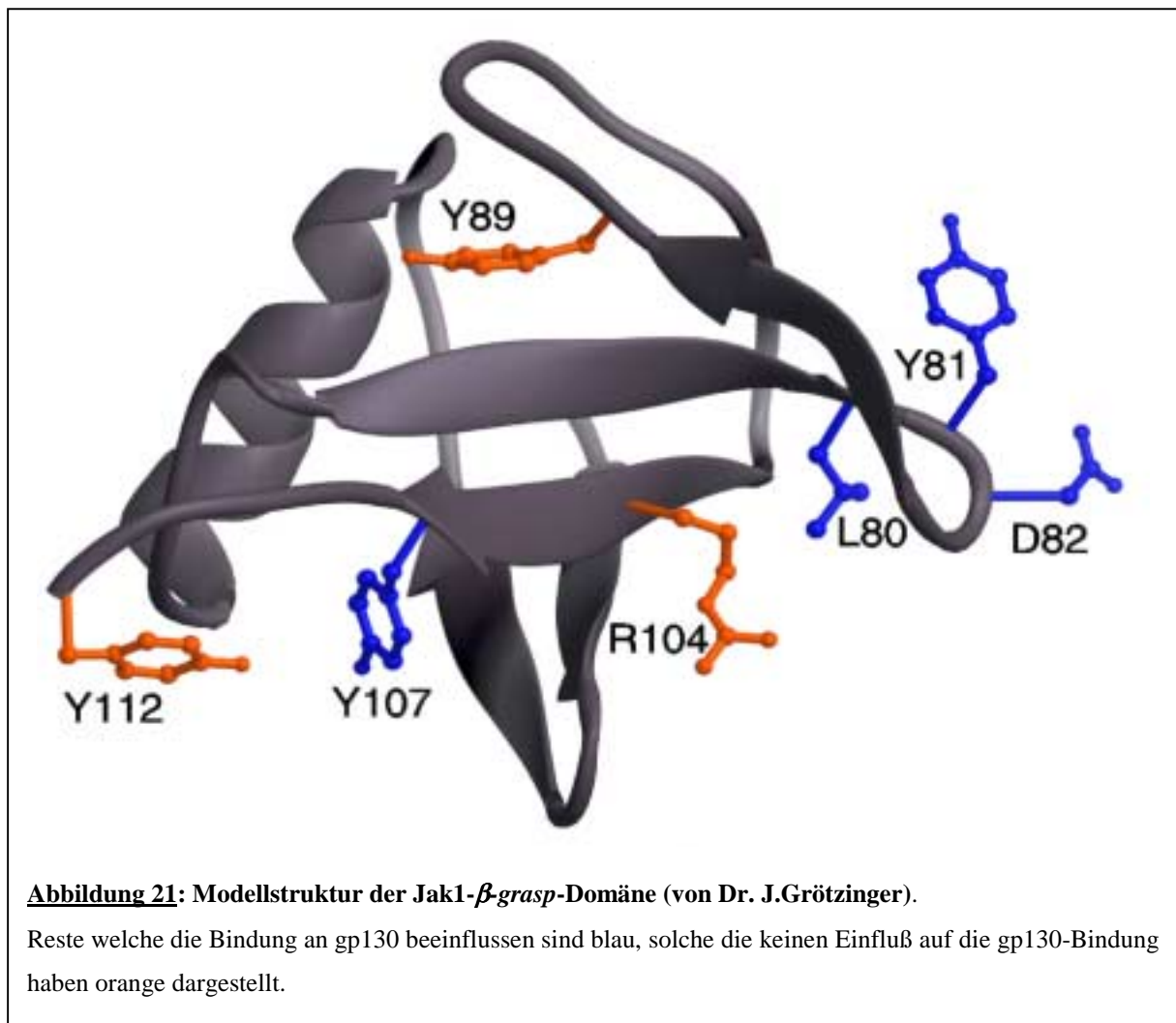
Die Sequenz der mJak1 ist zweimal dargestellt, im *alignment* mit rap1 und Ubiquitin sowie im *alignment* mit den anderen Jaks. In rot sind die Bereiche wiedergegeben, die im Modell der mJak1 Helices (α) oder β -Faltblattstrukturen (β) ausbilden. Die *loop*-Regionen wurden mit l_1 - l_4 bezeichnet (l). In den *Jak-alignments* sind Sequenzhomologien zu FERM-Domänen hellblau markiert. Die in mJak1 ausgetauschten Aminosäuren sind durch Fettdruck hervorgehoben.

Die Region um die vierte konservierte Region der potentiellen FERM-Domäne scheint eine bedeutende Rolle bei der Rezeptorbindung zu spielen. Mutation von L80 zu Alanin führte zu

einem reproduzierbaren, aber schwachen Rückgang der Bindung an IL-5R β /gp130. Jak1-Konstrukte mit den Doppelmutationen L80A/Y81A oder Y81A/D82A banden nicht mehr an IL-5R β /gp130. Diese Aminosäuren liegen im Anfangsbereich einer *loop*-Region (*loop 4*), welche an der Bindung des Rezeptors beteiligt sein könnte. *loop 4* ist in der Jak-Familie nur mäßig konserviert, wie man es von einer Region erwarten würde, welche die Rezeptorbindung und damit auch die Bindungsspezifität vermitteln muß (Abbildung 21).

Mutation von Y89, in der fünften FERM-Konsensusbereich, zu Alanin hat keinen Effekt auf die Rezeptorbindung. Y89 scheint nur eine geringe Rolle bei der Stabilisierung der Struktur zu spielen (Abbildung 21).

Im Bereich der sechsten Konsensusbereich der potentiellen FERM-Domäne führte nur der Austausch von Y107 zu einem kompletten Rückgang der Bindung des IL-5R β /gp130-Konstruktes. Y107 kontaktiert andere hydrophobe Aminosäuren im Inneren der Domäne und



ist höchstwahrscheinlich essentiell für die strukturelle Integrität der β -grasp-Domäne. Der Austausch von Arginin 104 durch Glutaminsäure zeigte keinen Effekt auf die Rezeptorbindung, da R104 wahrscheinlich wie auch aus dem Modell ersichtlich an der

Oberfläche der Domäne lokalisiert ist und Lösungsmittelmoleküle kontaktiert. Mutation von Y112 zu Alanin beeinflusst die Bindung an gp130 nicht. Y112 befindet sich bereits in einer Verbindungsregion, welche die β -grasp-Domäne mit C-terminal liegenden Bereichen verknüpft. Anhand der Modellstruktur kann keine Aussage über eine mögliche Funktion dieses Tyrosins getroffen werden (Abbildung 21).

Das Modell der β -grasp-Domäne wird ferner durch Daten aus anderen Studien unterstützt:

- Verschiedene Punktmutationen im Bereich des sechsten FERM-Konsensusbereichs in Jak3 (zwischen den Aminosäuren 98-102 von Jak3) verhinderten die Bindung an die IL-2R γ -Kette. Eine natürlich vorkommende Mutation Y100C in Jak3 verursacht SCID im Menschen. Mutation derselben Aminosäure gegen Alanin unterband ebenfalls die

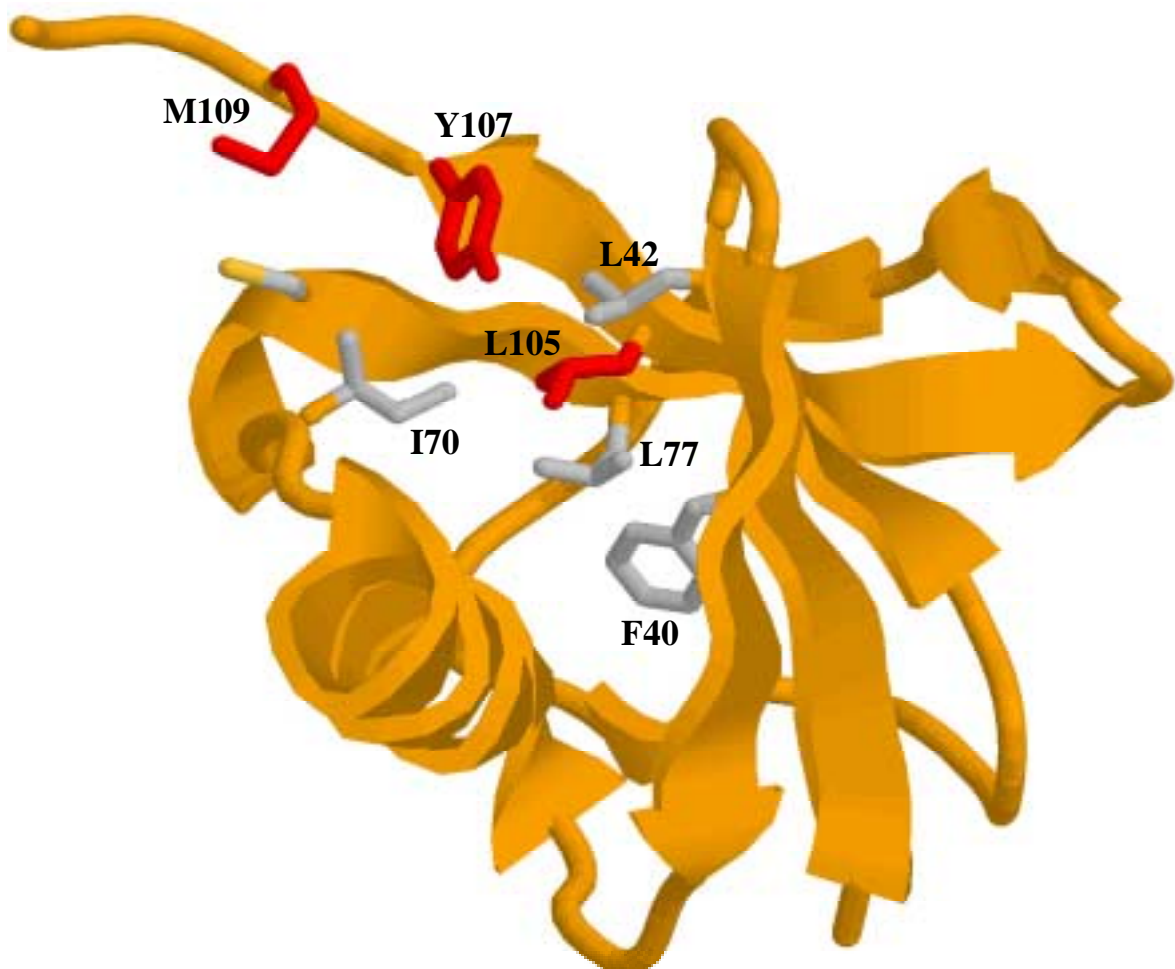


Abbildung 22: Die Aminosäuren L105, Y107 und M109 von Jak1 entsprechen L98, Y100 und I102 von Jak3 die essentiell für die Bindung an den IL-2R β sind.

