

**Konstruktion und Charakterisierung
eines konstitutiv aktiven
Zytokin Rezeptors: gp130**

Dissertation

zur Erlangung des Grades

„Doktor der Naturwissenschaften“

am Institut für Biochemie

in der Medizinischen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

Sigrid Lang

Kiel 2004

An sich

*Sei dennoch unverzagt! Gib dennoch unverloren!
Weich keinem Glücke nicht, steh höher als der Neid,
Vergnüge dich an dir, und acht es für kein Leid,
Hat sich gleich wider dich Glück, Ort und Zeit verschworen.*

*Was dich betrübt und labt, halt alles für erkoren,
Nimm dein Verhängnis an, lass alles unbereut.
Tu, was getan sein muss, und eh man dirs gebeut.
Was du noch hoffen kannst das wird noch stets geboren.*

*Was klagt, was lobt man doch? Sein Unglück und sein Glücke
Ist sich ein jeder selbst. Schau alle Sachen an:
Dies alles ist in dir. Lass deinen eitlen Wahn,*

*Und eh du fürder gehst, so geh in dich zurücke.
Wer sein selbst Meister ist, und sich beherrschen kann,
Dem ist die weite Welt und alles untertan.*

Paul Fleming

meinen Eltern und Schwestern

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	7
1.1	Zytokine.....	7
1.2	Interleukin-6	7
1.3	Signaltransduktion von Interleukin 6: der JAK/STAT-Weg	8
1.4	Glykoprotein 130.....	10
	Lösliche Rezeptoren	12
1.5	Bedeutung von IL-6 in humanen Krebserkrankungen am Beispiel des Multiplen Myeloms.....	12
1.6	STAT3 als Onkogen	14
1.7	Zielsetzung und Methodik	15
2	Material und Methoden	21
2.1	Chemikalien.....	21
2.2	Plasmide.....	21
2.3	Bakterienstämme	21
2.4	Zytokine.....	21
2.5	Antikörper.....	22
2.5.1	Primärantikörper.....	22
2.5.2	Sekundärantikörper	23
2.6	Nukleinsäure- und Proteinstandards	23
2.7	Radiochemikalien	24
2.8	Enzyme und Kits	24
2.9	Primer und Oligonukleotide	24
2.9.1	Primer.....	24
2.9.2	Oligonukleotide.....	25
2.10	Geräte und sonstige Materialien	26
2.11	Molekularbiologische Methoden	26
2.11.1	Restriktionsverdau von DNA.....	26
2.11.2	Agarose-Gelelektrophorese.....	27
2.11.3	Transformation kompetenter Bakterien	28
2.11.4	Plasmid-DNA-Mini-Präparation.....	30
2.11.5	Plasmid-DNA-Maxi-Präparation	30
2.11.6	Ligation.....	31
2.11.7	Polymerase-Ketten-Reaktion	33

2.11.8	RT-PCR	34
2.11.8.1	RNA-Isolierung.....	34
2.11.8.2	RT-Reaktion und PCR	34
2.12	Zellbiologische Methoden	35
2.12.1	Zellkultur	35
2.12.2	Zelllinien.....	36
2.12.3	Transfektion von Säugerzellen.....	37
2.12.3.1	Transiente Transfektion.....	37
2.12.3.1.1	DEAE-Dextran: transiente Transfektion von COS 7- und HepG2-Zellen.....	37
2.12.3.1.2	ExGen: transiente Transfektion von HeLa-Zellen	39
2.12.3.2	Stabile Transfektion	40
2.12.3.2.1	Retrovirale Transfektion: stabile Transfektion von BAF/3 -Zellen	40
2.12.3.2.1.1	Transfektion der Verpackungszelllinie.....	43
2.12.3.2.1.2	Transduktion der Zielzellen	43
2.12.3.2.1.3	Selektion	44
2.12.4	Proliferationstest	44
2.12.5	Biotinylierung von Oberflächenproteinen	44
2.13	Biochemische Methoden	46
2.13.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	46
2.13.2	Proteinfärbungen.....	48
2.13.2.1	Silberfärbung.....	48
2.13.2.2	Coomassiefärbung.....	49
2.13.3	Western-Blotting.....	49
2.13.4	„Strippen“ von Membranen	50
2.13.5	Indirekte Immundetektion.....	50
2.13.6	Metabolische Markierung der Proteine.....	51
2.13.7	Immunpräzipitation.....	52
2.13.8	Luziferasetest	53
2.13.9	DNA-Protein-Bindungstest.....	56
2.14	Immunbiologische Methoden	58
2.14.1	Indirekte Immunfluoreszenzfärbung adhärenter Zellen.....	58
2.14.2	Indirekte Immunfluoreszenzfärbung von Suspensionszellen.....	59
3	Ergebnisse.....	60
3.1	Klonierung von Δ -gp130 und L-gp130.....	60
3.2	Expression der Proteine Δ -gp130 und L-gp130.....	64
3.3	Expression der Proteine Δ -gp130 und L-gp130 an der Zelloberfläche Biotinylierungstest	65

3.4	Lokalisation der Proteine Δ -gp130 und L-gp130 in der Zelle	67
3.4.1	Indirekte Immunfluoreszenzfärbung von transfizierten COS-7 Zellen.....	67
3.4.2	Indirekte Immunfluoreszenzfärbung von transfizierten HeLa Zellen	69
3.5	Phosphorylierung der Proteine Δ -gp130 und L-gp130	70
3.6	Auswirkungen von Δ -gp130 und L-gp130 auf die Signaltransduktion	71
3.6.1	Phosphorylierungsstatus von STAT3 in transfizierten COS-7 Zellen.....	71
3.6.2	Phosphorylierung von STAT3 in transient transfizierten HepG2 Zellen.....	73
3.7	Funktionalität der durch L-gp130 phosphorylierten STAT3 Proteine.....	74
3.7.1	DNA-Protein-Bindungstest	74
3.7.2	Luziferase-Expressionstest.....	76
3.8	Generierung von stabilen BAF/3 Zellen: retrovirale Transfektion.....	78
3.8.1	Der retrovirale Vektor: pMOWS.....	79
3.8.2	Transfektion der Verpackungszelllinie Phönix-Eco.....	80
3.8.3	Transduktion der BAF/3 Zellen	81
3.8.4	Selektion der WT-gp130 und L-gp130 transfizierten BAF/3 Zellen	83
3.9	Charakterisierung der stabilen Zelllinien: L-gp130 und WT-gp130	85
3.9.1	RT-PCR.....	85
3.9.2	Proliferationstest: Zytokinabhängigkeit der Proliferationsrate	87
3.9.3	Proliferationstest: Einfluß von HIL-6 auf die Proliferationsrate	88
3.9.4	Aktivierung von Effektorproteinen: STAT5	89
3.9.5	Aktivierung von Effektorproteinen: STAT3	91
4	Diskussion	93
4.1	Konstitutiv aktives gp130.....	93
4.2	Aktivierung von gp130: Ist die physikalische Dimerisierung ausreichend oder ist das Erreichen einer spezifischen Konformation und Orientierung der zytoplasmatischen Rezeptorbereiche essentiell?.	94
4.3	L-gp130: Ein Modell für eine permanente, ligandenunabhängige Stimulation von gp130.....	95
4.3.1	Effekte von L-gp130 auf transient transfizierte Zellen	95
4.3.2	Effekte von L-gp130 auf stabil transfizierte Zellen: BAF/3-L-gp130 Zellen wachsen faktorunabhängig.....	95
4.4	L-gp130 als Modell: Expansion hämatopoetischer Stammzellen und die Bedeutung gp-130 vermittelter Signale auf die Differenzierung von pluripotenten Zellen.....	104
4.5	Biotechnologischer Einsatz von L-gp130: Expansion von faktorabhängigen Zelllinien und primären Zellen?.....	108
4.6	Hat gp130 onkogenes Potential?	109
5	Zusammenfassung	110

6	Literaturverzeichnis.....	114
7	Abkürzungsverzeichnis	136
8	Anhang.....	141
9	Danksagung	154
10	Lebenslauf.....	155

1 Einleitung

1.1 Zytokine

Der Begriff Zytokine bezeichnet eine heterogene Gruppe von löslichen Proteinen und Peptiden mit einem niedrigen Molekulargewicht (ca. 20 kDa), die als humorale Mediatoren im Immun- und Nervensystem wichtige Funktionen ausüben. Alle Zytokine wirken in nano- bis picomolaren Konzentrationen und sind als unspezifische Komponenten der humoralen Immunantwort und im Nervensystem insofern von Bedeutung, als sie die Kommunikation zwischen verschiedenen Zellen gewährleisten. Sie sind an der Regulation von Immunantworten im physiologischen und pathophysiologischen Zustand beteiligt. Einige Zytokine wirken systemisch und beeinflussen so Prozesse wie Inflammation, Akut-Phase-Reaktion, Hämatopoese und Wundheilung [1, 2]. Zu den Zytokinen zählen neben den Interleukinen und den Chemokinen auch die Lymphokine, die Monokine, Tumor-Nekrose-Faktoren (TNF's), koloniestimulierende Faktoren (CSF's) und Interferone (INF's). Zytokine wirken para- oder auto- oder endokrin. Ein Zytokin kann verschiedene Zelltypen stimulieren (Pleiotropie) und verschiedene Zytokine können den gleichen Signalweg anschalten, man spricht in diesem Fall von Redundanz.

1.2 Interleukin-6

Die meisten Zytokine zeigen keine ausgeprägte Sequenzhomologie, können aber aufgrund ihrer Sekundär- und Tertiärstrukturen klassifiziert werden. Interleukin-6 (IL-6) gehört zu den langkettigen 4-Helix-Bündel-Zytokinen (*long chain 4 helix bundle cytokines*). Proteine dieser Gruppe, die das Glykoprotein 130 (gp130) als signaltransduzierendes Rezeptorelement verwenden, bezeichnet man als IL-6-artige Zytokine. Hierzu zählen neben IL-6 [3], Interleukin 11 [4], *Ciliary Neurotrophic Factor*: CNTF [5], *Leukemia Inhibitory Factor*: LIF [6, 7] Onkostatin M (OSM) [8, 9], *Cardiotrophin-1*: CT-1 [10, 11], *Novel Neurotrophin-1*: NNT-1 [12], Interleukin-27: IL-27 [13] und *Cardiotrophine-like Cytokine*: CLC [14]. Die vier Helices der IL-6 artigen Zytokine werden mit A, B, C und D bezeichnet. Die Helices A und B nehmen eine aufwärts gerichtete Orientierung ein, die Helices C und D hingegen sind abwärts orientiert (*up-up-down-down*-Anordnung). Die Helices sind über verschieden lange Schleifen miteinander verbunden [15, 16].

IL-6 wirkt als proinflammatorisches Zytokin vor allem immunregulatorisch, das heißt, es fördert die Freisetzung weiterer Zytokine und Chemokine. Zytokine werden nicht von einem

spezialisierten Zelltyp produziert. IL-6 zählt neben Interleukin-4, Interleukin-5, Interleukin-10 und Interleukin-13 zu den Typ-2-Zytokinen, das heißt es wird von Th2 T-Helferzellen produziert. Weitere Zellen, die IL-6 produzieren, sind Makrophagen, B-Zellen, Monozyten, Endothelzellen und Fibroblasten. Nach entsprechender Stimulation (Lipopolysaccharide, Viren, Zytokine wie IL-1, TNF-alpha, IFN-gamma) produzieren auch Mesangiumzellen, glatte Muskelzellen, Astrozyten, Keratinozyten und Chondrozyten IL-6 [17, 18]. Die Serumkonzentration an IL-6 beträgt bei gesunden Menschen $\cong 10$ pg/ml [17]. IL-6 ist wie viele Zytokine ein Glykoprotein, das über den klassischen sekretorischen Weg sezerniert wird. Als sezerniertes Protein ist der Ort seiner Expression nicht zwangsläufig der Ort, an dem es seine biologische Wirkung ausübt. Nach der Abspaltung des Signalpeptids besteht das humane IL-6 aus 184 Aminosäuren. Je nach Glykosylierungsgrad weist es ein Molekulargewicht von 21-28 kDa auf. Da IL-6 nicht membrangängig ist, wirkt es, wie alle Zytokine, über spezifische Rezeptoren, die auf der Oberfläche der Zielzellen exprimiert werden.

IL-6 induziert die Produktion von Akut-Phase-Proteinen in Hepatozyten [19 - 22]. Pluripotente B-Zellen differenzieren unter IL-6-Einfluß zu antikörperproduzierenden Plasmazellen [23].

In Kombination mit IL-3, *Stem Cell Factor* (SCF) oder *Flt-3 Ligand* (FL) bewirkt IL-6 die Proliferation von adulten, murinen hematopoetischen Stammzellen [24, 25]. Gemeinsam mit IL-2 wirkt es auf die Teilung und Differenzierung von zytotoxischen Zellen [26-28]. Auch an der neuronalen Differenzierung ist IL-6 beteiligt [29]. Außerdem hat IL-6 wichtige Funktionen im Knochenstoffwechsel [30-32] und beeinflusst massiv die Hämatopoese [33-35]. IL-6 wird in Folge von Verletzungen, Infektionen und Entzündungen sehr schnell und in großen Mengen produziert und koordiniert dann die Aktivität von Leberzellen, Makrophagen und Lymphozyten.

1.3 Signaltransduktion von Interleukin 6: der JAK/STAT-Weg

Durch IL-6 werden mehrere Signaltransduktionswege induziert. Die beiden am besten untersuchten Signalwege, die durch IL-6 angeschaltet werden, sind der Janukinase-*Signal Transducer and Activator of Transcription* (JAK/STAT)-Weg, der über die Transkriptionsfaktoren STAT1 und STAT3 wirkt und der Ras/*Mitogen Activated Protein Kinase* (Ras/MAPK)-Weg mit den Transkriptionsfaktoren *ETS-like gene 1* [36], *Activating protein-1* (AP-1) und *Nuclear Factor IL-6* (NF-IL-6) als Effektorproteinen [37] (siehe Abbildung 1).

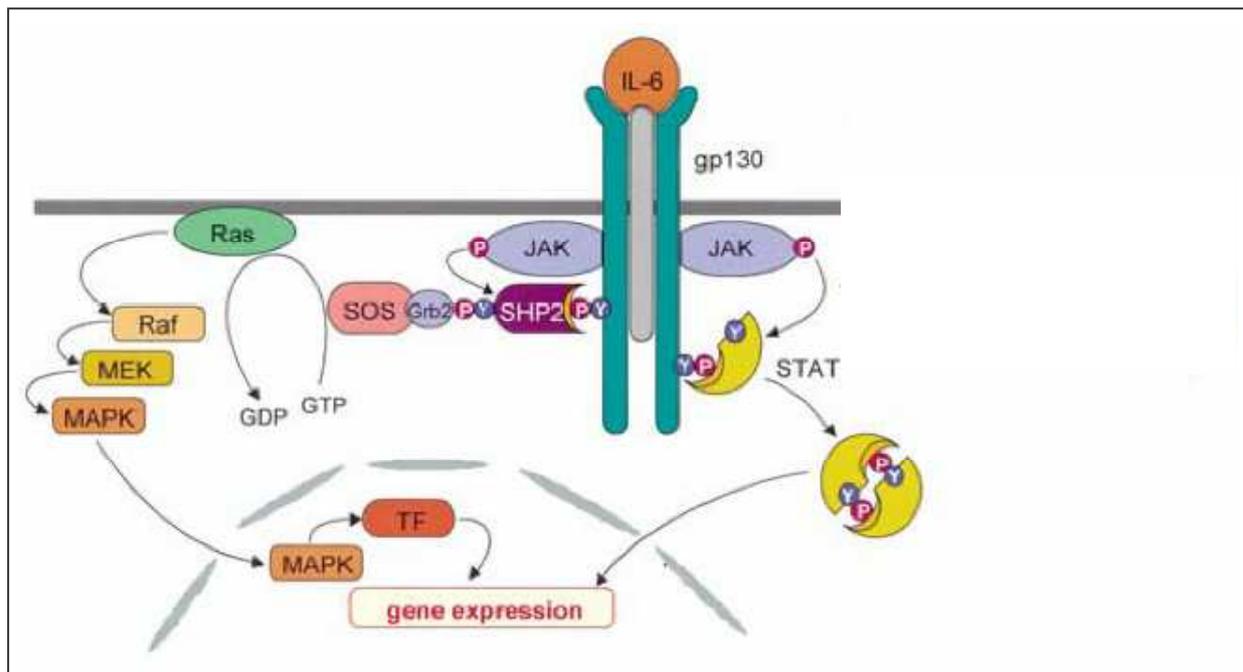


Abbildung 1: Bindung von IL-6 an gp130 (grün) und den IL-6R (grau) aktiviert unter anderem den JAK/STAT und den Ras/Raf/MAPK Transduktionsweg, TF: Transkriptionsfaktor nach [38].

Bei der über den JAK/STAT Weg verlaufenden Signaltransduktion bindet zunächst der Ligand IL-6 an den spezifischen IL-6 Rezeptor (IL-6R- α /gp80). Diese Bindung bewirkt die Rekrutierung zweier Moleküle des auch als IL-6R- β bezeichneten Glykoproteins 130 (gp130). Von diesem heterotrimeren Rezeptorkomplex ist das gp130 die signaltransduzierende Untereinheit. Im zytoplasmatischen Bereich von gp130 befinden sich definierte Tyrosin-Motive, die innerhalb der IL-6 Familie stark konserviert sind und als Boxen 1-3 bezeichnet werden [39-41]. Die Sequenzbereiche Box1 und Box2 sind mit den Januskinasen (JAK's) assoziiert. Nach der Ligandenbindung autophosphorylieren die JAK's und bewirken die Phosphorylierung der Rezeptortyrosine [42, 43]. Nach Ligandenbindung assoziiert hauptsächlich die Januskinase JAK1, aber auch JAK2 und Tyk2 [44]. Sobald die Tyrosine phosphoryliert sind, dienen sie als Anlagerungsstellen für die *Src homology 2* (SH2) Domäne der STAT-Transkriptionsfaktoren. Durch IL-6 wird in geringem Maße STAT1 und in größeren Mengen STAT3 rekrutiert und durch die JAK's an jeweils einer Aminosäure phosphoryliert. Die Phosphorylierung erfolgt für STAT3 am Tyrosin 705 [45] und für STAT1 am Tyrosin 701 [46]. Im phosphorylierten Zustand bilden die STAT-Faktoren Homo- und Heterodimere, die durch aktiven Transport in den Zellkern transportiert werden und dort die Aktivität von Zielgenen modulieren [47, 43, 48-50].

1.4 Glykoprotein 130

Die Zytokine IL-6 und IL-11 verwenden gp130-Homodimere und spezifische Rezeptoren, den IL-6R bzw. den IL-11R, um ihre Signale ins Zellinnere zu übertragen. CNTF benötigt ebenfalls einen trimeren Komplex bestehend aus gp130, LIFR und CNTFR. NNT-1 verwendet gp130-LIFR/CNTFR [51, 52]. CT-1 signalisiert über gp130 und einen noch nicht identifizierten spezifischen Rezeptor [53] bzw. über gp130, LIFR und den CNTFR. Die anderen IL-6-artigen Zytokine übertragen ihre Wirkung auf Zielzellen durch dimere Rezeptorkomplexe: LIF signalisiert über gp130 und LIFR, OSM über gp130 und OSMR oder über gp130 und LIFR. IL-27 verwendet gp130-WSX-1 [13]. Die Verwendung von gleichen Rezeptoruntereinheiten bedingt die starke funktionale Redundanz innerhalb der IL-6-Zytokinfamilie.

Das von allen Familienmitgliedern benutzte gp130 zählt zu den Typ I Transmembranmolekülen. Das heißt, der N-Terminus des Proteins befindet sich extrazellulär und das Protein besitzt eine Transmembrandomäne (siehe Abbildung 2). Gp130 ist ubiquitär exprimiert [3] und wurde auch in Membranbereichen wie *Lipid Rafts* und *Caveolae* nachgewiesen [54-56]. Das reife Protein umfaßt 896 aa und hat ein Molekulargewicht von 130-150 kDa. Das Protein besitzt 11 potentielle N-Glykosylierungsstellen, von denen 9 glykosyliert werden [57]. Die physiologische Bedeutung von gp130 wurde durch ein Mausmodell, in dem homozygot eine Mutation im gp130 Gen vorliegt, untersucht. Einige Embryonen sterben bereits am Tag 12.5 der Embryonalentwicklung, am Tag 18.5 leben nur noch 2.7%, geboren werden diese Mutanten überhaupt nicht. Eine nähere Analyse des letalen Phänotyps ergab eine Fehlentwicklung der Herzventrikelwand (hypoplastisches Myokardium) und eine stark reduzierte Anzahl pluripotenter hämatopoetischer Vorläuferzellen in Leber und Thymus [66]. Nach der Bindung kommt es zur Internalisierung des Liganden. An diesem Prozeß ist ein Dileuzinmotiv im zytoplasmatischen Bereich von gp130 beteiligt [67]. Der Rezeptor gp130 wird ebenfalls internalisiert, dieser Vorgang ist ligandenunabhängig und wird durch eine Phosphorylierung am Serin 782 reguliert [68].

Alle Mitglieder der Zytokinrezeptor-Superfamilie (IL-2R (außer IL-2R-alpha), IL-3R, IL-4R, IL-5R, IL-6R, IL-7R Granulozyten-Makrophagen Kolonie-stimulierender Faktor-R (GM-CSF), Wachstumshormon-R (GH), Prolaktin-R, Epo-R) zeichnen sich durch vier konservierte Cysteine nahe am N-Terminus aus und durch ein Tryptophan-Serin-X-Tryptophan-Serin WSXWS-Motiv (X steht für eine beliebige AS) proximal der Zellmembran [40].

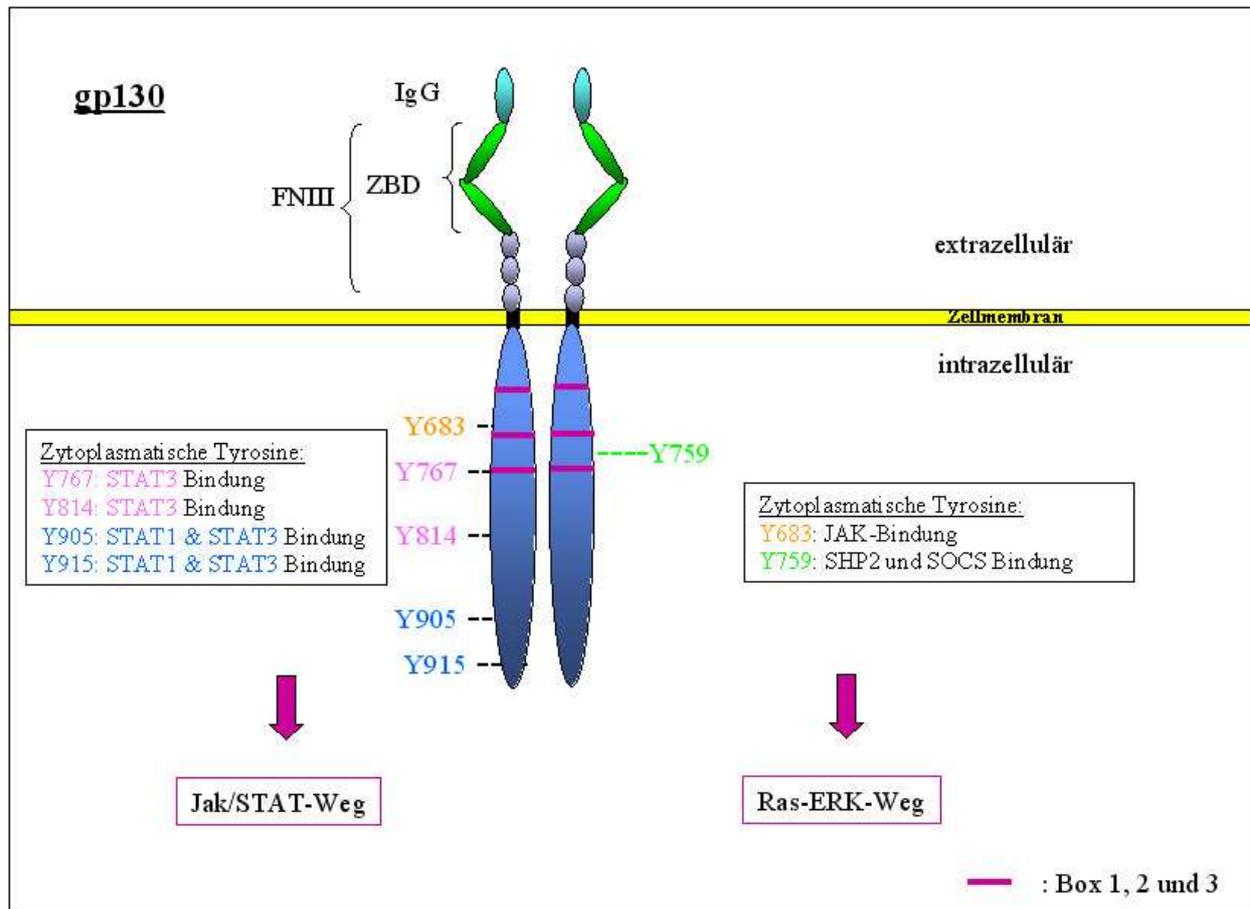


Abbildung 2: Struktur von gp130 mit Hervorhebung des zytoplasmatischen Bereiches. Der extrazelluläre Teil des Zytokinrezeptors gp130 ist modular aufgebaut aus der Immunglobulin ähnlichen Domäne (Ig) und den Fibronectin III (FNIII) Domänen. Die zwei N-terminalen FNIII Domänen werden auch als Zytokinbindemodul (ZBM) bezeichnet. Die Struktur des intrazellulären Bereiches ist noch nicht aufgeklärt, man geht aber davon aus, daß sowohl die Transmembrandomäne als auch der membranproximale Bereich eine α -helikale Struktur einnehmen. Die als Box1 (AS 651-658), Box2 (AS 691-702) und Box 3 (AS 761-770) bezeichneten Bereiche (-rote Balken) sind innerhalb der IL-6-Zytokinfamilie konservierte Bereiche. An die Box1 bindet JAK1 [58, 59], die Box2 erhöht die Affinität dieser Bindung [60]. Die sechs zytoplasmatischen Tyrosinreste dienen als Anlagerungsstellen für die STAT Faktoren. STAT3 bindet an das Motiv pYXXQ, also die Tyrosine 767, 814, 905 und 915. STAT1 bindet an das Motiv pYXPQ, also an die Tyrosine 905 und 915 [61-63]. An das Tyr 759 bindet die SH2 domain containing phosphatase 2 (SHP2) [63]. Die Funktionen der einzelnen Tyrosinreste wurden eingehend untersucht [64, 65].

Lösliche Rezeptoren

Der spezifische IL-6R existiert auch in einer löslichen Form (sIL-6R) [69]. Ein gesunder Erwachsener hat einen Serumspiegel von 50-80 ng/ml sIL-6R [70, 71]. Der sIL-6R weist die gleichen Bindungsaffinitäten auf wie der membrangebundene Rezeptor [72]. Der lösliche IL-6R entsteht durch das alternative Spleißen der mRNA [73, 74]. Das resultierende Molekül besteht aus dem extrazellulären Bereich des IL-6R und unterscheidet sich durch 14 AS am COOH-Terminus von seiner membrangebundenen Form [71, 72]. Löslicher IL-6R kann auch durch die proteolytische Spaltung des Proteins oberhalb der Transmembrandomäne erfolgen. An diesem Prozeß sind Proteasen beteiligt [75-78]. Man bezeichnet diesen Vorgang als *Shedding*. Das Shedding kann durch PMA induziert werden, in diesem Fall ist die Metalloproteinase *A Disintegrin Metalloproteinase Domain/ TNF converting enzyme* ADAM17/TACE beteiligt [79]. Shedding kann auch unter physiologischen Umständen erfolgen, man spricht dann von basalem Shedding. Der IL-6R wird basal durch ADAM10 gespalten [80]. Viele lösliche Zytokinrezeptoren wirken antagonistisch, der sIL-6R hingegen ist ein Agonist. Zusammen mit IL-6 stimuliert er auch Zellen, die selbst keinen IL-6R exprimieren (z.B. hämatopoetische Vorläuferzellen [81], endotheliale Zellen [82] und neuronale Zellen [83, 84]. So kommt es zu einer Erweiterung des Wirkungsspektrums von IL-6 [85, 35, 86]. Rose-John bezeichnete diesen Vorgang als *Transsignaling* [73].

Durch alternatives Spleißen der mRNA entsteht auch lösliches gp130 (sgp130). Im Serum gesunder Menschen findet man 300 ng/ml des sgp130 [87]. Die physiologische Rolle von sgp130 wird im Zusammenhang mit dem Transsignaling deutlich. Lösliches gp130 bindet den im Serum befindlichen IL6/sIL-6R Komplex und verhindert bzw. kompetiert so die Stimulation von Zellen, die den IL-6R nicht exprimieren. Es wirkt somit als Antagonist des Transsignalings [88].

1.5 Bedeutung von IL-6 in humanen Krebserkrankungen am Beispiel des Multiplen Myeloms

Die als Multiples Myelom bezeichnete Krankheit ist charakterisiert durch die langsame Proliferation und Akkumulation maligner, vollständig differenzierter Plasmazellen im Knochenmark. Alle betroffenen Plasmazellen stammen dabei von einem Plasmazellklon ab. Im Kontrast zu gesunden Plasmazellen benötigen Multiple Myelom-Zellen keine Antigen-Aktivierung für die Induktion der klonalen Proliferation. Sie produzieren ein im strukturellen

Aufbau normales, monoklonales Immunglobulin, das keine spezifische Antikörperfunktion ausübt. Das durchschnittliche Diagnosealter liegt bei über 50 Jahren. Das Multiple Myelom macht 1% aller malignen Krankheiten aus und 10% aller hämatologischen Erkrankungen. Es tritt in Menschen und Mäusen spontan auf, ist also keine Erbkrankheit. Bei BALB/c Mäusen kann sie durch die Injektion von Mineralöl in die Peritoneal-Höhle induziert werden. Die Erkrankung ist unheilbar, die mittlere Überlebensdauer beträgt im Mittel drei Jahre.

Schon früh wurde IL-6 als essentieller Wachstumsfaktor für Plasmazytomzellen beschrieben [89, 90]. Aufgrund dieser Beobachtungen wurde sehr intensiv untersucht, woher das IL-6 im Zusammenhang mit den malignen Plasmazellen stammt. Zwei Antworten wurden darauf gefunden: Es gibt eine autokrine Produktion durch die Tumorzellen selbst [91]. Dem gegenüber steht eine parakrine IL-6 Produktion durch Zellen des Knochenmarks, der durch den Kontakt mit den Multiplen Myelom-Zellen verstärkt wird [92-95]. Osteoblasten, Osteoklasten und Stromazellen produzieren IL-6. Außerdem exprimieren Multiple Myelom-Zellen den sIL-6R und unterstützen damit die Produktion von IL-6 durch die Stromazellen des Knochenmarks [96]. Reguliert wird dieser Prozeß durch IL-1 β , das wiederum von den Tumorzellen gebildet wird. Indirekt vermittelt IL-6 die Neovaskularisation des Knochenmarks durch die Induktion von Proteinen wie Matrix Metalloproteinase 1 (MMP-1) und Matrix Metalloproteinase 2 (MMP-2) [96-98]. Außerdem wirkt IL-6 durch die Hochregulierung des vaskulären endothelialen Wachstumsfaktors-1 (VEGF-1) positiv auf die Tumorverbreitung [99]. Die Bedeutung von IL-6 zeigte sich besonders eindrucksvoll in Mäusen, in denen das Gen für IL-6 ausgeschaltet ist. In diesen Tieren ist keine Plasmazytom-Induktion durch Mineralölinjektion möglich [100-102]. IL-6/sIL-6R transgene Mäuse hingegen entwickeln die Erkrankung nach dieser Behandlung schneller und stärker als Kontrolltiere [103]. Der sIL-6R hat einen agonistischen Effekt auf Multiple Myelom-Zellen. Durch das Transsignaling können auch IL-6R negative Zellen auf diesen Molekülkomplex reagieren. Bei der Behandlung von Multiplen Myelom-Zellen und von Mäusen, die mit entsprechenden Zellen transplantiert wurden, zeigten Antikörper gegen IL-6 antiproliferative bzw. lebensverlängernde Effekte [104-106]. In klinischen Versuchen führte die Behandlung von Patienten mit monoklonalen Antikörpern gegen IL-6 ebenfalls zu antiproliferativen Effekten, ergab aber keine klinisch definierte Heilung [107, 108]. Kombinationstherapien aus Dexamethason, einer IL-6 Antikörperbehandlung und Chemotherapie sind erfolgversprechend [109].

Interessanterweise wurde das durch das Kaposi Sarkoma-assoziierte Herpesvirus HHV-8 [110] kodierte virale-IL-6 (vIL-6) in Knochenmarkszellen von Multiplen Myelom-Patienten gefunden

[111]. Dieses virale Protein interagiert direkt mit gp130, es benötigt keinen spezifischen α -Rezeptor [112, 113]. Es zeigt eine ähnliche Wirkung auf Multiple Myelom-Zellen wie IL-6, indem es das Wachstum stimuliert und Apoptose verhindert. Die Bedeutung von vIL-6 im Multiplen Myelom wird noch kontrovers diskutiert [114].

1.6 STAT3 als Onkogen

Multiple Myelom-Zellen werden nicht nur durch IL-6 stimuliert, sondern durch alle IL-6 artigen Zytokine [115]. Ausschlaggebend ist in jedem Fall die Aktivierung des Transkriptionsfaktors STAT3 [116]. STAT-Proteine werden durch Zytokine wie Interferon [117] und IL-6 aktiviert, durch Rezeptoren mit intrinsischer Tyrosinkinaseaktivität wie den epidermalen Wachstumsfaktor (EGF) oder den *platelet derived growth factor* (PDGF) [118], und auch durch einige Nichtrezeptor-Tyrosinkinasen wie die Src-Kinase [119]. In gesunden Zellen ist die Aktivierung von STAT-Proteinen im Verlauf der Signalübertragung transient. Eine solche Aktivierung findet z. B. im Verlauf der normalen Hämatopoese statt [120, 121]. Bei Erkrankungen wie beispielsweise Brustkrebs [122-124] und hämatologischen Erkrankungen wie dem Multiplen Myelom [125], in lymphoiden und myeloiden Leukämiezellen [126, 127], und beim malignen Lymphom ist die Aktivierung von STAT-Proteinen konstitutiv (Übersicht siehe: [125]). Mittlerweile haben zahlreiche Untersuchungen klar den Zusammenhang zwischen der konstitutiven Signalübertragung durch STAT-Proteine und der Progression der malignen Transformation gezeigt [125, 128, 129].

Konstitutiv aktives STAT3 hat drei Auswirkungen auf Multiple Myelom-Zellen. Es bewirkt eine Anregung der Proliferation, was längerfristig zu einer Akkumulation von malignen Zellen führt. In frisch isolierten Myelom-Zellen induziert IL-6 *in vitro* das Wachstum und erhöht die Überlebensrate [89, 95]. Dieser Effekt läßt sich mit Hilfe von Anti-IL-6 Antikörpern inhibieren.

Außerdem bewirkt die Verhinderung des programmierten Zelltodes (Apoptose) eine Resistenz gegen Therapien, die auf eine Apoptoseinduktion abzielen, um Tumorzellen zu eliminieren. Im Fall des Multiplen Myeloms bewirkt konstitutiv aktives STAT3 eine Resistenz gegenüber der ligandenvermittelten Apoptose [130]. IL-6 bewirkt in diesem Zusammenhang die verstärkte Expression des antiapoptotisch wirkenden Proteins Bcl-xL und Mcl-1 [131, 132]. Die Expression von dominant negativem STAT3 in Multiplen Myelom-Zellen inhibierte die Bcl-xL Expression und führte so zu einer proapoptotischen Wirkung [125]. Andere Experimente bestätigten diesen Zusammenhang. Das Protein Bcl-xL schützt Multiple Myelom-Zellen vor durch Chemotherapie

induzierter Apoptose [133]. Die Blockierung der STAT3 Signalübertragung durch einen JAK spezifischen Inhibitor (AG490) induziert Apoptose in humanen Myelomzellen [125].

Murine Embryonen, in denen das Gen für den Transkriptionsfaktor STAT3 ausgeschaltet ist, sterben zwischen Tag 6.5-7 der Embryonalentwicklung [134]. Die gewebespezifische Ausschaltung des Gens in Keratinozyten hat Auswirkungen auf die Zellbeweglichkeit und die Wundheilung [135]. In T-Lymphozyten aus Mäusen, in denen STAT3 ausgeschaltet ist, kann IL-6 nicht wie normal die Apoptose verhindern [136]. Bromberg et al. generierten durch den Austausch zweier Aminosäuren in der SH2-Domäne von STAT3 durch zwei Cysteine ein vom Phosphorylierungsstatus seines Tyrosins (T705) unabhängiges, aktives STAT3-Molekül. Dieses Molekül ist ohne spezifische Induktion aktiv. Transfiziert man Zellen mit diesem Konstrukt und injiziert diese subkutan in Mäuse, die ein gestörtes Immunsystem haben, so löst man in diesen Tieren eine Tumorbildung aus. Das bedeutet, daß dauerhaft aktives STAT3 ein onkogenes Potential besitzt. Die Untersuchung ergab Hinweise darauf, dass der Zellzyklus aktiviert ist. Die Genexpression von Cyclin D1 und c-Myc ist erhöht [137, 138]. Die Deregulierung des Zellzyklus ist die dritte Auswirkung eines IL-6 Überschusses bzw. von konstitutiv aktivem STAT3 auf transformierte Zellen.

1.7 Zielsetzung und Methodik

Konstitutiv aktives STAT3 spielt in humanen Krebserkrankungen eine wichtige Rolle. Es ist dabei nicht entscheidend, welches Zytokin zu der Aktivierung führt. Alle Zytokine der IL-6-Familie wirken als Wachstumsfaktoren für Multiple Myelom-Zellen. Da alle Zytokine der IL-6-Familie das Transmembranprotein gp130 als gemeinsame Rezeptoruntereinheit verwenden, sind offenbar gp130-vermittelte Signale für den Prozeß der malignen Transformation von großer Bedeutung. Es stellt sich die Frage, welcher Schritt in der Signaltransduktion durch gp130 entscheidend ist. Eine Transfektion von hämatopoetischen Zellen mit dauerhaft aktivem Jak2 zeigte eine konstitutive Aktivierung von STAT1, STAT3 und STAT5 und die Fähigkeit zu faktorunabhängigem Wachstum. In Mäusen riefen diese Zellen myelo- und lymphoproliferative Erkrankungen hervor [139]. Wir haben uns die Frage gestellt, welche Auswirkungen ein dauerhaft aktives gp130 haben könnte. Die physiologische Konsequenz eines ligandenunabhängig dimerisierten und konstitutiv aktiven gp130 Moleküls ist bislang nicht bekannt. Es ist bisher nicht untersucht worden, ob die massiven Auswirkungen, die dauerhaft aktives STAT3 hat, nicht auch durch konstitutiv aktives gp130 hervorgerufen sein könnten. Da die Aktivierung von gp130 in der Signalkaskade der IL-6 artigen Zytokine zeitlich vor der Jak2

und der STAT3 Aktivierung liegt, ist dies durchaus denkbar. Vielleicht können unsere Versuche erste Hinweise auf das onkogene Potential von gp130 ergeben. Möglicherweise wird gp130 zu einem neuen Zielmolekül bei der Entwicklung von Therapien und bei der Entwicklung von pharmakologischen Blockaden.