Die Position der Aminosäuren L105, Y107 und M109 von Jak1 (L105, Y107 und M109; rot markierte Seitenketten) sind im Modell der Jak1- β -grasp-Domäne hervorgehoben. L105 und Y107 sind strukturell wichtige Aminosäuren in Jak1. L105 bildet hydrophobe Kontakte mit F40, L42, L77 und Y107 aus. Y107 kontaktiert L42, I70, L105 und M109, während M109 mit Y107 interagiert.

Signaltransduktion nach IL-2-Gabe, während die Mutation von Y100 zu Phenylalanin die IL-2-Signaltransduktion nicht störte [78]. Diese Daten implizieren eine strukturelle Rolle für Y100 in Jak3. Auch die Mutation von L98 und I102 zu Alanin verhinderten die Signaltransduktion nach IL-2, während die Mutation von L99 zu Alanin keinen Effekt zeigte [78]. Diese zusätzlichen Daten legen die Interpretation nahe, daß L98, Y100 und I102 in einer β -Faltblattstruktur involviert sind, und daß diese drei Aminosäuren für die Struktur wichtige hydrophobe Kontakte im Inneren der Domäne ausbilden. Diese Hypothese läßt sich anhand des β -*grasp*-Modells überprüfen. Die entsprechenden Aminosäuren in Jak1 (L105, Y107 und M109) sind tatsächlich in einem β -Faltblatt (β_6) der β -*grasp*-Domäne lokalisiert und bilden Kontakte zum hydrophoben Kern der Domäne aus (Abbildung 22). Falls die Positionen in Jak3 vergleichbar mit Jak1 sind, dürften die Mutationen von L98, Y100 und I102 die Struktur der β -*grasp*-Domäne zerstören. Damit wäre der Rückgang der Jak3-Bindung an den Rezeptor bei Mutation dieser Reste zu erklären.

- Ein Tyk2-Konstrukt, dem die N-terminalen 21 Aminosäuren fehlen, band noch an den IFNAR1, während eine Deletion der 28 N-terminalen Reste zum Verlust der Bindung an den Rezeptor führte [79]. Ab Glycin 26 beginnt in Tyk2 der erste konservierte FERM-Konsensusbereich (Abbildung 20). Deletion der 28 N-terminalen Aminosäuren von Tyk2

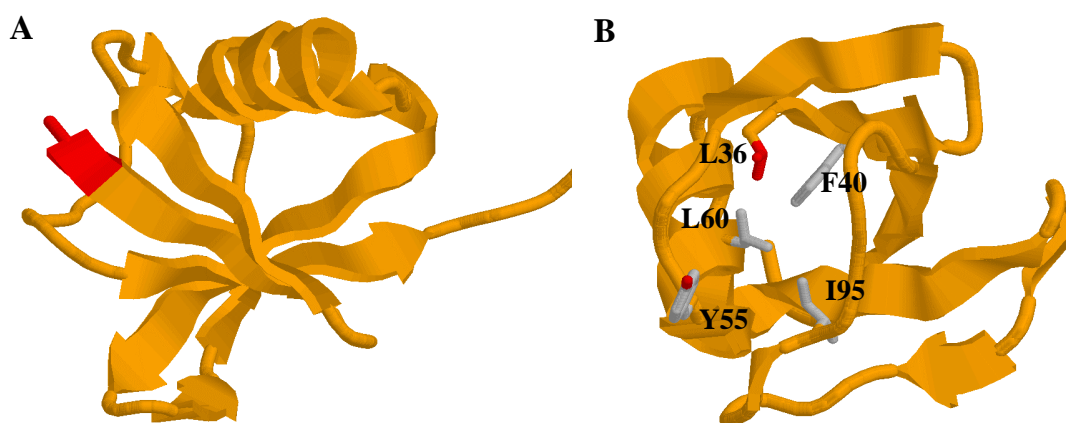


Abbildung 22: Eventueller Einfluß des N-terminus auf die Struktur der β -*grasp*-Domäne.

(A) Der N-Terminus der β -*grasp*-Domäne (β_1) (rot dargestellt) bildet Kontakte zu den benachbarten β -Faltblattsträngen (β_2 und β_6) aus. (B) L36 (rot dargestellt) von Jak1 verschließt im Modell eine hydrophobe Tasche, die von den Aminosäuren F40, Y55, L60 und I95 ausgebildet wird.

könnte die strukturelle Integrität der β -*grasp*-Domäne gefährden. Das Modell für Jak1 ermöglicht eine Prüfung dieser Hypothese. Aus dem Modell von Jak1 ist zu erkennen, daß

der N-Terminus der Domäne (Abbildung 23A: rot markierter Bereich) einen β -Faltblattstrang ausbildet, welcher zwischen einem weiteren Strang (β_2) und einer *loop*-Region vor einem Strang (β_6) lokalisiert ist. Der Zusammenhalt dieser Struktur wird damit auch durch hydrophobe Aminosäuren aus der N-terminalen β -Faltblattstruktur gesichert. Durch die Deletion der zwei N-terminalen Aminosäuren im β -*grasp*-Jak1-Modell wird eine hydrophobe Tasche freigelegt (F40, L60, Y55, I95), welche normalerweise von L36 abgedeckt wird (Abbildung 23B). Weitere N-terminale Aminosäuren sollten außerdem zu diesem Zweck noch nötig sein. Das Fehlen dieser Aminosäuren könnte einen Einfluß auf die strukturelle Integrität der Domäne haben.

Zusätzlich gibt es Hinweise, daß für die Bindung oder die strukturelle Integrität noch Bereiche C-terminal zur β -*grasp*-Domäne eine Rolle spielen sollten. Jak3/Jak1-Chimären, welche die N-terminalen 109 Aminosäuren von Jak3 besitzen, können trotz eigentlich intakter β -*grasp*-Domäne nicht an den IL-2R γ binden [78]. Bemerkenswerterweise liegt genau am Übergang der Chimäre von Jak3 zu Jak1 das W116 von Jak1, welches die Bindung an gp130 als Doppelmutation Y81A/W116A unterdrücken konnte. Damit scheint W116, obwohl es nicht mehr innerhalb der β -*grasp*-Domäne lokalisiert ist, für eine Bindung an gp130 erforderlich zu sein. Es wäre also denkbar, daß dieser Bereich eine Interaktion mit der β -*grasp*-Domäne eingeht und somit eine übergeordnete Struktur ausbildet die für eine Rezeptorbindung erforderlich ist. Damit wäre dieser Bereich extrem anfällig für Mutationen und würde die Ergebnisse von Cacalano et al. erklären [78].

Alle anderen getesteten Mutationen, welche Regionen C-terminal zu W116 betrafen (K133E, L158A/F159A, L166A/V167A), zeigten keinen Effekt bezüglich der Bindung des chimären IL-5R β /gp130-Konstruktes.

4.3 Untersuchungen zur Kinaseaktivität von Jak1

Konstitutiv aktive Janus-Kinasen sind bei verschiedenen malignen Transformationen beschrieben worden: In HTLV-I-transformierten humanen T-Zellen und murinen *v-abl*-transformierten Zellen ließen sich konstitutiv aktivierte Jak1 und Jak3 nachweisen [97, 98]. In Patienten mit akuter lymphoblastischer Leukämie (ALL) ist Jak2 aktiv [99]. Ein TEL-Jak2-Fusionsprotein, welches durch chromosomale Translokation entsteht, ist ebenfalls stimulationsunabhängig aktiv und führt zu lymphoiden und myeloiden Leukämien [100]. Konstitutiv aktive Jak3 wurde in T-Zellen aus fortgeschrittenen Lymphomen (*anaplastic*

large T-cell lymphoma (ALCL), *Sezary syndrome*) nachgewiesen [101]. Das Latente Membranprotein 1 (LMP1) des Epstein-Barr-Virus, welches für die Immortalisierung von B-Zellen nötig ist, wirkt wie ein permanent aktivierter Rezeptor der TNF-Rezeptor-Familie und führt zur Aktivierung von Jak3 und von STAT-Faktoren [102]. Es ist deshalb wichtig, den Aktivierungsmechanismus der Janus-Kinasen zu verstehen oder deren Aktivierung wenigstens verfolgen zu können.

Um die Aktivierung der Jaks zu verfolgen, wurden Kinase-*assays* entwickelt. Jak1, Jak2 und Tyk2 wurden erfolgreich in Sf158-Insektenzellen exprimiert und waren - höchstwahrscheinlich bedingt durch die hohe intrazelluläre Jak-Konzentration- konstitutiv phosphoryliert. Die Kinaseaktivität stieg mit der Expressionsdauer und somit mit dem Expressionsspiegel der Jaks an. Die Kinaseaktivität von Jak1 korrelierte ebenfalls mit dem im Western-Blot gemessenen Phosphorylierungszustand. Die Phosphorylierung ist also zumindest für Jak1 mit der Aktivierung gleichzusetzen. Zu der für Jak3 diskutierten Hemmung durch Phosphorylierung [56] kam es bei in Insektenzellen exprimierter Jak1 nicht. Diese Janus-Kinasen sind also aktiviert und eignen sich zur Untersuchung der Kinaseaktivität. Das System kann in Zukunft genutzt werden, um große Mengen Jaks zu exprimieren und diese zu reinigen. Liegen die aktivierten Jaks als aufgereinigte Proteine vor, können Untersuchungen zur Substratspezifität unternommen werden.

Voruntersuchungen zur Substratspezifität fielen vielversprechend aus. Es wurde ein nichtradioaktiver *in-vitro*-Kinase-*assay* für Jak1 entwickelt. Die Phosphorylierung eines biotinylierten Peptids (Y966 aus Jak2) konnte durch Fluoreszenz-aktivierten Nachweis im ELISA gemessen werden. Dies erlaubt weitergehende Studien zur Substratspezifität der Jaks mit weiteren Peptiden. Ziel ist es, diese Untersuchungen mit gereinigten Jaks durchzuführen.

5 Ausblick

5.1 Fragestellungen aus der gp130-Mutagenese

Die gp130-Mutagenesedaten, die in der vorliegenden Arbeit vorgestellt wurden, zeigen die Beteiligung eines großen Teils des membranproximalen Bereiches von gp130 an der Jak-Bindung und -Aktivierung. Erstmals konnte für gp130 nachgewiesen werden, daß die Fähigkeit Jak1 zu binden nicht unbedingt die Fähigkeit Jaks zu aktivieren, miteinschließt. Vielmehr scheinen bestimmte Rezeptorbereiche auch für eine korrekte Aktivierung der Jaks notwendig zu sein. Trotz der neuen Daten fällt eine Interpretation schwer. Leider gibt es praktisch keine Daten bezüglich der Struktur der zytoplasmatischen Bereiche von Zytokinrezeptoren [103]. Deshalb kann derzeit nicht entschieden werden, ob Mutationen, welche die Bindung von Jaks verhindern, tatsächlich eine Aminosäure betreffen, welche direkt die Jaks kontaktiert, oder ob eine Struktur zerstört wird, die für die Jak-Bindung notwendig ist. Einer weiterführenden Mutagenese des membranproximalen Bereiches sollten deshalb Strukturdaten oder eine Modellvorstellung zugrunde liegen. Dann könnten die eigentlich interessanten Fragen beantwortet werden:

- Wie ist die Spezifität der Jak-Bindung am gp130 determiniert?
- Wie unterscheidet sich gp130 diesbezüglich von anderen Rezeptoren, welche spezifisch nur eine Janus Kinase rekrutieren?

Unbedingt zu klären bleibt die Frage nach der Aktivierbarkeit von Jak1 durch die W652-Mutante. Es ist nicht klar, ob die Jaks an diesen mutierten Rezeptor nicht aktiviert werden können, oder ob die zwar aktivierte Kinase, falsch ausgerichtet ist und dadurch ihre Substrate (Rezeptor, STATs) nicht phosphorylieren kann.

Das Konstrukt gp130W666A kann auf seine Wirkung als potentiell dominant-negativ wirkender Rezeptor hin getestet werden. Hierzu soll es in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe Müller-Newen in unterschiedlichen Zellsystemen getestet werden.

Verschiedene Klone der Ba/F3-Transfektanten, welche die Konstrukte gp130F676A und gp130 Δ Box2 exprimieren, zeigten ein unterschiedliches Verhalten bezüglich Proliferation und STAT3-Aktivierung nach IL-6 Stimulation, so daß noch keine Schlüsse betreffend die Effekte dieser Mutation gezogen werden können. Hier ist eine Untersuchung weiterer Klone notwendig.

Da die Phosphorylierung von Y683 nicht notwendig ist für die Vermittlung der Jak/STAT-Signaltransduktion, könnte Y683 auch eine strukturelle Rolle spielen. Der Austausch von Tyrosin 683 durch Alanin oder durch Glycin könnte -durch eine eventuelle Zerstörung der gp130-Struktur- stärkere Auswirkungen auf die Signaltransduktion haben.

5.2 Perspektiven der Jak-Forschung

Aus der hier präsentierten Jak1-Mutagenese und der Forschung anderer Gruppen ergeben sich interessante Ansätze zur Untersuchung der Jak/Protein-Interaktionen und der Jak-Kinasespezifität bzw. -Regulierung.

5.2.1 Die Jak1/Rezeptor-Interaktion

Bezüglich der Jak1/gp130-Interaktionsstudien, sollen -basierend auf dem Modell des β -*grasp*-folds von Dr. A. Grötzinger- weitere Mutanten hergestellt werden, um das Modell zu unterstützen. Am *loop* 4 werden weitere Aminosäureaustausche und eine Deletion vorgenommen. Dieser exponiert liegende *loop* ist besonders interessant, da in diesem Bereich die mutierten Jak1 L80A, L80A/Y81A und Y81A/D82A eine verringerte Bindung an gp130 zeigten. Deshalb werden zusätzlich die Aminosäuren YDES (81-84) deletiert, E83 wird zu Lysin und Lysin 86 zu Glutaminsäure mutiert. In Zukunft könnten auch Mutationen in andere *loops* der Jak1 β -*grasp*-Domäne eingeführt werden. Hierfür würde sich besonders der *loop* 1 anbieten, da er in direkter Nachbarschaft zum *loop* 4 liegt und eine geringe phylogenetische Konservierung innerhalb der Jak-Familie aufweist.

Jak1-Konstrukte mit den Mutationen Y268A und Y281A im 12. FERM-Konsensusbereich, liegen schon vor und sollen nun auch bezüglich der Rezeptorbindung getestet werden.

Folgende Fragen bleiben zu klären:

Welchen Einfluß haben die Mutationen in Jak1 auf die Bindung anderer Zytokinrezeptoren?

Jak1 bindet an die signaltransduzierenden Rezeptoruntereinheiten (gp130, LIFR, OSMR) der IL-6-Typ-Zytokine, an die gemeinsame Rezeptorkette der β c für IL-3, IL-5 und GM-CSF, an die Rezeptoruntereinheiten IL-2R β , IL-4R α , IL-13 α und an Rezeptoren für Klasse-II-Zytokine (IFN α R2, IFN γ R). Zytokinrezeptoren, die Jak1 binden, zeigen jedoch keine hohe Sequenzhomologie in ihren membranproximalen Bereichen. Damit stellt sich die Frage, ob die verschiedenen Mutationen in der Jak1 unterschiedliche Effekte auf die Bindung einzelner Rezeptoren haben. Im Institut stehen der IL-5R β und chimäre Rezeptoren zu Verfügung,

welche den extrazellulären Teil der IL-5R β -Kette und die zytoplasmatischen Bereiche von LIFR, OSMR und IFN α R2 (von J.Tavernier, Gent) besitzen. Die Kopräzipitation mit Jak1-Mutanten sollte auch für diese Rezeptorketten getestet werden. Ein Expressionsvektor für den IL-4R sowie ein präzipitierender monoklonaler Antikörper wurden von K. Friedrich (Jena) zur Verfügung gestellt und der IFN γ R kann im Zuge einer Kooperation mit I. M. Kerr (London) untersucht werden.

Welchen Einfluß haben die Jak1-Mutanten auf die Oberflächenexpression des OSM-Rezeptors?

Studien in unserem Labor haben gezeigt, daß der OSMR bei Jak1- und Jak2-Überexpression verstärkt an der Zelloberfläche präsentiert wird. In ähnlicher Weise wurde beschrieben, daß Tyk2 notwendig für die Aufrechterhaltung der IFNAR-Expressionsspiegel ist [79]. Derzeit wird vermutet, dass durch die Bindung der Jaks eventuell ein ER-Retentionssignal in seiner Funktionalität gestört wird. Dadurch kann der Rezeptor verstärkt an die Oberfläche gelangen. Die OSMR-Expression an der Zelloberfläche sollte daher ein weiterer *Read-out* für die Funktion der Jak1-Mutanten sein. In der Tat wird die Oberflächenexpression vom OSMR nicht hochreguliert wenn man Jak1-L80A/Y81A überexprimiert, welche an gp130 nicht mehr bindet (Simone Radtke; Daten nicht gezeigt). Dies ist ein Hinweis, daß solche Mutanten ebenfalls den OSMR nicht mehr binden. Diese Studien werden in Kooperation mit Simone Radtke durchgeführt.

Welche Bereiche der Jak1, Jak2 und Tyk2 determinieren die Bindungsspezifität an gp130?

Über die Regionen, welche die Bindungsspezifität der verschiedenen Jaks an Zytokinrezeptoren vermitteln, ist wenig bekannt. Die Spezifität der Bindung der einzelnen Jaks kann nur auf Bereichen beruhen, welche sich durch fehlende Sequenzhomologie auszeichnen. Wie oben beschrieben, ist der *loop 4* der β -*grasp*-Domäne von Jak1 an der Bindung von gp130 beteiligt. Außerdem gibt es im *loop 4* signifikante Sequenzunterschiede zwischen den Mitgliedern der Jak-Familie. Auf der Grundlage der Modelle des β -*grasp*-*fold*s der verschiedenen Jaks könnten die verschiedenen *loop 4*-Regionen der Jaks gezielt in die Struktur von anderen Jaks überführt werden. Für solche Studien am gp130 bietet es sich an, den *loop 4* aus Jak3, die nicht an gp130 binden sollte, durch die entsprechenden Sequenzen aus Jak1, Jak2 und Tyk2 zu ersetzen. Die Bindung der so veränderten Jak3 an gp130 könnte nun untersucht werden. Reicht der Austausch eines *loops* nicht aus, um die Bindung der mutierten Jak3 an gp130 zu vermitteln, so können weitere *loops* ausgetauscht werden. Hierfür

bieten sich die dem *loop* 4 benachbarten *loops* 1 und 5 an. Besonders *loop* 1 zeigt größere Unterschiede zwischen den Jak-Familienmitgliedern. So können die minimal nötigen Bereiche der Jak1 determiniert werden, welche die Bindung an gp130 vermitteln.

5.2.2 Einfluß verschiedener potentieller modularer Domänen in Jaks

Das derzeit spärliche Wissen über die Struktur-Funktionsbeziehungen der Janus-Kinasen steht in flagrantem Gegensatz zur Wichtigkeit dieser Kinasen in der Zytokinsignaltransduktion. Daher besteht zur Zeit reges Interesse, den Initiationsschritt der zytoplasmatischen Zytokinsignaltransduktion, die Aktivierung und Regulation der Janus-Kinasen, zu verstehen. Die Vorhersagen des strukturellen Aufbaus der Janus-Kinasen entwickeln sich stetig weiter. So werden im Bereich des Jak-N-Terminus außer der β -*grasp*-Domäne noch eine SH2-Domäne und eine PH-Domäne anhand von Sequenzhomologien vorhergesagt (Abbildung 3). Die β -*grasp*-Domäne ist -wie in dieser Arbeit gezeigt- an der Rezeptor-bindung beteiligt. Die möglichen Funktionen der anderen potentiellen Domänen sind unbekannt.

Welchen Einfluß hat die putative SH2-Domäne auf die Signaltransduktion?