Ebenfalls unbekannt ist die Bedeutung der dauerhaften Dimerisierung von zwei gp130 Molekülen für den Prozeß der Signaltransduktion an sich. Eine Möglichkeit ist, daß eine Dimerisierung ausreicht, um eine ligandenunabhängige Aktivierung des Rezeptors zu erreichen. Viele Experimente weisen aber auch darauf hin, das eine genau definierte Konformation und eine exakte Orientierung der zytoplasmatischen Bereiche des Rezeptors erreicht werden muß, um zu einer Signalweiterleitung zu führen. Dann würde nicht jede künstliche Dimerisierung automatisch auch zu einer Aktivierung führen.

Um diesen Fragen nachzugehen wurden auf cDNA Ebene zwei gp130-Konstrukte generiert. Das Konstrukt Δ -gp130 besteht aus dem Signalpeptid des humanen gp130-Moleküls, sowie aus dem humanen gp130 Molekül, das 20 Aminosäuren über der Transmembrandomäne trunziert wurde. Somit fehlt die gesamte für die Ligandenbindung verantwortliche extrazelluläre Domäne (siehe Abbildung 3). Sofern die extrazelluläre Domäne des Rezeptors dazu dienen sollte, die zytoplasmatischen Bereiche des Rezeptors in einem Abstand voneinander zu halten, der eine Aktivierung verhindert, könnte eine solche Mutante die Annäherung der zytoplasmatischen Domänen und damit eine Aktivierung zur Folge haben.

Ein zweites Konstrukt L-gp130, das generiert wurde, besteht ebenfalls aus dem Signalpeptid, der gesamten zytoplasmatischen und der Transmembrandomäne des humanen gp130. Carboxyterminal wurde anstelle der extrazellulären Domäne die basische Leuzin-Reißverschluß Region aus dem humanen c-Jun Protein eingefügt Ein zweites Konstrukt L-gp130, das generiert wurde, besteht ebenfalls aus dem Signalpeptid, der gesamten zytoplasmatischen und der Transmembrandomäne des humanen gp130. Carboxyterminal wurde anstelle der extrazellulären Domäne die basische Leuzin-Reißverschluß Region aus dem humanen c-Jun Protein eingefügt (siehe Abbildung 3).

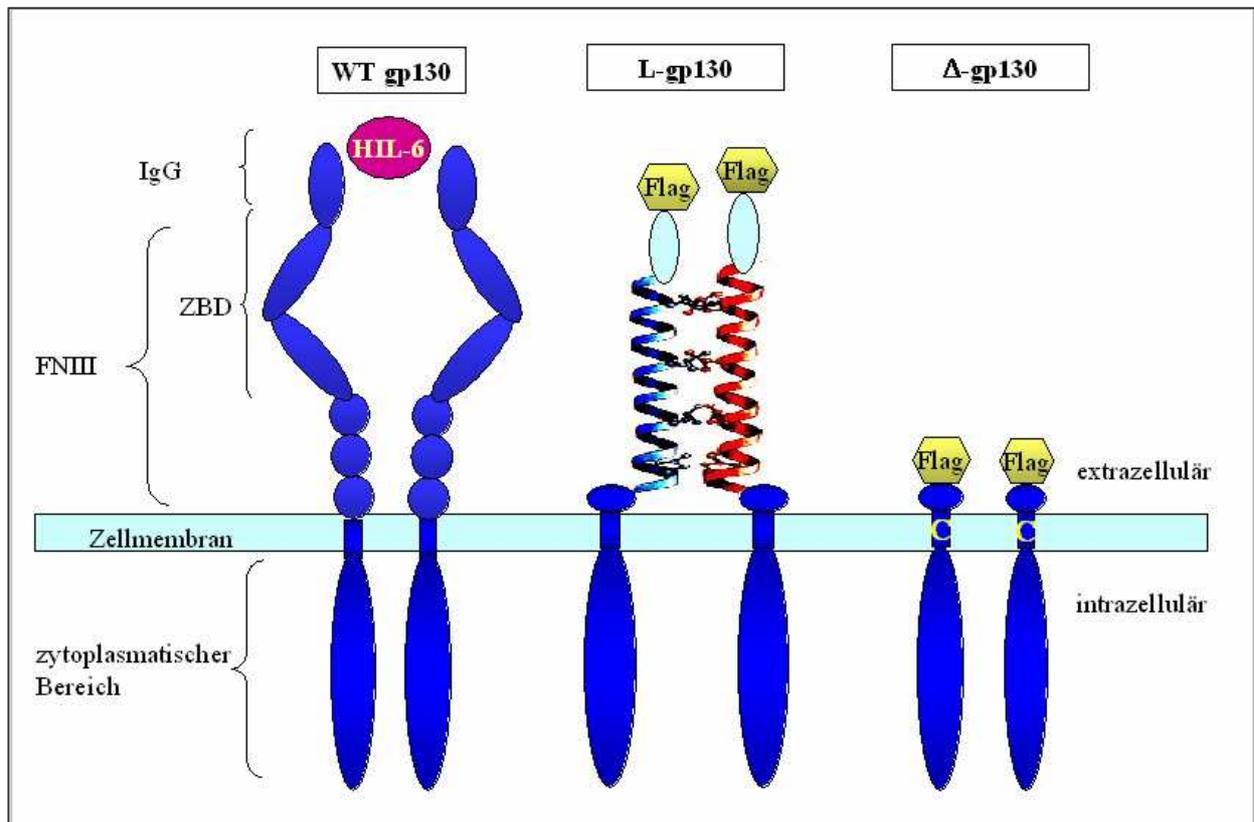


Abbildung 3: Schemazeichnung der Konstrukte Δ -gp130 und L-gp130. Links der Wildtyprezeptor dimerisiert durch den Liganden Hyper-IL-6 (HIL-6). Ig: IgG-ähnliche Domäne, ZBD: Zytokinbindemodul, FNIII: FibronektinIII-ähnliche Domäne. Mitte: Bei L-gp130 wurde der extrazelluläre Bereich durch einen Leuzin-Reißverschluß des *c-Jun* Proteins ersetzt. Rechts: Für Δ -gp130 wurde das Wildtypprotein extrazellulär 20 Aminosäuren über der Transmembrandomäne trunziert, Flag: Fag-Tag, C: das Cystein in der Transmembrandomäne von gp130 ist auch im Wildtyprezeptor und auch bei L-gp130 vorhanden aber nur bei Δ -gp130 eingezeichnet. Nähere Erklärungen im Text.

Die Leuzin-Reißverschluß Regionen dieses chimären Proteins können miteinander interagieren, dadurch eine Dimerisierung bewirken und möglicherweise so die Signaltransduktion auslösen [140, 141].

Das Strukturmotiv des basischen Leuzin-Reißverschlusses aus dem humanen *c-Jun* Protein wurde bereits erfolgreich für die Dimerisierung von Molekülen verwendet [140, 141]. Proteine der Jun-Familie (Jun, JunB, JunD) und der Fos-Familie (Fos, Fra-1, Fra-2, FosB) sind an einer Reihe zellulärer Prozesse wie Proliferation, Differenzierung, Apoptose und Onkogenese beteiligt [142]. Proteine dieser Familien sind bekannt dafür, dass sie untereinander und mit anderen Proteinen sowohl Homo- als auch Heterodimere bilden. Das Heterodimer Jun-Fos bildet

beispielsweise den Transkriptionsfaktor AP-1 (siehe Abbildung 4). Für die Dimerbildung haben diese Proteine einen helikalen Bereich, der dadurch gekennzeichnet ist, daß an jeder siebten Position ein Leuzin vorkommt. Direkt davor (Richtung Aminoterminus) befindet sich eine Region, die durch eine Reihe von basischen Aminosäuren gekennzeichnet ist (Lysine und Arginine). Im Falle des 340 Aminosäuren umfassenden c-Jun Proteins gibt es fünf solcher Leuzine im Abstand von je sieben AS. Die Region der wiederholten Leuzine faltet sich im Protein zu einer Helix. Die Leuzine kommen dabei alle auf einer Seite der Helix zu liegen. Die anfängliche Vorstellung vom zahnartigen Ineinandergreifen der Leuzine gab diesem Motiv den Namen *basic zipper* bZIP-Motiv. Die Helices eines Dimers lagern sich parallel zueinander, das heißt, die beiden aminoterminalen Enden weisen in die gleiche Richtung, ebenso die beiden carboxyterminalen Enden [143]. Die beiden Helices sind umeinander gewunden und nehmen eine als *coiled-coil* bezeichnete Konformation an [144]. Die Interaktionen in einem *coiled-coil* kommen durch ein Netzwerk elektrostatischer Interaktionen zwischen den beiden Helices, durch hydrophobe Wechselwirkungen, Wasserstoffbrückenbindungen und van-der-Waals-Kontakte zustande.

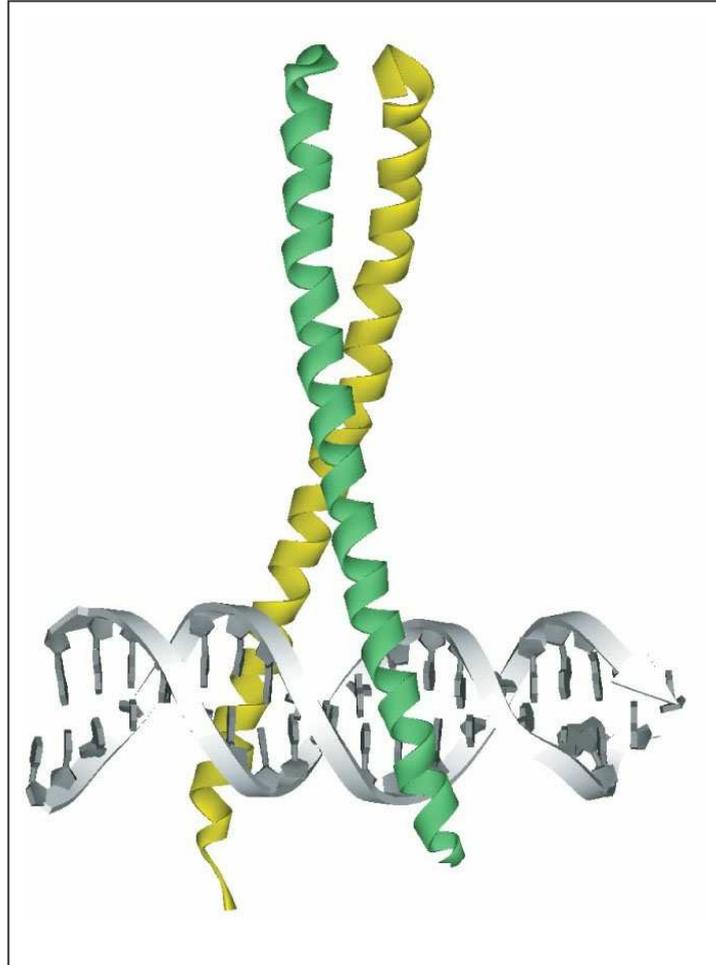


Abbildung 4: (a) Schematische Darstellung eines Jun (gelb) Fos (grün) Heterodimers gebunden an eine spezifische DNA-Sequenz (grau). Der Leuzin-Reißverschluss bewirkt die Dimerisierung und sorgt für die korrekte Positionierung der DNA-bindenden basischen Region des Transkriptionsfaktors [145]. Durch die Dimerbildung gelangen die Leuzin-Reißverschlüsse in eine Position, die einer Zange ähnelt, welche die DNA umgreift. Die Bindung eines solchen Transkriptionsfaktors (z.B. AP-1) bewirkt eine Biegung der DNA.

Fos-Proteine können nicht homodimerisieren, bzw. ergeben thermodynamisch sehr instabile Dimere [146]. Jun-Proteine hingegen bilden Homodimere. Daher haben wir uns entschlossen, durch die Verwendung des Jun Leuzin-Reißverschluß Bereiches und somit die Bildung von Jun-Homodimeren eine künstliche Dimerisierung von gp130 Monomeren zu bewirken.

Das beste Zellsystem um Effekte der gp130 Chimären zu untersuchen sind BAF/3-Zellen [147]. Um die Wirkung von Zytokinen *in vitro* zu untersuchen, werden häufig faktorabhängige, immortalisierte Zelllinien verwendet. Für die Proliferation und das Überleben dieser Zellen sind bestimmte Wachstumsfaktoren oder Zytokine essentiell. Ist der essentielle Faktor vorhanden, sind solche Zellen zu unbegrenztem Wachstum fähig. Ein Entzug der entsprechenden Faktoren hingegen führt innerhalb von 24-36 h zum Zelltod durch Apoptose [147]. Transfiziert man eine

faktorabhängige Zelllinie mit einer DNA, die für einen Rezeptor kodiert, den diese Zellen vorher nicht exprimiert haben, so kann man das Wachstum dieser Zellen von neuen Faktoren abhängig machen. Diese Methode wird verwendet, um spezifische Wachstums- und Differenzierungssignale zu untersuchen, die der neue Rezeptor auslöst. In dieser Arbeit wurde die IL-3 abhängige Zelllinie BAF/3 verwendet. BAF/3-Zellen exprimieren endogen keine Zytokinrezeptoren der IL-6-Familie (eine Ausnahme stellt der Rezeptor von IL-27 (WSX-1)) dar, aber er wird nur in einem niedrigen Maße in BAF/3-Zellen exprimiert [13]). Sie sind daher besonders geeignet um die Effekte der chimären Rezeptoren zu untersuchen.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien

Es wurden, soweit erhältlich, ausschließlich Chemikalien des Reinheitsgrades pro analysi der Firmen Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen/Schnelldorf), Sigma Diagnostics, Inc. (St.Louis, USA), Fluka Chemie AG (Buchs, Schweiz) und Serva Feinbiochemica GmbH & Co KG (Heidelberg) verwendet.

2.2 Plasmide

Die cDNA für humanes gp130 wurden von Hirano beschrieben [148], das Plasmid für STAT3 wurde von Althoff [79] beschrieben, das Plasmid für den IL6-R von Vollmer [149]. Die cDNA des humanen *c-jun* Gens wurde von Prof. Kastellein zur Verfügung gestellt [141]. Die retroviralen Plasmide pMOWS und pMOWS-GFP wurden von Frau Prof. Klingmüller generiert und freundlicherweise zur Verfügung gestellt [150]. Das Luziferase-Reporter-Konstrukt SIEM-Luc wurde freundlicherweise von H. Gascan (Nantes) zur Verfügung gestellt [151].

2.3 Bakterienstämme

Für Transformationen wurden die Bakterienstämme *Escherichia coli* DH5 α [152] von Invitrogen und *E. coli* JM105 verwendet.

2.4 Zytokine

Das Designerzytokin HIL-6 wurde von M. Fischer kloniert und exprimiert [153]. Das murine IL-3 wurde von der Strathmann Biotec AG (Hamburg) bezogen. Die Produktion des verwendeten IL-6 wurde beschrieben in: [154].

2.5 Antikörper

2.5.1 Primärantikörper

Antikörper	Firma	Bestellnummer
Stat5	Santa Cruz Biotechnology, Inc. Heidelberg	sc-835
Phospho-p44/42 Map Kinase (Thr202/Tyr204)	Cell Signaling Technology	#9101
STAT3	Transduction Laboratories, Lexington, KY	S21320
Anti-FLAG [®] M1 Monoclonal Mouse	Sigma, Missouri, USA	F3040
Anti-FLAG [®] M2 Monoclonal Mouse	Sigma, Missouri, USA	F3165
Anti-FLAG [®] BiotinylatedM2	Sigma, Missouri, USA	F9291
gp130	Santa Cruz Biotechnology Inc , Heidelberg	sc-655
Anti-FLAG [®] Polyclonal Rabbit	Sigma, Missouri, USA	F7425
Anti-ERK1/2pAb	Promega, Madison Wisconsin, USA	V114A
Antiactive [®] MAPKpAb	Promega, Madison Wisconsin, USA	V803A
Anti-Phosphotyrosine, clone 4G10	Upstate Biotechnology, Lake Placid, New York	#05-321
Phospho-STAT3 (Tyr705)	New England BioLabs, Frankfurt	9131 S
Anti-Phospho-ERK1/ERK2 (T202/Y204)	R&D Systems GmbH, Wiesbaden- Nordenstadt	V8031

Tabelle 1: Auflistung der verwendeten Primärantikörper

2.5.2 Sekundärantikörper

Antikörper	Firma	Bestellnummer
Anti-Rabbit IgG (H+L) Peroxidase-conjugated	Pierce, Illinois, USA	31460
Anti-Mouse IgG (H+L) Peroxidase-conjugated	Pierce, Illinois, USA	31432
Goat-Anti-Rabbit-AlexaFluor488	Molecular Probes, (Invitrogen Karlsruhe)	A11001
WGA-Tetramethylrhodamin	Molecular Probes (Invitrogen Karlsruhe)	F24630
Goat-Anti-Rabbit-Cy3	Jackson ImmunoResearch (Dianova, Hamburg)	111-165-003
Goat-Anti-Maus546AlexaFluor	Molecular Probes (Invitrogen, Karlsruhe)	A11003
Mouse-Anti hgp130 Phycoerythrin	R&D Systems GmbH, Wiesbaden-Nordenstadt	FAB228P

Tabelle 2: Auflistung der verwendeten Sekundärantikörper

2.6 Nukleinsäure- und Proteinstandards

Marker	Hersteller
Protein Molecular Weight Marker	MBI Fermentas Molecular Biology, St. Leon-Rot
SmartLadder™	Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe
Rainbow Marker	Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden
Benchmark™ Prestained Protein Ladder	Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe

Tabelle 3: Auflistung der verwendeten Nukleinsäure- und Proteinstandards

2.7 Radiochemikalien

Trans-³⁵S-LabelTM (43.5 TBq/mmol) und [Methyl-³H]

Thymidine, 25 Ci/mmol; 185MBq) wurden von Amersham Biosciences Europe GmbH (Freiburg) bezogen.

2.8 Enzyme und Kits

Restriktionsendonukleasen, Alkalische Phosphatase (CIAP), T4-DNA-Polymerase, Polynukleotidkinase, Taq-Polymerase und Klenow-Fragment wurden, sofern nicht anders angegeben von MBI Fermentas Molecular Biology (St. Leon-Rot) bezogen. Die Pfu Turbo® DNA-Polymerase wurde von Stratagene Europe (Amsterdam, Holland) bezogen. Die verwendete Omniskript Reverse Transkriptase stammt von Quiagen (Hilden).

2.9 Primer und Oligonukleotide

2.9.1 Primer

Name	Sequenz: 5' – 3'
SPgp130rev00	GCGGAATTCTTTATCATCGTCATCTTTGTAGTCACCTGTAGATTCAGTGGT
SPgp130for00	CTAGGCCTGTACGGAAGTGTTA
JUNlzfor00	CGCCAATTGTGCGGCGGCAGAATCGCCCGGCTGGAG
JUNlzrev00	CGCGGATCCGAATTCGTTTCATGACTTTCTGTTT
PGFPfor00	TAGGCGTGTACGGTGGGAGGTC
PGFPrev00	CATTTTATGTTTCAGGTTTCAGGGGG
DApSVL	TGTGGTTTGTCCAAACTCATC
DA130A	AATTTGAGTTGCATTGTGAACG
DA130B	TCCATTGGCTTCAAAGG
T7 promotor	TAATACGACTCACTATAGGG
T7 terminator	GCTAGTTATTGCTCAGCGG
P09SL01	GGCACTATACATCAAATCGCG
P09SSL01	TCGGAAACCCGTCGGCCTCCG

Name	Sequenz: 5' – 3'
CD130sense01	GTACAAAGTGGCTACAGA
CD130revsi	GAAGTACTGTTGCCTGGG
FLAGse02	GGTGACTACAAAGATGACGATG
Seqsi	CGTCGCCGTCCAGCTCGACCAG
Retro-rev03	CGGGATCCCGCTGAGGCATGTAGCCGCC
Retro-se03	CCCAAGCTTGGGGCCACCATGTTGACGTTGCAGACT
Pef-sense	TGCTCTAGAGCCGCCACCATGTTGACGTTGCAG
Pef-rev	GCATCTAGATCACTGAGGCATGTA
Retrostop-rev	CGGGATCCTCACTGAGGCATGTA
PLEGFP-N-sense	GCAGAGCTGGTTTAGTGAACCG
PLEGFP-N1-sense	GCAGAGCTGGTTTAGTGAACCG
Gp130exon15sense	GATCAAATGTATTCAGATGGC

Tabelle 4: Auflistung der verwendeten Primer

2.9.2 Oligonukleotide

Name	Sequenz: 5' – 3'
SIEM67-rev	CGACAAGATTTACGGGAAATG
SIEM67-se	CATTTCCCGTAAATCTTGTCG
SIEM67-rev	BIO*- CGACAAGATTTACGGGAAATG
SIEM67-se	BIO*-CATTTCCCGTAAATCTTGTCG
MIGKO1 & MIGKO2	5' - TCCTCGAGCCGGCGGCCGCG-3' 3' AGCTCGGCCCGCCGGCGCAGCT-5'
MIG130A & MIG130B	5' - AATTCCTCGAGCCGGGATCCG-3 3' - AGCTCGGCCCTAGGCAGCT -5'

Tabelle 5: Auflistung der verwendeten Oligonukleotide

2.10 Geräte und sonstige Materialien

Die mikroskopische Auswertung transfizierter Zellen erfolgte mittels eines Axiovert 200 Mikroskopes (Carl Zeiss, Göttingen). Für GFP-transfizierte Zellen wurde der FITC-Filtereinsatz verwendet. Licht mit dem bei diesem Filter angeregt wird hat eine Wellenlänge von 485 (+/- 20) nm, die Emmissionswellenlänge liegt zwischen 515 bis 565 nm. Immunfärbungen von Zellen wurden an einem Laser Scanning Mikroskop, LSM-510 (Zeiss, Jena) analysiert.

Gerät	Hersteller
Geltrockner: Gel Dryer Model 583	BioRad, Laboratories GmbH, München
Eppendorf centrifuge 5415 R	Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH Wesseling-Berzdorf
SDS-PAGE und DNA-Gelkammern	BioRad, Laboratories GmbH, München
Heraeus Megafuge 1.0	Heraeus Instruments GmbH, Hanau
Biofuge Pico	Heraeus Instruments GmbH, Hanau
Thermomixer compact	Eppendorf Vertrieb Deutschland GmbH Wesseling-Berzdorf
Robocycler Gradient 96	Stratagene GmbH, Heidelberg
Hera Cell Incubator	Kendro Laboratory Products GmbH, Langenselbold

Tabelle 6: Geräteliste

2.11 Molekularbiologische Methoden

2.11.1 Restriktionsverdau von DNA

Restriktionsenzyme sind Endonukleasen, die spezifische Nukleotidsequenzen von 4-8 Basen in der DNA erkennen und den Doppelstrang an diesen Stellen schneiden, indem sie die Phosphodiesterbindungen zwischen den Nukleotiden spalten. Ihre Erkennungssequenzen sind immer spezifisch. Durch einen Restriktionsverdau entstehen so je nach Sequenz der eingesetzten DNA und nach Enzym Fragmente definierter Länge. Die Enzyme werden vom Hersteller in einer definierten Aktivität geliefert (Enzymeinheit/Volumen) und liegen in einer 50%-igen

Glycerollösung vor. Eine Einheit (Unit) eines Enzyms ist dabei so definiert, daß 1 µg Lambda-Phagen-DNA in einer Stunde bei 37 °C komplett verdaut wird. Mit der folgenden Formel kann die einzusetzende Enzymmenge berechnet werden:

$$\frac{\text{Länge_des_Lambda_Phagen_Genoms} * \text{Anzahl_der_Schnittstellen_in_der_eingesetzten_DNA} * \text{Menge_der_eingesetzten_DNA}}{\text{Länge_der_eingesetzten_DNA} * \text{Anzahl_der_Schnittstellen_in_Lambda_Phagen} * \text{Unit / ul_des_Enzyms}}$$

Bei der Berechnung der Enzymmenge muß beachtet werden, daß maximal 5% (v/v) Glycerol im Gesamtvolumen enthalten sind, da eine zu hohe Glycerolkonzentration die Spezifität des Verdau verändern kann. Folgende Komponenten wurden für einen Restriktionsverdau zusammen pipettiert:

Restriktionsverdau:

ca.	1	µg	Plasmid-DNA
1/10	X	µl	10 x-Restriktionspuffer
ca.	1	Unit	Restriktionsenzym
ad	X	µl	Aqua dest.

Für jeden Verdau wurden die für das jeweilige Enzym optimalen Restriktionspuffer und Temperaturen gewählt. Die Restriktionsdauer variierte von einer Stunde bis zu einer Restriktion über Nacht.

2.11.2 Agarose-Gelelektrophorese

Mit der Methode der Agarose-Gelelektrophorese lassen sich DNA-Fragmente unterschiedlicher Größen auftrennen. Die negativ geladene DNA wandert dabei zum positiven Pol. Die Wanderungsgeschwindigkeit von DNA in einem Agarosegel hängt von ihrer Größe, ihrer Konformation und der Zusammensetzung des Gels ab. Kleine, lineare DNA-Fragmente durchlaufen die Gelmatrix schneller als größere, zirkularisierte Fragmente. Die DNA-Proben wurden mit 1/6 ihres Volumens 6 x DNA-Ladepuffer gemischt, aufgetragen und dann je nach Größe der erwarteten Produkte in 0.7-2 %-igen (w/v) Agarosegelen aufgetrennt. Die aufgetrennten Nukleinsäuren wurden in einem Ethidiumbromidbad (0.5 µg/ml) angefärbt. 3,8-diamino-6-ethyl-5-phenylphenantridium Bromid (Ethidiumbromid) interkaliert spezifisch in doppelsträngige Nukleinsäuren. Die Komplexe fluoreszieren wenn sie UV-Licht von ≥300 nm ausgesetzt werden. Die Intensität der Fluoreszenz ist dabei direkt proportional zur Masse der

Nukleinsäurefragmente. Für einen EtBr-Nachweis muß eine DNA-Bande aus mindestens 25 ng DNA bestehen. Als Längenstandard wurde ein Marker für den Größenbereich 200 Basenpaare – 10 Kilobasen eingesetzt (SmartLadder, Invitrogen Life Technologies, Karlsruhe). Die Gele liefen bei 100-130 Volt, 40-60 min.

6 x DNA-Ladepuffer:

15	% (w/v)	Ficoll 400
0,06	% (w/v)	Bromphenolblau
0,06	% (v/v)	Xylene Cyanol
30	mM	EDTA

50 x TAE-Puffer:

2	M	Tris-HCl, pH 7.5
50	mM	Ethylendiamintetraacetat (EDTA)
0.5	M	Essigsäure

2.11.3 Transformation kompetenter Bakterien

Bakterienzellen können fremde DNA-Moleküle aus dem Medium aufnehmen und diese können sich in der Bakterienzelle replizieren, wenn die Fremd-DNA in einem Klonierungsvektor vorliegt, dessen Replikationsstartpunkt von der Bakterienzelle erkannt wird. Die Bakterien werden vor einer Transformation durch eine Behandlung mit eiskaltem CaCl₂ aufnahmefähig gemacht, man spricht dann von kompetenten Zellen. Die cDNAs für die Konstrukte Δ-gp130 und L-gp130 wurden in verschiedene Vektoren kloniert. Zu Beginn wurde mit dem pBluescript KSII-Vektor (Stratagene GmbH, Heidelberg), einem Klonierungsvektor gearbeitet. Dabei handelt es sich um einen Plasmidvektor, der einer relaxierten Kontrolle unterliegt. Das heißt er kann sich solange vermehren, bis in jeder Zelle durchschnittlich 10-200 Exemplare vorliegen. Auf diese Weise wird auch die in dem Vektor inserierte cDNA stark vervielfältigt. Um die Plasmid-DNAs in ausreichender Menge zur Verfügung zu haben wurden E. coli Bakterien mit den entsprechenden Plasmiden wie folgt transformiert: Zu jeweils 100 µl der auf Eis aufgetauten kompetenten Bakterien, wurden jeweils 1-10 µl des Ligationsansatzes oder 2 ng Plasmid-DNA pipettiert und die Mischung dann 5-30 min auf Eis inkubiert. Nun folgte ein Hitzeschock bei 42 °C im Wasserbad für genau 90 s. Während dieser Zeit nehmen die Bakterien die Fremd-DNA auf. Ob ein Plasmid aufgenommen wurde kann man anhand der Expression der auf diesem

Plasmid liegenden Antibiotikaresistenzgene erkennen. Werden diese Gene exprimiert, so verleihen sie den Wirtszellen eine entsprechende Resistenz. Die Bakterien wurden nun abgekühlt und je Ansatz mit 300 µl LB-Medium versetzt. Es folgte eine Inkubationsphase von 45-60 min. im 37 °C-Brutschrank, während dieser Zeit beginnt die Plasmidreplikation und die Resistenzgenexpression. Erst danach wurden die Bakteriensuspensionen kurz abzentrifugiert und die Bakterienpellets in 100 µl LB-Medium resuspendiert. Die Bakterien wurden dann auf Agarplatten die mit geeigneten Antibiotika angereichert waren ausgestrichen. Die Inkubation der Platten erfolgte über Nacht bei 37 °C.

“Luria Bertani”-Bakterienmedium (LB):

10	g	Caseinhydrolysat
5	g	Hefeextrakt
5	g	NaCl
10	ml	Tris-HCl pH 8.0, 1 M
ad	1	l
		Aqua dest.

Für die Expansion von Einzelkolonien wurden die über Nacht gewachsenen Kolonien mit sterilen Zahnstochern einzeln von den Platten gepickt und in antibiotikahaltigem LB-Medium nochmals 5 h auf dem Schüttler (220 rpm) bei 37 °C inkubiert. Anschließend konnte die nun stark vermehrte Plasmid-DNA aus den Bakterien isoliert werden.

LB-Agarplatten:

500 ml 3%-iger Agar (w/v) und 500 ml 2 x LB wurden autoklaviert und auf ca. 50 °C abgekühlt, bevor sie mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzt und in sterile 10 cm Ø Petrischalen (Sarstedt, Nümbrecht) gegossen. Die Platten wurden bei 4 °C gelagert.

Antibiotikum	eingesetzte Konzentration:
Ampicillin	100 µg/ml
Chloramphenicol	170 µg/ml
Kanamycin	50 µg/ml
Streptomycin	50 µg/ml
Tetracyclin	33 µg/ml

Tabelle 7: Für LB-Agarplatten und LB-Flüssigmedium eingesetzte Antibiotikakonzentrationen.

2.11.4 Plasmid-DNA-Mini-Präparation

Zur Gewinnung kleinerer Mengen Plasmid-DNA aus den Bakterienkulturen wurde die Methode der alkalischen Lyse angewendet. Jeweils 1.5 ml der Schüttelkulturen wurden bei 13.000 rpm 1 min zentrifugiert. Die Flüssigkeit wurde verworfen und das Pellet in einem Tropfen Restflüssigkeit gründlich resuspendiert. Die alkalische Lyse der Zellen erfolgte durch die Zugabe von 300 µl TENS. Das darin enthaltene EDTA entfernt Magnesiumionen und schwächt somit die Zellwand. Mit Natriumdodecylsulfat (SDS), einem anionischen Detergens wird dieser Auflösungsprozess unterstützt. Die Proben wurden 2-5 s geschwenkt und dann sofort mit 150 µl Birnboim-Acetat versetzt. Durch die abrupte Neutralisierung der Lösung durch das saure Birnboim-Acetat renaturieren die Plasmide, die genomische DNA verklebt mit den Proteinen und wird anschließend bei 13.000 rpm in 2 min abzentrifugiert. Der Verdau von störender RNA erfolgte durch die Inkubation des Überstandes mit 3 µl RNase (10 µg/ml, Boehringer, Mannheim) bei 37 °C für 10 min. Anschließend erfolgte die Aufreinigung der DNA durch die Zugabe von 400 µl Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1). Die organischen Lösungsmittel fällen Proteine, während die Nukleinsäuren in der wässrigen Lösung bleiben. Nach einer gründlichen Durchmischung wurden die Proben bei 13.000 rpm 5 min zentrifugiert. Die Proteine befanden sich nun als weiße Grenzschicht zwischen der unteren Phenolschicht und der oberen wässrigen Schicht. Die obere Phase mit der DNA wurde vorsichtig abgenommen. Die DNA wurde durch die Zugabe von 900 µl -20 °C kaltem, Ethanol (96% (v/v)) präzipitiert und das Pellet mit 70% (v/v) Ethanol gewaschen. Nach dem Trocknen wurden die DNA-Pellets in 20 µl destilliertem Wasser resuspendiert und so bei -20 °C aufbewahrt.

TENS:

10	mM	Tris-HCl, pH 7.5
1	mM	EDTA
0.1	M	NaOH
0.5	%	SDS (w/v)

Birnboim-Acetat:

299	mM	Kaliumacetat
5	%	Ameisensäure (w/v)

2.11.5 Plasmid-DNA-Maxi-Präparation

Zur Isolation der Plasmid-DNA aus einer größeren Menge Bakterienkultur wurde das Nucleobond®AX-Kit (Macherey-Nagel, Düren) verwendet. Es wurde nach Herstellerangaben

gearbeitet. Während der alkalischen Lyse der Bakterien denaturieren die Plasmid-DNA und die chromosomale DNA. Durch die Zugabe von Kaliumacetat wird der pH-Wert ausgeglichen, die Plasmide renaturieren. Die genomische DNA verklebt mit den gefällten Proteinen. Das Kit verwendet das Prinzip des Anionenaustauschharzes. Als Matrix dienen großporige Siliziumkugeln, die an Methyl-Ethylamin Gruppen gekoppelt sind. An diese funktionelle Gruppe binden Nucleinsäuren mit ihren negativ geladenen Phosphatgruppen. Durch mehrere Waschschrte wird die DNA von störenden Proteinen, Kohlenhydraten etc. gereinigt und mittels 1 M KCl eluiert.

Die Berechnung der Plasmid-DNA-Konzentration erfolgte durch die photometrische Messung der optischen Dichte der DNA-Lösung bei 260 bzw. 280 nm. Gemessen wurde eine 1:100-Verdünnung der DNA in Aqua dest. Die optische Dichte von 1 entspricht dabei 50 µg doppelsträngiger Plasmid-DNA/ml. Dementsprechend wurde die Konzentration nach folgender Formel berechnet:

$$\text{OD}_{260} \cdot 50 \cdot \text{Verdünnungsfaktor (100)} / 1000 = \mu\text{g DNA} / \mu\text{l}$$

Anhand der photometrischen Messung kann auch der Reinheitsgrad der DNA überprüft werden. Der Koeffizient aus $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ liegt bei sehr sauberer DNA zwischen 1.7 und 1.9. Die Proben wurden bei -20 °C aufbewahrt.

2.11.6 Ligation

Während einer Ligation soll ein DNA-Fragment, das sog. Insert mit einem aufgeschnittenen DNA-Molekül, dem sog. Vektor verknüpft werden. Vektoren sind DNA-Moleküle, die den Einbau von Fremd-DNA erlauben. DNA-Ligasen katalysieren diesen Vorgang. Diese Enzyme reparieren Einzelstrangbrüche in doppelsträngigen DNA-Molekülen, wie sie beispielsweise bei der DNA-Replikation oder der Rekombination auftreten. Es kommt dabei unter Verbrauch von ATP zu einer kovalenten Bindung zwischen der 5'-Phosphatgruppe und der 3'-OH-Gruppe der Einzelstränge. Ligasen können aber auch zwei DNA-Fragmente ligieren. Schneidet man eine DNA mit einer Restriktionsendonuklease auf, so entsteht dabei ein Ende mit einer freien 5'-Phosphatgruppe und eines mit einer freien 3'-OH-Gruppe. Diese Enden können wieder religieren, wenn eine Ligase zugefügt wird. Das kann verhindert werden, indem man an den 5'-Enden eines solchen DNA-Moleküls die 5'-Phosphatgruppe abspaltet. Enzyme wie die alkalische Phosphatase werden für solche Dephosphorylierungen eingesetzt. Da die Ligase für die Verknüpfung ein freies 5'-Phosphatende benötigt, kommt eine Ligation jetzt nur dann

zustande, wenn ein Insert mit seinem freien 5'-Phosphatende mit dem Vektor verknüpft wird. Der Dephosphorylierungsansatz besteht aus:

Dephosphorylierungsansatz:

x	μl	Vektor-DNA
1	μl	Calf Intestinal Alkaline Phosphatase
2 x	μl	Aqua dest.

Die DNA wurde so für 1 h bei 37 °C inkubiert, bevor sie mittels Phenol:Chloroform:IAA gereinigt und unter Zugabe von 1/10 des Volumens 3M Natriumacetat (pH 5.2) und dem doppelten Volumen 97%-igem (v/v) Ethanol bei -20 °C wieder gefällt wurde. Die DNA wurde dafür bei 4 °C 20 min bei 14.000 rpm zentrifugiert und das Pellet mit 70%-igem (v/v) Ethanol gewaschen, bevor es getrocknet und in Aqua dest. wieder gelöst wurde. Grundsätzlich wurden Vektoren und Inserts, die für Ligationen eingesetzt wurden vorher auf Agarosegelen elektrophoretisch aufgetrennt und die entsprechenden Banden aus den Gelen unter UV-Licht ausgeschnitten. Für die Wiedergewinnung der DNAs aus der Gelmatrix wurde das QIAquick Gel Extraction-Kit (Quiagen, Hilden) verwendet. Für die Ligationen wurde die DNA-Ligase aus T4-Phagen-infizierten E. coli- Zellen benutzt, sie benötigt ATP als Kofaktor (MBI Fermentas Molecular Biology, St. Leon-Rot). Die Ligationsansätze wurden wie folgt zusammen pipettiert:

Ligationsansatz:

	20-50	ng	Vektor-DNA
	x	ng	Insert-DNA: molare Verhältnisse Insert: Vektor \cong 1:1 bis 10: 1
	1	μl	10 x Ligationspuffer
	1	U	T4-DNA-Ligase
ad	10	μl	Aqua dest.

Es wurden verschiedene Kontrollen mit angesetzt: In einem Ansatz ohne Insert und mit Ligase wird die Vollständigkeit der Dephosphorylierung des Vektors überprüft, wegen der fehlenden 5'-Phosphatgruppe können vollständig dephosphorylierte Vektoren nicht religieren. Ein Ansatz ohne Insert und ohne Ligase zeigt den Anteil des noch ungeschnittenen Vektors. Ein Kontrollansatz wurde ohne Insert, mit Ligase und mit der Polynukleotidkinase (MBI Fermentas Molecular Biology, St. Leon-Rot) angesetzt. Die PNK fügt ein 5'-Phosphatende an den Vektor an. Diese Positivkontrolle zeigt den Anteil an wieder dephosphoryliertem und religiertem

Vektor. Dies ist nur bei einfach geschnittenem Vektor möglich; bei einem Vektor der mit zwei Enzymen geschnitten wurde sollten bei dieser Kontrolle nur sehr wenige Kolonien erscheinen. Die Ligationsansätze wurden entweder 1-2 h bei RT oder über Nacht bei 4-12 °C inkubiert und damit dann kompetente Bakterien transformiert.

2.11.7 Polymerase-Ketten-Reaktion

Die "Polymerase Chain Reaction" PCR ist eine von Kary Mullis [155, 156] entwickelte Methode zur gezielten Amplifizierung von DNA-Sequenzen. Das Prinzip einer PCR besteht aus der sequentiellen Abfolge der folgenden Schritte: Denaturierung der DNA, Anlagerung der Primer und DNA-Synthese. Die DNA-Doppelstrangstruktur muß denaturiert werden, damit die zur DNA-Sequenz komplementären Oligonukleotide binden können, man spricht von der Primer-Anlagerung. Eine hitzestabile DNA-Polymerase benutzt diese Primer als Startpunkte für die Synthese der komplementären DNA-Stränge entlang der Matrize. Bei der nächsten Denaturierung werden die neu gebildeten Stränge wieder von der Matrize gelöst, so daß weitere Primermoleküle an ihre jeweiligen Positionen - auch an die neu gebildeten Stränge - binden können. Mit steigender Zahl der Zyklen wird so der Sequenzbereich zwischen den Zielsequenzen der Primer exponentiell amplifiziert.

Für PCRs bei denen mit dem Produkt nicht weitergearbeitet wurde wurde die Taq DNA Polymerase (MBI Fermentas Molecular Biology, St. Leon-Rot) verwendet. Diese thermostabile DNA-Polymerase stammt aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus* und synthetisiert die Synthese von DNA in 5' ⇒ 3' Richtung. Sie besitzt keine 3' ⇒ 5'-Exonukleaseaktivität und nur eine geringe 5' ⇒ 3'-Exonukleaseaktivität. Für Klonierungen wurde die Pfu Turbo® DNA-Polymerase (Stratagene GmbH, Heidelberg) verwendet. Dieses Enzym wurde aus dem Organismus *Pyrococcus furiosus* isoliert, es generiert glatte Enden und hat aufgrund seiner 3' ⇒ 5'-Exonukleaseaktivität eine sehr viel geringere Fehlerrate/Nukleotid (1.3×10^{-6}) als die Taq-Polymerase. Alle PCR-Reaktionen wurden nach dem folgenden Schema pipettiert:

1	µl	dNTPs (2'-Deoxynukleosid-5'-Triphosphat), 10 mM
5	µl	Sense-Primer, 10 pM
5	µl	Reverse-Primer, 10 pM
1-2	ng	DNA
1	U	Polymerase
5	µl	Puffer, 10 x; der Ansatz wurde mit Aqua dest. auf 50µl aufgefüllt.

Die PCR Reaktionen wurden in einem Taqman Robocycler durchgeführt.

PCR-Schritt mit Temperatur		Zeitdauer
Denaturierung	95 °C	3 min
Anlagerung der Primer	55 °C	1 min
Extension	72 °C	1 min
Denaturierung	95 °C	1 min

Tabelle 8: Beispiel für ein Standard-PCR-Programm, die Anlagerungstemperatur richtet sich dabei nach der Schmelztemperatur der eingesetzten Primer. Die Anzahl der Zyklen lag bei 25-33.

2.11.8 RT-PCR

Um die Expression der Konstrukte in transfizierten Zellen auf mRNA-Ebene nachzuweisen, wurde eine RT-PCR durchgeführt.

2.11.8.1 RNA-Isolierung

RNA wurde mittels des RNEasy Mini Kits (Quiagen, Hilden) aus Säugerzellen gemäß dem Mini Protocol for Isolation of Total RNA from Animal Cells (Spin Protocol) isoliert. Die Zellen werden in einem stark denaturierenden Puffer (Guanidinisothiocyanat) lysiert, was zu einer Inaktivierung von RNasen führt. Die Proben werden dann homogenisiert (Zentrifugation durch die QUIAshredder-Säulen), mit Ethanol versetzt und auf die RNeasy Säulen gegeben. Die RNA bindet an die Siliziumgelmembran, Verunreinigungen können durch Waschen entfernt werden. Um störende DNA aus der RNA-Präparation vollständig zu eliminieren wurde die RNA dreimal jeweils 30 min direkt auf der Säule mit DNase behandelt (ebenfalls gemäß Herstellerangaben). Die Konzentration wurde photometrisch bestimmt und die RNA bei -80 °C eingefroren.

2.11.8.2 RT-Reaktion und PCR

Die RNA wurde mit Hilfe der Omniskript Reverse Transkriptase (Quiagen, Hilden) in cDNA umgeschrieben. Die Omniskript Reverse Transkriptase erstellt eine cDNA von einer RNA-Matrize. Außerdem verfügt das Enzym über eine RNaseH Aktivität, die dafür sorgt, daß in den entstehenden RNA-DNA-Hybriden der RNA-Anteil abgebaut wird. Das Endprodukt der Reaktion ist einzelsträngige cDNA. Es wurde gemäß Herstellerangaben gearbeitet. Als Primer

wurde ein Oligo-dT Primer eingesetzt. Für die cDNA Synthese wurden jeweils 1 µg RNA eingesetzt.

Da die RT-Reaktion mit Oligo-dT Primern unspezifisch alle RNA Moleküle mit Poly-A-Bereich umschreibt, wurde in der nachfolgenden PCR ein Primer verwendet, der für gp130 spezifisch ist.

Die Reaktion wurde wie folgt angesetzt:

2	µl	cDNA (aus dem 20µl-Ansatz)
1	µl	dNTP's, 10 mM
5	µl	Reverse-Primer, CD130 revsi, 10pM
5	µl	Sense-Primer, CD130 sense, 10pM
3	µl	MgCl ₂ , 25 mM
5	µl	10 x Puffer mit (NH ₄) ₂ SO ₄
1	U	Taq-Polymerase, rekombinant
ad	50	µl Aqua dest.

Die Reaktionen wurden mit einem *Taqman*-Robocycler durchgeführt:

- 95 °C 5 min Denaturierung
- 55 °C 1 min Annealing
- 72 °C 1 min Extension
- 95 °C 1 min Denaturierung
- 72 °C 3 min letzte Extension

2.12 Zellbiologische Methoden

2.12.1 Zellkultur

Insofern nicht anders angegeben wurden alle Zellen in DMEM (1x) High Glucose (PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich, E15-843) /10 FCS (v/v) /60 mg/l Penicillin, sowie 100 mg/l Streptomycin bei 37 °C und 5% CO₂ in einer wasserdampfgesättigten Atmosphäre kultiviert. Entsprechend ihres Wachstums wurden die Zellen alle 3-5 Tage kokultiviert. Adhärente Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen und dann mittels Trypsin-EDTA von den Platten abgelöst.

Für die Gewinnung des WEHI-Kulturüberstandes wurden die WEHI-Zellen in Standardmedium ohne Mediumwechsel solange kultiviert bis das Medium einen deutlichen Farbumschlag rot→gelb zeigte [157]. Die Zellen wurden nun abzentrifugiert und der Überstand zweimal durch 0.45 µm Filter sterilisiert. Für die Kultivierung der IL-3 abhängigen BAF/3 Zellen wurden dem Standardmedium 10% (v/v) von diesem WEHI-Kulturüberstand zugefügt. Mit gp130 stabil transfizierte BAF/3 Zellen sind unabhängig von IL-3, benötigen dann jedoch IL6-sIL6R als essentiellen Wachstumsfaktor. Das Designerzytokin Hyper-IL-6 besteht aus IL-6 und dem löslichen IL-6R [153]. Es kann für die Stimulation von Zellen eingesetzt werden, die den IL-6R selbst nicht exprimieren. Entsprechend wurde das Standardmedium für die BAF/-WT-gp130 Zellen mit 10 ng/ml HIL-6 komplementiert.

In flüssigem Stickstoff gelagerte Zellen wurden schnell im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut und sofort mit 5 ml vorgewärmtem Standardmedium gewaschen bevor sie in 10 ml Standardmedium ausgesät wurden. Zum Einfrieren wurden ca. 5×10^6 Zellen in Einfriermedium (50% (v/v) FCS, 10% (v/v) DMSO, 40% (v/v) Standardmedium aufgenommen und in einer isolierten Box mehrere Stunden bei -20 °C vorgekühlt. Schließlich wurden die Zellen bei -80 °C über Nacht eingefroren und dann in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

Das verwendete L-Glutamin und die G418 Solution wurden von der Firma PAA bezogen. Hygromycin B stammt von Invitrogen Life Technologies (Karlsruhe), Puromycin von der Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen/ Schnellendorf).

2.12.2 Zelllinien

Verwendete Zelllinien:

Zelllinie	Ursprung	Kultivierung	Literatur
BAF/3	murine pre-B-Zellen, peripheres Blut	Standardmedium + 10% (v/v) WEHI- Kulturüberstand	[147]
BAF/3-WT- gp130	BAF/3 Zellen stabil transfiziert mit gp130	Standardmedium + 10 ng/ml HIL-6	[158]
Phönix-Eco	Prof. Klingmüller, DKFZ, Heidelberg	Standardmedium	[159]

Zelllinie	Ursprung	Kultivierung	Literatur
EcoPack2TM-293	HEK-293-Abkömmling, humane Niere, embryonal	Standardmedium	BD Biosciences
NIH-3T3	murin, Embryo	Standardmedium	ATCC*
HELA	human, Xervix, Adenokarzinom	Standardmedium	ATCC
WEHI-3B	murin, myelomonocytische Leukämiezellen	Standardmedium	ATCC
COS-7	Grüne Meerkatze (<i>Cercopithecus aethiops</i>), Nebennierenrinde	Standardmedium	ATCC
HepG2	human, hepatozelluläres Karzinom	Standardmedium	ATCC

Tabelle 9: Auflistung der verwendeten Zelllinien *ATCC: American Type Culture Collection, <http://www.lgcpromochem.com/atcc/>

2.12.3 Transfektion von Säugerzellen

2.12.3.1 Transiente Transfektion

Transiente Transfektionsmethoden haben den Vorteil, daß eine hohe Effizienz erreicht wird. Bis zu 100% der Zielzellen können transfiziert werden.

2.12.3.1.1 DEAE-Dextran: transiente Transfektion von COS 7- und HepG2-Zellen

Um die Auswirkungen der gp130 Konstrukte in Zellen zu testen, wurden eukaryotische Zellen transfiziert (COS-7, HepG2). Für die Transfektion von COS-7 Zellen wurden die Konstrukte in den p409 Vektor kloniert. Eine Besonderheit des p409-Vektors ist sein Replikationsursprung. Es handelt sich um den aus Affen stammenden *Simian Virus 40* (SV-40)-Replikationsursprung. Das Genom des Simian Virus-40 enthält zwei Gengruppen, die so genannten ‘frühen’ Gene werden zu Beginn des Infektionszyklus des Virus exprimiert und kodieren für zwei Proteine, die T-Antigene. Die ‘späten’ Gene kodieren für die Viruskapsidproteine. Im p409-Vektor ist die Gengruppe der frühen Gene durch die Fremd-DNA ersetzt, so daß kein T-Antigen gebildet werden kann. Die fehlende Funktion muß komplementiert werden. COS-7 Zellen haben in ihrem Genom diese fehlende Gengruppe, sie exprimieren das T-Antigenprotein konstitutiv. In Zellen die den Vektor aufgenommen haben bindet das T-Antigen an Sequenzen im SV-40-

Replikationsursprung und unterstützt durch die Aufwindung der DNA-Stränge die Replikation des Vektors und damit auch des Inserts. Es kommt so zu einer hohen Replikation und durch die Promotor-Enhancer-Region des humanen Cytomegalovirus (CMV) auch zu einer hohen Expression der eingeführten DNA.

Unter einer Transfektion versteht man das Einführen von Fremd-DNA in eukaryotische Zellen. Der Zusatz transient bedeutet, daß die aufgenommene DNA nicht in das Wirtszellgenom integriert wird. Da extrachromosomal keine Replikation des Plasmids möglich ist, geht sie im Laufe fortschreitender Zellteilungen und durch Abbau verloren. Es kommt aber in einer Zeitspanne von 48-72 h zu einer vorübergehenden sehr starken Expression des Fremdgenes, so daß die Effekte der heterologen Genexpression untersucht werden können.

Die zu transfizierenden Zellen wurden am Vortag so gesplittet, daß sie am Transfektionstag zu ca. 80% konfluent waren. Nach dem Absaugen des Kulturmediums wurden die Zellen mit Standardmedium versetzt, welchem 75 µM Chloroquin zugesetzt war. Die zu transfizierende DNA wurde wie unten beschrieben verdünnt. Das DEAE-Dextran wurde unter leichtem Schütteln langsam zu der Lösung getropft. Diethylaminoethyl (DEAE)-Dextran ist ein polykationisches Derivat von Dextran. Die hochmolekulare Zuckerverbindung bildet mit der Plasmid-DNA Komplexe. Von dem DEAE-Dextran wurden 4 mg/ml in PBS eingewogen und steril filtriert.

	5	µg	Plasmid-DNA (Plasmidmenge variabel)
	65	µl	Diethylaminoethyl (DEAE)-Dextran (4 mg/ml in PBS, sterilfiltriert)
ad	500	µl	Standardmedium + 75 µM Chloroquin

Die Zellen wurden so für 4-6 Stunden im Brutschrank inkubiert. Danach wurde das Medium abgesaugt und DMEM mit 10% (v/v) Dimethylsulfoxid (DMSO) zu den Zellen gegeben. Dieser DMSO-Schock wurde für 8 min bei RT durchgeführt, anschließend wurden die Zellen 1-2 x vorsichtig mit PBS gewaschen, bevor die Weiterkultivierung der Zellen in DMEM-Medium erfolgte. Das Lösungsmittel DMSO hat die Eigenschaft, lebende Gewebe und Membrane zu penetrieren ohne diese nachhaltig zu schädigen. Häufig wird es dazu verwendet, andere Komponenten mit zu transportieren. In diesem Fall sorgt es für den Transport der DNA-Zuckerkomplexe ins Zellinnere [160]. Am nächsten Tag wurde bei den so transfizierten Zellen das Medium gewechselt. Um die Transfektionseffizienz zu überprüfen wurden in jedem Experiment Zellen mit dem pEGFP-N1 (BD Clontech, Heidelberg) Plasmid transfiziert. Dieser Vektor enthält den Replikationsursprung SV40 und kodiert eine Variante des *green fluorescent protein* (GFP), das eGFP (e: *enhanced*). Das GFP Protein stammt aus der biolumineszenten

Qualle *Aequorea victoria* und ist ein stabiles Protein von 238 AS, das seine maximale Fluoreszenz bei einer Anregung mit Licht der Wellenlänge 450-490 nm hat [161]. Das Kontrollplasmid führt bei erfolgreicher Transfektion und Expression, unter entsprechender Belichtung zu einem grünen Fluoreszieren der Zellen (Emmissionsmaximum des EGFP: 507 nm). Um die Effizienz vergleichen zu können wurden von diesem Kontrollvektor und den anderen im Versuch verwendeten Vektoren die gleichen Mengen transfiziert.

10 x PBS (Phosphate-Buffered Saline):

	80	g	NaCl
	2	g	KCl
	4.4	g	Na ₂ HPO ₄ • 7H ₂ O
	2.4	g	KH ₂ PO ₄
ad	1	l	Aqua dest. Der pH-Wert wurde mit HCl auf 7.4 eingestellt.

2.12.3.1.2 ExGen: transiente Transfektion von HeLa-Zellen

Das Transfektionsreagens ExGen (MBI Fermentas Molecular Biology, St. Leon-Rot) ist das kationische Polymer Polyethylenimin. Es interagiert effektiv mit der DNA und mit Proteoglykanen auf der Zelloberfläche. Die Komplexe werden durch Endozytose aufgenommen. In der Zelle bewirkt die DNA/ExGen-Komplexe einen pH-Wert Ausgleich der Endosomen, was zu einer Auflösung der Vesikel führt. Die DNA Komplexe gelangen so ins Zytoplasma, bevor die Vesikel lysosomal abgebaut werden [162]. Für die Transfektion wurde das Medium von den Zellen abgesaugt und durch 1 ml frisches Medium ersetzt. Die Zellen wurden wieder in den Brutschrank gestellt, während die ExGen/DNA-Komplexe hergestellt wurden. Die Mengenangaben beziehen sich auf eine 6-Loch-Platte, pro Loch wurden 2 µg DNA eingesetzt: In einem Eppendorfgefäß wurden 260 µl NaCl mit 40µl der ExGen 500-Lösung gemischt. In einem zweiten Gefäß wurden 300 µl NaCl mit 12 µg des zu transfizierenden Plasmides, gemischt. Im nächsten Schritt wurde die Lösung aus dem ersten Gefäß (300 µl NaCl mit ExGen) zum Inhalt des zweiten Gefäßes (300 µl NaCl mit Plasmid) pipettiert. Die Reihenfolge ist hierbei unbedingt zu beachten. Die Lösungen wurden sofort gemischt und 15 min bei RT inkubiert. In dieser Zeit findet die Komplexbildung ExGen/DNA statt. Nun wurden pro Loch 100 µl der Transfektionslösung (ExGen/DNA in NaCl) tropfenweise hinzu pipettiert. Die Platte wurde vorsichtig geschwenkt um die Lösung besser zu verteilen und dann für 4-6 h im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Überstände abgesaugt und durch frisches Standardmedium ersetzt.

2.12.3.2 Stabile Transfektion

Bei einer stabilen Transfektion nehmen die Zielzellen das Transgen stabil in ihr Genom auf. Das hat den Vorteil einer konstanten Expression des fremden Gens. Die Information geht nicht wie bei transienten Methoden im Laufe mehrerer Zellteilungen verloren. Stabile Transfektionen erreichen allerdings nicht die Effizienz von transienten Transfektionen. Durch stabile Transfektionen werden 10^{-3} bis 10^{-7} Prozent der Zellen transfiziert. Die wenigen transfizierten Zellen können jedoch über die Expression von Antibiotikaresistenzgenen selektioniert werden. Die Resistenzgene werden neben dem Transgen von den transfizierten Vektoren kodiert.

2.12.3.2.1 Retrovirale Transfektion: stabile Transfektion von BAF/3 -Zellen

Die Methode der retroviralen Transfektion wird für Zellen eingesetzt die schwierig zu transfizieren sind. Man macht sich dabei eine Besonderheit aus dem Lebenszyklus der Reverse Transkriptase Onkoviren (Retroviren) zunutze: Retroviren integrieren im Laufe ihres Lebenszyklus ihr gesamtes aus RNA bestehendes Genom stabil in das Genom der Wirtszelle. In diesem Stadium wird das Virus auch als Provirus bezeichnet. Die einzige Aufgabe des Provirus ist die Replikation sämtlicher viraler Gene, was durch die Transkriptionsmaschinerie der Wirtszelle gewährleistet ist. Retroviren kodieren in der Regel nur wenige Gene. Essentiell sind die drei Gene *env*, *gag* und *pol*. Das als *envelope (env)* bezeichnete Hüllprotein ist wichtig für die Rezeptorerkennung des Virus und wird auf seiner Zelloberfläche exprimiert. Das *group-specific-antigene (gag)* kodiert das Kapsidprotein des Virus. Mit dem Kürzel *pol (polymerase)* wird das Gen für die reverse Transkriptase bezeichnet, die nach erfolgreicher Infektion die genomische virale RNA in zelluläre DNA umschreibt.

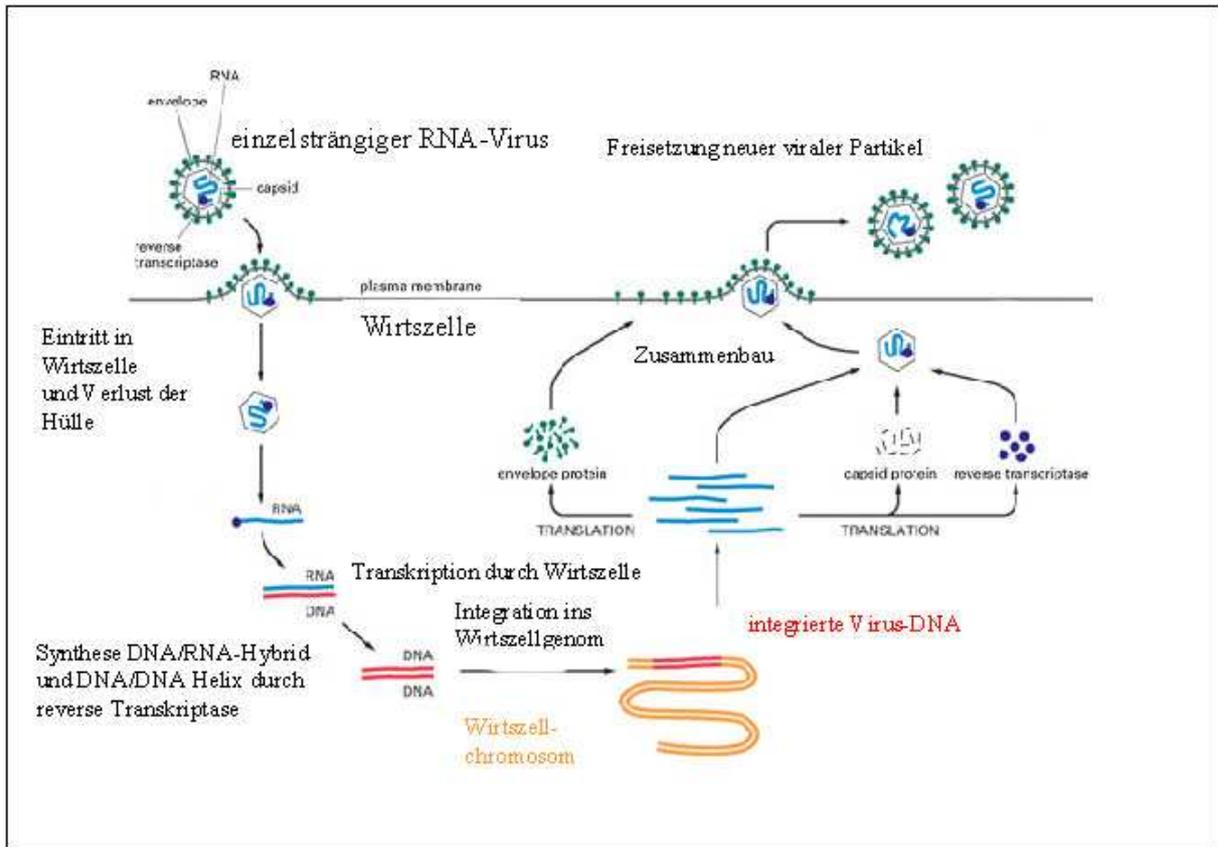


Abbildung 5: Der Lebenszyklus eines Retrovirus: nach Adsorption und Penetration gelangt der Virus durch rezeptorvermittelte Membranfusion in die Wirtszelle, wo sich zunächst seine Hüllproteine teilweise auflösen. Auch das Kapsid löst sich auf und entläßt die virale RNA ins Zytoplasma der Wirtszelle. Das virale Enzym reverse Transkriptase benutzt die virale RNA als Matrize und generiert einen cDNA Strang. Dabei werden die Bereiche R, U₅ und U₃ dupliziert und fusioniert man spricht dann von der *long terminal repeat* (LTR)-Region. Sie kommt ausschließlich in der DNA des Provirus vor. Die LTR enthält einen Enhancer- und Promotorbereich für die Transkription der viralen mRNA, sowie Polyadenylierungs- und Transkriptionsstoppsignale. Durch die RNaseH Aktivität der Polymerase wird anschließend der RNA-Teil des RNA-DNA-Hybrids verdaut, so daß der zweite Strang der cDNA gebildet werden kann. Die nukleäre Translokation und die Integration der doppelsträngigen cDNA in das Wirtszellgenom erfordert bei den meisten Retroviren eine Teilung der Wirtszelle. Die Barriere der Kernmembran muß überwunden werden. Eine virale Integrase katalysiert schließlich die Integration in ein Wirtszellchromosom, wobei aktiv transkribierte Bereiche des Genoms bevorzugt werden. Aufgrund ihres Promotors wird die virale Erbinformation bei weiteren Zellteilungen von der Transkriptionsmaschinerie der Wirtszelle transkribiert. Die virale RNA wird zum Teil translatiert, das ergibt die Proteine die für neue Viruspartikel notwendig sind (Hüllproteine, Kapsidprotein etc.) Zum Teil wird sie auch in neue Partikel verpackt. Ist der Zusammenbau neuer Viren im Zytoplasma abgeschlossen, verlassen die Viren die Wirtszelle durch Abknospung. Die endgültige Reifung erfolgt erst nach dem Verlassen der Wirtszelle durch eine Protease. Erst dann wird die reverse Transkriptase aktiviert, das reguliert die Menge an aktivem Enzym in einer Wirtszelle. So wird eine Mehrfachintegration von Virus-DNA in der gleichen Zelle vermieden

(Schema nach http://www.accessexcellence.org/AB/GG/retro_Life.html, Text sinngemäß nach „Basic Virology“, Herausgeber: E. Wagner und M. Martinez, Blackwell Science, Inc.).

Beim retroviralen Gentransfer werden zwei Komponenten verwendet, um ein Transgen in eine Zelle einzuschleusen. Der retrovirale Vektor enthält das Verpackungssignal ψ , sowie die 3' und 5' LTR-Regionen und ein Resistenzgen. In diesen Vektor wird das Transgen kloniert. Der Vektor enthält nicht die Gensequenzen für die Proteine die für die Verpackung der viralen

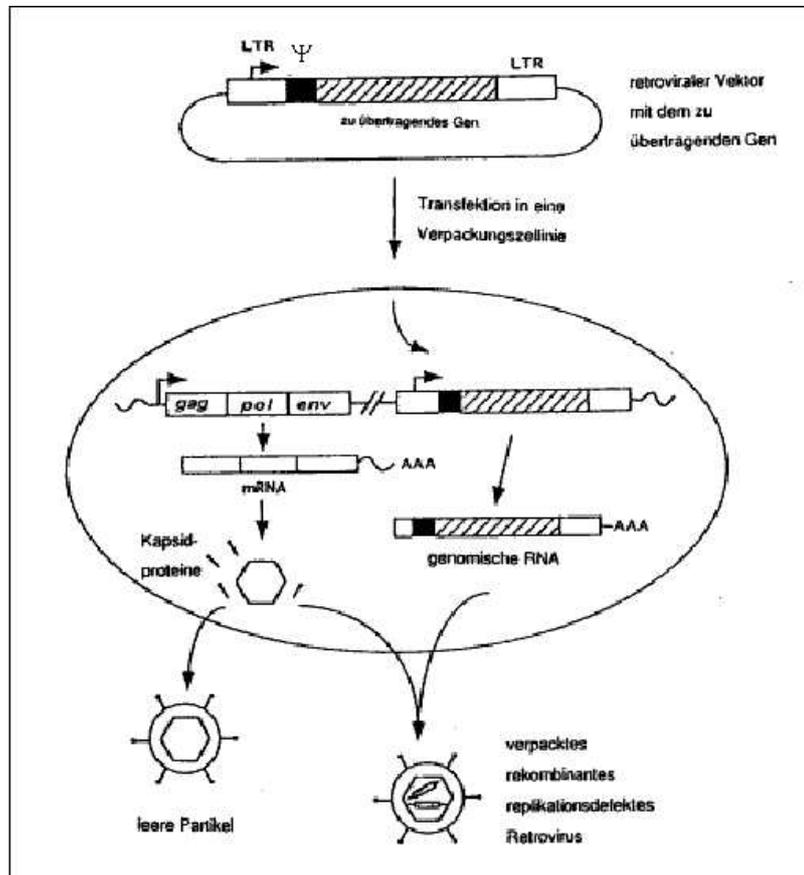


Abbildung 6: Das Prinzip der retroviralen Transfektion: Mit dem retroviralen Vektor, der das Transgen enthält, wird zunächst die Verpackungszelllinie transfiziert. Diese liefert aufgrund der von ihr kodierten viralen Hüllproteine komplette, aber replikationsdefiziente Virionen, die in den Überstand sezerniert werden. Mit dem Überstand werden die Zielzellen transduziert.
© Robert Koch-Institut, 1999-2001, <http://www.rki.de>

Erbinformation und des Transgens notwendig sind: *gag*, *pol* und *env*. Die Sequenzen, die für diese Proteine kodieren, sind stabil in Zellen transfiziert. Die entsprechenden Proteine werden von diesen sog. Verpackungszelllinien konstitutiv exprimiert. In den Verpackungszelllinien gibt es aber nicht das essentielle Verpackungssignal ψ . Nach der Transfektion der Verpackungszelllinie mit dem retroviralen Vektor werden von diesem Transkripte hergestellt. Diese werden sowohl translatiert als auch als genomische RNA in neue Virionen verpackt. Die Verpackungszelllinie entläßt also virale Partikel. Mit Hilfe dieser replikationsdefekten Virionen können nun die Zielzellen infiziert werden. Nach erfolgreicher Transduktion integriert sich die

virale DNA die das Transgen enthält in das Genom der Zielzelle. Dort werden das zu übertragende Gen sowie der Selektionsmarker exprimiert, so daß die Zellen selektioniert werden können.

2.12.3.2.1.1 Transfektion der Verpackungszelllinie

Für die Transfektion wurde die ekotrophe Verpackungszelllinie Phönix-Eco verwendet [163]. Ekotrophe virale Partikel können ausschließlich Zellen infizieren aus denen sie produziert wurden, im Fall der Phönix-Eco Zelllinie sind das Zellen aus Mäusen oder Ratten. Die Phönix-Eco Zellen wurden mittels der Calciumphosphat-Methode entsprechend den Herstellerangaben transfiziert (CalPhosTM Mammalian Transfection Kit, BD Biosciences Clontech, Palo Alto). 24 h vor der Transfektion wurden 8×10^5 Zellen in 2 ml Standardmedium kultiviert. Für die Transfektion wurden pro Loch einer 6-Loch-Platte jeweils 5 µg der folgenden Plasmide verwendet: pMOWS-Δ-gp130, pMOWS-L-gp130, pMOWS-WT-gp130 und pMOWS-GFP [150]. Die Transfektionslösung wurde nach 6 Stunden abgenommen und durch jeweils 2 ml IMDM Medium (Gibco, 31980) + 30% (v/v) FCS + 50 µM β-Mercaptoethanol + Penicillin-Streptomycin ersetzt. Nach 24 Stunden wurde der retrovirale Überstand abgenommen und durch Zellulosemischesterfilter (0.45µm, Roth, Karlsruhe) gefiltert. Die retroviralen Überstände wurden sofort zur Infektion der Zielzellen eingesetzt oder bei -80 °C eingefroren.

2.12.3.2.1.2 Transduktion der Zielzellen

Die Transduktion wurde mittels Spinokulation durchgeführt [164]. Die Zielzellen wurden 12-18 h vor der Transfektion so gesplittet, daß sie sich am Tag der Infektion in einer stoffwechselaktiven Wachstumsphase befanden. 1×10^5 BAF/3 Zellen wurden in 50 µl Standardmedium resuspendiert und mit 250 µl des retroviralen Überstandes gemischt. Um die Infektionseffizienz zu erhöhen wurde dem Infektionsmedium 8 µg/ml Polybren zugefügt. Polybren ist ein positiv geladenes Polymer, dessen kleine Moleküle an die Oberfläche von Zellen binden und deren Oberflächenspannung neutralisieren. Virale Glykoproteine können darauf hin effektiver an ihre Rezeptoren binden. Die Transduktion der NIH-3T3 Zellen erfolgte durch zentrifugieren bei 300 rpm für 2 h bei 20 °C bzw. bei 1800 rpm für 2 Stunden bei 37 °C für die BAF/3 Zellen [164]. Nun wurde das Infektionsmedium abgenommen und durch Standardmedium (im Falle der BAF/3 Zellen mit 10% (v/v) WEHI supplementiert) ersetzt.

2.12.3.2.1.3 Selektion

Nach 48 h wurde die Selektion mit 1.5 µg/ml Puromycin (Sigma, P-7255) gestartet. Damit die Zellen in den Platten nicht zu dicht wachsen wurden sie 48 h später gesplittet und mittels FACS-Analyse der Prozentsatz der erfolgreich mit GFP transfizierten Zellen ermittelt. Am dritten Tag nach Beginn der Selektion wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen, um alle im Medium vorhandenen Zytokine zu entfernen. Die BAF/3 Zellen die mit dem Wildtyp gp130-Plasmid transfiziert worden waren wurden ohne WEHI aber mit 10 ng/ml HIL-6 selektioniert. BAF/3 Zellen die mit Δ-gp130 und L-gp130 transfiziert worden waren wurden ohne WEHI und ohne sonstige Zytokine ausgesät. Die mikroskopische Auswertung der Ansätze erfolgte mittels eines Axiovert 200 Mikroskopes (Carl Zeiss, Göttingen).

2.12.4 Proliferationstest

Die BAF/3, BAF/3-WT-gp130 und BAF/3-L-gp130 Zellen wurden dreimal mit PBS gewaschen um im Medium vorhandene Zytokine zu entfernen und anschließend gezählt. Pro Loch einer 96 Loch-Platte wurden 3000-5000 Zellen ausgesät. Als Negativkontrolle wurden native BAF/3 Zellen ohne Zytokin ausgesät. Ohne den essentiellen Wachstumsfaktor IL-3 sterben diese Zellen. Als Positivkontrolle wurden BAF/3-WT-gp130-Zellen mit dem Designerzytokin HIL-6 ausgesät. Zellen dieser Linie sind stabil mit gp130 transfiziert und wachsen unabhängig von IL-3. Sie sind stattdessen abhängig von IL-6/sIL-6R bzw. von HIL-6. Die BAF/3-L-gp130 Zellen wurden ebenfalls ohne Zytokin, bzw. mit WEHI oder HIL-6 als Kontrolle ausgesät. Die Platten wurden so drei bis fünf Tage im Brutschrank inkubiert. Nun wurden 0.25 µCi /Loch [³H]-Methyl-Thymidin dazu pipettiert und die Zellen so über einen Zeitraum von 4 h im Brutschrank inkubiert. Die Zellen wurden in einem Cell Harvester (Inotech, Dottikon, Schweiz) auf Glasfaserfilter (Printed Filtermat A, Wallac, Turku, Finnland) geerntet. Diese Glasfaserfilter wurden in Szintillatorflüssigkeit (Betaplate 1450 Scint, Wallac, Turku, Finnland) getränkt und der Thymidineinbau in einem Liquid Scintillation & Luminescence Counter 1450 Microbeta (Wallac, Turku, Finnland) gemessen.

2.12.5 Biotinylierung von Oberflächenproteinen

COS-7 Zellen wurden mittels der DEAE-Dextran Methode mit jeweils 5 µg der folgenden Plasmide transfiziert: Δ-gp130-p409, L-gp130-p409 und WT-gp130-pSVL. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen viermal mit eiskaltem PBS gewaschen. Für die

Oberflächenmarkierung wurde der Biotinester LC-Sulfo-NHS-(+)-Biotin von Pierce verwendet. Es handelt sich hierbei um ein wasserlösliches, zellimpermeables Biotin-Analogon das daher selektiv mit Proteinen reagiert, die auf der Zelloberfläche lokalisiert sind. Das Sulfosuccinimidyl-6-(biotin-amido)hexanoat reagiert mit primären Aminen, auch solchen aus Pufferlösungen. Das Waschen der Zellen vor der Markierungsreaktion ist wichtig um störende Amine aus dem Medium zu entfernen.

Von dem LC-Sulfo-NHS-(+)-Biotin wurden 10 mg/ml in DMSO gelöst und von dieser Lösung 25 μ l in 5 ml PBS verdünnt. Jede Kulturschale mit Zellen wurde mit 5 ml Lösung für 15 min bei RT auf einem Schüttler inkubiert. Aminhaltige Puffer inhibieren den Biotinylierungsprozeß, daher wurden die

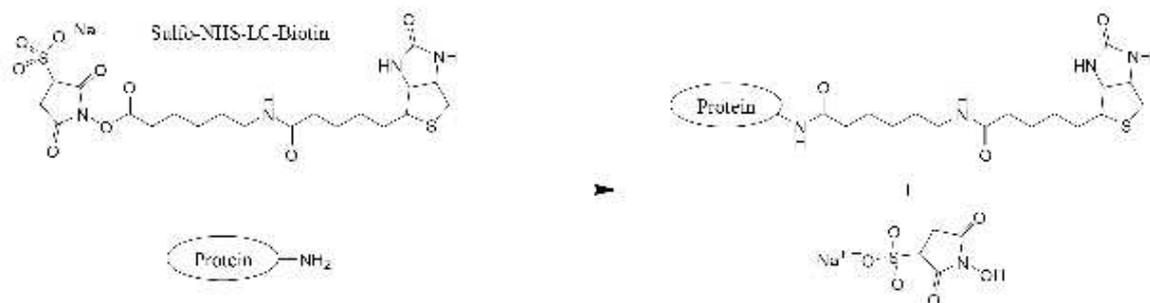


Abbildung 7: Reaktion des Sulfo-NHS-LC-Biotins mit dem primären Amin eines Proteins. Die Reaktion findet bei einem pH-Wert von 7-9 statt, es entstehen stabile Amidbindungen. Der Abstand zwischen zwei Proteinen, der mit dem Sulfo-NHS-LC-Biotin überbrückt werden kann, beträgt 22.4 Å.

Platten anschließend mit 1 ml 50 mM NH_4Cl für 10 min inkubiert, um die Reaktion abzustoppen. Um nicht eingebaute Biotinmoleküle und das Nebenprodukt Sulfo-NHS zu entfernen, wurden die Zellen mit PBS gewaschen, lysiert und eingefroren. Die Zellysate wurden bei 4 °C aufgetaut, 15 min abzentrifugiert und der Überstand mit den folgenden Antikörpern über Nacht bei 4 °C inkubiert:

untransfizierte Probe:	α -FlagM2 (10 μ g) und BS12 (3 μ g)
Δ -gp130- transfizierte Probe:	α -FlagM2 (10 μ g)
L-gp130- transfizierte Probe:	α -FlagM2 (10 μ g)
WT-gp130 -transfizierte Probe:	BS12 (3 μ g)

Am nächsten Tag wurden jeweils 30 µl Protein-A-Sepharose (gp130-transfizierte Probe) bzw. Protein A/G-Sepharose (Oncogene Research Products, Boston MA) (alle anderen Proben) hinzugegeben und bei 4 °C für 4 Stunden auf einem über Kopf Schüttler inkubiert. Die Sepharosepellets wurden zweimal mit NP-40-haltigem und einmal mit detergensfreiem Lysispuffer gewaschen, mit 15 µl Lämmli-puffer versetzt und bei 95 °C 10 min erhitzt. Die Proben wurden auf einem 10%-igen (w/v) SDS-Gel elektrophoretisch aufgetrennt und die Proteine bei 25 Volt in 75 min auf eine PVDF-Membran transferiert. Der Western Blot wurde in 5% (w/v) Milchpulver/TBS über Nacht geblockt. Das Protein Streptavidin (60 kDa) bindet pro Tetramer 4 Moleküle des extrem kleinen (244 Da) Biotins. Die nicht kovalente Interaktion zwischen Biotin und Streptavidin ist sehr spezifisch und die stärkste nicht kovalente Bindung die bekannt ist ($K_A \sim 10^{14} \text{M}^{-1}$). Das verwendete Streptavidin ist mit einer Peroxidase (POD) gekoppelt. Es wurde in Blockierlösung 1:5000 verdünnt und der Blot damit 1 h bei RT inkubiert. Nach dieser Inkubation wurde der Blot dreimal in TBS gewaschen und mit dem ECL-Chemilumineszenz Kit (Amersham) entwickelt. Der Chemilumineszenznachweis beruht auf der Reaktion zwischen der Peroxidase und dem Lumigen PS-3 Acridan. Die Oxidation resultiert in einem Acridiniumester und einer Chemilumineszenz mit einer Emissionswellenlänge von 430 nm. Das emittierte Licht wurde mit einer CCD Kamera (Fujifilm LAS1000) gemessen.