SH2-Domänen können nach Mutation des für die Phosphotyrosinbindung wichtigen Arginins zu Lysin Phosphotyrosine nicht mehr binden. Eine Jak1 mit derart veränderter putativer SH2-Domäne, Jak1R466K, wurde auch hergestellt, zeigte jedoch keinen Effekt in Bezug auf die gp130-Bindung (Daten nicht gezeigt). Besonders interessant wäre es zu untersuchen, ob unter Umständen SOCS-Proteine mit Phosphotyrosinen an dieser putativen SH2-Domäne binden können. Diese Jak-Inhibitoren werden -neuesten Ergebnissen zufolge- in ihren C-terminalen Bereichen Tyrosin-phosphoryliert. In Zusammenarbeit mit Serge Haan wird zur Zeit getestet, ob Jak1 mit mutierter SH2-Domäne SOCS-Proteine weniger stark bindet als Wild-Typ-Jak1. Diese Mutante könnte in Jak1-defizienten Fibroblasten exprimiert werden, um mögliche Effekte auf die Signaltransduktion und die Regulierung der Kinaseaktivität zu untersuchen.

Welche Funktion hat die vermeintliche PH-Domäne in Jak1?

Es ist nicht bekannt, ob die Jaks membranverankerte Proteine sind. Eine Myristylierung, Palmitoylierung oder Farnesylierung von Jaks wurde noch nicht nachgewiesen. Es gibt auch keine überzeugende Übereinstimmung zu Myristylierungshomologie-Sequenzen innerhalb des extremen N-Terminus der Jaks. Auch PH-Domänen werden mit der Membranlokalisierung von Proteinen in Verbindung gebracht. Sie können aber auch die Wechselwirkung mit anderen Proteinen vermitteln. Eine Deletion der vermeintlichen PH-Domäne aus Jaks könnte die Membranlokalisation der Jaks stören und die Signaltransduktion

unterdrücken. Es wäre interessant, solche PH-Deletionsmutanten, als GFP-Fusionsproteine in Zellen zu exprimieren und ihre Lokalisation im Fluoreszenzmikroskop im Vergleich zum Wild-Typ-Konstrukt zu verfolgen. Auch könnte eine PH-Deletionsmutante, die Jak1- und Jak2-abhängige Oberflächenexpression des OSM-Rezeptors verhindern, falls die Membranlokalisation essentiell für die Assoziation der Jaks an Zytokinrezeptoren ist.

5.2.3 Untersuchungen zur Substratspezifität von Janus-Kinasen.

Über die Spezifität der Kinasedomänen der verschiedenen Jaks ist nur wenig bekannt. Studien mit isolierten Kinasedomänen von Jak1 und Jak2 schreiben Jak2 eine ausgeprägtere Fähigkeit zur Phosphorylierung verschiedener Tyrosinreste von gp130, STAT1 und STAT3 zu [104]. Studien mit intakten, in Zellen aktivierten Jaks gibt es bisher kaum. Besonders im IL-6-System, in dem Jak1, Jak2 und Tyk2 aktiviert werden können, stellt sich die Frage, ob die verschiedenen Jaks eine Substratspezifität besitzen.

Mit Hilfe des nichtradioaktiven *in-vitro*-Kinase-assays für Jak1, d.h. durch Fluoreszenz-aktivierten Nachweis phosphorylierter Peptide im ELISA, kann die Substratspezifität der Jak1 untersucht werden. Es stehen hierzu eine Reihe von biotinylierten Peptiden zur Verfügung, welche freundlicherweise von der Firma Jerini synthetisiert wurden. Die Sequenzen der vorhandenen Peptide entsprechen Tyrosin-Motiven von gp130, STAT3, Jak2 und SOCS3. Es handelt sich hierbei um alle sechs Tyrosin-Motive des gp130 (Y683, Y759, Y767, Y814, Y905, Y915), um das für die STAT-Dimerisierung relevante Tyrosin-Motiv von STAT3 (Y705), um das Y966 aus Jak2, an welches PLC- γ phosphorylierungsabhängig bindet, um Y1007/Y1008 aus dem Aktivierungs-loop der Kinasedomäne von Jak2 und um die Tyrosine 156, 157 und 159 aus SOCS3. Zusätzlich könnten in Zukunft Peptide mit den Tyrosinen 269, 270 und 317 von Shc oder andere Motive (z.B.: aus SOCS oder SHP-2) in den Kinase-assay eingesetzt werden. Als Negativkontrolle steht ein Peptid zur Verfügung, welches die Aminosäuren des Peptids mit Y767 von gp130 in veränderter Reihenfolge enthält. Da im IL-6-System auch Jak2 und Tyk2 aktiviert werden können und die Hierarchie und Bedeutung der einzelnen Jaks für dieses Signaltransduktionsystem nicht klar ist, könnten die Studien auch auf die anderen Mitglieder der Jak-Familie ausgeweitet werden.

Zusätzlich wäre eine Weiterentwicklung des Kinaseaktivität-assays wichtig. Optimalerweise sollte der assay so funktionieren, daß die Peptide auf einer ELISA-Platte immobilisiert und anschließend von gereinigten Jaks phosphoryliert werden. Hierfür sollte eine Aufreinigung der Jaks in Zukunft angestrebt werden. Dies könnte im Baculosystem mit His-getagten Jaks versucht werden. Da die Jaks, bedingt durch hohe Expressionsspiegel, konstitutiv aktiviert sind, müßten die entsprechenden Kinase-inaktiven Jaks als Negativkontrollen ebenfalls

vorliegen.

Mit diesem *assay* könnten auch Inhibitoren getestet werden.

5.2.4 Die Regulierung der Kinaseaktivität von Jak1

Der Mechanismus der Regulierung der Kinaseaktivität von zytoplasmatischen Kinasen ist mitunter sehr kompliziert, von vielen Faktoren abhängig und beschränkt sich in der Regel nicht auf Veränderungen innerhalb der Kinasedomäne sondern bezieht andere Domänen der Kinase mit ein, welche z.B. für die Substratbindung oder die Rekrutierung anderer Proteine wichtig sind [96, 105-108].

Die Rolle der Kinasedomäne

1. Der Aktivierungsmechanismus von Jak3 könnte sich fundamental von dem der anderen Familienmitglieder unterscheiden: Jak1, Jak2 und Tyk2 besitzen vor dem katalytisch wichtigen DFG-Motiv in der Aktivierungsschleife (*A-loop*) der Kinasedomäne ein Glycin, während Jak3 hier ein Alanin aufweist (Abbildung 24). Genau dieser Unterschied wurde im Fall der FGFR- (*fibroblast growth factor*)-Kinasedomäne und der IR-Kinasedomäne (Insulin-Rezeptor) für die unterschiedlichen Regulationsmechanismen, die aus den gelösten Strukturen der nicht aktivierten und der aktivierten Kinasedomäne abgeleitet wurden, verantwortlich gemacht [109]. Durch das im IR an dieser Position befindliche Glycin kann der *A-loop* eine Konformation einnehmen, die die Bindung von ATP verhindert, während im Fall des FGFR sich ein Alanin an dieser Position befindet und eine solche Konformation nicht erlaubt. Entsprechend kann ATP auch in die inhibierte FGFR-Kinasedomäne binden. Durch Mutation des Glycin 1019 zu Alanin, welche die potentielle Bindungsinhibierung von ATP aufheben würde, ließe sich eventuell gezielt eine konstitutiv aktive Jak1 herstellen. Falls ein Tyrosin (wie im Fall des Inhibitionsmechanismus der IR-Kinasedomäne) als Pseudosubstrat in das katalytische Zentrum ragt, sollte dieses phosphoryliert werden können. Falls keine Aktivierung der Kinase erfolgt, ist das ein Hinweis darauf, daß das Doppelyrosinmotiv nicht autophosphoryliert wird und daß Substrate nach Aufhebung der ATP-Bindungshemmung nicht erfolgreich mit dem *A-loop* um die Bindung an das aktive Zentrum kompetieren können. Es könnte dann nach dem Vorbild der FGFR-Kinasedomäne andere Bereiche geben, welche die Substratbindung verhindern. Die Mutation von Glycin 1019 von Jak1 sollte die strukturelle Integrität der Kinasedomäne nicht gefährden und würde mit relativ wenig Aufwand Hinweise auf den Inhibierungsmechanismus liefern. In Zukunft könnten konstitutiv aktivierte Jaks für die Behandlung von Melanomen, welche eine STAT abhängige Wachstumshemmung zeigen, eingesetzt werden.

```

IR:   HRDLAARNCMVAHDFTVKIDFGMTRDIY.ETDYRKGKGGK
FGFR: HRDLAARNVLVTEDNVMKIDDFGLARDIH.HIDYYKKTNG

Jak1: HRDLAARNVLVESEHQVKIDDFGLTKAIETDKEYYTVKDDR
Jak2: HRDLATRNILVENENRVKIDDFGLTKVLPQDKEYYKVKEPG
Tyk2: HRDLAARNVLLDNDRLVKIDDFGLAKAVPEGHEYYRVREDG
Jak3: HRDLAARNILVESEAHVKIDDFGLAKLLPLGKDYVREPG

```

Abbildung 24: Die Aminosäure vor dem katalytisch wichtigen DFG-Motiv (die durch Rotfärbung hervorgehoben ist) könnte für einen unterschiedlichen Regulationsmechanismus von Jak1, Jak2 und Tyk2 im Vergleich zu Jak3 verantwortlich sein.

Katalytisch wichtige Bereiche in der Kinasedomäne der Jaks sind blau hinterlegt. Als Vergleich sind die entsprechenden Bereiche aus der Insulin-Rezeptor(IR)- und der FGF-Rezeptor(FGFR)-Kinasedomäne dargestellt

2. Weiterhin fällt auf, daß die JH1-Domäne der Janus-Kinasen eine spezifische Insertion aufweist, welche als JSI (Janus-spezifische Insertion) bezeichnet wurde [110]. Für diese Insertion wurde eine Helixstruktur vorhergesagt, die sich in Modellen der Jak-Kinasedomäne räumlich sehr nahe am aktiven Zentrum befindet. Dieser Bereich könnte an der Substraterkennung beteiligt sein und so die Spezifität der Janus-Kinasen mitbestimmen. Diese Theorie könnte mit Hilfe des nichtradioaktiven *in-vitro*-Kinaseassays für Jaks überprüft werden. Ergeben sich aus diesen ELISA-Studien spezifische Substrate für einzelne Jaks, so könnten die JSI der Jaks untereinander ausgetauscht und im ELISA auf ihre eventuell veränderte Substratspezifität untersucht werden. Dieses Projekt würde in Kooperation mit Serge Haan durchgeführt.

Die Rolle anderer Bereiche bei der Regulierung der Kinaseaktivität

Die Mutagenese-Studien von Jak1 zeigten, daß der Phosphorylierungszustand von Mutanten die nicht mit gp130 assoziieren, gegenüber dem Wild-Typ erniedrigt ist. Die entsprechenden Mutationen könnten die Aggregation der Jaks in Lösung verhindern oder die Regulierung der Jaks beeinflussen. Phosphorylierung und Kinaseaktivität der Jak1-Mutanten sollten deshalb unbedingt untersucht werden.

Auch Deletionen der einzelnen Domänen von Jak1 (β -*grasp*, PH, SH2,) könnten Auswirkungen auf die Kinaseaktivität haben.

6 Zusammenfassung

Die gemeinsame Rezeptoruntereinheit gp130 ist für Zellantworten nach Stimulation mit IL-6-Typ-Zytokinen essentiell. Gp130 vermittelt die Signaltransduktion über konstitutiv gebundene Kinasen der Jak-Familie (Jak1, Jak2 und Tyk2). In dieser Arbeit wurde die Interaktion von Jak1 mit gp130 durch Mutagenese an beiden Molekülen untersucht.

Die Mutagenese von gp130 führte zu interessanten neuen Erkenntnissen:

- Die minimal nötige Bindungsregion von Jak1 an gp130 konnte auf die membranproximalen 68 Aminosäuren eingegrenzt werden. Anhand von Deletionsmutanten konnte gezeigt werden, daß der Bereich C-terminal zur Box2 keine Rolle für die Bindung endogener Jak1 spielt, daß die Box2 aber dennoch wichtig für diese Assoziation ist.
- Jak-Überexpression kann zu einem veränderten apparenten Bindungsverhalten der Jaks an gp130 führen.
- W666 wurde als erste Aminosäure im membranproximalen Bereich von gp130 außerhalb der Box1- und der Box2-Region identifiziert, die die Jak1-Bindung -und damit auch alle anderen Signaltransduktionsschritte- unterdrückt. Ob W666 direkt mit Jak1 interagiert, oder ob die Mutation eine eventuelle, für die Jak-Bindung relevante Struktur des zytoplasmatischen Bereiches stört, ist bisher unklar.
- Jak-Rekrutierung durch nur eine Rezeptorkette im gp130-Dimer ist nicht ausreichend, um die Signaltransduktion einzuleiten. Die Konstrukte Δ Box1, P656A/P658A und W666A wirken im IL-5-Chimären System allesamt dominant-negativ.
- Die Bindung von Jak1 ist notwendig aber nicht ausreichend für die STAT-Aktivierung. Der Effekt ist bei der Mutante W652A besonders ausgeprägt; Box1 könnte also neben der Vermittlung der Bindung noch andere wichtige Funktionen für die Jak-Aktivierung ausüben.

Weiterhin wurde die Bindung von Jak1 an gp130 untersucht, indem erstmals Aminosäureaustausche im N-Terminus der Jak1 -in konservierten Bereichen der sog. FERM-Domäne- vorgenommen wurden. Von einer potentiellen β -grasp-Domäne in Jak1 (zwischen den Aminosäuren 36 und 112) wurde von Dr. J. Grötzinger ein Strukturmodell erstellt. Die β -grasp-Domäne umfaßt exakt die Region der Konsensusbereiche 1 bis 6 der vermeintlichen FERM-Domäne in Jak1.

- Die vierte konservierte Region der potentiellen FERM-Domäne scheint eine bedeutende Rolle bei der Rezeptorbindung zu spielen. Die Jak1-Mutanten L80A, L80A/Y81A und Y81A/D82A führten zu einem Rückgang der Bindung an IL-5R β /gp130. Im β -*grasp*-Strukturmodell liegen diese Aminosäuren im Anfangsbereich einer *loop*-Region (*loop 4*), welche an der Bindung des Rezeptors beteiligt sein könnte. *loop 4* ist in der Jak-Familie nur mäßig konserviert, wie man es von einer Region erwarten würde, welche die Rezeptorbindung und damit auch die Bindungsspezifität vermittelt.
- Im Bereich der sechsten Konsensusregion der potentiellen FERM-Domäne führte nur die Mutation von Y107 zu einem kompletten Verlust der Bindung des IL-5R β /gp130-Konstruktes. Y107 kontaktiert andere hydrophobe Aminosäuren im Inneren der Domäne und ist höchstwahrscheinlich essentiell für die strukturelle Integrität der β -*grasp*-Domäne.

Schließlich wurde ein auf radioaktiver Markierung beruhender Autokinetest sowie ein auf der Phosphorylierung von biotinylierten Peptiden basierender nicht-radioaktiver Kinaseaktivitäts-ELISA für Jak1 etabliert.

7 Literaturverzeichnis

- 1 Hirano, T., Yasukawa, K., Harada, H., Taga, T., Watanabe, Y., Matsuda, T., Kashiwamura, S., Nakajima, K., Koyama, K., Iwamatsu, A. and et al. Complementary DNA for a novel human interleukin (BSF-2) that induces B lymphocytes to produce immunoglobulin, *Nature* , (1986), **324**, 73-6
- 2 Bazan, J. F. Structural design and molecular evolution of a cytokine receptor superfamily, *Proc Natl Acad Sci U S A* , (1990), **87**, 6934-8
- 3 Heinrich, P. C., Behrmann, I., Muller-Newen, G., Schaper, F. and Graeve, L. Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway, *Biochem J* , (1998), **334**, 297-314
- 4 Heinrich, P. C., Dufhues, G., Flohe, S., Horn, F., Krause, E., Krüttgen, A., Legres, L., Lenz, D., Lütticken, C., Schooltink, H., Stoyan, T., Conradt, H. S. and Rose-John, S. (1991) Interleukin-6, its hepatic receptor and the acute phase response in liver
42. Colloquium Mosbach 1991. Molecular aspects of Inflammation., Springer Verlag Berlin, Heidelberg
- 5 Tilg, H., Dinarello, C. A. and Mier, J. W. IL-6 and APPs: anti-inflammatory and immunosuppressive mediators, *Immunol Today* , (1997), **18**, 428-32
- 6 Jordan, M., Otterness, I. G., Ng, R., Gessner, A., Rollinghoff, M. and Beuscher, H. U. Neutralization of endogenous IL-6 suppresses induction of IL-1 receptor antagonist, *J Immunol* , (1995), **154**, 4081-90
- 7 Akira, S., Taga, T. and Kishimoto, T. Interleukin-6 in biology and medicine, *Adv Immunol* , (1993), **54**, 1-78
- 8 Baumann, H. and Gauldie, J. The acute phase response [see comments], *Immunol Today* , (1994), **15**, 74-80
- 9 Murakami, M., Hibi, M., Nakagawa, N., Nakagawa, T., Yasukawa, K., Yamanishi, K., Taga, T. and Kishimoto, T. IL-6-induced homodimerization of gp130 and associated activation of a tyrosine kinase, *Science* , (1993), **260**, 1808-10
- 10 Taga, T., Hibi, M., Hirata, Y., Yamasaki, K., Yasukawa, K., Matsuda, T., Hirano, T. and Kishimoto, T. Interleukin-6 triggers the association of its receptor with a possible signal transducer, gp130, *Cell* , (1989), **58**, 573-81
- 11 Mackiewicz, A., Schooltink, H., Heinrich, P. C. and Rose-John, S. Complex of soluble human IL-6-receptor/IL-6 up-regulates expression of acute-phase proteins, *J Immunol* , (1992), **149**, 2021-7
- 12 Lütticken, C., Wegenka, U. M., Yuan, J., Buschmann, J., Schindler, C., Ziemiecki, A., Harpur, A. G., Wilks, A. F., Yasukawa, K., Taga, T., Kishimoto, T., Barbieri, G., Pellegrini, S., Sendtner, M., Heinrich, P. C. and Horn, F. Association of transcription factor APRF and protein kinase Jak1 with the interleukin-6 signal transducer gp130, *Science* , (1994), **263**, 89-92
- 13 Stahl, N., Boulton, T. G., Farruggella, T., Ip, N. Y., Davis, S., Witthuhn, B. A., Quelle, F. W., Silvennoinen, O., Barbieri, G., Pellegrini, S., Ihle, J. N. and Yancopoulos, G. D. Association and activation of Jak-Tyk kinases by CNTF-LIF-OSM-IL-6 beta receptor components, *Science* , (1994), **263**, 92-5
- 14 Guschin, D., Rogers, N., Briscoe, J., Witthuhn, B., Watling, D., Horn, F., Pellegrini, S., Yasukawa, K., Heinrich, P., Stark, G. R. and et al. A major role for the protein tyrosine kinase JAK1 in the JAK/STAT signal transduction pathway in response to interleukin-6, *Embo J* , (1995), **14**, 1421-9
- 15 Rodig, S. J., Meraz, M. A., White, J. M., Lampe, P. A., Riley, J. K., Arthur, C. D., King, K. L., Sheehan, K. C., Yin, L., Pennica, D., Johnson, E. M., Jr. and Schreiber, R. D. Disruption of the Jak1 gene demonstrates obligatory and nonredundant roles of the Jaks in cytokine-induced biologic responses, *Cell* , (1998), **93**, 373-83
- 16 Jiao, H., Berrada, K., Yang, W., Tabrizi, M., Plataniias, L. C. and Yi, T. Direct association with and dephosphorylation of Jak2 kinase by the SH2-domain-containing protein tyrosine phosphatase SHP-1, *Mol Cell Biol* , (1996), **16**, 6985-92