2.13 Biochemische Methoden

2.13.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Mit der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese werden Proteingemische unter denaturierenden Bedingungen aufgetrennt. Das anionische Detergens SDS wirkt stark proteindenaturierend. Indem es in einem konstanten Verhältnis von 1.4 g SDS: 1g Protein an Proteine bindet, maskiert es deren Ladung. Die Mobilität von Proteinen im SDS-Gel ist dabei linear mit dem Logarithmus ihrer molaren Masse korreliert. Vor dem Auftragen wurden die Proteinproben mit 2 x Lämmli-puffer versetzt und für 10 min bei 95 °C erhitzt. Das Mercaptoethanol des Lämmli-puffers führt zur Disulfidbrückenspaltung und bewirkt zusammen mit der Erwärmung eine Denaturierung der Proteine. Ein SDS-Gel enthält folgende Komponenten: Polyacrylamid (30% Acrylamid (w/v) und 0.8% Bisacrylamid (w/v)), Tetramethylethyldiamin (TEMED) ist ein organisches Amin, das die Radikalbildung initiiert. Weiterhin Ammoniumpersulfat (APS), es liefert die Startradikale die für die Polymerisationsreaktion nötig sind und SDS. Die rekombinanten Proteine wurden auf 4-7%-igen

(v/v) Sammelgelen und 10-12%-igen (v/v) Trenngelen aufgetrennt. Als Größenstandard wurde der RainbowMarker (Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden) 10-250 kDa und der Prestained Protein Molecular Weight Marker (MBI Fermentas Molecular Biology, St. Leon-Rot) 19-118 kDa verwendet. Die Elektrophorese erfolgte bei 150 Volt für 1 h in 1 x Elektrophoresepuffer.

10 x SDS-PAGE –Puffer:

1.92	M	Glycin
0.25	M	Tris-Base
1	%	SDS (w/v)

2 x Lämmli-Puffer:

100	mM	Tris/HCl, pH 6.8
200	mM	Dithiothreitol
4	%	SDS (w/v)
0.2	%	Bromphenoblau (w/v)
20	%	Glycerin (v/v)
10	%	2-Mercaptoethanol (v/v)

Sammelgel 7.5% (v/v):

3.3	ml	Aqua dest.
1.7	ml	0.5 M Tris, pH 6.8
1.7	µl	Polyacrylamid
66.7	µl	10% SDS (w/v)
66.7	µl	APS
6.7	µl	TEMED

Trenngel 10% (v/v):

5.9	ml	Aqua dest.
3.8	ml	1.5 M Tris, pH 8.8
5	ml	Polyacrylamid
150	µl	SDS 10% (w/v)
150	µl	APS
6	µl	TEMED

Trenngel 12.5% (v/v):

7.5	ml	Aqua dest.
6	ml	1.5 M Tris, pH 8.8
10	ml	Polyacrylamid
240	µl	SDS 10% (w/v)
240	µl	APS
12	µl	TEMED

Die Mengenangaben sind ausreichend für zwei BioRad-Gele 8 x 5.5 cm, 0.75 mm.

2.13.2 Proteinfärbungen

Die auf den SDS-Gelen aufgetrennten Proteine können durch verschiedene Färbemethoden sichtbar gemacht werden.

2.13.2.1 Silberfärbung

Mit einer Silberfärbung können Proteinmengen von 1-10 ng/Bande angefärbt werden. Die Gele wurden dazu für 5 min in Fixierer I und anschließend 5 min in Fixierer II geschwenkt und dann zweimal mit 60 °C warmem Aqua dest. gewaschen. Für 30 s wurden sie dann in die Reduktionslösung gelegt und anschließend sechsmal mit Aqua dest. gewaschen. In der Färbelösung verblieben die Gele anschließend 12 min, bevor sie wieder in Aqua dest. gewaschen wurden. In der Entwicklerlösung wurden die Gele solange geschwenkt, bis die Proteinbanden gut sichtbar waren. Der Färbeprozess wurde durch die Zugabe von Essigsäure gestoppt.

Fixierer I:

40 % Methanol (v/v)
10 % Essigsäure (v/v)

Fixierer II:

10 % Ethanol (v/v)
15 % Essigsäure (v/v)

Reduktionslösung:

0.4 g Farmerscher Abschwächer (50-90% (w/v) Natriumthiosulfat, 25-50% (w/v) Kaliumhexacyanoferrat (III), 1-5% Calgon (w/v), 1-5% Natriumcarbonat (w/v))
ad 100 ml Aqua dest.

Färbelösung:

0.2 g Silbernitrat
ad 100 ml Aqua dest.

Entwickler:

14.5 g Natriumcarbonat
500 µl Formaldehyd(37%)
ad 500 ml Aqua dest.

Stopplösung:

7 % Essigsäure (v/v)

2.13.2.2 Coomassiefärbung

Coomassiefärbungen sind weniger sensitiv als Silberfärbungen, es können Proteinmengen von etwa 100 ng/Bande angefärbt werden. Die Proteine sind durch die Denaturierung im Gel fixiert und bilden in der sauren Färbelösung Komplexe mit dem Farbstoff. Die Gele wurden für 20 min in der Coomassielösung geschwenkt und dann so lange in die Entfärberlösung gelegt, bis die blauen Proteinbanden gut sichtbar waren.

Coomassielösung:

50	%	Methanol (v/v)
10	%	Essigsäure (v/v)
0.1	%	Coomassie Blau G 250 (w/v)

Entfärberlösung:

50	%	Methanol (v/v)
10	%	Essigsäure (v/v)

2.13.3 Western-Blotting

In einem Western-Blot wurden die elektrophoretisch aufgetrennten Proteine aus der Gelmatrix auf eine Polyvinylidendifluoridmembran mit einer Porenweite von 0.2 µm (PVDF) (Machery-Nagel, Düren) übertragen. Auf der Membran adsorbierte Proteine sind dann für hochmolekulare Liganden wie zum Beispiel Antikörper frei zugänglich. Für den Elektrobplot wurde die auf Gelgröße zurechtgeschnittene PVDF-Membran 2 min in Methanol, 2 min in Aqua dest. und schließlich 2 min in den Transferpuffer präinkubiert. Auf die Blotting-Apparatur wurden 3 Lagen Filterpapier, die Membran, das Gel und abschließend nochmals 3 Lagen Filterpapier luftblasenfrei übereinander gestapelt. Das Blotten erfolgte je nach Gelgröße mit 15-20 Volt für 80 min.

10 x Transferpuffer:

249	mM	Trisbase
1.9	M	Glycin

Dem einfachen Transferpuffer wurden vor Gebrauch noch 20% (v/v) Methanol zugesetzt.

2.13.4 „Strippen“ von Membranen

Die Membran wurde bei 70 °C 30 min mit Strippingpuffer inkubiert und dabei gelegentlich geschüttelt. Im Anschluß wurde die Membran mit einem großen Puffervolumen, viermal 10 min mit TBST-Puffer gewaschen und dann erneut 1 h bei RT blockiert.

„Stripping“-Puffer für Hybond-P Membran:

100	mM	2-β-Mercaptoethanol
2	%	SDS (w/v)
62.5	mM	Tris pH 6.7

2.13.5 Indirekte Immundetektion

Die PVDF-Membranen mit den transferierten Proteinen wurden für die indirekten Immundetektionen eingesetzt. Dabei erfolgt ein Nachweis der Proteine durch spezifische Antikörper. In der indirekten Immundetektion wird noch ein zweiter Antikörper eingesetzt, der gegen die Spezies gerichtet ist, aus der der Erstantikörper stammt. Dieser Zweitantikörper ist peroxidasegekoppelt und bindet an den Erstantikörper. Für den Nachweis der Peroxidase wurde das Chemilumineszenz Detektionskit ECL Plus verwendet (Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg). So werden die Antikörper-Antigen-Komplexe auf der Membran sichtbar. Überall dort wo sich keine Antigen-Antikörper-Komplexe befinden gibt es auf der Membran unspezifische Bindungsstellen. Um eine hohe Hintergrundfärbung auszuschließen müssen diese freien Stellen auf den Membranen geblockt werden. Die Membranen wurden dazu über Nacht bei 4 °C oder 1 h bei Raumtemperatur in der Blockierlösung geschwenkt. Anschließend wurden die jeweiligen Antikörper in Blockierlösung verdünnt zu den Membranen gegeben. Die Membranen wurden so über Nacht bei 4 °C inkubiert und dann 3 x mit TBS-Tween (TBST) gewaschen. Die Inkubation mit dem Zweitantikörper erfolgte für 1 Stunde bei RT in lichtgeschützten Gefäßen (Verdünnung 1:5000 bis 1:10000). Die Membranen wurden anschließend dreimal für 5 min in TBST und zweimal in TBS gewaschen. Für die Entwicklung der Blots wurden diese mit der ECL-Plus-Lösung überschichtet (2 ml Lösung A + 50µl Lösung B), 5 min inkubiert und dann zwischen zwei Lagen Filterpapier abgetrocknet. Die Auswertung der Signale erfolgte mittels einer CCD-Kamera (Fujifilm LAS1000).

Blockierlösung und Antikörper-Verdünnungspuffer:

5 % Magermilchpulver (w/v)

0.02 % Tween-20 (v/v)

10 x TBS:

24.2 g Tris-Base

80 g NaCl

ad 1 l Aqua dest. Der pH –Wert wurde auf 7.6 eingestellt.

Waschpuffer TBST:

1 x TBS

0.1 % Tween 20 (v/v)

2.13.6 Metabolische Markierung der Proteine

Um die Proteine Δ -gp130 und L-gp130 aus transfizierten COS 7-Zellen nachzuweisen, wurde eine Immunpräzipitation durchgeführt. Dazu wurden die Zellen für 30 min in 5 ml/Platte Mangelmedium inkubiert. Dem Mangelmedium fehlten die für die Proteinsynthese essentiellen schwefelhaltigen Aminosäuren Cystein und Methionin. In der Markierungsphase wurde den Zellen über einen Zeitraum von 2 h 50 μ Ci/ml 35 S-Methionin und 35 S-Cystein angeboten. Während dieser Inkubationsphase bauen die Zellen die benötigten, markierten Aminosäuren in alle neu synthetisierten Proteine ein. Dann wurde das radioaktive Medium abgenommen und durch Medium welches mit 0.5% (v/v) FCS versetzt war ersetzt. So wurden die Zellen für weitere 2 h im Brutschrank inkubiert. Alle cystein- und methioninhaltigen Proteine wurden so metabolisch markiert.

Mangelmedium:

MEM (Eagel' s Minimal Essential Medium)

+126 mg/l L-Arginin

+1 g/l Glucose

+292 mg/l L-Glutamin

+3 mg/l i-Inositol

+52 mg/l L-Leucin

2.13.7 Immunpräzipitation

Die markierten Zellen wurden mit PBS gewaschen und mit Hilfe von 3 ml/Platte Lysispuffer durch mehrfaches auf- und abpipettieren lysiert. Die Lösung wurde dann 30 min bei 4 °C über Kopf geschüttelt und 20 min bei 13.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Mit dem Überstand wurde weitergearbeitet. Ab diesem Schritt wurde nur mit 1 ml des Lysates weitergearbeitet. Vor der Zugabe des Antikörpers wurden die Proben mit Pansorbin inkubiert. Pansorbin ist ungereinigtes Protein-A, an das alle unspezifisch an die Protein-A-Sepharose bindenden Proteine binden. Das Pansorbin wurde vor Gebrauch je zweimal mit TNET und PBS gewaschen. Die Lösung wurde bei 4 °C 1 h oder über Nacht auf einem über-Kopf-Schüttler inkubiert und dann zweimal 10 min bei 13.000 rpm bei 4 °C abzentrifugiert. Am nächsten Tag wurden 2 µg/ml Lysat der Antikörper sc655 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Heidelberg) dazugegeben. Dieser polyklonale Antikörper erkennt spezifisch die Aminosäuren 896-915 von gp130 der Spezies Mensch, Maus und Ratte. Diese Mischung wurde über Kopf, wieder bei 4 °C mindestens 2 h oder über Nacht geschüttelt. Dann erfolgte die Zugabe der Protein-A-Sepharose: je 1 ml Aliquot wurden 50 µl Sepharose dazugegeben. Das bakterielle Zellwandprotein Protein-A erkennt die Fc-Region vieler Antikörper, wenn diese an ihr Antigen gebunden vorliegen. Die Protein-A-Sepharose wurde vor ihrer Verwendung folgendermaßen vorbereitet: 5 mg Protein-A-Sepharose wurden in 100 ml TNET für mindestens 30 min vorgequollen und dann bei 4 °C aufbewahrt. Anschließend wurde die Sepharose je 2 x mit TNET und PBS gewaschen. Die Inkubationsphase des Antigen-Antikörper-Gemisches mit der Protein-A-Sepharose dauerte mindestens 1 h, meist jedoch über Nacht bei 4 °C. Die Proben wurden dann 2 min bei 13.000 rpm und RT zentrifugiert und die Sepharosepellets zweimal mit TNET-Puffer, sowie zweimal mit PBS gewaschen. Mit Hilfe einer Mikropipette (Hamilton Company Reno, Nevada) wurde die Restflüssigkeit aus den Proben entfernt und die Sepharose-Pellets mit je 10-20 µl Lämmli-puffer versetzt. Das führt zur Lösung der nicht kovalenten Bindungen zwischen der Sepharose und dem Protein-Antikörperkomplex. Die Proben wurden dafür 10 min bei 95 °C erhitzt. Die im Überstand befindlichen markierten Proteine wurden auf einem 12.5%-igen (v/v) SDS-Gel aufgetrennt. Das Gel wurde anschließend 30 min in Fixierer (Isopropanol:Wasser:Essigsäure = 25: 65: 10) gewaschen und danach für eine 1 h in der fluorographischen Intensivierlösung Amplify (Amersham, Uppsala, Schweden) gelegt. Der Transfer der emittierten Energie zum Film ist bei schwachen β -Strahlern ineffizient. Durch das Polyacrylamidgel wird ein Teil der emittierten Energie absorbiert. Bringt man die Probe aber in direkten Kontakt mit einem organischen oder anorganischen Szintillator kann dieses Problem umgangen werden (z. B. Amplify). Der Szintillator wird durch die β -Strahlen angeregt und gibt

die Energie in Form von Lichtenergie wieder ab Das Gel wurde danach auf Filterpapier 1 h bei 65 °C getrocknet. Die Exposition der BIOMAX MS-Röntgenfilme (Kodak, Amersham Biosciences, Freiburg) erfolgte in einer Röntgenkassette über Nacht bei -80 °C.

Lysispuffer:

50	mM	Tris-HCl, pH 7.5
100	mM	NaCl
50	mM	Na-F
3	mM	Na-Orthovanad
1	ml	Brij 96

Je 20 ml Lysispuffer wurden noch 40µl einer Proteinase-Inhibitoren-Lösung zugegeben (Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets, 1 Tablette wird in 2 ml Aqua dest. gelöst, Roche Diagnostics, Mannheim).

TNET-Puffer:

20	mM	Tris-HCl pH 7.5
140	mM	NaCl
5	mM	EDTA
1	%	Triton X 100 (v/v)
2	mM	Methionin
0.01	%	Na-Azid (w/v)

2.13.8 Luziferasetest

Das verwendete Luziferase-Reporter-Konstrukt beinhaltet drei Kopien der STAT3 Konsensus Bindungsstelle aus dem *c-fos*-Gen. Dieses *sis-inducible-element* (SIEM) hat die folgende Sequenz: 5' – CATTCCCGTAAATC TTGTCG - 3'. 3' von dieser Bindungsstelle befindet sich ein Thymidinkinase Minimal-Promotor der die Expression des Luziferasegens aus *Photinus pyralis* steuert. Mit Hilfe dieses Konstruktes kann gemessen werden ob und wie viel aktiviertes STAT3 in einem Zellysat vorhanden ist. Nur im phosphorylierten also aktiven Zustand können STAT3 Moleküle dimerisieren, an die SIEM-Sequenz binden, den Promotor aktivieren und so die Expression des Luziferasegens auslösen. Für den Versuch wurde das Dual-Luziferase Reporter System von Promega verwendet. In diesem System werden die Aktivitäten von zwei

Enzymen bestimmt. Neben der Messung der Luziferase von *Photinus pyralis* die bei 560 nm emittiert wird auch die Luziferase von *Renilla reniformis* gemessen. Die Renillaluziferase emittiert Licht bei 482 nm. Die beiden Enzyme haben unterschiedliche Strukturen und Substrate.



Abbildung 8: Schema des verwendeten Luziferase-Reporter-Konstruktes: hinter der Siem-Bindestelle liegt der Promotor der die Expression der Luziferase steuert.

Die Bestimmung der Renillaluziferase wird wie vom Hersteller beschrieben für jede Probe direkt im Anschluß an die Photinusluziferase gemessen und bietet eine interne Kontrolle. Normalisiert man die Aktivität des Reportergens gegen die Aktivität dieser internen Kontrolle, können experimentelle Schwankungen wie unterschiedliche Transfektionseffizienzen, nicht vollständige Zellyse, Pipettierfehler usw. weitgehend eliminiert werden.

Die Luziferase von *Photinus pyralis* ist ein 61 kDa Protein das keine posttranslationale Prozessierung durchläuft. Die Photonenemission erfolgt durch Oxidation des Luziferins in einer ATP, Mg^{2+} und O_2 abhängigen Reaktion hin zum Oxyluziferin. Sobald das Enzym mit dem Substrat gemischt wird erfolgt eine Lichtemission, die sehr schnell abnimmt.

Die Renillaluziferase ist ein 36 kDa Protein und kann ebenfalls als genetischer Reporter direkt nach der Translation verwendet werden. In dieser Reaktion wird Coelenterazin unter Mitwirkung von O_2 zu Coelenteramid umgesetzt. Als Renillasegen wurde das Plasmid pRL-TK verwendet. Dieser Vektor gewährleistet mit dem Herpes Simplex Virus Thymidinkinase-Promotor eine niedrige aber konstitutive Expression des nachgeschalteten Renilla-Luziferasegens.

Die HepG2 Zellen wurden in 6-Loch-Platten am Vortag so ausgesät daß sie am Tag der Transfektion eine Konfluenz von 70% hatten. Die Transfektion erfolgte mittels der DEAE-Dextran Methode. Folgende Mengen und Kombinationen an Plasmiden wurden transfiziert:

5 μ g SIEM-Luc + 500 ng pRL-TK: jeweils mit und ohne Stimulation mit IL-6.

5 μ g SIEM-Luc + 500 ng pRL-TK + 5 μ g Δ gp130- pIRES-CG: ohne Stimulation.

5 μ g SIEM-Luc + 500 ng pRL-TK + 5 μ g L-gp130- pIRES-CG: ohne Stimulation.

Untransfizierte Zellen: jeweils mit und ohne Stimulation mit IL-6.

Die Menge des pRL-TK-Konstruktes wurde minimiert um mögliche negative Effekte zwischen den Promotoren der verschiedenen Plasmide gering zu halten. Nach 48 h wurden die Zellen mit PBS gewaschen und für 2 Tage in serumfreiem Standardmedium kultiviert. Die Stimulation der Kontrollansätze erfolgte mit 50 ng/ml IL-6 für 15-18 h. Danach wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und dann pro Loch mit 100 µl des Passiv-Lysis-Puffers bei RT in 15 min auf einem Schüttler lysiert und mit einem Gummischaber abgekratzt. Der Lysepuffer wurde von Promega entwickelt, um störende Eigenlumineszenz von Pufferkomponenten zu minimieren. Die Lysate wurden bei -20 °C eingefroren und innerhalb der nächsten vier Wochen gemessen. Ein wiederholtes auftauen und einfrieren der Proben muß vermieden werden. Die Luziferase und Renillase-Aktivitäten wurden in 75 x 12 mm Röhrchen (Sarstedt, Nürnbrecht) in einem Luminometer gemessen. Das Gerät integriert die totale Lichtemission über einen Zeitraum von 10 s. Dabei wurden zu 100 µl LARII Reagenz 20 µl Zellysate gegeben, schnell gemischt und sofort die Photinus-Luziferase-Aktivität gemessen. Durch die Zugabe von 100 µl Stop & Glow Lösung wurde die Photinus Lumineszenz abgestoppt und die Renilla-Luziferase aktiviert und gemessen. Alle Messwerte sind Doppelwerte. Die Aktivität wird angegeben in Relativen Luziferase Einheiten (RLU); diese ist definiert als der Quotient aus der Photinus-Luziferase-Aktivität durch die Renilla-Luziferase-Aktivität multipliziert mit dem Faktor 10^4 , um den so erhaltenen Wert wieder an die ursprünglichen Luziferasewerte anzugleichen. Jedes Reportergenexperiment wurde mindestens fünfmal unabhängig wiederholt und die Daten sind als Mittelwert mit Standardabweichung angegeben.

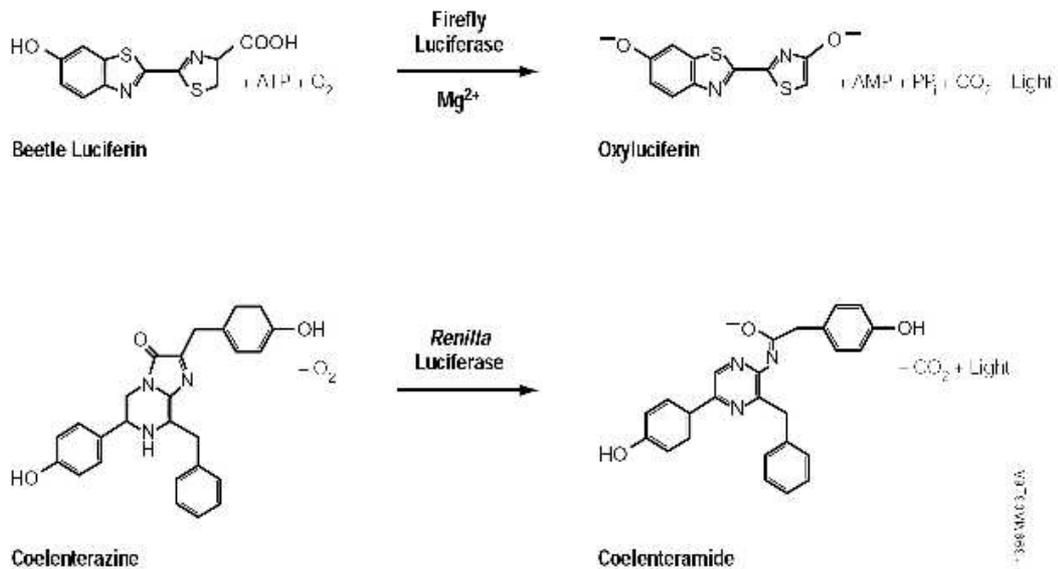


Abbildung 9: Chemische Reaktionen bei der Umsetzung von *Photinus pyralis* Luziferase und der *Renilla reniformis* Luziferase (nach Produktinformation Promega)

2.13.9 DNA-Protein-Bindungstest

In diesem Versuch wurden Oligonukleotide verwendet die die STAT3 Konsensus Bindungsstelle aus dem *c-Fos* Gen enthalten, das *sis-inducible-element* (siem). Die Sequenzen der Oligonukleotide sind Tabelle 5 zu entnehmen (Oligonukleotid siem-67-sense und siem-67-reverse). Die Oligonukleotide wurden zum einen in ihrer normalen, nicht modifizierten Form als Kompetitor verwendet. Zum anderen wurden ihre 5' Enden mit einem Biotin versehen. Biotin bindet spezifisch an Avidin, so daß an die biotinylierte DNA gebundene Proteine mit Hilfe von Streptavidin-Agarose aus dem Lysat gefällt werden können.

Die biotinylierten Oligonukleotide wurden zu den Lysaten gegeben, aktive STAT3 Komplexe binden daran und können dann mit Hilfe der Streptavidin-Agarose aus dem Lysat gefällt werden. Als Kontrolle für die Spezifität dieses Nachweises wurden zu den Proben als Kompetitor die nicht biotinylierten Oligonukleotide in einem 30-fachen Überschuß gegeben. Auch an diese Oligonukleotide binden während der Inkubationsphase von 10 min alle im Lysat befindlichen phosphorylierten STAT3 Moleküle. Nach Zugabe der biotinylierten Oligonukleotide wird nur in den Proben ohne vorherige Kompetitorbehandlung noch freies STAT3 für eine Bindung zur

Verfügung stehen. Nur aus diesen Proben können mit Hilfe der Streptavidin-Agarose schließlich STAT3-Moleküle nachgewiesen werden.

HepG2 Zellen wurden mit der DEAE-Dextran Methode transient transfiziert. Folgende Ansätze wurden vorbereitet: HepG2 Zellen untransfiziert (Negativkontrolle); HepG2 Zellen transfiziert mit gp130, STAT3 und IL6R (Positivkontrolle), HepG2 Zellen transfiziert mit STAT3 und IL6R, sowie Zellen mit STAT3, IL6R und Δ -gp130 bzw. STAT3, IL6R und L-gp130. Alle Proben wurden aufgeteilt und einmal mit IL-6 stimuliert bzw. unstimuliert gelassen. Jede dieser Proben wurden noch einmal aufgeteilt und einmal mit Kompetitor präinkubiert und einmal nicht.

Die transfizierten Zellen wurden über Nacht in serumfreiem Medium kultiviert. Am nächsten Tag wurde das Medium nochmals für 6 h durch frisches, FCS-freies Medium ersetzt. Die Stimulation der Zellen erfolgte mit 40 ng/ml IL-6 für 10 min bei 37 °C. Danach wurden die Zellen mit 1 ml Lysispuffer lysiert und in flüssigem Stickstoff gefroren um eine vollständige Lyse zu erreichen. Die Proben wurden bei -80°C gelagert und vor der Weiterverarbeitung bei 4 °C auf einem über Kopf Schüttler aufgetaut. Feste Bestandteile wurden abzentrifugiert, mit den Überständen wurde weitergearbeitet.

Für die Vorreinigung wurden zu jeder Probe 50 μ l Avidin-Agarose zugegeben und bei 4 °C 1-2 h über Kopf geschüttelt. Die Agarose wurde bei 8000 rpm 2 min abzentrifugiert und die Überstände in neue Eppendorfgefäße überführt. Zu den Proben die mit den kompetitiven Oligonukleotiden behandelt werden sollten wurden die unbiotinylierten Oligonukleotide in der ca. 30-fachen Menge der biotinylierten Oligonukleotide zu pipettiert und bei 4 °C 10 min auf einem über Kopf Schüttler inkubiert.

Die Streptavidin-Agarose wurde wie folgt vorbehandelt: zu jedem Aliquot (jeweils 50 μ l) wurden 2 μ g der biotinylierten Oligonukleotide pipettiert und 10 min bei RT auf einem Schüttler präinkubiert. Diese präinkubierte Agarose wurde dann zu den einzelnen Lysatproben gegeben und alles über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Agarose gewaschen: zweimal mit Lysispuffer + NP-40, einmal mit Lysispuffer ohne NP-40 und einmal mit 50 mM Tris. Die Restflüssigkeit wurde entfernt und die Agarosepellets, mit 15 μ l Lämmli versetzt und bei 95 °C 10 min erhitzt. Anschließend wurden die Proteine mit Hilfe einer SDS-Gelelektrophorese auf einem 7.5 % (v/v) Gel aufgetrennt. Die Proteine wurden dann bei 20 Volt innerhalb von 80 min aus dem Gel auf eine PVDF-Membran übertragen. Die Membran wurde in Waschpuffer zweimal 10 min gewaschen und in 5% (w/v) BSA für 1h bei RT blockiert. Für den Western Blot wurde der Anti-Phosphotyrosin-Antikörper 4G10 in einer Konzentration von 0.5

$\mu\text{g/ml}$ eingesetzt. Der peroxidasegekoppelte Sekundärantikörper Anti-Maus-POD wurde 1:4000 (Pierce, Illinois, USA) eingesetzt. Der Nachweis des Sekundärantikörpers erfolgte mit dem ECL-Kit von Amersham.

2.14 Immunbiologische Methoden

2.14.1 Indirekte Immunfluoreszenzfärbung adhärenter Zellen

5 $\mu\text{g/ml}$ Poly-D-Lysin (Sigma Diagnostics, Inc. St. Louis, USA) wurden in sterilem PBS verdünnt und Deckgläschen (Menzel-Gläser, Braunschweig) darin 15 min bei RT inkubiert und unter der Sterilwerkbank getrocknet. Eine konfluente Platte COS-7 Zellen wurde 24-48 h nach der Transfektion trypsinisiert und in 1 ml Medium resuspendiert. Davon wurden 100 μl /Loch einer 24-Loch-Platte ausgesät. Am nächsten Tag wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und dann 15 min bei RT mit 4% (w/v) Paraformaldehyd fixiert. Die Zellen wurden nicht permeabilisiert. Anschließend wurden die Zellen zweimal mit TBS gewaschen und dann mit 0.1% (w/v) BSA in TBS 45 min bei RT geblockt. Die Zellen wurden nun erneut zweimal 5 min mit TBS gewaschen und dann mit dem entsprechenden Erstantikörper (in TBS/ 0.1% (w/v) BSA verdünnt) für 1 h bei RT auf dem Schüttler oder über Nacht bei 4 °C in einer feuchten Kammer inkubiert. Die Zellen wurden nun dreimal 5 min mit TBS gewaschen und dann mit dem fluoreszenzgekoppelten Sekundärantikörper (1: 1000 verdünnt in TBS/ 0.1% (w/v) BSA) bei RT 1h im Dunkeln inkubiert oder bei 37 °C für 1 Stunde. Nachdem die Zellen wieder dreimal 5 min mit TBS gewaschen worden waren, wurden die Deckgläschen auf Objektträgern in wasserunlöslichem Eindeckmedium (SlowFade Light Antifade Kit, Molecular Probes, Leiden, Niederlande) eingedeckt und mit Nagellack versiegelt. Die Auswertung erfolgte an einem Laser Scanning Mikroskop LSM510 (Zeiss, Jena).

Um die Strukturen der Zellen zu verdeutlichen wurde parallel eine *Wheat Germ Agglutinin* Tetramethylrhodamin Färbung durchgeführt. WGA ist ein Protein das an spezifische Kohlenhydrate bindet. Da die Prozessierung dieser Zuckerreste hauptsächlich im Golgi-Apparat stattfindet, kann man so den Golgi-Apparat für Kolokalisationsstudien fluoreszenzmarkieren. Für die Negativkontrolle wurden untransfizierte Zellen verwendet.

2.14.2 Indirekte Immunfluoreszenzfärbung von Suspensionszellen

Suspensionszellen wurden mittels einer speziellen Zentrifuge (Cyclospin) auf Deckgläschen adhärirt und getrocknet. Die trockenen Zellen wurden mit TBS 20 min bei RT rehydriert und anschließend 30 min bei RT mit 4% (w/v) Paraformaldehyd fixiert. Nachdem die Zellen zweimal mit TBS gewaschen worden waren, wurden sie mit 0.1% (w/v) BSA in TBS 45 min bei RT geblockt und dann wieder zweimal mit TBS gewaschen. Die folgenden Arbeitsschritte entsprechen denen der Immunfluoreszenzfärbung für adhärente Zellen.

3 Ergebnisse

Für verschiedene Effektorproteine von Zytokin-Signalwegen, wie z.B. STAT3 wurde in verschiedenen wissenschaftlichen Untersuchungen eine konstitutive Aktivierung nachgewiesen. Die dauerhafte Aktivierung steht eindeutig mit dem onkogenen Potential der entsprechend fehlregulierten Proteine im Zusammenhang und hat damit einen direkten Bezug zu einer Reihe von humanen Krebserkrankungen. Das Transmembranprotein gp130 ist die gemeinsame Rezeptoruntereinheit aller IL-6-artigen Zytokine. Die physiologische Bedeutung eines konstitutiv aktiven gp130 Rezeptors ist bisher nicht bekannt und sollte in dieser Arbeit untersucht werden. Dazu wurden die ligandenunabhängig dimerisierten gp130 Rezeptoren Δ -gp130 und L-gp130 auf cDNA Ebene generiert, die entsprechenden Proteine in eukaryotischen Zellen exprimiert und ihre Wirkung in Zellsystemen untersucht.

3.1 Klonierung von Δ -gp130 und L-gp130

Um die Konstrukte Δ -gp130 und L-gp130 auf cDNA Ebene zu generieren, wurden für beide Chimären die folgenden Bereiche aus dem Plasmid des humanen Wildtyp (WT) „pSVL hugp130“ (# 344) verwendet: Nukleotide +1 bis +66, sowie Nukleotide + 2068 bis + 3007. Das entspricht dem Signalpeptid des WT-gp130, dem Bereich 20 AS oberhalb der Transmembrandomäne, der Transmembrandomäne sowie dem gesamten zytoplasmatischen Bereich des humanen gp130. Um die Proteine besser nachweisen zu können, wurde direkt hinter das Signalpeptid (Richtung C-Terminus) ein Oktapeptid eingefügt. Für den Nachweis dieses als Flag-Tag bezeichneten Peptids gibt es monoklonale Antikörper.

Für den Leuzin-Zipperbereich aus dem humanen *c-Jun* Gen wurde per PCR ein 117 bp langes (39 AS) Fragment aus dem Plasmid „hu *c-Jun*“ (# 295) amplifiziert. Das PCR-Produkt wurde mit den Restriktionsenzymen *MunI* und *BamHI* geschnitten und in den Klonierungsvektor pBKSII ligiert (siehe Abbildung 10). Das Signalpeptid-Fragment wurde ebenfalls durch PCR amplifiziert, dann mit *XhoI* und *EcoRI* geschnitten und in den mit *XhoI* /*EcoRI* geschnittenen Klonierungsvektor pBKSII ligiert. Danach wurde über die miteinander kompatiblen Schnittstellen *MunI/EcoRI* und die Schnittstelle *BamHI* der Bereich für den Leuzin-Zipper inkloniert (Abbildung 10). Dabei wurde die *MunI/EcoRI*-Schnittstelle zerstört. Daher konnte das Konstrukt nun wieder mit *EcoRI* und *SpeI* geschnitten werden, um den zytoplasmatischen

Bereich des gp130 hinein zu ligieren. In dem Plasmid „pSVL hugp130“ (#344) fehlt die im unveränderten WT vorhandene *EcoRI* Schnittstelle an der Basenpaarposition 3097. Daher ergab ein Plasmidverdau mit *EcoRI* und *SpeI* den gesamten zytoplasmatischen Bereich des WT-gp130.

Bei Eukaryoten ist die Sequenzumgebung um das Startkodon herum wichtig für eine optimale Initiation der Translation. Die Effektivität der Ribosomenanlagerung an die mRNA ist stark von dieser Sequenz abhängig. Die Sequenz, die am häufigsten in eukaryotischen Genen zu finden ist, wurde von M. Kozak beschrieben und nach ihm als Kozaksequenz benannt [165]. Um eine optimale Kozaksequenz für die gp130 Konstrukte zu haben, wurde zu einem späteren Zeitpunkt das Originalplasmid „pSVL hugp130“ (#344) mit *HincII* und *NotI* geschnitten und die fertigen Konstrukte Δ -gp130 und L-gp130 ebenfalls mit *HincII* und *NotI* aus dem Klonierungsvektor ausgeschnitten und so in den pSVL-Vektor umgesetzt (pSVL: *XhoI/NotI*). Später wurden die cDNAs für Δ -gp130 und L-gp130 mehrfach umkloniert. Die verwendeten Restriktionsschnittstellen für die Umklonierung in die Vektoren p409, pCDNA3.1 und pMOWS sind im Anhang abgebildet.

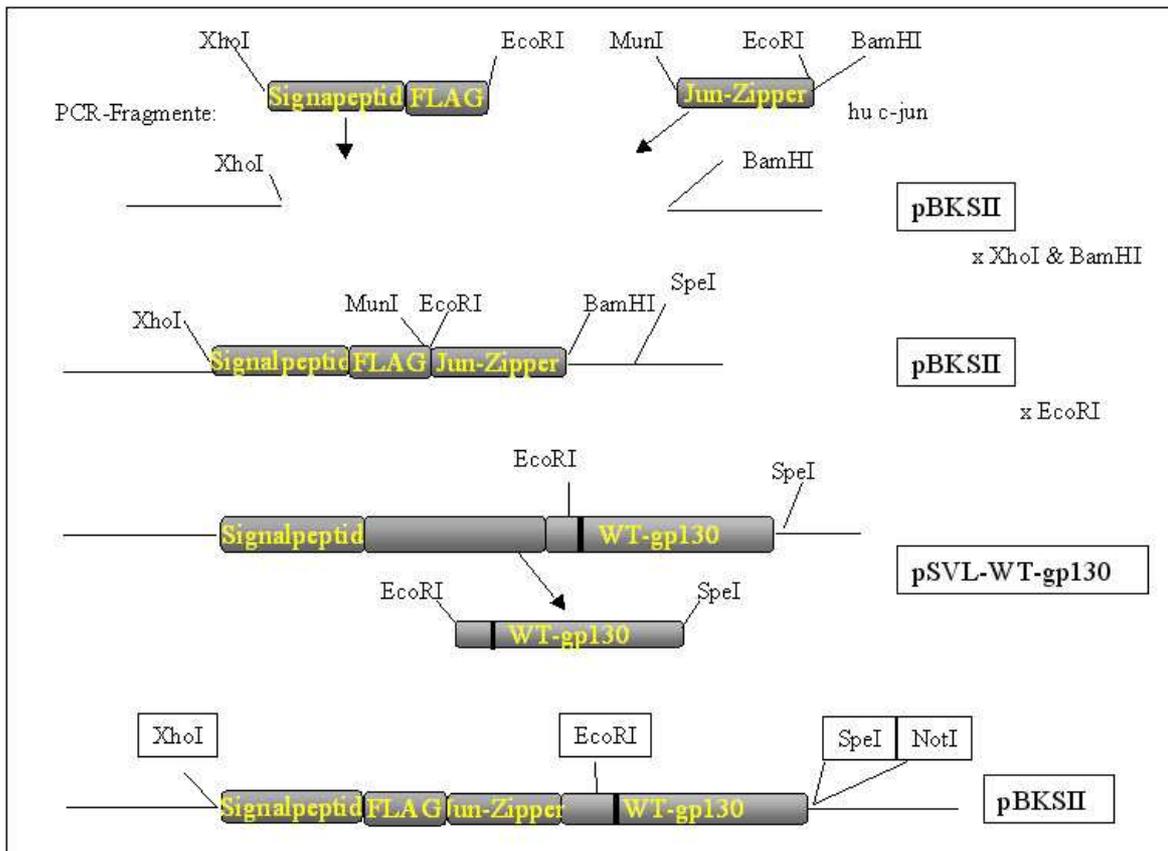


Abbildung 10: Klonierung von L-gp130. Erklärungen siehe Text.

Die Aminosäuresequenz von Δ -gp130 (blau): Die Transmembrandomäne von gp130 ist orange hervorgehoben. Der offene Leserahmen der Δ -gp130 cDNA ist 1035 bp lang und kodiert für ein Protein mit 344 AS (+ Stopkodon). Das theoretische Molekulargewicht des Proteins beträgt 38 kDa. Für die Berechnung des Molekulargewichts wurde die Software DNASTar EditSeqTM 4.05 verwendet. Abbildung 11 zeigt die schematische Anordnung der verschiedenen Proteinteilbereiche im Konstrukt Δ -gp130. Es setzt sich aus dem Signalpeptid (SP), dem FLAG-Tag und dem zytoplasmatischen Bereich des WT-gp130 zusammen.

Signalpeptid aus dem WT-gp130: MLTLQTWLVQALFIFLTTESTG

Flag-Tag: DYKDDDDK

Transmembrandomäne und zytoplasmatischer Bereich aus dem WT-gp130:

EFTFTTPKFAQGEIEAIVVPVCLAFLLTLLGVLF^{CFN}KRDLIKKHIWPNVPDPSKSHIAQ
WSPHTPPRHNFNSKDQMYSDGNFTDVS^{VVEIE}ANDKKPFPE^{DLKSLDLFKKEKINTEGH}

SSGIGGSSCMSSSRPSISSSDENESSQNTSSTVQYSTVVHSGYRHQVPSVQVFSRSESTQPL
LDSEERPEDLQLVDHVDGGDGILPRQQYFKQNCSEQHESSPDISHFERSKQVSSVNEEDFV
RLKQQISDHISQSCGSGQMCMFQEVSAADAFGPGTEGQVERFETVGMEAATDEGMPKS
YLPQTVRQGGYMPQ

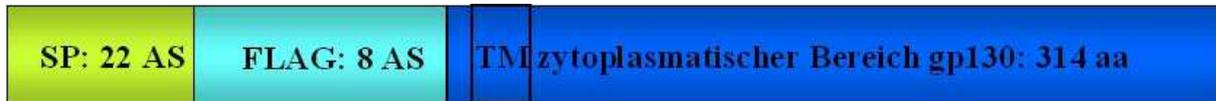


Abbildung 11: Das Konstrukt Δ -gp130 in der schematischen Übersicht.

SP: Signalpeptid des WT-gp130, FLAG: FLAG-Tag, TM: Transmembrandomäne (Nukleotidsequenz siehe Anhang).

Die Aminosäuresequenz von L-gp130 (blau): Die Transmembrandomäne von gp130 ist orange hervorgehoben. Die cDNA für L-gp130 ist 1167 bp lang, das entspricht einem Protein von 388 AS (+ Stopkodon). Das theoretische Molekulargewicht des Proteins beträgt 43 kDa. Für die Berechnung des Molekulargewichts wurde die Software DNASTAR EditSeqTM 4.05 verwendet.

Signalpeptid aus dem WT-gp130: MLTLQTWLVQALFIFLTTESTG

Flag-Tag DYKDDDDK

Linker ELCGG

Leuzin-Reißverschluß aus dem hu *c-jun*-Gen:

RIARLEEKVKTLKAQNSELASTANMLREQVAQLKQKVMN

Transmembrandomäne und zytoplasmatischer Bereich aus dem WT-gp130:

EFTFTTPKFAQGEIEAIVVPVCLAFLLTLLGVLF^{CFN}KRDLIKKHIWPNVPDPSKSHIAQ
WSPHTPPRHNFNNSKDQMYSDGNFTDVSVEIEANDKKPFPEDLKSLDLFKKEKINTEGH
SSGIGGSSCMSSSRPSISSSDENESSQNTSSTVQYSTVVHSGYRHQVPSVQVFSRSESTQPL
LDSEERPEDLQLVDHVDGGDGILPRQQYFKQNCSEQHESSPDISHFERSKQVSSVNEEDFV
RLKQQISDHISQSCGSGQMCMFQEVSAADAFGPGTEGQVERFETVGMEAATDEGMPKS
YLPQTVRQGGYMPQ

Abbildung 12 zeigt die schematische Anordnung der verschiedenen Proteinteilbereiche im Konstrukt L-gp130. Es setzt sich aus dem Signalpeptid (SP), dem FLAG-Tag, dem Leuzin-Zipper und dem zytoplasmatischen Bereich des WT-gp130 zusammen.

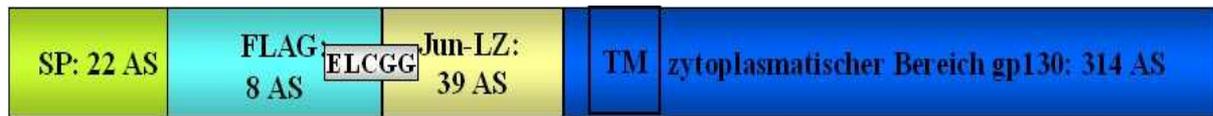


Abbildung 12: Das Konstrukt L-gp130 in der schematischen Übersicht.

SP: Signalpeptid des WT-gp130, FLAG: FLAG-Tag, Jun-LZ: Leuzin-Zipper aus dem humanen *c-jun*-gen, TM: Transmembrandomäne. Die Aminosäuren ELCGG zwischen dem Flag-Tag und dem Zipperbereich wurden eingefügt um die Übergänge im Proteinprodukt flexibler zu machen und so eine Dimerisierung zu erleichtern [141]. (Nukleotidsequenz siehe Anhang).

3.2 Expression der Proteine Δ -gp130 und L-gp130

In transient transfizierten COS-7 Zellen wurde die Expression der chimären Proteine mittels [³⁵S]-markiertem Methionin/Cystein-Einbau nachgewiesen. Die Zellen wurden dafür zunächst in Medium ohne die schwefelhaltigen Aminosäuren Cystein und Methionin inkubiert. Diese essentiellen Aminosäuren wurden den Zellen dann mit radioaktiv markiertem Schwefel angeboten. Alle neu synthetisierten Proteine enthalten dann die radioaktiv markierten Aminosäuren und können darüber nachgewiesen werden. Aus untransfizierten Zellen konnte mit dem gp130-spezifischen Antikörper sc655 kein Protein gefällt werden (Abbildung 13, Spur UT). Die Proteine Δ -gp130 und L-gp130 wurden von den eukaryotischen Zellen exprimiert und ergaben Proteinbanden von ca. 38 kDa für Δ -gp130 und ca. 43 kDa für L-gp130 (Abbildung 13 Spuren Δ -gp130 und L-gp130). Die Expression von Δ -gp130 ist geringer als die von L-gp130, obwohl die Zellen mit den gleichen Plasmidmengen transfiziert wurden. Als Positivkontrolle wurden Zellen mit WT-gp130 transfiziert und das synthetisierte Protein ebenfalls mit dem spezifischen Antikörper sc655 präzipitiert (Abbildung 13, Spur WT-gp130). Aufgrund seiner verschiedenen Glykosylierungsformen läuft das WT-gp130 Protein in der SDS-PAGE etwas höher als bei 130 kDa.

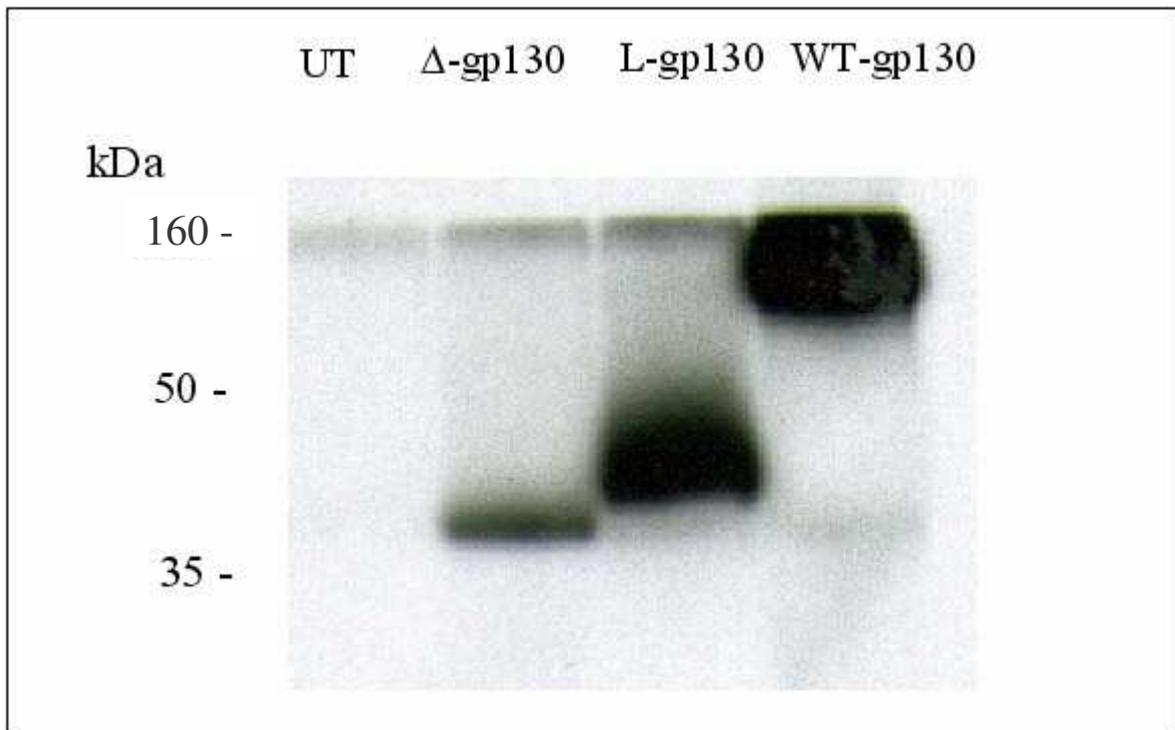


Abbildung 13: Expression der Proteine Δ -gp130 und L-gp130 in COS-7 Zellen.

COS-7 Zellen wurden mit den cDNA's für Δ -gp130, L-gp130 und WT-gp130 mittels DEAE-Dextran Methode transient transfiziert. 48 h nach der Transfektion wurden die Proteine metabolisch markiert und mit einem gp130 spezifischen Antikörper (sc655) präzipitiert. Die Immunkomplexe wurden mit Protein-A-Sepharose gefällt, auf einem 12.5%-igen SDS-Gel aufgetrennt und mittels Fluorographie analysiert. UT: untransfizierte Zellen. Die chimären Proteine Δ -gp130 und L-gp130, sowie das WT-gp130 werden exprimiert.

3.3 Expression der Proteine Δ -gp130 und L-gp130 an der Zelloberfläche Biotinylierungstest

Die chimären Proteine Δ -gp130 und L-gp130 beinhalten das Signalpeptid und die Transmembrandomäne des humanen gp130 Proteins. Sofern Δ -gp130 und L-gp130 richtig prozessiert und in der Zelle korrekt transportiert werden, sollten sie daher in der Plasmamembran von transfizierten Zellen nachweisbar sein (siehe Abbildung 14). Mit Hilfe des wasserlöslichen, zellimpermeablen Biotinesters LC-Sulfo-NHS-(+)-Biotin können selektiv Proteine markiert werden, die auf der Zelloberfläche lokalisiert sind. Dieser Biotinester wurde in einem Biotinylierungstest verwendet, um die Lokalisation der chimären Proteine in transfizierten Zellen zu untersuchen (siehe Abbildung 14).

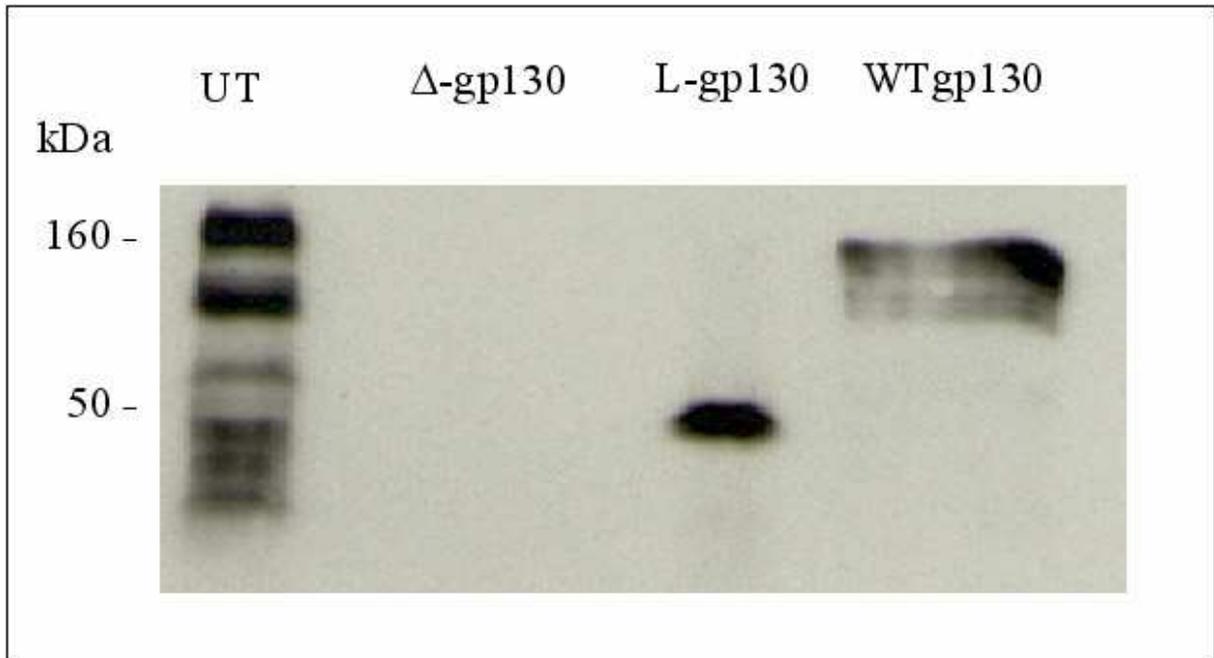


Abbildung 14: Expression der Proteine Δ -gp130 und L-gp130 an der Zelloberfläche.

COS-7 Zellen wurden mittels DEAE-Dextran transient transfiziert, 48 h nach der Transfektion erfolgte die Inkubation der Zellen mit Biotinester. Der Biotinester reagiert selektiv mit Proteinen, die auf der Zelloberfläche lokalisiert sind. Nach 15 min wurden die Zellen lysiert. Für den spezifischen Nachweis wurden die gefällten gp130 Proteine aus den Lysaten mit dem anti-FlagM2 Antikörper und im Falle der Positivkontrolle (WT-gp130) mit einem gp130-spezifischen Antikörper (BS12) präzipitiert. Für die untransfizierte Kontrolle wurden beide Antikörper verwendet. Die Proteine wurden auf einem SDS-Gel aufgetrennt und auf eine PVDF-Membran transferiert. Die Membran wurde mit Streptavidin-Peroxidase inkubiert, die Peroxidase wurde durch Chemilumineszenz nachgewiesen. UT: untransfizierte Zellen. Das Protein L-gp130 wird an der Oberfläche von COS-7 Zellen exprimiert.

Nach der Transfektion wurden die Zellen mit dem Biotinester inkubiert und anschließend lysiert. Für die Präzipitation der Proteine wurden ein gp130-spezifischer Antikörper (Abbildung 14 Spur WT-gp130) und ein Flag-Tag spezifischer Antikörper verwendet (Abbildung 14 Spuren Δ -gp130 und L-gp130). Untransfizierte Zellen dienten als Kontrolle. Für die Kontrolle wurden beide Antikörper eingesetzt (Abbildung 14, Spur UT). Da die verwendeten Antikörper spezifisch nur das gp130 bzw. das Flag-Tag erkennen sollten, ist es unklar woher die Signale in dieser Spur stammen. Möglicherweise handelt es sich um Kreuzreaktionen zwischen den Antikörpern.

Das Protein Δ -gp130 konnte mit dieser Methode nicht nachgewiesen werden (Abbildung 14, Spur Δ -gp130). Das Protein L-gp130 konnte nachgewiesen werden (Abbildung 14, Spur L-gp130). Auf der PVDF-Membran ist eine Proteinbande von ca. 43 kDa zu sehen. Als Positivkontrolle dienten WT-gp130 transfizierte Zellen. Aus Lysaten dieser Zellen konnte ein Protein mit der entsprechenden Größe von ca. 130 kDa nachgewiesen werden (Abbildung 14,

Spur WT-gp130). Die Doppelbande in dieser Spur stammt möglicherweise von verschiedenen glykosilierten gp130 Proteinen, die beide durch den Antikörper nachgewiesen wurden (Abbildung 14, Spur WT-gp130).

3.4 Lokalisation der Proteine Δ -gp130 und L-gp130 in der Zelle

3.4.1 Indirekte Immunfluoreszenzfärbung von transfizierten COS-7 Zellen

Um zu untersuchen, in welchem Kompartiment der Zelle die Proteine Δ -gp130 und L-gp130 exprimiert werden, wurden COS-7 Zellen transient transfiziert. Der verwendete Vektor ist bicistronisch, das heißt, er kodiert neben dem inklonierten Gen auch das *green fluorescent protein* (GFP). Die Zellen wurden mit Methanol fixiert, durch spezifische Antikörper markiert und die transgenen Proteine mit Hilfe von fluoreszenzgekoppelten Sekundärantikörpern nachgewiesen. Eine Fixierung mit Methanol läßt die Zellmembran nicht intakt, daher weist man mit dieser Methode die gesamte Proteinpopulation in der Zelle nach, nicht nur die Expression der Proteine in der Plasmamembran.

Für die Detektion der chimären gp130 Rezeptorproteine wurde der Antikörper Anti-Flag M2 eingesetzt. Die leicht unspezifische Hintergrundfärbung bei den untransfizierten Zellen ist bedingt durch den Sekundärantikörper (Abbildung 15, a).

In L-gp130 transfizierten Zellen erkennt man eine prominente Färbung des Golgi-Apparates und des angrenzenden endoplasmatischen Retikulums (ER). Das Protein konnte in der ganzen Zelle in Vesikeln angefärbt werden. Lediglich in den nukleären Bereichen ist kein Protein nachweisbar. Auch die Plasmamembran der Zelle weist eine spezifische Färbung auf (Abbildung 15, c). Die transfizierte Zelle exprimiert auch das GFP in hohem Maße. Dieses Protein ist diffus in der gesamten Zelle verteilt (Abbildung 15, d). Die Abbildung 15, e zeigt die Kolo-kalisation der Proteine L-gp130 und GFP.

Δ -gp130 transfizierte Zellen zeigen eine starke Färbung des Proteinsyntheseapparates, also des endoplasmatischen Retikulums und des Golgi-Apparates. Das Protein konnte auch in einzelnen Vesikeln nachgewiesen werden. Das Muster der gefärbten Bereiche und damit die Verteilung des Proteins ist nicht so feindispers wie das bei L-gp130 transfizierten Zellen der Fall ist (Abbildung 15, f). Eine Färbung der Plasmamembran ist hier nicht sichtbar. Insgesamt ist die Expression dieses Proteins geringer als die von L-gp130, obwohl die gleichen Mengen an DNA transfiziert wurden (Abbildung 15 vgl. f mit c). Auch die GFP Expression ist im Vergleich zu d) geringer.

Die Δ -gp130 transfizierte Zelle sieht morphologisch anders aus als die L-gp130 transfizierte Zelle. Auch die GFP-Expression ergibt ein anderes Bild als bei den L-gp130 transfizierten Zellen (vgl. Abbildung 15 d mit g).

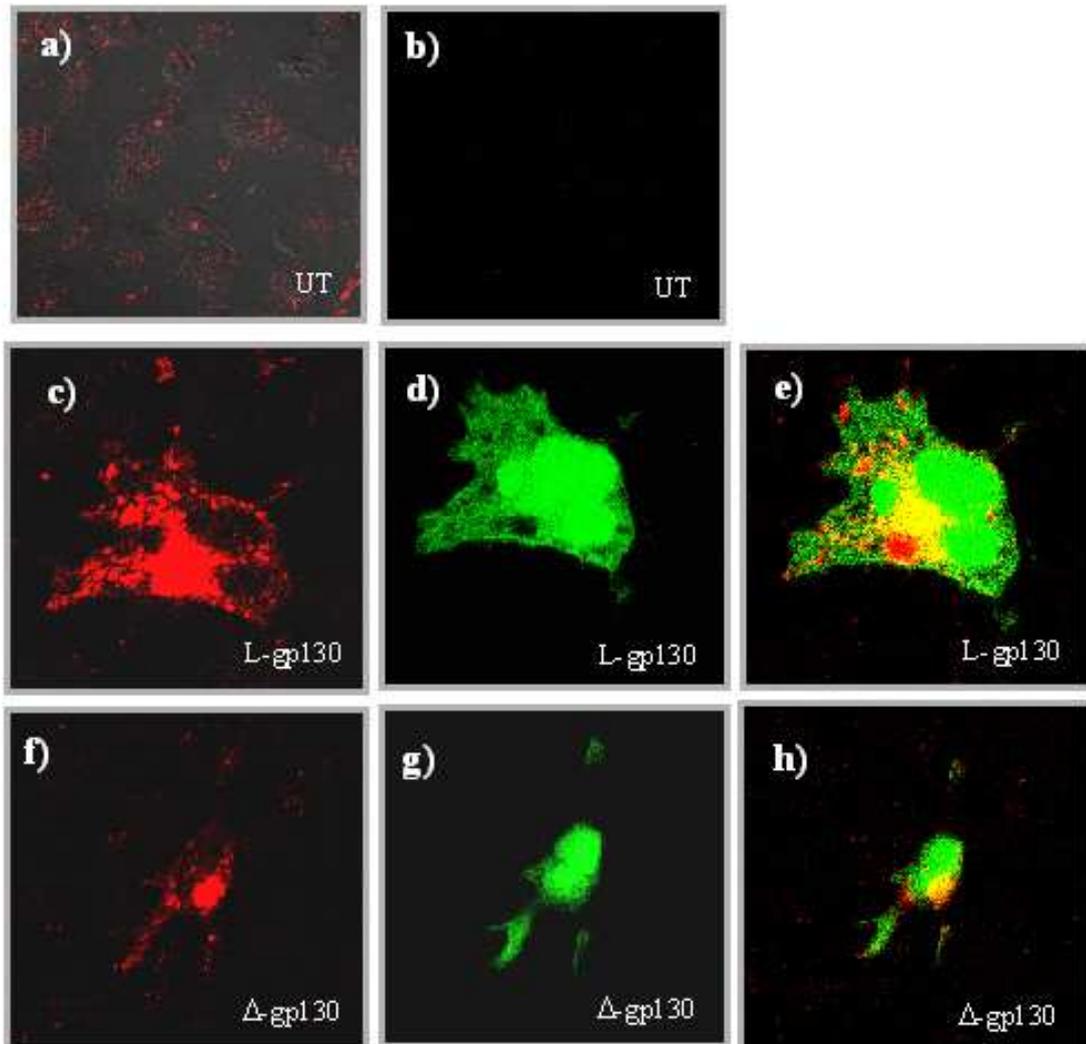


Abbildung 15: Indirekte Immunfärbung von transfizierten COS-7 Zellen.

Die Zellen wurden mittels DEAE-Dextran transient mit den Plasmiden Δ -gp130-pIRES-GFP und L-gp130 pIRES-GFP transfiziert. 48 h nach der Transfektion wurden die Zellen mit Methanol fixiert. Die chimären Proteine wurden mit dem α -FLAG M2 Antikörper markiert und durch den Indocarbocyanin (Cy3) gekoppelten Esel- α -Maus Sekundärantikörper nachgewiesen. Das ergibt die roten Signale (a, c und f). Der Vektor pIRES-CG ist ein bicistronischer Vektor, der neben dem Transgen auch das grünfluoreszierende Protein (GFP) kodiert. Die Bilder b, d und g zeigen die GFP-Expression. In e und h sind die beiden Fluoreszenzen überlagert. Bereiche die gelb erscheinen zeigen die Kolo-kalisation der Proteine Δ -gp130 bzw. L-gp130 mit dem GFP- Protein. a-b: untransfizierte Zellen, c-e: L-gp130 pIRES-GFP transfizierte Zellen, f-h: Δ -gp130-pIRES-GFP transfizierte Zellen.

3.4.2 Indirekte Immunfluoreszenzfärbung von transfizierten HeLa Zellen

Um die Lokalisation von L-gp130 in der Plasmamembran zu bestätigen und noch deutlicher zu zeigen, wurde in diesem Versuch die L-gp130 cDNA in humanen HeLa Zellen transient exprimiert. Die Lokalisation des transgenen L-gp130-Proteins wurde durch eine indirekte Immunfluoreszenzfärbung untersucht (siehe Abbildung 16).

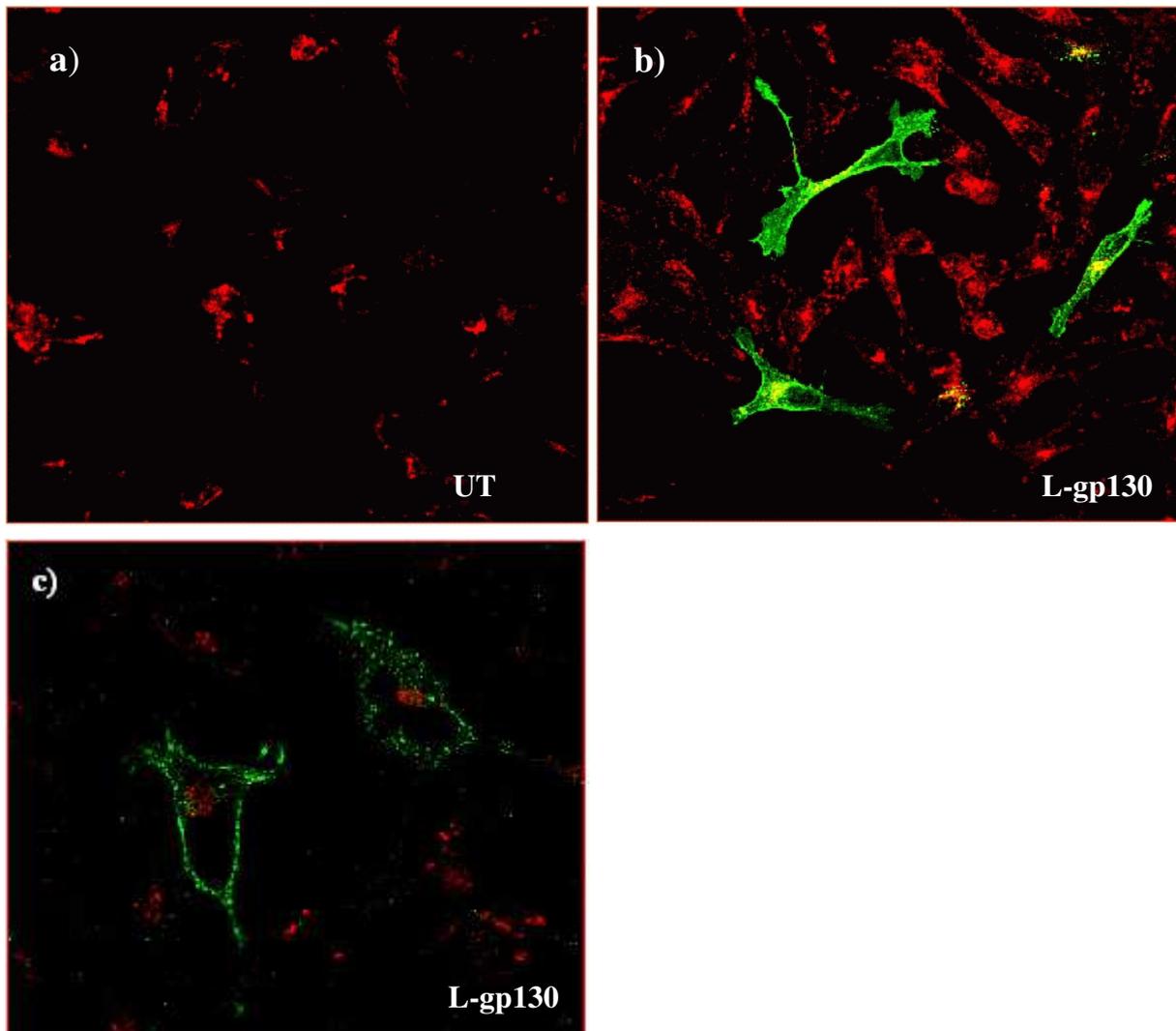


Abbildung 16: Indirekte Immunfärbung von transfizierten HeLa Zellen.

Lokalisation des Proteins L-gp130 in transient transfizierten HeLa-Zellen: Zellen wurden mittels ExGen transient transfiziert. Die Immunfärbung erfolgte 24 h nach der Transfektion mit dem α -FLAG M2 Antikörper und einem Esel- α -Maus-AlexaFluor 488 Sekundärantikörper (grüne Signale). Die Zellen wurden mit Methanol fixiert. Die roten Signale stammen von einer Anti-WGA-Tetramethylrhodamin-Färbung (*Wheat Germ Agglutinin*). Dieser Antikörper färbt spezifisch Kohlenhydrate, die hauptsächlich im Golgi-Apparat lokalisiert sind. Gelbe Bereiche in b zeigen daher die Lokalisation von L-gp130 im Golgi-Apparat. Bild a zeigt untransfizierte Zellen, b und c L-gp130 transfizierte Zellen. Das Protein L-gp130 ist in der Plasmamembran nachweisbar.

HeLa Zellen wurden transient transfiziert, mit Methanol fixiert und mit dem spezifischen Flag Antikörper inkubiert. Als Kontrolle wurden untransfizierte Zellen verwendet (Abbildung 16, a). Die rote Fluoreszenz ergibt sich aus einer α -WGA-Tetramethylrhodamin-Färbung. *Wheat Germ Agglutinin* bindet spezifisch an N-Acetyl- β -(1,4)-D-Glucosamin)₂ Reste. Sowohl die Glykoprotein-Prozessierung, als auch das Anheften dieses Zuckerrestes finden im Golgi-Apparat statt. Die rote Färbung zeigt daher hauptsächlich den Golgi-Apparat der Zellen (Abbildung 16, b und c).

Das Protein L-gp130 wurde nach der Inkubation mit dem spezifischen Anti-Flag Antikörper mit einem AlexaFluor Sekundärantikörper markiert und erscheint grün (Abbildung 16, b und c). Mit Ausnahme der nukleären Bereiche, sind L-gp130 transfizierte Zellen vollständig gefärbt. Auch die Plasmamembranen der Zellen sind deutlich gefärbt. Um die spezifische Anfärbung der Membran zu verdeutlichen, wurden verschiedene Belichtungszeiten gewählt (Abbildung 16, b und c). Gelbe Bereiche zeigen die Lokalisation des Proteins L-gp130 im Golgi-Apparat (Abbildung 16, b).

3.5 Phosphorylierung der Proteine Δ -gp130 und L-gp130

Das Transmembranprotein gp130 wird durch Ligandenbindung aktiviert. Zytoplasmatisch assoziierte Januskinasen werden durch die Aktivierung phosphoryliert und phosphorylieren ihrerseits das gp130 an zytoplasmatischen Tyrosinresten. In diesem Experiment wurde untersucht, ob die Proteine Δ -gp130 und L-gp130 phosphoryliert werden. Dafür wurden die Proteine aus Lysaten transfizierter COS-7 Zellen mit dem Antikörper 4G10 präzipitiert. Dieser Antikörper erkennt spezifisch ausschließlich Proteine mit phosphorylierten Tyrosinresten. Um die chimären gp130-Proteine spezifisch nachzuweisen, wurden die immunpräzipitierten Proteine auf eine Membran geblottet. Diese Membran wurde dann mit dem Anti-Flag Antikörper inkubiert (siehe Abbildung 17).

Während in untransfizierten und Δ -gp130 transfizierten Zellen kein Signal zu sehen ist (Abbildung 17, Spur UT und Spur Δ -gp130), wurde in L-gp130 transfizierten Zellen ein Protein mit apparentem Molekulargewicht von ca. 43 kDa detektiert (Abbildung 17, Spur L-gp130). Diese Proteingröße stimmt mit den Berechnungen für das phosphorylierte L-gp130-Protein überein.

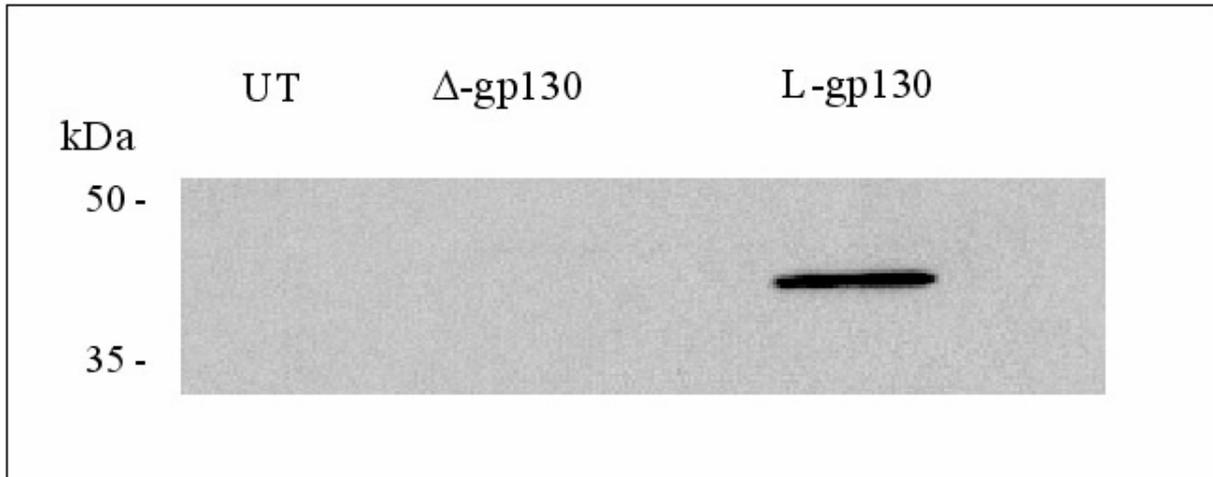


Abbildung 17: Western-Blot Analyse der Phosphorylierung der Proteine Δ -gp130 und L-gp130.

COS-7 Zellen wurden mit den Plasmiden Δ -gp130 und L-gp130 transient transfiziert und 48 h nach der Transfektion lysiert. Aus den Lysaten wurden zunächst alle Proteine präzipitiert, die phosphorylierte Tyrosinreste tragen (Antikörper 4G10). Die Proteine wurden im SDS-Gel aufgetrennt und auf eine PVDF Membran übertragen. Für die spezifische Erkennung wurde die Membran mit dem α -FLagM2 Antikörper inkubiert. UT: untransfizierte Zellen. Das Protein L-gp130 wird phosphoryliert.

3.6 Auswirkungen von Δ -gp130 und L-gp130 auf die Signaltransduktion

3.6.1 Phosphorylierungsstatus von STAT3 in transfizierten COS-7 Zellen

In der Signalübertragung von IL-6 bindet der Ligand zunächst an den IL-6R, daraufhin werden zwei Moleküle gp130 zu dem Komplex rekrutiert und die rezeptorassoziierten Januskinasen werden phosphoryliert bzw. autophosphorylieren. Eines der Haupteffektormoleküle in der Signalübertragung von IL-6 ist der Transkriptionsfaktor STAT3. Nach der erfolgten Aktivierung der Januskinasen dienen dieselben als Anheftungsstellen für zytoplasmatische STAT3-Proteine. Dies führt zur Phosphorylierung des STAT3. Nur im phosphorylierten Zustand dimerisieren STAT Proteine und sind dann aktiv. Um nachzuweisen, ob die chimären gp130-Rezeptoren in transfizierten Zellen eine Signaltransduktion initiieren, wurde daher der Phosphorylierungsstatus von STAT3 untersucht (Abbildung 18).

Als Negativkontrolle wurden untransfizierte COS-7 Zellen verwendet, die für 24 h in serumfreiem Medium kultiviert wurden. Die Stimulation erfolgte mit 50 ng/ml IL-6 für 10 min bei 37 °C. Danach wurden die Zellen lysiert. Aus den Lysaten wurden zunächst alle Proteine mit phosphorylierten Tyrosinresten präzipitiert und mittels Protein-A-Sepharose gefällt. Die Proteine wurden durch Lämmli-puffer wieder von der Sepharose gelöst und auf einem SDS-Gel

aufgetrennt. Anschließend wurden sie in einem Western-Blot auf eine PVDF Membran übertragen. Die Membran wurde mit einem Anti-STAT3 Antikörper inkubiert. Weder mit noch ohne diese Stimulation konnte phosphoryliertes STAT3 aus Lysaten untransfizierter Zellen nachgewiesen werden (Abbildung 18, Spur UT Ø und UT +).

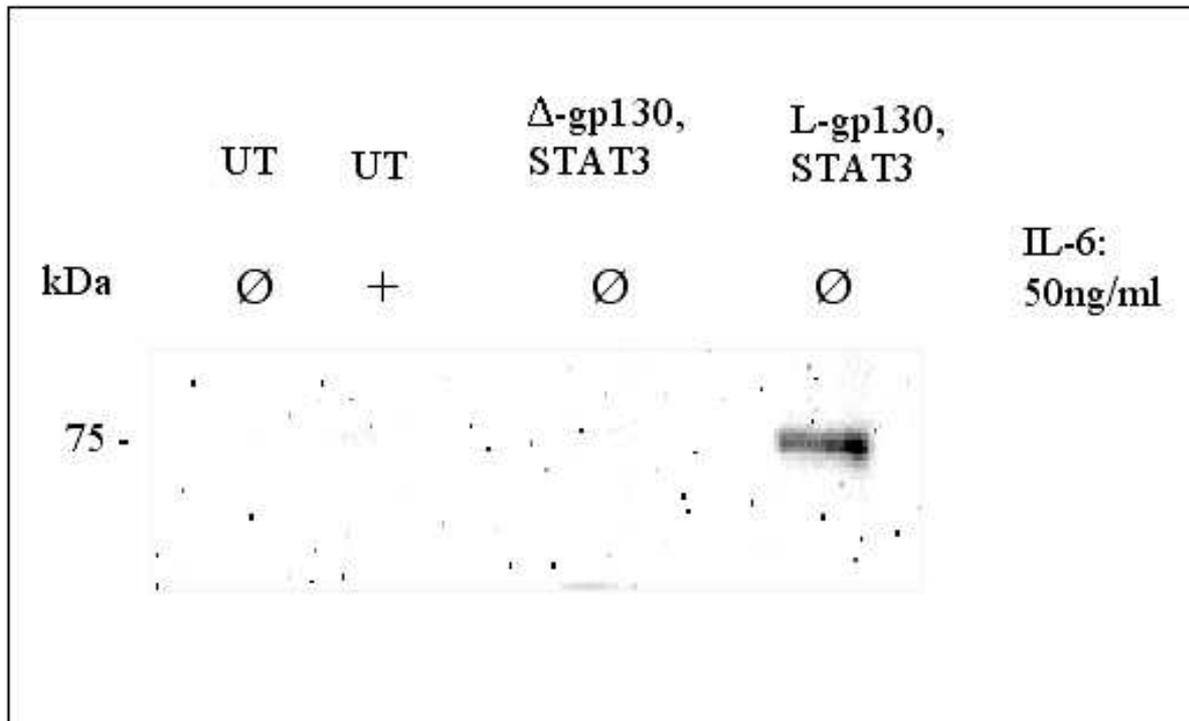


Abbildung 18: Western-Blot Analyse von phosphoryliertem STAT3 aus transfizierten COS-7 Zellen.

COS-7 Zellen wurden mit den Plasmiden Δ-gp130 und L-gp130 und STAT3 transient kotransfiziert. Nach 48 h wurden die Zellen in serumfreiem Medium kultiviert. Die untransfizierten Kontrollzellen wurden mit 50 ng/ml IL-6 stimuliert. Nach 10 min wurden alle Zellen lysiert. Zunächst wurden alle Proteine präzipitiert, die phosphorylierte Tyrosinreste enthalten (Antikörper 4G10). Die Proteine wurden auf einem SDS-Gel aufgetrennt und auf eine PVDF Membran übertragen. Diese wurde mit einem α-STAT3 Antikörper inkubiert. Der peroxidasegekoppelte Zweitantikörper wurde durch Chemilumineszenz nachgewiesen. UT Ø: untransfizierte Zellen ohne Stimulation, UT +: untransfizierte Zellen mit Stimulation, Δ-gp130, STAT3 Ø: Δ-gp130 und STAT3 transfizierte Zellen ohne Stimulation, L-gp130, STAT3 Ø: L-gp130 und STAT3 transfizierte Zellen ohne Stimulation. Eine Transfektion mit L-gp130 führt zu einer stimulationsunabhängigen STAT3 Phosphorylierung.