- 17 Yin, T., Shen, R., Feng, G. S. and Yang, Y. C. Molecular characterization of specific interactions between SHP-2 phosphatase and JAK tyrosine kinases,*J Biol Chem* , (1997), **272**, 1032-7
- 18 Schaper, F., Gendo, C., Eck, M., Schmitz, J., Grimm, C., Anhuf, D., Kerr, I. M. and Heinrich, P. C. 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* , (1998), **335**, 557-65
- 19 Kim, H., Hawley, T. S., Hawley, R. G. and Baumann, H. Protein tyrosine phosphatase 2 (SHP-2) moderates signaling by gp130 but is not required for the induction of acute-phase plasma protein genes in hepatic cells,*Mol Cell Biol* , (1998), **18**, 1525-33
- 20 Shuai, K. The STAT family of proteins in cytokine signaling,*Prog Biophys Mol Biol* , (1999), **71**, 405-22
- 21 Starr, R., Willson, T. A., Viney, E. M., Murray, L. J., Rayner, J. R., Jenkins, B. J., Gonda, T. J., Alexander, W. S., Metcalf, D., Nicola, N. A. and Hilton, D. J. A family of cytokine-inducible inhibitors of signalling,*Nature* , (1997), **387**, 917-21
- 22 Endo, T. A., Masuhara, M., Yokouchi, M., Suzuki, R., Sakamoto, H., Mitsui, K., Matsumoto, A., Tanimura, S., Ohtsubo, M., Misawa, H., Miyazaki, T., Leonor, N., Taniguchi, T., Fujita, T., Kanakura, Y., Komiya, S. and Yoshimura, A. A new protein containing an SH2 domain that inhibits JAK kinases,*Nature* , (1997), **387**, 921-4
- 23 Naka, T., Narazaki, M., Hirata, M., Matsumoto, T., Minamoto, S., Aono, A., Nishimoto, N., Kajita, T., Taga, T., Yoshizaki, K., Akira, S. and Kishimoto, T. Structure and function of a new STAT-induced STAT inhibitor,*Nature* , (1997), **387**, 924-9
- 24 Sasaki, A., Yasukawa, H., Suzuki, A., Kamizono, S., Syoda, T., Kinjyo, I., Sasaki, M., Johnston, J. A. and Yoshimura, A. Cytokine-inducible SH2 protein-3 (CIS3/SOCS3) inhibits Janus tyrosine kinase by binding through the N-terminal kinase inhibitory region as well as SH2 domain,*Genes Cells* , (1999), **4**, 339-51
- 25 Yasukawa, H., Misawa, H., Sakamoto, H., Masuhara, M., Sasaki, A., Wakioka, T., Ohtsuka, S., Imaizumi, T., Matsuda, T., Ihle, J. N. and Yoshimura, A. The JAK-binding protein JAB inhibits Janus tyrosine kinase activity through binding in the activation loop,*Embo J* , (1999), **18**, 1309-20
- 26 Schmitz, J., Weissenbach, M., Haan, S., Heinrich, P. C. and Schaper, F. SOCS3 Exerts Its Inhibitory Function on Interleukin-6 Signal Transduction through the SHP2 Recruitment Site of gp130,*J Biol Chem* , (2000), **275**, 12848-12856
- 27 Cohnen, S. J., Sanden, D., Cacalano, N. A., Yoshimura, A., Mui, A., Migone, T. S. and Johnston, J. A. SOCS-3 is tyrosine phosphorylated in response to interleukin-2 and suppresses STAT5 phosphorylation and lymphocyte proliferation,*Mol Cell Biol* , (1999), **19**, 4980-8
- 28 Zhang, J. G., Farley, A., Nicholson, S. E., Willson, T. A., Zugaro, L. M., Simpson, R. J., Moritz, R. L., Cary, D., Richardson, R., Hausmann, G., Kile, B. J., Kent, S. B., Alexander, W. S., Metcalf, D., Hilton, D. J., Nicola, N. A. and Baca, M. The conserved SOCS box motif in suppressors of cytokine signaling binds to elongins B and C and may couple bound proteins to proteasomal degradation,*Proc Natl Acad Sci U S A* , (1999), **96**, 2071-6
- 29 Rui, L. and Carter-Su, C. Identification of SH2-bb β as a potent cytoplasmic activator of the tyrosine kinase Janus kinase 2,*Proc Natl Acad Sci U S A* , (1999), **96**, 7172-7
- 30 Liu, B., Liao, J., Rao, X., Kushner, S. A., Chung, C. D., Chang, D. D. and Shuai, K. Inhibition of Stat1-mediated gene activation by PIAS1,*Proc Natl Acad Sci U S A* , (1998), **95**, 10626-31
- 31 Kovanen, P. E., Junttila, I., Takaluoma, K., Saharinen, P., Valmu, L., Li, W. and Silvennoinen, O. Regulation of Jak2 tyrosine kinase by protein kinase C during macrophage differentiation of IL-3-dependent myeloid progenitor cells,*Blood* , (2000), **95**, 1626-32
- 32 Luttkicken, C., Coffey, P., Yuan, J., Schwartz, C., Caldenhoven, E., Schindler, C., Kruijjer, W., Heinrich, P. C. and Horn, F. Interleukin-6-induced serine phosphorylation of transcription factor APRF: evidence for a role in interleukin-6 target gene induction,*FEBS Lett* , (1995), **360**, 137-43

- 33 Chung, J., Uchida, E., Grammer, T. C. and Blenis, J. STAT3 serine phosphorylation by ERK-dependent and -independent pathways negatively modulates its tyrosine phosphorylation,*Mol Cell Biol* , (1997), **17**, 6508-16
- 34 Jain, N., Zhang, T., Fong, S. L., Lim, C. P. and Cao, X. Repression of Stat3 activity by activation of mitogen-activated protein kinase (MAPK),*Oncogene* , (1998), **17**, 3157-67
- 35 Ceresa, B. P., Horvath, C. M. and Pessin, J. E. Signal transducer and activator of transcription-3 serine phosphorylation by insulin is mediated by a Ras/Raf/MEK-dependent pathway,*Endocrinology* , (1997), **138**, 4131-7
- 36 Duhe, R. J., Evans, G. A., Erwin, R. A., Kirken, R. A., Cox, G. W. and Farrar, W. L. Nitric oxide and thiol redox regulation of Janus kinase activity,*Proc Natl Acad Sci U S A* , (1998), **95**, 126-31
- 37 Duhe, R. J. and Farrar, W. L. Structural and mechanistic aspects of Janus kinases: how the two-faced god wields a double-edged sword,*J Interferon Cytokine Res* , (1998), **18**, 1-15
- 38 Pellegrini, S. and Dusanter-Fourt, I. The structure, regulation and function of the Janus kinases (JAKs) and the signal transducers and activators of transcription (STATs),*Eur J Biochem* , (1997), **248**, 615-33
- 39 Ihle, J. N., Witthuhn, B. A., Quelle, F. W., Yamamoto, K., Thierfelder, W. E., Kreider, B. and Silvennoinen, O. Signaling by the cytokine receptor superfamily: JAKs and STATs,*Trends Biochem Sci* , (1994), **19**, 222-7
- 40 Leonard, W. L. and O'Shea, J. J. Jaks and Stats: biological implications,*Ann. Rev. Immunol. 1998* , (1998), **16**, 293-322
- 41 Conway, G., Margoliath, A., Wong-Madden, S., Roberts, R. J. and Gilbert, W. Jak1 kinase is required for cell migrations and anterior specification in zebrafish embryos,*Proc Natl Acad Sci U S A* , (1997), **94**, 3082-7
- 42 Binari, R. and Perrimon, N. Stripe-specific regulation of pair-rule genes by hopscotch, a putative Jak family tyrosine kinase in *Drosophila*,*Genes Dev* , (1994), **8**, 300-12
- 43 Neubauer, H., Cumano, A., Muller, M., Wu, H., Huffstadt, U. and Pfeffer, K. Jak2 deficiency defines an essential developmental checkpoint in definitive hematopoiesis,*Cell* , (1998), **93**, 397-409
- 44 Parganas, E., Wang, D., Stravopodis, D., Topham, D. J., Marine, J. C., Teglund, S., Vanin, E. F., Bodner, S., Colamonici, O. R., van Deursen, J. M., Grosveld, G. and Ihle, J. N. Jak2 is essential for signaling through a variety of cytokine receptors,*Cell* , (1998), **93**, 385-95
- 45 Macchi, P., Villa, A., Giliani, S., Sacco, M. G., Frattini, A., Porta, F., Ugazio, A. G., Johnston, J. A., Candotti, F., O'Shea, J. J. and et al. Mutations of Jak-3 gene in patients with autosomal severe combined immune deficiency (SCID),*Nature* , (1995), **377**, 65-8
- 46 Candotti, F., Oakes, S. A., Johnston, J. A., Giliani, S., Schumacher, R. F., Mella, P., Fiorini, M., Ugazio, A. G., Badolato, R., Notarangelo, L. D., Bozzi, F., Macchi, P., Strina, D., Vezzoni, P., Blaese, R. M., O'Shea, J. J. and Villa, A. Structural and functional basis for JAK3-deficient severe combined immunodeficiency,*Blood* , (1997), **90**, 3996-4003
- 47 Puck, J. M., Pepper, A. E., Henthorn, P. S., Candotti, F., Isakov, J., Whitwam, T., Conley, M. E., Fischer, R. E., Rosenblatt, H. M., Small, T. N. and Buckley, R. H. Mutation analysis of IL2RG in human X-linked severe combined immunodeficiency,*Blood* , (1997), **89**, 1968-77
- 48 Briscoe, J., Rogers, N. C., Witthuhn, B. A., Watling, D., Harpur, A. G., Wilks, A. F., Stark, G. R., Ihle, J. N. and Kerr, I. M. Kinase-negative mutants of JAK1 can sustain interferon-gamma-inducible gene expression but not an antiviral state,*Embo J* , (1996), **15**, 799-809
- 49 Zhuang, H., Patel, S. V., He, T. C., Sonstebly, S. K., Niu, Z. and Wojchowski, D. M. Inhibition of erythropoietin-induced mitogenesis by a kinase-deficient form of Jak2,*J Biol Chem* , (1994), **269**, 21411-4
- 50 Hanks, S. K., Quinn, A. M. and Hunter, T. The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains,*Science* , (1988), **241**, 42-52