Um zu überprüfen, ob eine Transfektion mit Δ-gp130 die Signaltransduktion auslöst, wurden COS-7-Zellen auch mit den Plasmiden für Δ-gp130 und STAT3 kotransfiziert. Das Plasmid für das STAT3-Protein wurde kotransfiziert, um zu gewährleisten, daß für eine Signalauslösung genügend STAT3 in den COS-7 Zellen vorhanden ist. Da Δ-gp130 ligandenunabhängig aktiv sein sollte, wurden diese Zellen nicht stimuliert. Aus Lysaten dieser Zellen war kein aktives STAT3 detektierbar (Abbildung 18, Spur Δ-gp130 Ø). Aus Zellysaten von mit L-gp130 und STAT3 kotransfizierten COS-7-Zellen konnten phosphorylierte STAT3 Proteine nachgewiesen

werden. Erwartungsgemäß wurde eine Proteinbande bei ca. 85 kDa detektiert (Abbildung 18, Spur L-gp130 Ø). Da auch der chimäre Rezeptor L-gp130 ohne Ligand dimerisieren und so ein Signal auslösen sollte, wurden auch diese Zellen vor der Lyse nicht zytokinstimuliert (Abbildung 18, Spur L-gp130 Ø).

3.6.2 Phosphorylierung von STAT3 in transient transfizierten HepG2 Zellen

Die Auslösung der STAT3 Phosphorylierung durch L-gp130 in transfizierten COS-7 Zellen wurde in diesem Versuch durch die Verwendung einer zweiten Zelllinie bestätigt. Zellen der humanen Hepatomzelllinie HepG2 exprimieren endogen gp130, IL-6R und STAT3 in ausreichenden Mengen und müssen daher im Experiment nicht mit den entsprechenden Plasmiden kotransfiziert werden.

Untransfizierte HepG2 Zellen, und mit Δ -gp130 bzw. L-gp130 transfizierte Zellen wurden in serumfreiem Medium kultiviert und mit 50 ng/ml HIL-6 stimuliert bzw. unstimuliert gelassen. Hyper-IL-6 ist ein Designerzytokin, das aus IL-6 und dem löslichen IL-6R besteht [153]. Es kann für die Stimulation von Zellen verwendet werden. In diesen Zellen wird durch die Stimulation die IL-6-Signalkaskade aktiviert. Nach der Lyse der Zellen erfolgte eine Präzipitation der STAT3 Proteine mit einem Phospho-STAT3 Antikörper. Die Antigen-Antikörper-Komplexe wurden mittels Protein-A-Sepharose gefällt. Die so präzipitierten Proteine wurden auf einem SDS-Gel aufgetrennt und auf eine PVDF Membran geblottet. Die Membran wurde anschließend mit einem Anti-STAT3 Antikörper inkubiert (Abbildung 19).

Eine Stimulation mit IL-6 führte in den untransfizierten HepG2 Zellen zu einer STAT3-Phosphorylierung (Abbildung 19, Spur UT +). Das phosphorylierte STAT3-Protein ist nur dann meßbar, wenn die Zellen vorher mit IL-6 stimuliert wurden. Aus Lysaten unstimulierter Zellen konnte das Protein nicht nachgewiesen werden (Abbildung 19, Spur UT Ø).

Mit dem Plasmid für Δ -gp130 transfizierte Zellen wurden für den Versuch nicht stimuliert. Aus Lysaten dieser Zellen war kein phosphoryliertes STAT3 nachweisbar. In den beiden Spuren wurden unterschiedliche Proteinmengen in der SDS-PAGE aufgetragen (Abbildung 19, 2 Spuren Δ -gp130 Ø).

In den Spuren L-gp130 Ø ist phosphoryliertes STAT3, mit einer Größe von ca. 85 kDa, zu sehen. Beide Spuren zeigen Proteine aus Lysaten L-gp130 transfizierter Zellen, in den beiden Spuren wurden unterschiedliche Proteinmengen in der SDS-PAGE aufgetragen. Auch diese

Zellen wurden vor der Lyse nicht zytokinstimuliert, um eine ligandenunabhängige STAT3-Phosphorylierung messen zu können (Abbildung 19, 2 Spuren L-gp130 Ø).

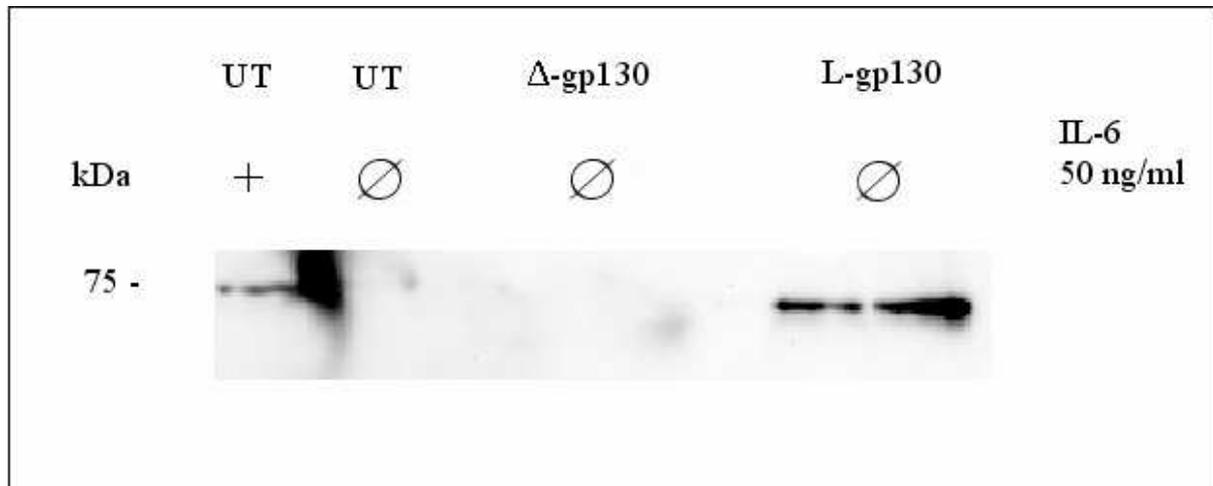


Abbildung 19: Western-Blot Analyse von phosphoryliertem STAT3 aus transfizierten HepG2 Zellen.

HepG2 Zellen wurden mit den Plasmiden Δ-gp130 und L-gp130 transient transfiziert. Nach 48 h wurden die Zellen in serumfreiem Medium kultiviert und die untransfizierten Kontrollzellen mit 50 ng/ml IL-6 stimuliert. Nach 10 min wurden alle Zellen lysiert. Phosphoryliertes STAT3 wurde mit dem Phospho-STAT3 Antikörper präzipitiert. Die Proteine wurden im SDS-Gel aufgetrennt und auf eine PVDF Membran übertragen. Diese wurde mit einem α-STAT3 Antikörper inkubiert. Der peroxidasegekoppelte Sekundärantikörper wurde durch Chemilumineszenz nachgewiesen. UT Ø: untransfizierte Zellen ohne Stimulation, UT +: untransfizierte Zellen mit Stimulation, Δ-gp130, STAT3 Ø: Δ-gp130 und STAT3 transfizierte Zellen ohne Stimulation, L-gp130, STAT3 Ø: L-gp130 und STAT3 transfizierte Zellen ohne Stimulation. Eine Transfektion mit L-gp130 führt zu einer stimulationsunabhängigen STAT3 Phosphorylierung

3.7 Funktionalität der durch L-gp130 phosphorylierten STAT3 Proteine

3.7.1 DNA-Protein-Bindungstest

Um zu zeigen, daß die STAT3 Proteine, die nach einer Transfektion mit L-gp130 stimulationsunabhängig phosphoryliert werden auch biologisch aktiv sind, wurde ein DNA-Protein-Bindungstest durchgeführt. Im Verlauf der durch IL-6 ausgelösten Signaltransduktion werden unter anderem phosphorylierte STAT3-Dimere in den Kern transloziert. Dort binden diese Transkriptionsfaktoren an spezifische DNA-Sequenzen und regulieren dadurch die Expression der entsprechenden Gene. In diesem Versuch wurde untersucht, ob durch L-gp130 aktiviertes STAT3 an eine spezifische DNA-Sequenz binden kann (Abbildung 20).

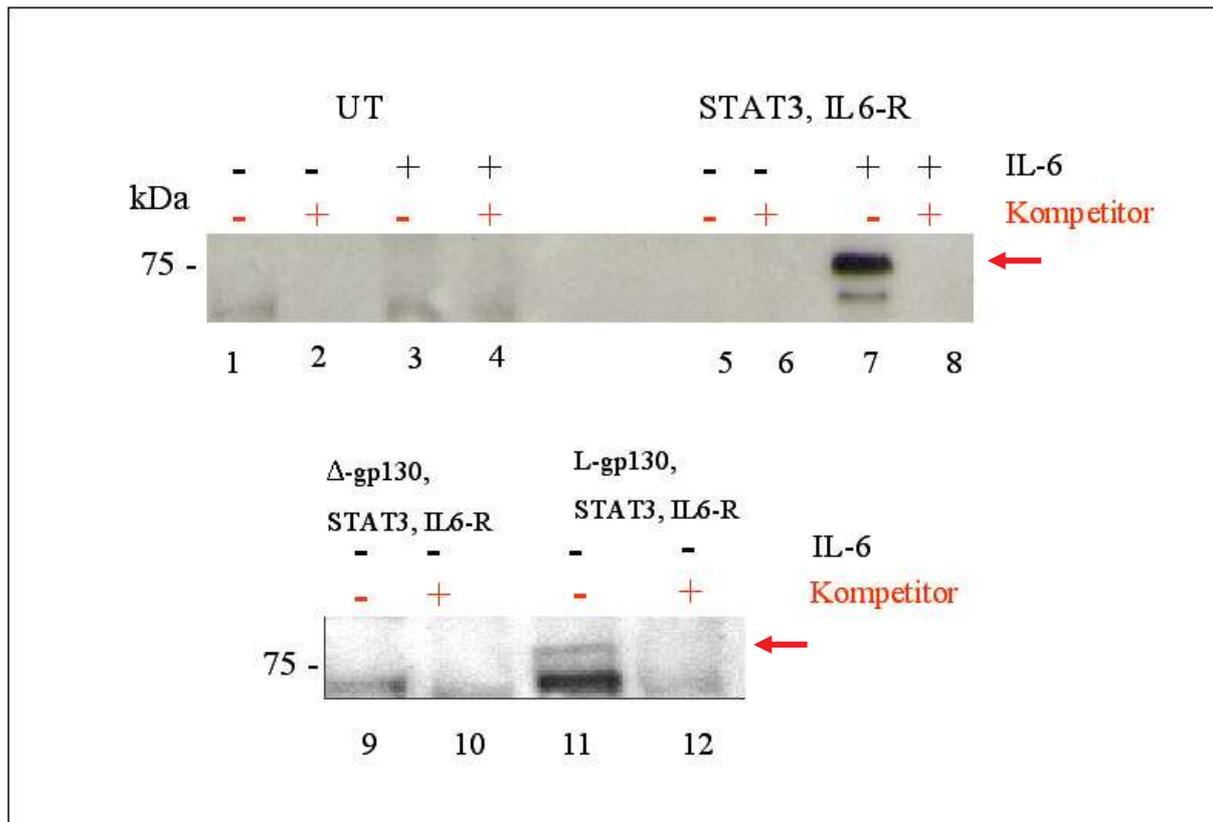


Abbildung 20: DNA-Bindungstest mit phosphoryliertem STAT3 aus transfizierten COS-7 Zellen.

COS-7 Zellen wurden transient transfiziert, nach 48 h lysiert und mit einem biotinmarkierten Oligonukleotid inkubiert. Dieses enthält die *Siem*-STAT3 Zielsequenz, an die phosphoryliertes STAT3 bindet. Die biotinylierten Komplexe wurden mit Streptavidin-Sepharose gefällt. Die so gefällten Proteine wurden im SDS-Gel aufgetrennt und im Western-Blot analysiert. Als Antikörper wurde der Phosphotyrosin Antikörper 4G10 eingesetzt. Der peroxidasegekoppelte Sekundärantikörper wurde durch Chemilumineszenz nachgewiesen. Die Spezifität wurde durch die Präinkubation mit dem gleichen unmarkierten Oligonukleotid, in der Abbildung als Kompetitor bezeichnet, gezeigt. Unmarkiertes Oligonukleotid konkuriert um die STAT3 Bindung, kann aber nicht durch Streptavidin gefällt werden. Spuren 1-4: untransfizierte Zellen, 5-8: STAT3 und IL-6R kotransfizierte Zellen, 9-10: Δ-gp130, STAT3 und IL-6R kotransfizierte Zellen, 11-12: L-gp130, STAT3 und IL-6R kotransfizierte Zellen

Dafür wurde ein biotinmarkiertes Oligonukleotid verwendet, das eine *siem*-Bindesequenz (*sis-inducible-element*) für aktives STAT3 enthält, wie sie z. B. im Promotorbereich des *c-Fos* Gens vorkommt. Lysate von transient transfizierten COS-7 Zellen wurden mit 50 ng/ml IL-6 für 10 min stimuliert bzw. unstimuliert gelassen und dann lysiert. Diese Lysate wurden nun mit dem biotinylierten Oligonukleotid inkubiert. Aktive STAT3 Moleküle können an die *siem*-Sequenz binden und diese DNA-Protein Komplexe wurden anschließend durch eine Fällung mit Streptavidin-Sepharose aus den Lysaten gewonnen. Um zu zeigen, daß dieser Nachweis spezifisch ist, wurde als Kompetitor ein *siem*-Oligonukleotid in 30-fachem molarem Überschuß

verwendet, das nicht biotinmarkiert war. Auch daran binden die aktiven STAT3 Moleküle, nur konnten diese dann nicht durch Streptavidin-Sepharose gefällt werden. Bei einer Präinkubation der Lysate mit dem unbiotinylierten Oligonukleotid (Kompetitor) binden bereits alle aktiven STAT3 Moleküle an ihre Zielsequenz und können daher nicht mehr an das später zugegebene biotinmarkierte Oligonukleotid binden. Entsprechend kann nach einer Präinkubation mit Kompetitor kein phosphoryliertes STA3 mehr nachgewiesen werden. Diese Kontrolle zeigt die Spezifität des Nachweises.

Aus Lysaten untransfizierter COS-7 Zellen war weder mit noch ohne IL-6 Stimulation phosphoryliertes STAT3 nachweisbar (Abbildung 20, Spuren 1-4). Die Anwesenheit des Kompetitors beeinflusst dieses Ergebnis nicht (Abbildung 20, Spuren 2 und 4).

Um zu gewährleisten, daß in den Zellen genügend STAT3 und IL-6R vorhanden sind, um auf eine IL-6 Stimulation reagieren zu können, wurden alle Zellen (mit Ausnahme der untransfizierten Proben) mit STAT3 und IL6-R kotransfiziert. In Lysaten von STAT3 und IL-6R transfizierten Zellen konnte erst nach der Stimulation mit IL-6 eine Proteinbande detektiert werden (Abbildung 20, Spur 7). Diese Bande verschwindet durch Zugabe des Kompetitors (Abbildung 20, Spur 8). Ohne Stimulation ist kein aktives STAT3 nachweisbar (Abbildung 20, Spur 5). Aus Lysaten von Δ -gp130, STAT3 und IL6-R transfizierten Zellen war ohne IL-6 Stimulation kein phosphoryliertes STAT3 nachweisbar (Abbildung 20, Spur 9). Anders bei L-gp130, STAT3 und IL6-R transfizierten Zellen. Hier ist auch ohne IL-6-Stimulation eine Proteinbande erkennbar (Abbildung 20, Spur 11). Nach Zugabe des Kompetitors war kein Protein mehr nachweisbar (Abbildung 20, Spur 12). In den meisten Spuren sind Doppelbanden zu sehen, dabei ist die obere Bande die spezifische STAT3 Bande (rote Pfeile), da die untere Bande auch in den untransfizierten Kontrollen zu sehen ist.

3.7.2 Luziferase-Expressionstest

Aktive Transkriptionsfaktoren müssen nicht nur an spezifische DNA-Sequenzen binden, sondern auch Promotoren (ko)aktivieren. Um zu zeigen, daß das durch L-gp130 phosphorylierte STAT3 dazu in der Lage ist, einen Promotor zu aktivieren, wurde ein Reporter gentest durchgeführt (Abbildung 21).

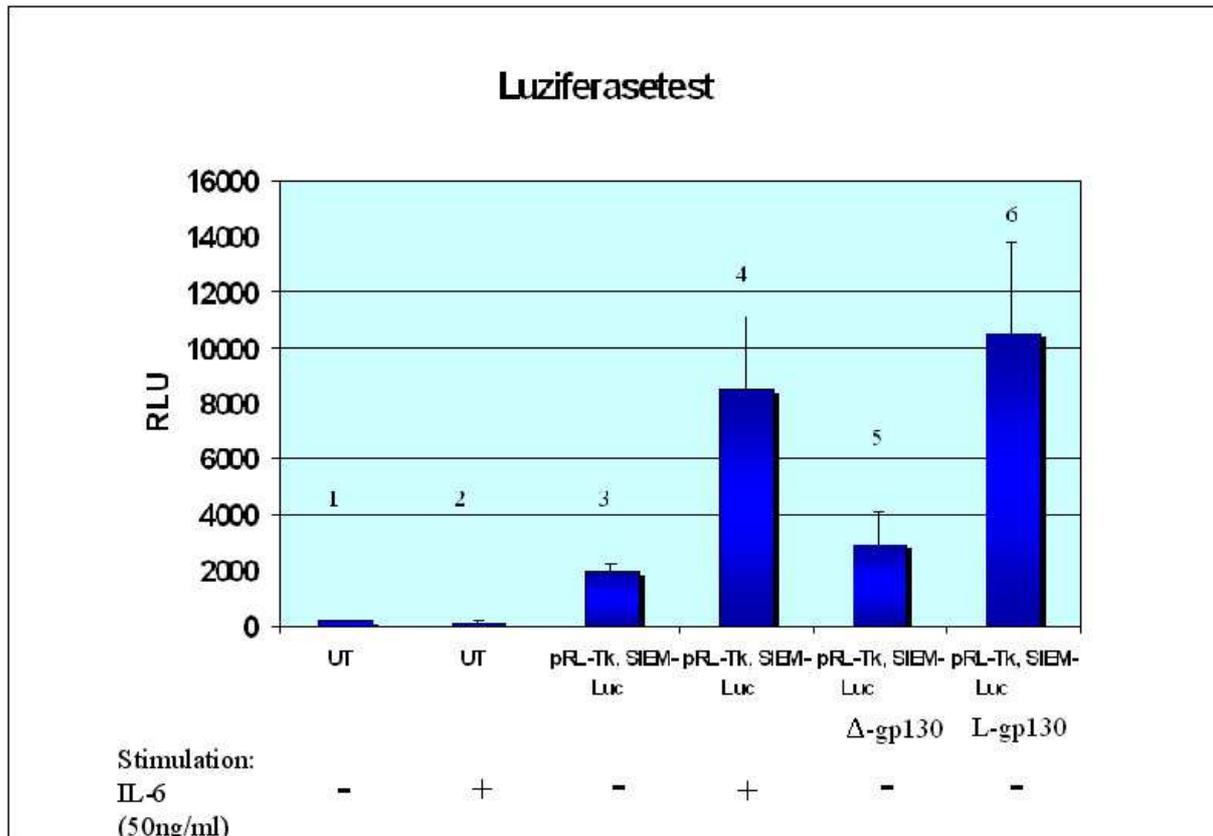


Abbildung 21: Luziferasetest: Fähigkeit von phosphoryliertem STAT3 zur Promotoraktivierung.

HepG2 Zellen wurden mit dem Plasmid für das Reportergenkonstrukt SIEM-Luc, sowie den Plasmiden für Δ -gp130 und L-gp130 transient transfiziert. Das Reportergenkonstrukt enthält die *siem*-Sequenz, an die aktives STAT3 bindet. Die Bindung kann die Aktivierung eines nachgeschalteten Promotors und damit die Expression des Luziferasereportergens auslösen. Als Kontrolle wurde ein zweites Luziferaseplasmid kotransfiziert (pRL-Tk). Die Zellen wurden 48 h nach der Transfektion für 24 h in serumfreiem Medium kultiviert. Danach erfolgte die Stimulation der Zellen mit IL-6 und die Lyse. Mit den Lysaten wurde der Dual-Luziferase Test nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Luziferaseaktivität wurde mit einem Luminometer gemessen. Die Aktivität wird angegeben in „Relativen Luziferase Einheiten“ (RLU). Alle Meßwerte sind Doppelwerte. Es wurden fünfmal unabhängig Zellen transfiziert und die Messungen wiederholt. Die Daten sind als Mittelwert mit Standardabweichung angegeben: Balken 1: untransfizierte Zellen ohne Stimulation; Balken 2: untransfizierte Zellen nach IL-6 Stimulation; Balken 3: mit pRL-Tk und SIEM-Luc transfizierte Zellen ohne Stimulation; Balken 4: mit pRL-Tk und SIEM-Luc transfizierte Zellen nach IL-6 Stimulation, Balken 5: mit pRL-Tk, SIEM-Luc und Δ -gp130 transfizierte Zellen ohne Stimulation, Balken 6: mit pRL-Tk, SIEM-Luc und L-gp130 transfizierte Zellen ohne Stimulation

Der Promotor des verwendeten Luziferasegens wird aktiviert, wenn phosphoryliertes STAT3 an die weiter 5' liegende *siem*-Sequenz bindet. HepG2 Zellen exprimieren genügend gp130, IL-6R und STAT3, um nach erfolgter Stimulation mit einer STAT3 Phosphorylierung zu reagieren. Deshalb mußten die entsprechenden cDNAs in diesem Versuch nicht kotransfiziert werden.

Für die Negativkontrolle wurden untransfizierte Zellen verwendet. Da sie kein Luziferasereporter gen exprimieren, kann in diesen Zellen auch nach Stimulation mit IL-6 keine Lumineszenz gemessen werden (Abbildung 21, Balken 1 und 2).

Als Positivkontrolle wurden Zellen mit den Luziferaseplasmiden pRL-Tk und *siem*-Luc kotransfiziert. Nur nach IL-6-Stimulation ist anhand der gestiegenen Lumineszenz die Aktivität von phosphoryliertem STAT3 meßbar (Abbildung 21, Balken 3 und 4). Aus Zellen, die neben den Luziferaseplasmiden mit der cDNA für Δ -gp130 kotransfiziert wurden, kann ohne Stimulation keine hohe Luziferaseaktivität, gemessen werden (Abbildung 21, Balken 5).

Zellen, die mit den Luziferaseplasmiden und der cDNA für L-gp130 kotransfiziert wurden zeigen stimulationsunabhängig eine Induktion der Reporter genaktivität (Abbildung 21, Balken 6).

3.8 Generierung von stabilen BAF/3 Zellen: retrovirale Transfektion

Für die Transfektion der BAF/3 Zellen wurde ein retrovirales System verwendet. Diese Methode macht sich eine Besonderheit aus dem Lebenszyklus der **Reverse Transkriptase Onkoviren** (Retroviren) zunutze. Retroviren kodieren unter anderem für das Enzym reverse Transkriptase, das eine DNA-Kopie des viralen RNA-Genoms herstellt. Diese Kopie wird stabil in ein Chromosom der Wirtszelle eingebaut und dann als provirale DNA bzw. Provirus bezeichnet. Dabei werden die Bereiche R, U₅ und U₃ dupliziert und fusioniert, man spricht dann von der *long terminal repeat* (LTR)-Region (Abbildung 22) [150]. Der verwendete retrovirale Vektor pMOWS enthält besondere, auf B-Zellen und hämatopoetische Zellen abgestimmte, LTR-Regionen (Abbildung 22) Der Einbau eines retroviralen Vektors in das Genom der Zielzelle hat den Vorteil einer konstanten Expression des Transgens. Die Information geht nicht, wie bei transienten Transfektionen, im Laufe mehrerer Zellteilungen verloren.

Jeder retrovirale Gentransfer verwendet zwei Komponenten, um ein Transgen in eine Zelle einzuschleusen. Den retroviralen Vektor mit dem Transgen und eine mit den Hüllproteinen des Virus stabil transfizierte Verpackungszelllinie (siehe auch Material und Methoden Abschnitt 2.12.3.3).

3.8.1 Der retrovirale Vektor: pMOWS

Bei der Konstruktion von retroviralen Vektoren sind die 3' und 5' untranslatierten Bereiche von großer Bedeutung. Sie setzen sich aus mehreren Elementen zusammen (Abbildung 22).

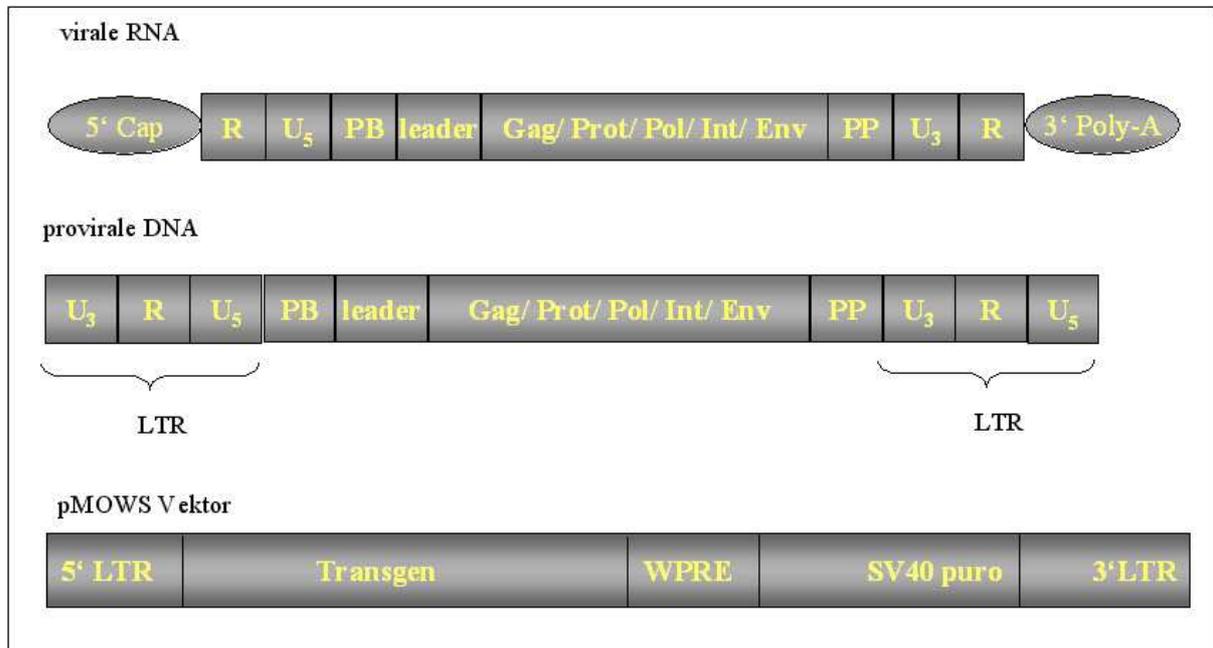


Abbildung 22: Ein als R (für *repeat*) bezeichneter Bereich umfaßt 20-250 Basenpaare und enthält wichtige Signale für die Transkription. Diese sind für die Generierung der proviralen DNA essentiell. Die als U₅ und U₃ (U: *unique*) bezeichneten Bereiche liegen in der viralen RNA am 5' bzw. 3' Ende. Sie sind 200-500 bp lang und enthalten wichtige cis-wirkende regulatorische Signale. Mit PB ist die *primer binding site* bezeichnet, hier bindet eine spezifische, zelluläre tRNA die bei der Initiierung der reversen Transkription als Primer fungiert. Die *Leader* Sequenz umfasst 50-400 Basenpaare und beinhaltet Signale, die für das Verpacken des viralen Genoms, sowie für die Virusreifung wichtig sind. Außerdem liegen in diesem Bereich Spleißstellen. Die Polypurin (PP)-Region ist eine Sequenz variabler Länge, die sich durch eine Häufung von Purinen auszeichnet. Auch sie spielt eine Rolle bei der Erstellung der proviralen DNA von der viralen RNA-Matrize.

Oben: Das Genom eines Retrovirus.

Retroviren besitzen zwei identische Kopien einer solchen RNA. Der 5' untranslatierte Bereich beginnt mit einer 7-Methylguanin-Kappe. Das Genom kodiert unter anderem die Proteine Gag (*group specific antigen*), Prot (*protease*), Pol (*polymerase*), Int (*integrase*) und Env (*envelope*). Der 3' untranslatierte Bereich endet in einer Poly(A)-Sequenz. Die Bedeutung der Bereiche R: *repeat*, U₅: *unique region 5' Ende*, U₃: *unique region 3' Ende*, PB: *primer binding site*, PP: Polypurin-Bereich und *leader sequence* sind im Text erklärt. Nicht eingezeichnet ist das Verpackungssignal Ψ.

Mitte: die als Provirus bezeichnete DNA nach der Integration ins Wirtszellgenom.

Man beachte die verdoppelten U₃ und U₅ Regionen und ihre Anordnung. Die Einheit U₃, U₅ und R wird als LTR (*long terminal repeat*) Region bezeichnet. Nicht eingezeichnet ist das Verpackungssignal Ψ.

Unten: der retrovirale Vektor enthält anstelle der genetischen Information für die Hüllproteine das Transgen. Der pMOWS Vektor kodiert außerdem eine Puromycinresistenz (SV40 puro). Die Bedeutung des WPRE (*woodchuck hepatitis B virus posttranscriptional regulatory element*) ist im Text erklärt. Nicht eingezeichnet ist das Verpackungssignal Ψ.

Der pMOWS-Vektor basiert auf dem Moloney-Maus-Leukämie-Virus (MoMuLV) [166, 167]. Die 5'-LTR-Region, die auch den Promotor beinhaltet, stammt von dem murinen embryonalen Stammzell Virus (*murine embryonal stem cell virus*) (MFG/MESV). Für das MESV-Virus konnte gezeigt werden, daß die Blockade der retroviralen Transkription in ES Zellen aufgehoben ist [168]. Der 5'-Bereich enthält kein negativ regulatorisches Element (NRE), welches in ursprünglichen MoMuLV-Vektoren mit der Primerbindestelle überlappt. Diese Überlappung führt zur Rekrutierung der negativ regulatorischen Elemente, welche potente transkriptionelle Repressoren sind. Mit dem *woodchuck hepatitis B virus post-transcriptional regulatory element* (WPRE) wurde eine Sequenz eingefügt, die sowohl die Transkription als auch die Translation verstärkt. Der 3'-LTR Bereich stammt aus dem *spleen focus-forming virus* (SFFV) und zeichnet sich durch eine Bindestelle für den ubiquitären transkriptionellen Aktivator Sp1 und für das enhanceraktivierende PEBP/CBF (*polyomavirus enhancer binding protein/core binding factor*) aus. Insgesamt wurden durch Sequenzveränderungen die Affinitäten für positive Transkriptionsfaktoren erhöht und die Affinitäten für negative transkriptionelle Regulatoren herabgesetzt [150].

3.8.2 Transfektion der Verpackungszelllinie Phönix-Eco

Die ekotrophe Verpackungszelllinie Phönix-Eco exprimiert konstitutiv die Proteine die für die Verpackung des retroviralen Vektors in virale Partikel notwendig sind.

Der erste Schritt einer retroviralen Transfektion ist die Transfektion der Verpackungszelllinie mit dem retroviralen Vektor, der das Transgen enthält. Nach einer erfolgreichen Transfektion werden von dem retroviralen Vektor Transkripte hergestellt. Diese werden zusammen mit den Hüllproteinen zu neuen viralen Partikeln verpackt und durch Knospung ins umgebende Medium entlassen.

Die ekotrophe Verpackungszelllinie Phönix-Eco wurde mittels der Calciumchlorid-Methode mit den Plasmiden pMOWS- Δ -gp130, pMOWS-L-gp130, pMOWS-WT-gp130 und pMOWS-GFP transfiziert. Das GFP kodierende Plasmid wurde dazu verwendet, die Transfektionseffizienz zu überprüfen (Abbildung 23). Das Protein GFP stammt aus der biolumineszenten Qualle *Aequorea victoria* und hat seine maximale Fluoreszenz bei einer Anregung mit Licht der Wellenlänge 450-490 nm.

Die Zellen wurden 24 h nach der Transfektion mit Licht der entsprechenden Wellenlänge bestrahlt. Zellen, die mit dem WT-gp130 transfiziert wurden, zeigen keine grüne Fluoreszenz

(Abbildung 23, linkes Bild). GFP transfizierte Zellen zeigen die Expression des Transgens. Die geschätzte Transfektionseffizienz lag bei 60-80 % (Abbildung 23, rechtes Bild).

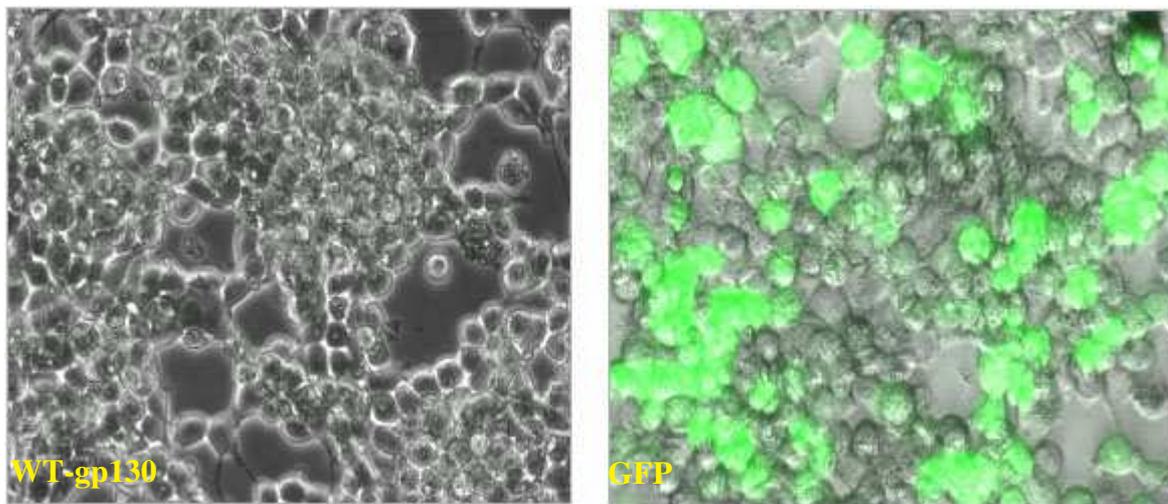


Abbildung 23: Transfektion der Verpackungszelllinie Phönix-Eco.

Phönix-Eco Zellen wurden mittels CaCl_2 -Methode transfiziert. Das linke Bild zeigt Zellen die mit dem pMOWS-WT-gp130 Vektor transfiziert sind, rechts pMOWS-GFP transfizierte Zellen. Die Proteinexpression wurde 24 h nach der Transfektion überprüft (Vergrößerung 20 x). Beide Bilder zeigen die Überlagerung einer Phasenkontrastaufnahme mit einer FITC-Aufnahme (Anregungswellenlänge: 485 nm). Im rechten Bild sind nur grün fluoreszierende Zellen transfiziert.

3.8.3 Transduktion der BAF/3 Zellen

Mit den so hergestellten viralen Partikeln wurden nun die BAF/3 Zellen transduziert. Nach erfolgreicher Transduktion integriert sich der retrovirale Vektor, der das Transgen enthält, in das Genom der Zielzelle. Dort wird neben dem Transgen auch das Resistenzgen exprimiert, so daß transduzierte Zellen mit Puromycin selektioniert werden können.

Zunächst sollte die Abhängigkeit der BAF/3 Zellen von dem Wachstumsfaktor IL-3 gezeigt werden. Dafür wurden native BAF/3 Zellen in Standardmedium kultiviert, das mit 10 % eines Kulturüberstandes von WEHI-Zellen supplemetiert worden war. Diese Zellen proliferieren und ziegen eine normale Morphologie (Abbildung 24, a).

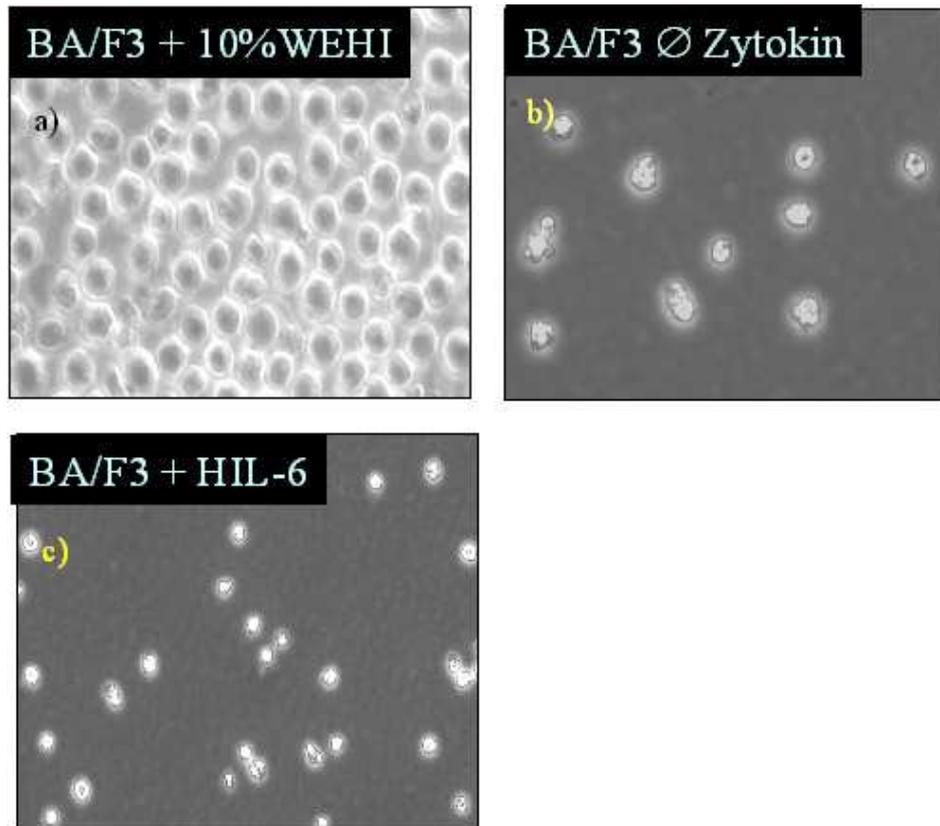


Abbildung 24: Morphologie nativer BAF/3 Zellen unter verschiedenen Wachstumsbedingungen.

a) BAF/3 Zellen wurden unter Standardbedingungen mit 10% WEHI kultiviert. Die Zellen haben eine runde Morphologie und sie proliferieren.

b) BAF/3 Zellen wurden dreimal mit PBS gewaschen und ohne Zytokin kultiviert. Das Bild wurde am zweiten Tag nach dem Zytokinenzug aufgenommen. Die Zellen sehen geschrumpft aus, sie sind tot.

c) Native BAF/3 Zellen wurden dreimal mit PBS gewaschen und dann mit HIL-6 (10ng/ml) kultiviert. Die Aufnahme entstand nach zwei Tagen. Die Zellen sehen geschrumpft aus, sie sind tot.

WEHI-Zellen sezernieren IL-3 in das sie umgebende Medium. Der gefilterte Kulturüberstand dieser Zellen dient den BAF/3 Zellen als IL-3-Quelle. Um die IL-3-Abhängigkeit der BAF/3 Zellen zu demonstrieren, wurden diese dreimal mit PBS gewaschen, um das IL-3 zu entfernen. Die Zellen wurden anschließend ohne Zytokin kultiviert. Wie anhand der veränderten Morphologie zu erkennen ist, sterben die Zellen nach zwei Tagen ohne Zytokin (Abbildung 24, b). Wurden native BAF/3 Zellen dreimal mit PBS gewaschen und dann mit HIL-6 kultiviert, so sterben sie ebenfalls innerhalb von zwei bis drei Tagen (Abbildung 24, c).

Für die Generierung der stabilen Zelllinien wurden BAF/3 Zellen mit Überständen der unterschiedlich transfizierten Verpackungszellen transduziert. Die Überstände dieser

Verpackungszellen enthalten die viralen Partikel mit den verschiedenen Transgenen. Alle transduzierten BAF/3 Zellen wurden 48 h nach der Transduktion mit 1.5 µg/ml Puromycin selektioniert. Die Aufnahmen aus Abbildung 25 entstanden 48 h nach Beginn der Puromycinselktion. Untransfizierte Zellen dienen als Negativkontrolle, die Zellen haben kein Puromycinresistenzgen und sterben (Abbildung 25, a). pMOWS-GFP transfizierte Zellen wurden unter Fluoreszenzbedingungen fotografiert. Zellen, die das Transgen aufgenommen haben, erscheinen grün. Zellen, die nicht grün fluoreszieren, tragen das Transgen nicht, haben daher keine Puromycinresistenz und sind daher gestorben (Abbildung 25, b).

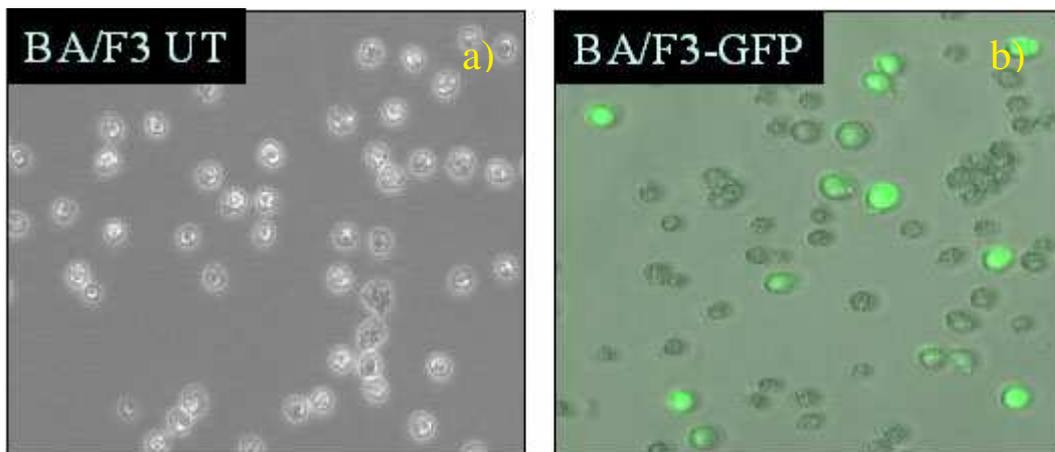


Abbildung 25: BAF/3 Zellen nach der Puromycinselktion.

Transduzierte und nicht transduzierte BAF/3 Zellen wurden zwei Tage mit Puromycin selektioniert. Um die Spezifität der Selektion zu überprüfen, wurde von den pMOWS-GFP transfizierten Zellen eine Fluoreszenzaufnahme gemacht (b). Als Kontrolle wurden untransfizierte BAF/3 Zellen mit Puromycin behandelt. Es handelt sich hier um eine Phasenkontrastaufnahme (a).

3.8.4 Selektion der WT-gp130 und L-gp130 transfizierten BAF/3 Zellen

WT-gp130, L-gp130 und Δ -gp130 transfizierte BAF/3 Zellen wurden 48 h nach der Transduktion für zwei Tage in Anwesenheit von 10% WEHI-Kulturüberstand mit Puromycin selektioniert. Die WT-gp130 Zellen wurden danach dreimal gewaschen und mit 10 ng/ml HIL-6 im Medium weiterkultiviert. Einige wenige Zellen überlebten mit HIL-6 als Wachstumsfaktor (Abbildung 26, a). Da einige Zellen diese Selektion zwar überlebten, aber nicht bzw. nur sehr langsam proliferierten, wurde mehrfach während der zweimonatigen Selektion wieder 10% WEHI-Kulturüberstand zugegeben. Sobald sich die Zellen vermehrt hatten, wurde das IL-3 wieder heraus gewaschen und die Selektion mit HIL-6 wieder gestartet. Abbildung 26, b)

entstand, nachdem den Zellen viermal WEHI-Kulturrüberstand zugesetzt und dieser wieder heraus gewaschen und durch HIL-6 ersetzt worden war. Danach proliferierten die Zellen in Anwesenheit von HIL-6 (Abbildung 26, b).

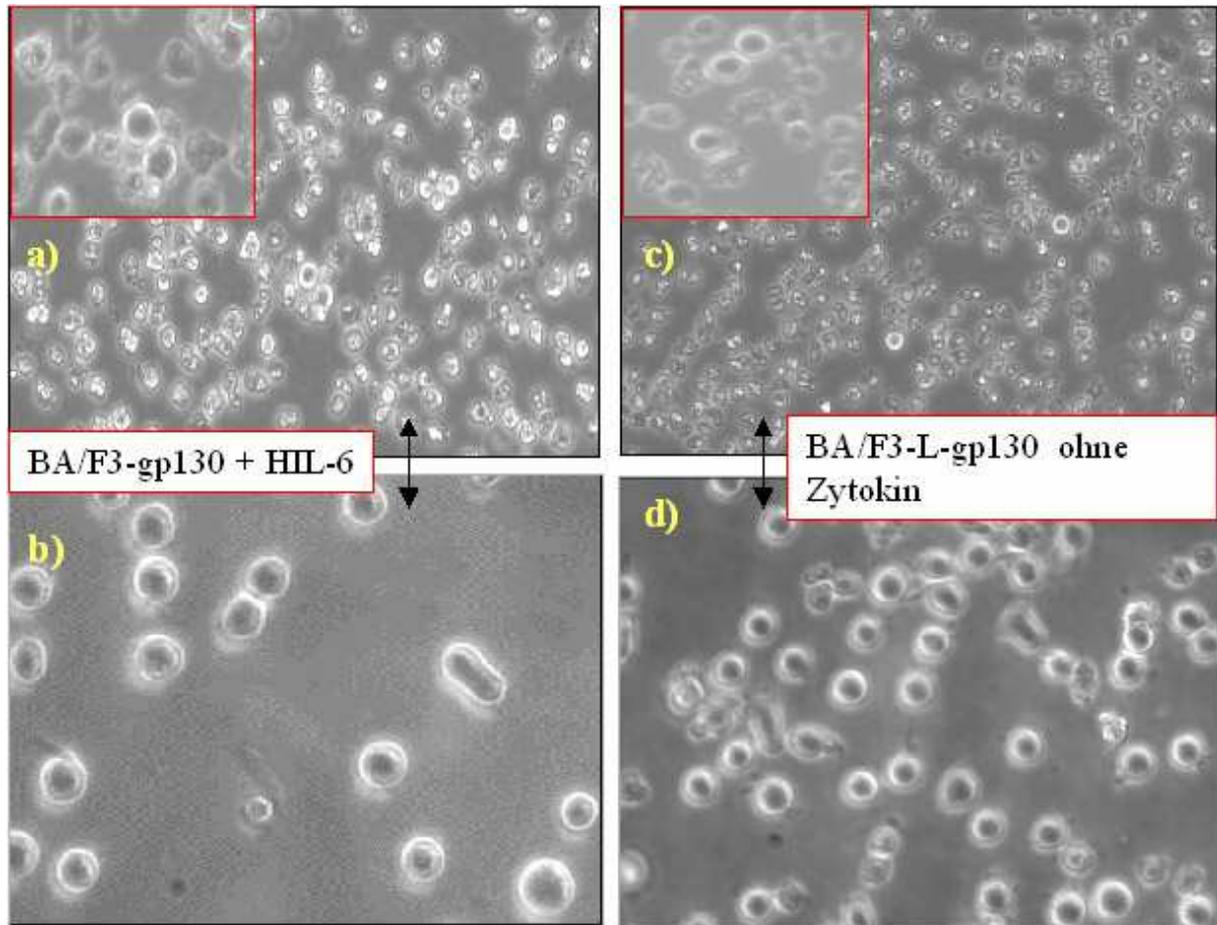


Abbildung 26: BAF/3-gp130 und BAF/3-L-gp130 Zellen während und nach der Selektion.

WT-gp130 transfizierte BAF/3 Zellen wurden zwei Tage in Anwesenheit von WEHI mit Puromycin selektiert. Dann wurden die Zellen dreimal gewaschen und ohne WEHI weiterkultiviert. Zu den Zellen wurde statt dessen 10 ng/ml HIL-6 gegeben (a). Die meisten Zellen starben während dieser Selektion (in (a): lebende Zellen siehe Ausschnitt). Durch die Zugabe von WEHI wurden die Zellen wieder zur Proliferation angeregt, bevor ihnen das IL-3 wieder entzogen wurde. Nachdem viermal WEHI zugesetzt und dieses wieder herausgewaschen und durch HIL-6 ersetzt worden ist, wuchsen die Zellen mit HIL-6 (b). BAF/3-L-gp130 Zellen wurden ebenfalls zwei Tage mit Puromycin selektiert, nach weiteren zwei Tagen gewaschen und dann ohne Zytokin ausgesät. Die meisten Zellen überlebten diese Selektion nicht (c, einzelne lebende Zellen siehe Ausschnitt). Nachdem viermal WEHI zugesetzt und dieses wieder herausgewaschen worden war wuchsen die Zellen ohne Zytokin (d).

Die L-gp130 transfizierten Zellen wurden nach der Puromycinvorselektion dreimal gewaschen und ohne Zytokin ausgesät. Wenn das gp130-Signal in diesen Zellen dauerhaft aktiviert ist, sollten die Zellen zytokinunabhängig wachsen können. Den Zytokinentzug überlebten, wie im vergrößerten Ausschnitt zu erkennen, nur wenige Zellen (Abbildung 26, c). Um die überlebenden Zellen zur Proliferation anzuregen, wurde auch hier in Abständen von 14-18 Tagen

10 % WEHI-Kulturüberstand zugegeben und später wieder heraus gewaschen. Auch diese Zellen proliferierten erst, nachdem viermal WEHI-Kulturüberstand zugesetzt und das IL-3 wieder heraus gewaschen worden war (Abbildung 26, d).

BAF/3 Zellen, die mit retroviralen Überständen von Δ -gp130 transfizierten Phönix-Eco Zellen transduziert worden waren, überlebten die ersten zwei Tage der Puromycinselektion. Danach wurden auch diese Zellen dreimal gewaschen und ohne Zytokin wieder ausgesät. Nach dem Zytokinentzug starben die Zellen alle innerhalb eines Tages (keine Abbildung).

3.9 Charakterisierung der stabilen Zelllinien: L-gp130 und WT-gp130

3.9.1 RT-PCR

Um die Expression der Transgene in den stabilen Zelllinien L-gp130 und WT-gp130 auf mRNA-Ebene zu untersuchen, wurde eine RT-PCR durchgeführt. Dafür wurde zunächst aus den entsprechenden Zellen RNA präpariert. Die RNA wurde anschließend in der Reversen Transkriptase (RT) Reaktion mit Oligo-dT Primern eingesetzt. Für die anschließende PCR wurden Primer aus dem zytoplasmatischen Bereich von gp130 verwendet, mit denen ein DNA-Fragment von 150 Basenpaaren amplifiziert werden kann. Als Negativkontrolle wurde von allen RNA Proben eine Reaktion ohne das Enzym Reverse Transkriptase angesetzt (Abbildung 27). Die RNA-Proben aus untransfizierten Zellen, WT-gp130 Zellen und L-gp130 Zellen waren nicht mit DNA kontaminiert (Abbildung 27, Spuren 1, 2 und 3). Die Spuren 4-6 zeigen Proben, in denen die Reverse Transkriptase verwendet wurde, um vorhandene mRNA in cDNA umzuschreiben. Aus untransfizierten BAF/3 Zellen konnte durch die RT-PCR mit den gp130-spezifischen Primern kein DNA-Fragment amplifiziert werden (Abbildung 27, Spur 4). Wurde RNA aus WT-gp130 transfizierten Zellen für die RT-PCR eingesetzt, konnte das 150 bp lange Fragment amplifiziert werden (Abbildung 27, Spur 5, roter Pfeil). Auch mit RNA aus L-gp130 transfizierten Zellen konnte als Produkt der RT-PCR ein 150 bp Fragment nachgewiesen werden (Abbildung 27, Spur 6).

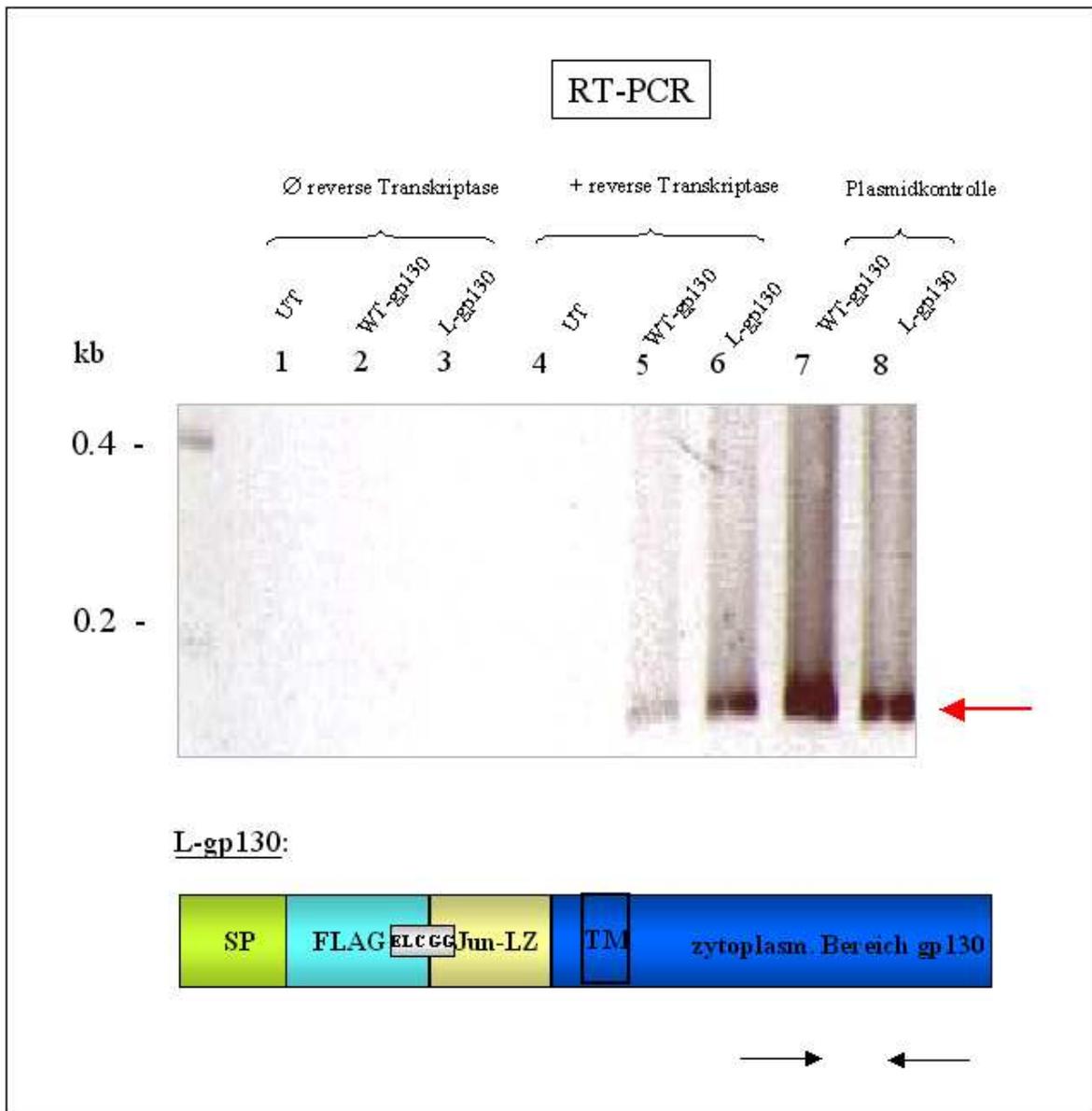


Abbildung 27: RT-PCR Nachweis der Transgenexpression auf RNA-Ebene.

Aus den stabilen Zelllinien WT-gp130 und L-gp130 wurde RNA isoliert und diese in einer reversen Transkriptase (RT) Reaktion eingesetzt. Die nachfolgende PCR wurde mit den Primern CD130revsi und CD130sense01 (Sequenzen siehe Tabelle 4) durchgeführt. Das erwartete DNA-Fragment ist 150 bp groß (roter Pfeil). Die Spuren 1-3 (Spur 1: RNA aus untransfizierten Zellen, Spur 2: WT-gp130 Zellen, Spur 3: L-gp130 Zellen) zeigen das Ergebnis der RT-PCR, in der keine reverse Transkriptase (RT) eingesetzt wurde. Damit wurden die RNA-Proben auf DNA-Kontaminationen überprüft. Spur 4: RT-PCR mit RNA aus untransfizierten Zellen, Spur 5: RT-PCR mit RNA aus WT-gp130 transfizierten Zellen, Spur 6: RT-PCR mit RNA aus L-gp130 transfizierten Zellen, Spur 7: PCR Kontrolle mit WT-gp130 Plasmid, Spur 8: PCR Kontrolle mit L-gp130 Plasmid. Die Schemazeichnung zeigt die Lage der Primer (schwarze Pfeile) im L-gp130.

Als Positivkontrolle wurde Plasmid-DNA als Matrize in der PCR eingesetzt. Spur 7 zeigt ein 150 bp Fragment das aus WT-gp130 Plasmid amplifiziert wurde und Spur 8 zeigt ein 150 Fragment das aus L-gp130 Plasmid amplifiziert wurde.

3.9.2 Proliferationstest: Zytokinabhängigkeit der Proliferationsrate

Um das Wachstumsverhalten der stabilen Zelllinien unter verschiedenen Stimulationsbedingungen zu überprüfen, wurden Proliferationstests durchgeführt. Dafür wurden BAF/3, BAF/3-Lgp130 und BAF/3-gp130 Zellen gewaschen und gezählt. Die gleiche Anzahl der verschiedenen Zellen wurde vier Tage unter verschiedenen Stimulationsbedingungen kultiviert. Dann wurde den Zellen über einen Zeitraum von 4 h radioaktiv markiertes Thymidin angeboten. Nur wenn Zellen proliferieren, wird DNA-neu synthetisiert und dabei das radioaktive Thymidin eingebaut. Die Menge an eingebauter Radioaktivität ist also ein Maß für die Proliferationsrate der Zellen.

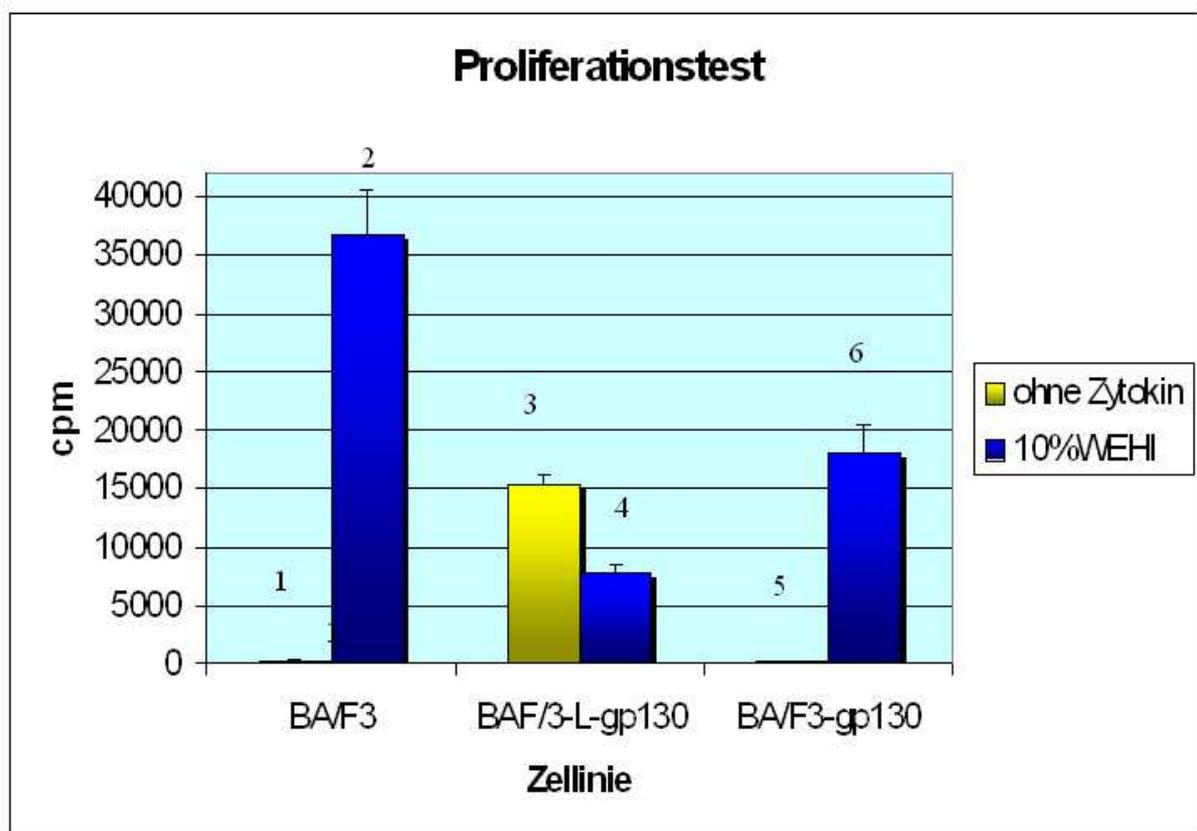


Abbildung 28: Proliferationstest der Zelllinien BAF/3, BAF/3-gp130 und BAF/3-L-gp130 nach Stimulation mit 10% WEHI bzw. nach Zytokinenzug.

5000 Zellen jeder Zelllinie wurden gewaschen, mit 10 % WEHI bzw. ohne Zytokin ausgesät und 4 Tage kultiviert. Dann wurde [³H] Methyl-Thymidin zugegeben und die Zellen weitere 4 h kultiviert. Die Zellen wurden auf Glasfaserfilter geerntet und die ³H Thymidin Inkorporation mit einem Szintillationsmeßgerät bestimmt. Bei den Daten handelt es sich um Mittelwerte +/- Standardabweichung von 10 Meßwerten. Balken 1: native BAF/3 Zellen ohne Zytokin, Balken 2: native BAF/3 Zellen mit 10% WEHI-Kulturüberstand, Balken 3: BAF/3-L-gp130 Zellen ohne Zytokin, Balken 4: BAF/3-L-gp130 Zellen mit 10% WEHI, Balken 5: BAF/3-gp130 Zellen ohne Zytokin, Balken 6: BAF/3-gp130 Zellen mit 10% WEHI-Kulturüberstand.

Native BAF/3 Zellen sterben, wenn sie ohne Zytokin kultiviert werden. Nach vier Tagen war keine Proliferation mehr meßbar (Abbildung 28, Balken 1). In Anwesenheit von 10% (v/v) WEHI-Kulturüberstand proliferieren die BAF/3 Zellen (Abbildung 28, Balken 2). BAF/3-L-gp130 Zellen wachsen hingegen auch zytokinunabhängig (Abbildung 28, Balken 3). Bemerkenswert ist, daß die Proliferationsrate der BAF/3-L-gp130 Zellen selbst mit WEHI-Kulturüberstand im Vergleich zu den nativen BAF/3 Zellen stark vermindert ist (Abbildung 28, vgl. Balken 2 und 4). Für diesen Versuch wurden BAF/3-L-gp130 Zellen verwendet, die erst seit 3 Wochen selektioniert und/oder adaptiert waren. BAF/3 WT-gp130 Zellen sterben ohne Zytokin (Abbildung 28, Balken 5), mit 10% (v/v) WEHI-Kulturüberstand ist eine Proliferation meßbar, die jedoch ebenfalls geringer ist als die der nativen BAF/3 Zellen (Abbildung 28, vgl. Balken 2 und 6).

3.9.3 Proliferationstest: Einfluß von HIL-6 auf die Proliferationsrate

Um die Effekte von HIL-6 auf die Zelllinie BAF/3-L-gp130 zu untersuchen, wurde ein weiterer Proliferationstest durchgeführt. Native BAF/3 und BAF/3-gp130 Zellen dienten dabei als Kontrolle. Die Zellen wurden nach dem Waschen mit verschiedenen Konzentrationen HIL-6 versetzt und wieder ausgesät. Als Negativkontrolle wurde kein Zytokin zugesetzt, für die Positivkontrolle wurden 10 % (v/v) des WEHI-Kulturüberstandes zugesetzt. Nach vier Tagen in Kultur wurde [³H] Methyl-Thymidin zugegeben und nach weiteren 4 h die Menge der aufgenommenen Radioaktivität bestimmt (Abbildung 29).

Die nativen BAF/3 Zellen wuchsen, nach IL-3-Entzug, nicht mit HIL-6. Auch steigende Konzentrationen von HIL-6 induzierten keine Proliferation. Die nativen Zellen wuchsen nur in Anwesenheit von 10 % (v/v) WEHI-Kulturüberstand (Abbildung 29, blaue Balken). Auf die L-gp130 Zellen hatte HIL-6 ebenfalls keinen Einfluß. Die Zellen wachsen zwar, dieser Effekt ist aber im getesteten Konzentrationsbereich (1- 10 ng/ml HIL-6) konzentrationsunabhängig (Abbildung 29, gelbe Balken). Erneut konnte gezeigt werden, daß die L-gp130 Zellen auch ohne Zytokin proliferieren (gelber Balken, ganz links). Bei BAF/3-gp130 Zellen induzierten steigende Konzentrationen HIL-6 die Proliferation. Ab 1 ng/ml ist ein deutliches Wachstum meßbar. Der proliferationsfördernde Effekt läßt sich mit zunehmenden Konzentrationen des Zytokins weiter steigern (Abbildung 29, lila Balken). Ohne Zytokin wachsen BAF/3-gp130 Zellen nicht (3er Balken ganz links). In Anwesenheit von 10% (v/v) WEHI-Kulturüberstand wachsen alle drei Zelllinien. Die L-gp130 transfizierten Zellen zeigen hier wieder eine deutlich niedrigere Proliferationsrate als die nativen Zellen (3er Balken ganz rechts).

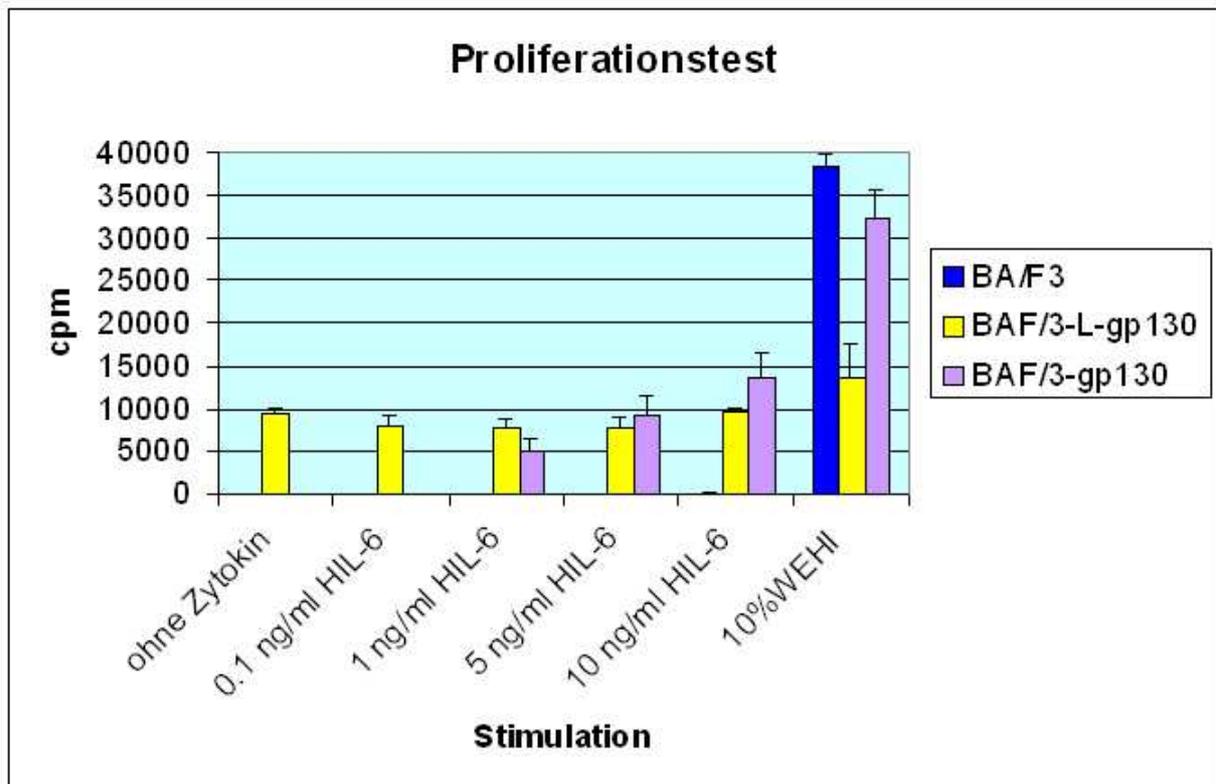


Abbildung 29: Proliferationstest zur Überprüfung der HIL-6 Abhängigkeit von BAF/3, BAF/3-L-gp130 und BAF/3-L-gp130 Zellen.

BAF/3, BAF/3-L-gp130 und BAF/3-L-gp130 Zellen wurden gewaschen und mit steigenden Konzentrationen HIL-6 über einen Zeitraum von 4 Tagen inkubiert. Anschließend wurden die Zellen 4 h mit [³H]-Thymidin inkubiert und dann auf Glasfaserfilter geerntet. Die [³H]-Thymidin Inkorporation wurde durch Szintillationszählung gemessen. Bei den Daten handelt es sich um Mittelwerte von 4 Meßwerten. Die zytokinunabhängige Proliferation von L-gp130 Zellen ist im Meßbereich (1-10 ng/ml) unabhängig von HIL-6.

Blau: untransfizierte BAF/3 Zellen, gelb: L-gp130 Zellen lila: BAF/3-gp130 Zellen.

3.9.4 Aktivierung von Effektorproteinen: STAT5

Native BAF/3 Zellen sind IL-3 abhängig. Durch eine Stimulation mit IL-3 wird der Transkriptionsfaktor STAT5 aktiviert. BAF/3-gp130 Zellen sind nicht mehr IL-3 abhängig, sondern können mit HIL-6 als Wachstumsfaktor überleben und proliferieren. In diesem Fall wird in den entsprechenden Zellen dann der Transkriptionsfaktor STAT3 aktiviert. Um die Auswirkungen des stabil transfizierten L-gp130 auf die Signaltransduktion zu untersuchen, wurde daher der Phosphorylierungsstatus der beiden Proteine STAT5 und STAT3 untersucht (Abbildung 30). BAF/3, BAF/3-gp130 und BAF/3-L-gp130 Zellen wurden gewaschen, für 6 h in serumfreiem Medium kultiviert und mit 10 % (v/v) WEHI-Kulturüberstand, 10 ng/ml IL-3 oder 10 ng/ml HIL-6 für 10 min stimuliert. Nach der Lyse wurden alle STAT5 Proteine präzipitiert.

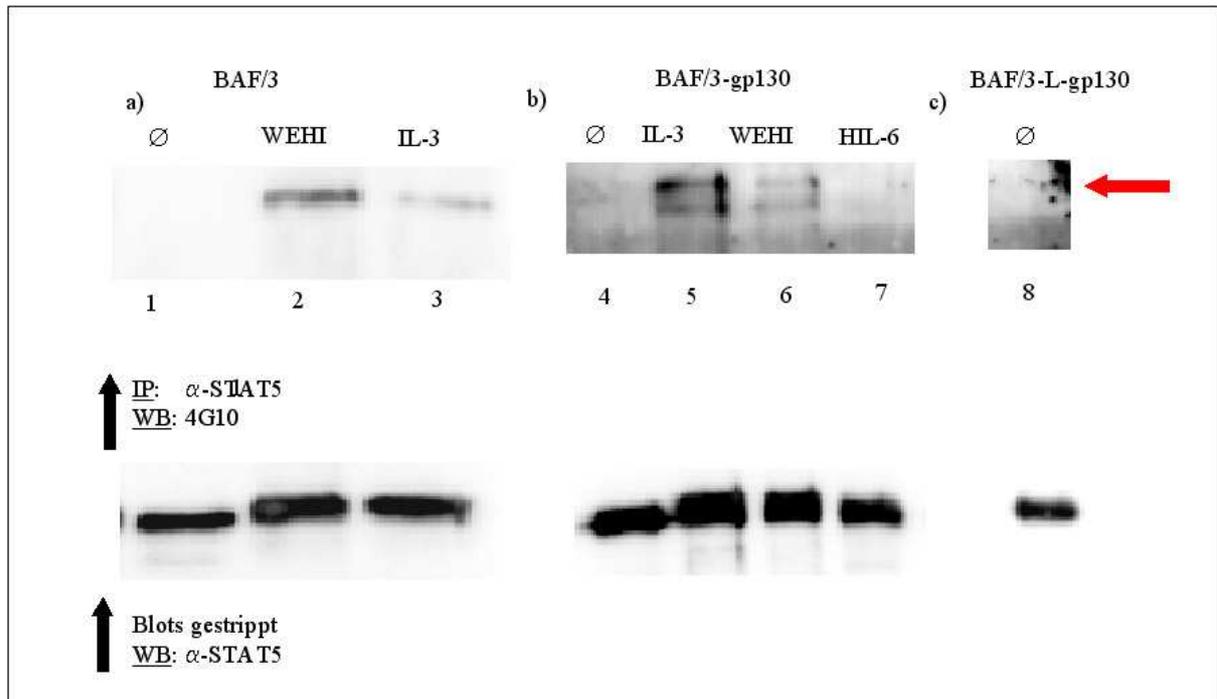


Abbildung 30: Western-Blot Analyse des Phosphorylierungsstatus von STAT5 in BAF/3, BAF/3-gp130 und BAF/3-L-gp130 Zellen.

Nachweis von phosphoryliertem STAT5 aus BAF/3, BAF/3-gp130 und BAF/3-L-gp130 Zellen. 2×10^6 Zellen wurden gewaschen und 6 h in serumfreiem Medium kultiviert. Die Stimulation mit den Zytokinen erfolgte für 10 min bei 37 °C. Anschließend wurden die Zellen lysiert. Durch die Inkubation mit einem STAT5 Antikörper wurden zunächst alle STAT5 Proteine präzipitiert. Die Proteine wurden im SDS-Gel aufgetrennt und auf eine PVDF Membran übertragen. Die Membran wurde mit dem phosphotyrosinspezifischen Antikörper 4G10 inkubiert. Der peroxidasegekoppelte Sekundärantikörper wurde durch Chemilumineszenz nachgewiesen. A: unstimulierte, mit WEHI-Kulturüberstand und IL-3 stimulierte BAF/3 Zellen, B: unstimulierte, mit WEHI-Kulturüberstand, IL-3 und HIL-6 stimulierte BAF/3-gp130 Zellen, C: unstimulierte BAF/3-L-gp130 Zellen. Aus L-gp130 Zellen ist keine stimulationsunabhängige STAT5 Phosphorylierung nachweisbar.

Der Western-Blot mit dem phosphotyrosinspezifischen Antikörper (4G10) zeigt daher nur phosphorylierte STAT5 Proteine (Abbildung 30, a, b und c). In nativen BAF/3 Zellen löst eine Stimulation mit WEHI-Kulturüberstand oder IL-3 die STAT5 Phosphorylierung aus (Abbildung 30 a, Spuren 2 und 3), in unstimulierten Kontrollzellen erscheint keine Bande (Abbildung 30 a, Spur 1). Auch bei BAF/3-gp130 Zellen führt die Stimulation mit WEHI-Kulturüberstand und IL-3 zur STAT5 Phosphorylierung (Abbildung 30 b, Spuren 5 und 6). Mit HIL-6 ist keine STAT5 Aktivierung induzierbar (Abbildung 30 b, Spur 7). Da mit L-gp130 transfizierte Zellen ohne Ligand aktiv sind, wurde nur die STAT5 Phosphorylierung in unstimulierten BAF/3-L-gp130 Zellen untersucht. Aus Lysaten dieser Zellen ist ohne Stimulation kein aktives STAT5 nachweisbar (Abbildung 30 c, Spur 8, roter Pfeil). In einigen Versuchen wurden bei dem STAT5 Nachweis Doppelbanden sichtbar. Möglicherweise handelt es sich dabei um proteolytische

Abbauprodukte. Um zu zeigen, daß in allen Spuren der Gele vergleichbare Proteinmengen analysiert wurden, wurden die Membranen unter stringenten Bedingungen gewaschen und mit einem STAT5 Antikörper reinkubiert. So wurde die Gesamtmenge an vorhandenem STAT5-Protein gezeigt (Abbildung 30, untere Spur). Man sieht, daß in allen Spuren vergleichbare STAT5 Mengen untersucht wurden.

3.9.5 Aktivierung von Effektorproteinen: STAT3

Mit WT-gp130 transfizierte BAF/3 Zellen können in Anwesenheit von HIL-6 überleben und proliferieren. In diesen Zellen kommt es dann zu einer Phosphorylierung von STAT3. Um die Auswirkung von stabil transfiziertem L-gp130 auf die STAT3 Aktivierung zu untersuchen, wurden BAF/3, BAF/3-gp130 und BAF/3-L-gp130 Zellen gewaschen, für 6 h in serumfreiem Medium kultiviert und mit 10 ng/ml HIL-6 stimuliert (Abbildung 31).