- 51 Zhao, Y., Wagner, F., Frank, S. J. and Kraft, A. S. The amino-terminal portion of the JAK2 protein kinase is necessary for binding and phosphorylation of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor beta c chain,*J Biol Chem* , (1995), **270**, 13814-8
- 52 Frank, S. J., Yi, W., Zhao, Y., Goldsmith, J. F., Gilliland, G., Jiang, J., Sakai, I. and Kraft, A. S. Regions of the JAK2 tyrosine kinase required for coupling to the growth hormone receptor,*J Biol Chem* , (1995), **270**, 14776-85
- 53 Kohlhuber, F., Rogers, N. C., Watling, D., Feng, J., Guschin, D., Briscoe, J., Witthuhn, B. A., Kotenko, S. V., Pestka, S., Stark, G. R., Ihle, J. N. and Kerr, I. M. A JAK1/JAK2 chimera can sustain alpha and gamma interferon responses,*Mol Cell Biol* , (1997), **17**, 695-706
- 54 Girault, J. A., Labesse, G., Mornon, J. P. and Callebaut, I. Janus kinases and focal adhesion kinases play in the 4.1 band: a superfamily of band 4.1 domains important for cell structure and signal transduction,*Mol Med* , (1998), **4**, 751-69
- 55 Velazquez, L., Mogensen, K. E., Barbieri, G., Fellous, M., Uze, G. and Pellegrini, S. Distinct domains of the protein tyrosine kinase tyk2 required for binding of interferon-alpha/beta and for signal transduction,*J Biol Chem* , (1995), **270**, 3327-34
- 56 Chen, M., Cheng, A., Candotti, F., Zhou, Y. J., Hymel, A., Fasth, A., Notarangelo, L. D. and O'Shea, J. J. Complex effects of naturally occurring mutations in the JAK3 pseudokinase domain: evidence for interactions between the kinase and pseudokinase domains,*Mol Cell Biol* , (2000), **20**, 947-56
- 57 Sakai, I. and Kraft, A. S. The kinase domain of Jak2 mediates induction of bcl-2 and delays cell death in hematopoietic cells,*J Biol Chem* , (1997), **272**, 12350-8
- 58 Zhuang, H., Patel, S. V., He, T. C., Niu, Z. and Wojchowski, D. M. Dominant negative effects of a carboxy-truncated Jak2 mutant on Epo-induced proliferation and Jak2 activation,*Biochem Biophys Res Commun* , (1994), **204**, 278-83
- 59 Gauzzi, M. C., Velazquez, L., McKendry, R., Mogensen, K. E., Fellous, M. and Pellegrini, S. Interferon-alpha-dependent activation of Tyk2 requires phosphorylation of positive regulatory tyrosines by another kinase,*J Biol Chem* , (1996), **271**, 20494-500
- 60 Feng, J., Witthuhn, B. A., Matsuda, T., Kohlhuber, F., Kerr, I. M. and Ihle, J. N. Activation of Jak2 catalytic activity requires phosphorylation of Y1007 in the kinase activation loop,*Mol Cell Biol* , (1997), **17**, 2497-501
- 61 Liu, K. D., Gaffen, S. L., Goldsmith, M. A. and Greene, W. C. Janus kinases in interleukin-2-mediated signaling: JAK1 and JAK3 are differentially regulated by tyrosine phosphorylation,*Curr Biol* , (1997), **7**, 817-26
- 62 Zhou, Y. J., Hanson, E. P., Chen, Y. Q., Magnuson, K., Chen, M., Swann, P. G., Wange, R. L., Changelian, P. S. and O'Shea, J. J. Distinct tyrosine phosphorylation sites in JAK3 kinase domain positively and negatively regulate its enzymatic activity,*Proc Natl Acad Sci U S A* , (1997), **94**, 13850-5
- 63 Tanner, J. W., Chen, W., Young, R. L., Longmore, G. D. and Shaw, A. S. The conserved box 1 motif of cytokine receptors is required for association with JAK kinases,*J Biol Chem* , (1995), **270**, 6523-30
- 64 VanderKuur, J. A., Wang, X., Zhang, L., Campbell, G. S., Allevato, G., Billestrup, N., Norstedt, G. and Carter-Su, C. Domains of the growth hormone receptor required for association and activation of JAK2 tyrosine kinase,*J Biol Chem* , (1994), **269**, 21709-17
- 65 Zhao, Y., Wagner, F., Frank, S. J. and Kraft, A. S. The amino-terminal portion of the JAK2 protein kinase is necessary for binding and phosphorylation of the granulocyte-macrophage colony-stimulating factor receptor beta c chain,*J Biol Chem* , (1995), **270**, 13814-8
- 66 Hanissian, S. H. and Geha, R. S. Jak3 is associated with CD40 and is critical for CD40 induction of gene expression in B cells,*Immunity* , (1997), **6**, 379-87
- 67 Lebrun, J. J., Ali, S., Ullrich, A. and Kelly, P. A. Proline-rich sequence-mediated Jak2 association to the prolactin receptor is required but not sufficient for signal transduction,*J Biol Chem* , (1995), **270**, 10664-70

- 68 Fujiwara, H., Hanissian, S. H., Tsytsykova, A. and Geha, R. S. Homodimerization of the human interleukin 4 receptor alpha chain induces Cepsilon germline transcripts in B cells in the absence of the interleukin 2 receptor gamma chain,*Proc Natl Acad Sci U S A* , (1997), **94**, 5866-71
- 69 Takeshita, T., Arita, T., Higuchi, M., Asao, H., Endo, K., Kuroda, H., Tanaka, N., Murata, K., Ishii, N. and Sugamura, K. STAM, signal transducing adaptor molecule, is associated with Janus kinases and involved in signaling for cell growth and c-myc induction,*Immunity* , (1997), **6**, 449-57
- 70 Higuchi, M., Asao, H., Tanaka, N., Oda, K., Takeshita, T., Nakamura, M., Van Snick, J. and Sugamura, K. Dispensability of Jak1 tyrosine kinase for interleukin-2-induced cell growth signaling in a human T cell line,*Eur J Immunol* , (1996), **26**, 1322-7
- 71 Kishimoto, T., Akira, S., Narazaki, M. and Taga, T. Interleukin-6 family of cytokines and gp130,*Blood* , (1995), **86**, 1243-54
- 72 Zhu, M. H., Berry, J. A., Russell, S. M. and Leonard, W. J. Delineation of the regions of interleukin-2 (IL-2) receptor beta chain important for association of Jak1 and Jak3. Jak1-independent functional recruitment of Jak3 to Il-2Rbeta,*J Biol Chem* , (1998), **273**, 10719-25
- 73 Miura, O., Cleveland, J. L. and Ihle, J. N. Inactivation of erythropoietin receptor function by point mutations in a region having homology with other cytokine receptors,*Mol Cell Biol* , (1993), **13**, 1788-95
- 74 Witthuhn, B. A., Quelle, F. W., Silvennoinen, O., Yi, T., Tang, B., Miura, O. and Ihle, J. N. JAK2 associates with the erythropoietin receptor and is tyrosine phosphorylated and activated following stimulation with erythropoietin,*Cell* , (1993), **74**, 227-36
- 75 Liu, K. D., Lai, S. Y., Goldsmith, M. A. and Greene, W. C. Identification of a variable region within the cytoplasmic tail of the IL-2 receptor beta chain that is required for growth signal transduction,*J Biol Chem* , (1995), **270**, 22176-81
- 76 Dorsch, M., Danial, N. N., Rothman, P. B. and Goff, S. P. A thrombopoietin receptor mutant deficient in Jak-STAT activation mediates proliferation but not differentiation in UT-7 cells,*Blood* , (1999), **94**, 2676-85
- 77 Chen, M., Cheng, A., Chen, Y. Q., Hymel, A., Hanson, E. P., Kimmel, L., Minami, Y., Taniguchi, T., Changelian, P. S. and O'Shea, J. J. 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* , (1997), **94**, 6910-5
- 78 Cacalano, N. A., Migone, T. S., Bazan, F., Hanson, E. P., Chen, M., Candotti, F., O'Shea, J. J. and Johnston, J. A. Autosomal SCID caused by a point mutation in the N-terminus of Jak3: mapping of the Jak3-receptor interaction domain,*Embo J* , (1999), **18**, 1549-58
- 79 Richter, M. F., Dumenil, G., Uze, G., Fellous, M. and Pellegrini, S. Specific contribution of Tyk2 JH regions to the binding and the expression of the interferon alpha/beta receptor component IFNAR1,*J Biol Chem* , (1998), **273**, 24723-9
- 80 Arcone, R., Pucci, P., Zappacosta, F., Fontaine, V., Malorni, A., Marino, G. and Ciliberto, G. Single-step purification and structural characterization of human interleukin-6 produced in Escherichia coli from a T7 RNA polymerase expression vector,*Eur J Biochem* , (1991), **198**, 541-7
- 81 Weiergraber, O., Hemmann, U., Kuster, A., Muller-Newen, G., Schneider, J., Rose-John, S., Kurschat, P., Brakenhoff, J. P., Hart, M. H., Stabel, S. and et al. Soluble human interleukin-6 receptor. Expression in insect cells, purification and characterization,*Eur J Biochem* , (1995), **234**, 661-9
- 82 Sambrook, Fritsch and Maniatis. (1989) Molecular cloning: A laboratory manual; Cold spring harbour, USA
- 83 U.Horsten. Identifizierung einer Region in Signaltransduktor gp130 für die Interaktion mit Interleukin-6 (IL-6) im ternären IL-6/IL-6-Rezeptor/gp130-Komplex,*Dissertation RWTH-Aachen* , (1997),
- 84 Andrews, N. C. and Faller, D. A rapid micropreparation technique for extraction of DNA-binding,*Nucleic acids reasearch* , (1991), **19**, 2499-2500

- 85 J.Sasse. Struktur/Funktionsanalysen am Interleukin-6-regulierten Transkriptionsfaktor STAT3, *Verlag Mainz*, (1997),
- 86 Narazaki, M., Witthuhn, B. A., Yoshida, K., Silvennoinen, O., Yasukawa, K., Ihle, J. N., Kishimoto, T. and Taga, T. Activation of JAK2 kinase mediated by the interleukin 6 signal transducer gp130, *Proc Natl Acad Sci U S A*, (1994), **91**, 2285-9
- 87 Murakami, M., Narazaki, M., Hibi, M., Yawata, H., Yasukawa, K., Hamaguchi, M., Taga, T. and Kishimoto, T. Critical cytoplasmic region of the interleukin 6 signal transducer gp130 is conserved in the cytokine receptor family, *Proc Natl Acad Sci U S A*, (1991), **88**, 11349-53
- 88 Schmitz, J., Dahmen, H., Grimm, C., Gendo, C., G, M. I.-N., Heinrich, P. C. and Schaper, F. The Cytoplasmic Tyrosine Motifs in Full-Length Glycoprotein 130 Have Different Roles in IL-6 Signal Transduction, *J Immunol*, (2000), **164**, 848-854
- 89 Barge, R. M., de Koning, J. P., Pouwels, K., Dong, F., Lowenberg, B. and Touw, I. P. 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*, (1996), **87**, 2148-53
- 90 Watowich, S. S., Liu, K. D., Xie, X., Lai, S. Y., Mikami, A., Longmore, G. D. and Goldsmith, M. A. Oligomerization and scaffolding functions of the erythropoietin receptor cytoplasmic tail, *J Biol Chem*, (1999), **274**, 5415-21
- 91 Miura, O., Nakamura, N., Quelle, F. W., Witthuhn, B. A., Ihle, J. N. and Aoki, N. Erythropoietin induces association of the JAK2 protein tyrosine kinase with the erythropoietin receptor in vivo, *Blood*, (1994), **84**, 1501-7
- 92 Goldsmith, M. A., Xu, W., Amaral, M. C., Kuczek, E. S. and Greene, W. C. The cytoplasmic domain of the interleukin-2 receptor beta chain contains both unique and functionally redundant signal transduction elements, *J Biol Chem*, (1994), **269**, 14698-704
- 93 Behrmann, I., Janzen, C., Gerhartz, C., Schmitz-Van de Leur, H., Hermanns, H., Heesel, B., Graeve, L., Horn, F., Tavernier, J. and Heinrich, P. C. A single STAT recruitment module in a chimeric cytokine receptor complex is sufficient for STAT activation, *J Biol Chem*, (1997), **272**, 5269-74
- 94 Hermanns, H. M., Radtke, S., Haan, C., Schmitz-Van de Leur, H., Tavernier, J., Heinrich, P. C. and Behrmann, I. Contributions of leukemia inhibitory factor receptor and oncostatin M receptor to signal transduction in heterodimeric complexes with glycoprotein 130, *J Immunol*, (1999), **163**, 6651-8
- 95 Cull, V., Tilbrook, P. A., Adenan, A. S., Chappell, D., Ingle, E., Sarna, M. K., Palmer, T. N., Watowich, S. S. and Klinken, S. P. Dominant action of mutated erythropoietin receptors on differentiation in vitro and erythroleukemia development in vivo, *Oncogene*, (2000), **19**, 953-60
- 96 Sicheri, F., Moarefi, I. and Kuriyan, J. Crystal structure of the Src family tyrosine kinase Hck [see comments], *Nature*, (1997), **385**, 602-9
- 97 Danial, N. N., Pernis, A. and Rothman, P. B. Jak-STAT signaling induced by the v-abl oncogene, *Science*, (1995), **269**, 1875-7
- 98 Migone, T. S., Lin, J. X., Cereseto, A., Mulloy, J. C., O'Shea, J. J., Franchini, G. and Leonard, W. J. Constitutively activated Jak-STAT pathway in T cells transformed with HTLV-I, *Science*, (1995), **269**, 79-81
- 99 Meydan, N., Grunberger, T., Dadi, H., Shahar, M., Arpaia, E., Lapidot, Z., Leeder, J. S., Freedman, M., Cohen, A., Gazit, A., Levitzki, A. and Roifman, C. M. Inhibition of acute lymphoblastic leukaemia by a Jak-2 inhibitor, *Nature*, (1996), **379**, 645-8
- 100 Peeters, P., Raynaud, S. D., Cools, J., Wlodarska, I., Grosgeorge, J., Philip, P., Monpoux, F., Van Rompaey, L., Baens, M., Van den Berghe, H. and Marynen, P. Fusion of TEL, the ETS-variant gene 6 (ETV6), to the receptor-associated kinase JAK2 as a result of t(9;12) in a lymphoid and t(9;15;12) in a myeloid leukemia, *Blood*, (1997), **90**, 2535-40

-
- 101 Zhang, Q., Nowak, I., Vonderheid, E. C., Rook, A. H., Kadin, M. E., Nowell, P. C., Shaw, L. M. and Wasik, M. A. Activation of Jak/STAT proteins involved in signal transduction pathway mediated by receptor for interleukin 2 in malignant T lymphocytes derived from cutaneous anaplastic large T-cell lymphoma and Sezary syndrome,*Proc Natl Acad Sci U S A* , (1996), **93**, 9148-53
- 102 Gires, O., Kohlhuber, F., Kilger, E., Baumann, M., Kieser, A., Kaiser, C., Zeidler, R., Scheffer, B., Ueffing, M. and Hammerschmidt, W. Latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus interacts with JAK3 and activates STAT proteins,*Embo J* , (1999), **18**, 3064-73
- 103 Subtil, A., Delepierre, M. and Dautry-Varsat, A. An alpha-helical signal in the cytosolic domain of the interleukin 2 receptor beta chain mediates sorting towards degradation after endocytosis,*J Cell Biol* , (1997), **136**, 583-95
- 104 Saltzman, A., Stone, M., Franks, C., Searfoss, G., Munro, R., Jaye, M. and Ivashchenko, Y. Cloning and characterization of human Jak-2 kinase: high mRNA expression in immune cells and muscle tissue,*Biochem Biophys Res Commun* , (1998), **246**, 627-33
- 105 Moarefi, I., LaFevre-Bernt, M., Sicheri, F., Huse, M., Lee, C. H., Kuriyan, J. and Miller, W. T. Activation of the Src-family tyrosine kinase Hck by SH3 domain displacement [see comments],*Nature* , (1997), **385**, 650-3
- 106 LaFevre-Bernt, M., Sicheri, F., Pico, A., Porter, M., Kuriyan, J. and Miller, W. T. Intramolecular regulatory interactions in the Src family kinase Hck probed by mutagenesis of a conserved tryptophan residue,*J Biol Chem* , (1998), **273**, 32129-34
- 107 Andreotti, A. H., Bunnell, S. C., Feng, S., Berg, L. J. and Schreiber, S. L. Regulatory intramolecular association in a tyrosine kinase of the Tec family,*Nature* , (1997), **385**, 93-7
- 108 Visco, C., Magistrelli, G., Bosotti, R., Perego, R., Rusconi, L., Toma, S., Zamai, M., Acuto, O. and Isacchi, A. Activation of Zap-70 tyrosine kinase due to a structural rearrangement induced by tyrosine phosphorylation and/or ITAM binding,*Biochemistry* , (2000), **39**, 2784-91
- 109 Hubbard, S. R. Structural analysis of receptor tyrosine kinases,*Prog Biophys Mol Biol* , (1999), **71**, 343-58
- 110 Haan, S. Struktur-/Funktionsuntersuchungen zu den SH2-Domänen der Signalmoleküle STAT3 und SOCS3,*Dissertation RWTH-Aachen* , (2000),

Herrn Prof. Dr. P. C. Heinrich möchte ich für die Aufnahme in seinem Labor, die hervorragenden Arbeitsbedingungen und sein stetes Interesse am Fortgang meiner Arbeit danken.

Herrn Prof. Dr. D. Enders gilt Dank für seine Bereitschaft das Korreferat dieser Arbeit zu übernehmen.

Dr. Iris Behrmann danke ich für die Aufnahme in ihrer Arbeitsgruppe, ihre ständige Ansprechbarkeit und Diskussionsbereitschaft.

Danken möchte ich Herrn Priv. Doz. Dr. Joachim Grötzinger für die Entwicklung des Modells der β -grasp-Domäne, welches die Mutagenesedaten der Jak1 interpretierbar machte.

Besonderer Dank gilt Iris Behrmann, Heike Hermanns, Simone Radtke und Serge Haan für die unzähligen „brainstorming“ Sitzungen, durch die wir es geschafft haben den hartnäckigen Widerstand der Janus Kinasen –bezüglich der Generierung publizierungswürdiger Daten- zu brechen. Die vielschichtigen, mehrdeutigen und teilweise skurilen fachlichen sowie außerfachlichen Diskussionen mit dem Duo Heike, Simone, Fattima und allen anderen Insassen aus Labor 13 waren der Laboratmosphäre stets förderlich.

Herzlicher Dank gilt Hildegard Schmitz-Van de Leur, „Marlies“ Kauffmann und Bettina Breuer für die Hilfsbereitschaft bei der Durchführung so mancher EMSAs und MAXIs. Besonders danke ich Hildegard für ihren Einsatz beim Klonieren und Sequenzieren etlicher Konstrukte. Andrea Küster danke ich von Herzen für ihre schnelle, geduldige und kompetente Hilfe bei der Beantwortung einer Vielzahl von Fragen, mit denen ich sie „belästigen“ mußte.

Vielen Mitstreitern aus Labor 13 und von Flur 42 sowie Hubert Szameit und Marcel Robberts möchte ich für ihre Kooperationsbereitschaft und die gute Stimmung im Labor danken.

Dank gebührt auch I.M.Kerr für die Bereitstellung der „London-COS7-Zellen“, die trotz ihres sporadischen eigensinnigen „Schmollens“, einen wirklichen Wendepunkt zum Guten, betreffend der für eine erfolgreiche Kopräzipitation nötigen hohen Transfektionseffizienzen, darstellten.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Claude Haan
Geburtsdatum: 29.05.1969
Geburtsort: Luxemburg
Staatsangehörigkeit: luxemburgisch

Schulbildung

1975-1981 Besuch der Grundschule in Strassen, Luxemburg
1981-1989 Besuch des Lycée Robert Schuman, Luxemburg
Abitur: Diplôme de fin d'études secondaires

Hochschulausbildung

1989-1990 Studium Chemie /Biologie am Cours universitaire à Luxembourg.
1990-1996 Studium der Chemie an der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule (RWTH) Aachen
11/1995-05/1996 Diplomarbeit am Institut für Technische Chemie und Petrochemie der RWTH-Aachen im Arbeitskreis von Prof. G. Schmitt
06/1996 – 09/1996 Praktikum am Institut für Biochemie der RWTH Aachen Im Arbeitskreis von Prof. P. C.Heinrich.
09/1996-06/2000 Promotion am Institut für Biochemie der RWTH Aachen im Arbeitskreis von Prof. P. C.Heinrich