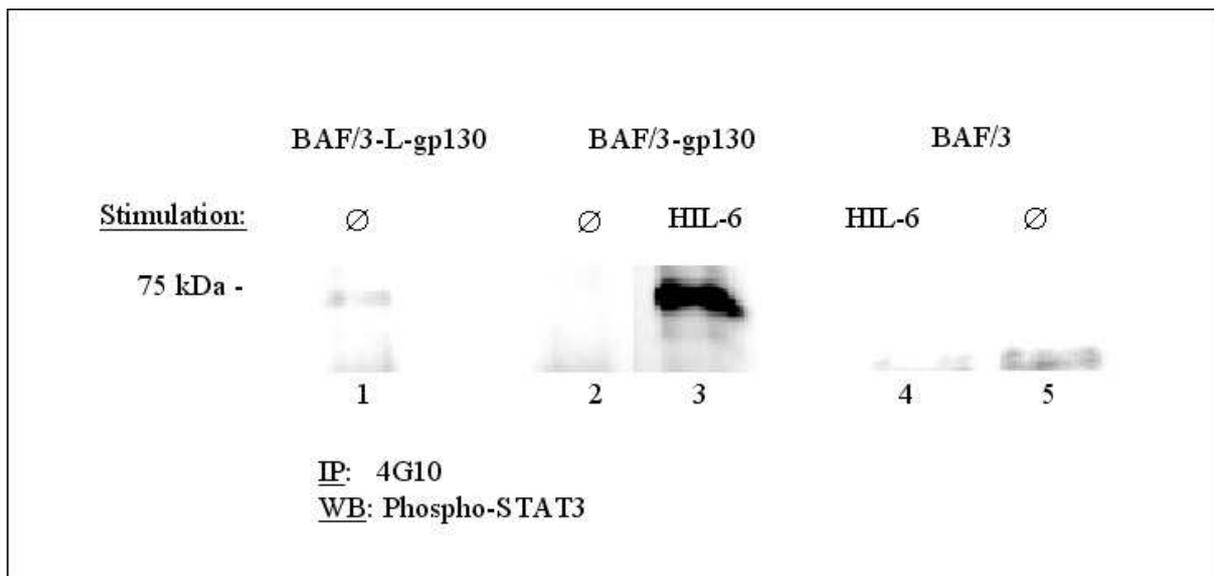


Abbildung 31: Western-Blot Analyse des Phosphorylierungsstatus von STAT3 in BAF/3, BAF/3-gp130 und BAF/3-L-gp130 Zellen.

2×10^6 BAF/3, BAF/3-gp130 und BAF/3-L-gp130 Zellen wurden gewaschen und für 6 h in serumfreiem Medium kultiviert. Die Stimulation mit HIL-6 erfolgte für 10 min bei 37 °C. Anschließend wurden die Zellen lysiert. Aus den Lysaten wurden alle phosphorylierten Proteine präzipitiert (Antikörper: 4G10) und durch Zugabe von Protein-A-Sepharose gefällt. Die Proteine wurden in einer SDS-PAGE aufgetrennt und im Western-Blot analysiert. Für die Detektion im Western-Blot wurde ein Antikörper verwendet, der ausschließlich phosphoryliertes STAT3 erkennt. Spur 1: unstimulierte BAF/3-L-gp130 Zellen, Spur 2: unstimulierte BAF/3-gp130 Zellen, Spur 3: mit HIL-6 stimulierte BAF/3-gp130 Zellen, Spur 4: mit HIL-6 stimulierte BAF/3 Zellen, Spur 5: unstimulierte BAF/3 Zellen. In L-gp130 Zellen ist STAT3 auch ohne Stimulation aktiv (Spur 1).

Phosphorylierte STAT3 Proteine wurden mit dem 4G10 Antikörper präzipitiert und im Western-Blot durch einen Phospho-STAT3 Antikörper analysiert. Aus Lysaten von BAF/3-L-gp130 Zellen ist ohne Stimulation phosphoryliertes STAT3 detektierbar (Abbildung 31, Spur 1). In BAF/3-gp130 Zellen ist eine STAT3 Aktivierung nur nach vorheriger Stimulation mit HIL-6 nachweisbar (Abbildung 31, Spuren 2 und 3). In nativen BAF/3 Zellen ist durch HIL-6 keine STAT3 Aktivierung induzierbar (Abbildung 31, Spuren 4 und 5).

4 Diskussion

4.1 Konstitutiv aktives gp130

Das Glykoprotein 130 ist die gemeinsame Rezeptoruntereinheit aller Zytokine der IL-6 Familie. Die Bindung eines Liganden bewirkt die Oligomerisierung des Transmembranrezeptors mit anderen Rezeptoruntereinheiten der IL-6 artigen Zytokine. Im Verlaufe der Signalübertragung kommt es zur Autophosphorylierung assoziierter Januskinasen und zur Phosphorylierung zytoplasmatischer Tyrosinreste des Rezeptors. Diese Rezeptorphosphotyrosine rekrutieren zytoplasmatische STAT Proteine, welche über ihre SH2 Domänen binden. Die STAT Proteine werden durch rezeptor-assoziierte Kinasen phosphoryliert. Diese Phosphorylierung induziert die Dimerisierung und die nukleäre Translokation der STAT Proteine. Im Zellkern wirken sie als Transkriptionsfaktoren und aktivieren spezifische Promotorelemente von Zielgenen. Durch gp130 werden verschiedene Signalwege in Zellen aktiviert, unter anderem der PI3-Kinase-, Ras/Raf/MAPK- und Jak-STAT-Weg. Im Falle des Jak-STAT Signaltransduktionsweges resultiert die Aktivierung durch IL-6 in der Homodimerisierung von gp130 und der Phosphorylierung der Transkriptionsfaktoren STAT1 und STAT3.

Die konstitutive Aktivierung von Proteinen des Jak-STAT Signalweges ist mit humanen Krebserkrankungen assoziiert. Insbesondere scheint dabei dauerhaft aktives STAT3 eine wichtige Rolle zu spielen [125, 137]. Der Zusammenhang zwischen konstitutiv aktivem STAT3 und Krebserkrankungen wurde z.B. für hämatologische Erkrankungen, wie das Multiple Myelom [125] und für Brustkrebs [124] gezeigt.

In dieser Arbeit sollte die Bedeutung von konstitutiv aktivem gp130 untersucht werden. Dazu wurden zwei chimäre gp130 Moleküle generiert. Für das Protein Δ -gp130 wurde der gp130-Wildtyprezeptor (WT-gp130) 15 AS über der Transmembrandomäne trunziert. An das Protein L-gp130 wurde extrazellulär ein Jun-Zipper angefügt, über den monomere Rezeptormoleküle dimerisieren können [140, 141]. Beide Moleküle wurden auf cDNA Ebene kloniert und die Proteine wurden exprimiert. In Transfektionsexperimenten wurden die Effekte der transgenen Rezeptoren auf den Jak-STAT Signaltransduktionsweg eukaryotischer Zellen untersucht.

4.2 Aktivierung von gp130: Ist die physikalische Dimerisierung ausreichend oder ist das Erreichen einer spezifischen Konformation und Orientierung der zytoplasmatischen Rezeptorbereiche essentiell?

Die Frage, ob eine Dimerisierung von gp130 ausreichend ist, um ein Signal auszulösen oder ob eine präzise Orientierung der zytoplasmatischen Bereiche erreicht werden muß, kann nicht beantwortet werden. Es wäre denkbar, daß die extrazellulären Domänen von gp130 dafür sorgen, daß die zytoplasmatischen Bereiche des Rezeptors in einem inaktiven Abstand zueinander liegen. Die Ligandenbindung könnte eine Konformationsänderung bewirken, welche die zytoplasmatischen Rezeptorbereiche näher zusammenbringt und die Autophosphorylierung der Januskinasen ermöglicht. Für den Erythropoetinrezeptor (EPOR), der als präformiertes nicht kovalentes Dimer vorliegt, konnte diese Art der Aktivierung gezeigt werden [169].

In der Transmembrandomäne von gp130 kommt die Aminosäure Cystein zweimal vor. Durch die Ausbildung einer Disulfidbrücke zwischen zwei Monomeren könnte eine Dimerisierung erfolgen, ohne daß es zu größeren Konformationsänderungen im zytoplasmatischen Bereich von gp130 kommt. Mit Hilfe des Δ -gp130 Konstruktes sollte unter anderem die Frage beantwortet werden, ob das Entfernen des extrazellulären Bereiches eine solche Dimerisierung ermöglicht. Weiterhin sollte untersucht werden, ob eine solche Dimerisierung zu einer Aktivierung der Signalkaskade führt oder nicht.

Diese Fragen konnten nicht beantwortet werden. Das Protein Δ -gp130 wird zwar exprimiert, aber nicht an seinen Bestimmungsort, die Plasmamembran transportiert. Möglicherweise führte die Trunkierung des extrazellulären Bereiches dazu, daß das verbleibende Protein nicht richtig gefaltet werden kann. Falsch gefaltete Proteine werden im endoplasmatischen Retikulum (ER) zurückgehalten und danach degradiert [170]. Die indirekte Immunfluoreszenzfärbung von Δ -gp130 in transfizierten Zellen weist darauf hin. In diesem Versuch konnten lediglich Bereiche des Proteinsyntheseapparates und Vesikel spezifisch fluoreszenzmarkiert werden, aber keine Plasmamembran (siehe Abb. 15).

4.3 L-gp130: Ein Modell für eine permanente, ligandenunabhängige Stimulation von gp130

4.3.1 Effekte von L-gp130 auf transient transfizierte Zellen

Die extrazellulären Bereiche des Transmembranrezeptors gp130 wurden durch den Leuzin-Zipper Bereich aus dem humanen c-Jun Protein ersetzt. Dies führte zu einer Dimerisierung der zytoplasmatischen Rezeptorbereiche. Die so induzierte Dimersierung des chimären Proteins L-gp130 führt zu einer konstitutiven Aktivierung. In transient transfizierten eukaryotischen Zellen löst L-gp130 eine stimulationsunabhängige Aktivierung von Proteinen des Jak-STAT Signaltransduktionsweges aus. Der Transkriptionsfaktor STAT3 ist zytokinunabhängig phosphoryliert. Um zu überprüfen, ob die durch L-gp130 aktivierten STAT3 Proteine ihre biologische Funktion ausüben können, wurde ein DNA-Bindungstest durchgeführt. Damit konnte gezeigt werden, daß die aktiven STAT3 Proteine aus Lysaten L-gp130 transfizierter Zellen in der Lage sind, an eine spezifische DNA-Sequenz zu binden. Es handelt sich dabei um eine natürliche Zielsequenz von aktivem STAT3, die als *siem* (*sis-inducible element*) bezeichnet wird. Diese Sequenz findet man im Promotorbereich des *c-Fos* Gens. Da für einen Transkriptionsfaktor nicht nur die Bindung an eine spezifische Zielsequenz von Bedeutung ist, sondern auch die Fähigkeit zur Aktivierung eines Promotors, wurde außerdem ein Reportergentest durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, daß die aktivierten STAT3 Proteine einen Thymidinkinasepromotor anschalten und damit die Expression eines Reportergens induzieren können. So konnte gezeigt werden, daß der chimäre Rezeptor L-gp130 stimulationsunabhängig den Jak-STAT Signalweg in eukaryotischen Zellen aktiviert.

Der Wildtyprezeptor gp130 ist ohne vorherige Stimulation nicht aktiv. L-gp130 hingegen signalisiert stimulationsunabhängig. Der Vorteil eines stimulationsunabhängigen Rezeptorsystems besteht darin, daß Effekte von endogenen Rezeptoren weitgehend ausgeschlossen werden können. Dies ist insbesondere in experimenteller Hinsicht von Vorteil, da WT-gp130 ubiquitär exprimiert wird.

4.3.2 Effekte von L-gp130 auf stabil transfizierte Zellen: BAF/3-L-gp130 Zellen wachsen faktorunabhängig

BAF/3 Zellen sind immortalisierte murine Prä-B-Zellen, die sowohl in Bezug auf Überleben als auch auf Proliferation, von dem Zytokin IL-3 abhängig sind [158]. Ein Entzug von IL-3 bewirkt

das Sterben der Zellen durch Apoptose innerhalb von 24-36 h [147, 171]. BAF/3 Zellen weisen das immunologische Profil sehr früher B-Zellen auf. Sie exprimieren das Oberflächenantigen B220, welches das früheste B-zellspezifische Antigen ist [147]. Ist auf Zellen die Expression von B220 nachweisbar, werden diese der B-Zelllinie zugeordnet [172]. Die Entwicklung einer myeloiden Vorläuferzelle zu einer reifen B-Zelle verläuft in mehreren Schritten. Pro-B Zellen (*progenitor B cell*), differenzieren in der Umgebung des Knochenmarks, zu den Prä-B Zellen (*precursor B cells*). Der Kontakt zwischen den Stromazellen des Knochenmarks und den unreifen B-Zellen ist dabei essentiell. Der Übergang von der Pro-B Zelle zur Prä-B Zelle ist mit Gen-Umlagerungen der Immunglobulin DNA assoziiert. Zuerst werden die Gene für die schwere Kette der Immunglobuline umgelagert. Ist dieser Vorgang abgeschlossen, so bezeichnet man die Zelle als Prä-B Zelle. Später werden auch die Gene für die leichte Kette der Immunglobuline umgelagert [172]. BAF/3 Zellen weisen noch keine umgelagerten Immunglobulingene auf, insofern ist ihre Bezeichnung als Prä-B-Zellen irreführend. Das entwicklungsbiologische Potential von BAF/3 Zellen ist hoch. In bestrahlten Mäusen, also *in vivo*, können BAF/3 Zellen zu antikörperproduzierenden B-Zellen differenzieren, *in vitro* besitzen sie diese Kapazität nicht [147].

Wir haben uns als Zellsystem für BAF/3 Zellen entschieden, da BAF/3 Zellen endogen keine Zytokinrezeptoren der IL-6-Familie exprimieren. Entsprechend kann man nach einer Transfektion die Auswirkungen solcher Proteine völlig unabhängig von einem Einfluß endogener Signale untersuchen.

Für die Generierung einer stabilen BAF/3-Zelllinie wurde ein retrovirales Transfektionssystem verwendet. Retrovirale Transfektionssysteme zeichnen sich im allgemeinen durch ihre hohe Effizienz aus [173, 174]. Es ist jedoch bekannt, daß die Expression von retroviralen Vektoren in bestimmten Zelltypen oftmals stark herunterreguliert wird [175, 176]. Dazu zählen embryonale Stammzellen und hämatopoetische Vorläuferzellen [177-179]. Der Mechanismus dieses als *retroviral silencing* bezeichneten Phänomens wird noch diskutiert. Zelltypspezifische trans-wirkende transkriptionelle Repressoren können die Transkription behindern. Als trans-wirkend wird ein Faktor bezeichnet, wenn er seine Funktion nicht im Bereich seines Gens, sondern an räumlich weiter entfernten Genen im Genom ausübt. Eine cis-wirkende *de novo* Methylierung des integrierten Provirus wird als weitere Ursache diskutiert. Cis-wirkende Faktoren beeinflussen nur die Expression von Genen, die auf dem gleichen Chromosom lokalisiert sind. Diese DNA-Methylierung könnte ein zellulärer Mechanismus sein, um retrovirale Elemente zu inaktivieren und damit die Verbreitung von transposablen Elementen zu verhindern [180-182].

Mit dem speziell an hämatopoetische Zellen angepaßten retroviralen Vektor pMOWS konnten Zellen stabil transfiziert werden [150]. Bei der Konstruktion retroviraler Vektoren für hämatopoetische Vorläuferzellen sind vor allem regulatorische Bereiche innerhalb der 5' und 3' *long terminal repeat* (LTR) Regionen zu beachten. Die Besonderheiten des Vektors pMOWS hinsichtlich dieser Bereiche wurden bereits im Ergebnisteil dargestellt. Zusammenfassend kann man sagen, daß durch Sequenzveränderungen die Affinitäten für positive Transkriptionsfaktoren erhöht und die Affinitäten für negative transkriptionelle Regulatoren herabgesetzt wurden.

BAF/3 Zellen sind im nativen Zustand abhängig von IL-3 [147], was zu einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors STAT5 führt (siehe Abbildung 32).

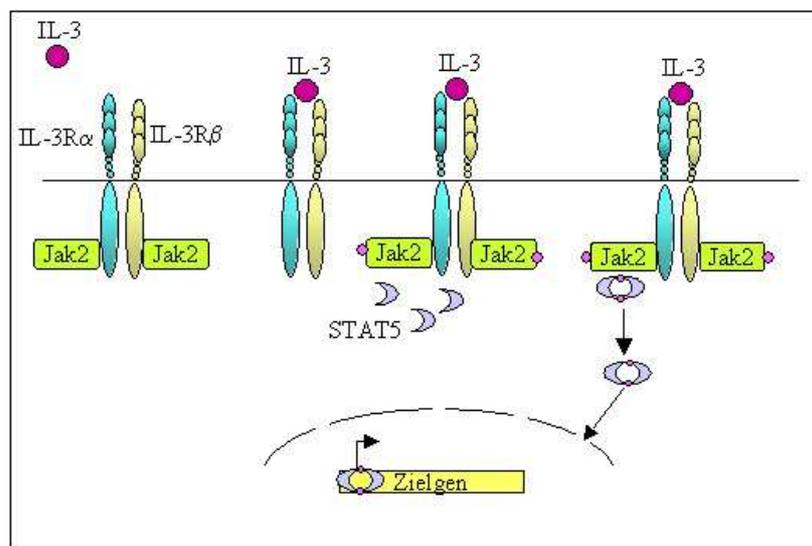


Abbildung 32: Aktivierung des Jak/STAT Signaltransduktionsweges in BAF/3 Zellen durch Stimulierung mit IL-3. Die Stimulation mit IL-3 bewirkt die Dimerisierung der Rezeptoruntereinheiten IL-3R α und IL-3R β . Im Verlauf der Signaltransduktion kommt es unter anderem zur Autophosphorylierung der Kinase Jak2. Der Transkriptionsfaktor STAT5 wird phosphoryliert und bildet daraufhin Dimere. Dimerisiertes STAT5 wandert in den Zellkern und induziert dort die Transkription von Zielgenen.

Eine Transfektion von BAF/3 Zellen mit dem WT-gp130 führt nach einer Stimulation mit IL-6/sIL6R zu einer Homodimerisierung von gp130 und einer Aktivierung von STAT3 [158]. Anstelle von IL-6/sIL-6R kann auch das Fusionsprotein Hyper-IL-6 (HIL-6) für die Stimulation von Zellen verwendet werden. Hyper-IL-6 ist ein Designerzytokin, das aus IL-6 und dem löslichen IL-6R besteht [153]. Bei einer Stimulation mit Hyper IL-6 ist man von der zelleigenen Expression des IL-6R unabhängig. BAF/3-WT-gp130 Zellen überleben und proliferieren ohne IL-3, insofern sie mit HIL-6 stimuliert werden [153].

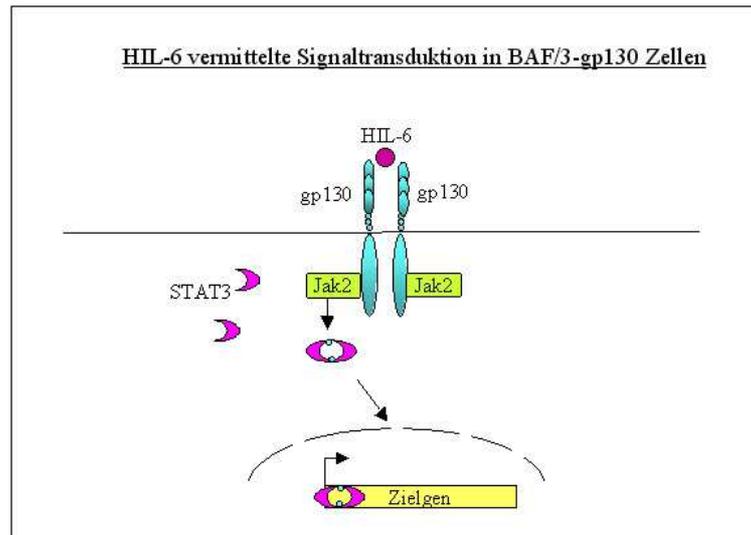


Abbildung 33: Aktivierung des Jak/STAT Signaltransduktionsweges in BAF/3 Zellen durch Stimulierung mit HIL-6. HIL-6 bewirkt auf BAF/3 Zellen die Homodimerisierung von gp130. Dies führt unter anderem zur Phosphorylierung von Jak2 und STAT3. Aktives STAT3 bildet Dimere und induziert nach der Translokation in den Zellkern die Transkription von Zielgenen.

Mit WT-gp130 transfizierte BAF/3 Zellen müssen dafür von einem Signalweg, der den Transkriptionsfaktor STAT5 aktiviert, umschalten zu einer Signaltransduktion, die in einer Phosphorylierung von STAT3 Proteinen resultiert (vgl. Abbildung 32 und Abbildung 33).

In L-gp130 transfizierten Zellen ist das Transmembranprotein gp130 konstitutiv aktiv, die gp130-Signalkaskade ist aktiviert. Der Transkriptionsfaktor STAT3 ist phosphoryliert und transfizierte Zellen proliferieren und überleben zytokinunabhängig (siehe Abbildung 34). Auch die Transfektion von BAF/3 Zellen mit dem chimären Rezeptor L-gp130 erfordert den Wechsel zwischen einem IL-3 induzierten und einem gp130 vermittelten Signalweg.

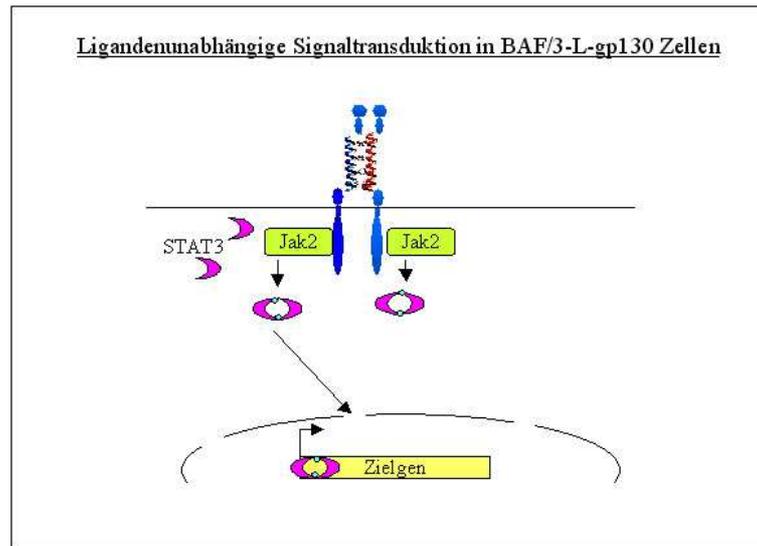


Abbildung 34: Ligandenunabhängige Aktivierung des Jak/STAT Signaltransduktionsweges in BAF/3-L-gp130 Zellen. L-gp130 ist in BAF/3 Zellen ein aktives Homodimer. Es führt vermutlich über eine Phosphorylierung von Jak2 (Jak1 und Tyk1) zu einer Phosphorylierung von STAT3 Molekülen.

Nach der retroviralen Transduktion wurden die BAF/3 Zellen selektioniert. Der retrovirale Vektor pMOWS kodiert für eine Puromycinresistenz, daher wurden die Zellen in Anwesenheit ihres essentiellen Wachstumsfaktors IL-3 mit Puromycin kultiviert. Nach zwei Tagen wurden die Selektionsbedingungen geändert. Wie in Abbildung 4 und 5 dargestellt, wurden sowohl das Puromycin als auch das IL-3 durch Waschen entfernt. WT-gp130 Zellen wurden mit HIL-6, L-gp130 Zellen ohne Zytokin kultiviert. Über einen Zeitraum von acht Wochen wurden die Selektionsbedingungen immer wieder angepaßt. Zwar überlebten wenige Zellen die Selektion mit HIL-6 bzw. ohne Zytokin, sie proliferierten jedoch nicht erkennbar. Um die überlebenden Zellen zu expandieren wurde daher nach 12-18 Tagen wieder WEHI-Kulturüberstand zugegeben. Die Zugabe des WEHI-Kulturüberstandes induzierte die Proliferation der Zellen. Diese Erholungsphasen waren essentiell. Versuche, Klone ohne eine solche angepaßte Selektion zu erhalten, schlugen fehl. Sobald nach Zugabe von WEHI-Kulturüberstand wieder eine größere Menge Zellen zur Verfügung stand, wurde das IL-3 wieder entfernt und die Zellen wieder mit HIL-6 bzw. ohne Zytokin kultiviert (siehe Abbildung 35 und Abbildung 36).

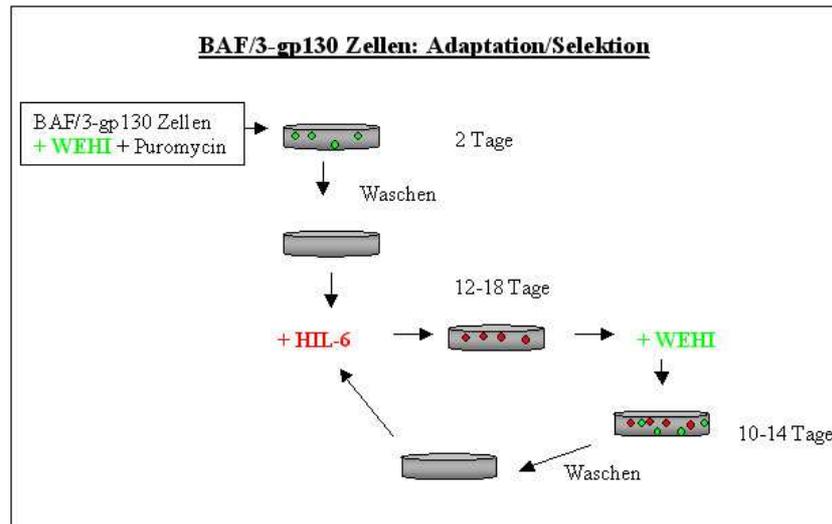


Abbildung 35: Selektions-/Adaptationsschema für WT-gp130 transfizierte BAF/3 Zellen. Zwischen den Selektionsphasen mit HIL-6 wurde den Zellen wieder WEHI-Kulturüberstand zugesetzt. Nach einigen Tagen wurden die Zellen gewaschen und die Selektion mit HIL-6 fortgesetzt.

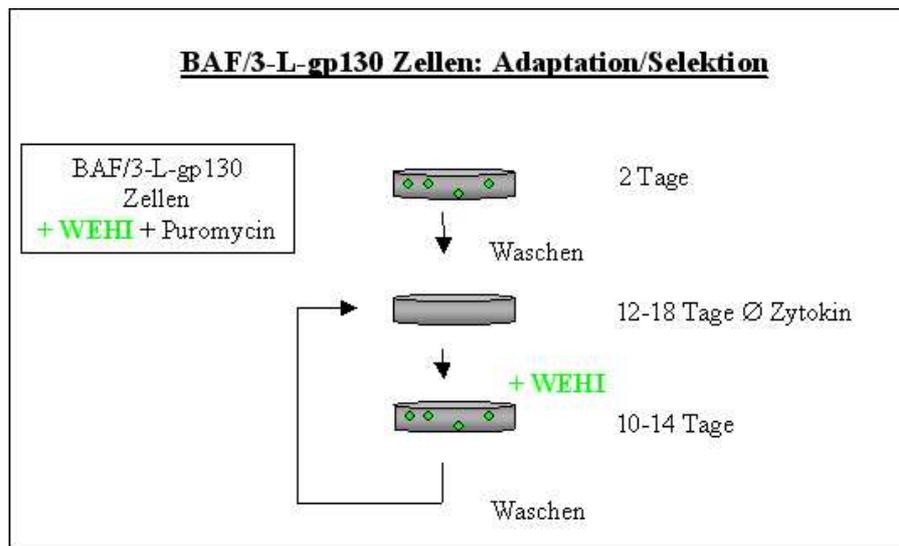


Abbildung 36: Selektions-/Adaptationsschema für L-gp130 transfizierte BAF/3 Zellen. Nach einer zytokinfreien Selektionsphase wurden die Zellen wieder mit IL-3 kultiviert. Nach einigen Tagen wurden die Zellen gewaschen und die Selektion ohne Zytokin fortgesetzt. Für die Generierung der stabilen Zelllinie BAF/3-L-gp130 waren vier solcher Zyklen notwendig.

Offensichtlich benötigten die transfizierten Zellen eine gewisse Zeit für die Umstellung ihrer Signalwege. Während dieser Zeit proliferierten die Zellen nicht. Es ist nicht klar, was durch die Selektion mit den wiederholten „Erholungsphasen“ im einzelnen bewirkt wurde. Es ist denkbar, daß die Selektion Klone begünstigt hat, die eine besonders hohe Expressionrate der transgenen

Rezeptorproteine aufweisen. Diese hätten während der Phasen mit HIL-6 bzw. während der zytokinfreien Phasen einen Überlebensvorteil gegenüber niedrig exprimierenden Klonen. Während der Phasen mit WEHI-Kulturüberstand wurden dann wieder alle Klone expandiert, unabhängig von ihrer Rezeptorexpression. Ein erneuter IL-3 Entzug hätte dann wieder präferentiell hochexprimierende Klone begünstigt. Dies würde erklären, warum nach den Phasen mit IL-3 nicht alle Zellen überlebten, sondern die meisten wieder starben. Im Laufe der Zeit würden sich so einzelne hoch exprimierende Klone durchsetzen.

Möglich ist auch, daß es sich weniger um einen Selektions- als mehr um einen Adaptationsprozeß handelte. Die transfizierten Zellen benötigen eine zeitlang, um alle für die neue Signaltransduktion nötigen Proteine hoch genug zu exprimieren. Auch nach der Adaptationstheorie wären alle Zellen, die die Phasen mit HIL-6 bzw. die zytokinfreien Selektionsphasen überstanden haben, durch die Zugabe von WEHI-Kulturüberstand wieder zur Proliferation angeregt worden. Alle Zellen hätten danach während der Adaptationszeit nach und nach die Gene, die die Proliferation positiv beeinflussen, langsam hochreguliert.

Die wenigen überlebenden Zellen reagierten zunächst nur in soweit auf die veränderten Bedingungen, als das sie überlebten. Sie konnten sich aber eine zeitlang nicht teilen. Nach der Selektion/Adaptation überlebten und proliferierten die transfizierten Zellen auch ohne die „Erholungsphasen“. Auffällig war, daß die stabil transfizierten BAF/3 Zellen nach den vier Selektions-Zyklen zunächst nur sehr langsam proliferierten. Die Proliferationsrate war, sowohl ohne als auch mit IL-3, im Vergleich zu untransfizierten BAF/3 Zellen wesentlich niedriger. Möglicherweise wurden in einem kritischen Zeitraum nicht nur die transgenen gp130 Proteine und Komponenten einer gp130 vermittelten Signalkaskade hoch-, sondern auch Komponenten der IL-3 Signaltransduktion herunterreguliert. Das würde erklären, warum transfizierte Zellen kurz nach der Selektionsphase selbst mit IL-3 nicht so gut proliferierten wie vor der Transfektion. Dieser Effekt konnte über einen Zeitraum von drei bis vier Wochen beobachtet werden. Innerhalb dieser Zeit erhöhte sich die Proliferationsrate transfizierter Zellen allmählich.

Offensichtlich aktivieren sowohl IL-3 als auch IL-6 Gene, die das Überleben und das Wachstum von Zellen steuern. Das beobachtete Verhalten der Zellen während der Selektion deutet darauf hin, daß es im Kontext gp130 vermittelter Signale einen klaren Unterschied gibt zwischen einem Signal, das ein Überleben der Zelle ermöglicht, und einem Signal, das die Proliferation einer Zelle reguliert. Die klare Unterscheidung zwischen Überleben und Wachstum war nur während eines kritischen Zeitraumes zu beobachten. Nach dieser kritischen Zeit waren alle Signale, die für eine Proliferation der Zellen notwendig sind, angeschaltet.

Daß BAF/3 Zellen grundsätzlich dazu in der Lage sind, zwischen den Signalwegen umzuschalten, kann anhand der Rezeptorexpression natürlicher Pro-B-Zellen nachvollzogen werden. Die Expression von Zytokinrezeptoren ist in B-Zellen stark abhängig vom Differenzierungsgrad der Zellen. Im Stadium der Prä- oder Pro-B-Zelle exprimieren B-Zellen keinen IL-6R [183]. Erst terminal differenzierte, aktivierte B-Zellen exprimieren den IL-6R. B-Zellen sind also erst ab einem bestimmten Entwicklungsstadium IL-6 responsiv. Natürliche B-Zellen besitzen alle intrazellulären Komponenten, die für eine gp130 vermittelte Signaltransduktion nötig sind, deren Expression ist jedoch zeitlich reguliert.

Die stabile Transfektion von BAF/3 Zellen mit dem WT-gp130 führte dazu, daß diese Zellen unabhängig von IL-3 und statt dessen abhängig von HIL-6 wachsen [158]. Daß L-gp130 transfizierte BAF/3 Zellen wie erwartet ohne Zytokinstimulation wachsen zeigt ebenfalls, daß BAF/3 Zellen auf die durch den chimären Rezeptor ausgelöste Signaltransduktion reagieren können.

Daß transfizierte Zellen erst umschalten müssen läßt sich besser verstehen, wenn man bedenkt, daß IL-3 auch als *Multilineage Colony Stimulating Factor* (multi-CSF) bezeichnet wurde. IL-3 wirkt auf alle hämatopoetischen Zellen, sein Wirkspektrum ist also breiter als das von IL-6. Es wird vermutet, daß IL-3 schon auf die pluripotente hämatopoetische Stammzelle wirkt. Die Wirkung von IL-6 ist spezifischer. Es wirkt nur auf myeloide Vorläuferzellen und in der lymphoiden Entwicklungslinie erst auf reife B-Zellen, die es zur Antikörperproduktion anregt [23, 172].

Die Schwierigkeiten bei der Selektion sind nicht auf das chimäre L-gp130 Protein zurückzuführen, da sie bei mit WT-gp130 transfizierten Kontrollzellen ebenfalls auftraten. Zwischen WT-gp130 und L-gp130 transfizierten Zellen gab es im Selektionsverhalten keine Unterschiede.

Mit Δ -gp130 transfizierte BAF/3 Zellen überlebten die erste Selektionsrunde nicht. Auch durch Zugabe von IL-3 konnte bei Δ -gp130 transfizierten BAF/3 Zellen nach dem ersten Zytokinentzug keine Proliferation mehr induziert werden. Die Zellen waren bereits nach einem Tag ohne Zytokin gestorben. Da das Protein Δ -gp130 offenbar nicht richtig prozessiert und nicht in der Plasmamembran exprimiert wird, kann es offensichtlich auch keine Signalübertragung auslösen. Mit dem leeren Vektor transfizierte Zellen überlebten die erste Selektionsphase ohne Zytokin bzw. mit HIL-6 ebenfalls nicht.

Nach der Selektion überleben und proliferieren L-gp130 transfizierte Zellen zytokinunabhängig. Damit stehen nun Zellen zur Verfügung, die L-gp130 stabil in ihr Genom integriert haben. Die Expression des chimären Rezeptors wurde auf RNA Ebene durch eine RT-PCR nachgewiesen. Der Transkriptionsfaktor STAT3 ist in den BAF/3-L-gp130 Zellen ohne Zytokinstimulation permanent aktiv. Da eine dauerhafte Phosphorylierung von STAT3 nicht in Kontrollzellen nachgewiesen werden konnte, ist sie eine Auswirkung des chimären gp130 Rezeptors.

Mit dem durch einen Leuzin-Reißerschlus künstlich dimerisierten L-gp130 Protein steht zum ersten mal ein System zur Verfügung, mit dem eine permanente Stimulation eines gp130-Signalweges untersucht werden kann. Bisher war das in dem Maße nicht möglich. In stabil mit IL-6 transfizierten HepG2 Zellen kommt es nach 15-30 min zur Internalisierung und Degradation des Liganden. Zeitgleich wird bei einer Ligandenbindung auch der spezifische IL-6R internalisiert [85]. Bis nach einer solchen Stimulation wieder genausoviel IL-6R auf der Zelloberfläche exprimiert wird wie vor der Stimulation, dauert es mehr als 8 h. Die erneute Expression des IL-6R ist cycloheximid-sensitiv, was dafür spricht, daß der internalisierte Rezeptor degradiert und IL-6R Proteine de novo synthetisiert werden [184]. Cycloheximid ist ein ribosomaler Inhibitor der Proteinsynthese. Es hemmt die Peptidyl-Transferase auf der großen Untereinheit der Ribosomen. Die gegenseitige Regulation von Ligand und spezifischem Rezeptor sowie die langanhaltende Desensibilisierung der Zelle nach erfolgter Stimulation ist vermutlich ein Schutz der Zelle gegen eine Überstimulierung mit IL-6 [184].

Es gibt bereits einige Chimären, die eine künstliche Dimerisierung der zytoplasmatischen Bereiche von gp130 verwenden. Ein Beispiel ist das Fusionsprotein aus der zytoplasmatischen Domäne von gp130 und dem FKBP12 Protein. FKBP12 bindet mit einer hohen Affinität die als *chemical inducer of dimerization* (CID) bezeichnete synthetische Droge AP20187. Das führt zu einer drogeninduzierten Dimerisierung und Aktivierung des gp130 vermittelten Signals. Dieses Modell führte *in vivo* zu einer AP20187 induzierbaren Expansion von Hepatozyten. Eine langfristige *in vitro* Expansion von primären Maushepatozyten konnte mit diesem System nicht erreicht werden [185]. Dieses System ist ligandenabhängig und durch die Internalisierung des Liganden begrenzt. Die Stabilität des Liganden in der Zellkultur ist im Hinblick auf eine permanente Aktivierung ebenfalls ein kritischer Punkt. Nach einiger Zeit ist der Ligand verbraucht und muß ersetzt werden. Mit großer Wahrscheinlichkeit ist das so vermittelte Signal nicht persistent. Ein weiteres Beispiel ist eine Chimäre aus dem intrazellulären Bereich von gp130, einer anti-HEL (*hen egg lysozyme*) Antikörperdomäne und einer Domäne des EpoR [186]. Auch dieses System ist ligandenabhängig. Eine permanente Stimulation von gp130

vermittelten Signalen konnte aufgrund der Ligandenabhängigkeit und der damit verbundenen Internalisierung bisher nur eingeschränkt untersucht werden. Mit unserem ligandenunabhängigen L-gp130 ist es erstmals möglich, die Auswirkungen von konstitutiven gp130 vermittelten Signalen in eukaryotischen Systemen zu untersuchen.

Um zweifelsfrei zu zeigen, daß die Auswirkungen auf die transfizierten Zellen durch L-gp130-Dimere ausgelöst werden, muß man zunächst zeigen, ob man die entsprechenden Effekte hemmen kann. Da wir davon ausgehen, daß das chimäre L-gp130 über die Jun-Zipper dimerisiert, könnte man versuchen, die Interaktion zwischen diesen Zipperbereichen zu verhindern bzw. zu kompetieren. Es ist bekannt, daß Proteine aus der Jun-Familie mit vielen anderen Proteinen Heterodimere bilden, unter anderem mit Proteinen aus der Fos-Familie. Mischt man Peptide, die den Fos und Jun-Zipper-Regionen entsprechen, so werden mit einer ca. 1000-fachen Präferenz Heterodimere gebildet [146]. Es sollte also möglich sein, durch Zugabe eines entsprechenden Fos-Proteins die überlebensfördernden und proliferativen Effekte des L-gp130 Proteins zu hemmen. Entsprechend behandelte BAF/3-L-gp130 Zellen müßten ihre Fähigkeit zu faktorunabhängigem Wachstum und Überleben verlieren und apoptotisch werden.

4.4 L-gp130 als Modell: Expansion hämatopoetischer Stammzellen und die Bedeutung gp-130 vermittelter Signale auf die Differenzierung von pluripotenten Zellen

Man kennt mehrere Typen von Stammzellen, die sich durch ihr unterschiedliches entwicklungsbiologisches Potential unterscheiden [187]. Totipotent ist ausschließlich die befruchtete Eizelle, aus ihr kann sich ein ganzer Organismus inklusive Keimzellen entwickeln. Als embryonale Stammzellen (ES) werden Zellen aus dem Blastozystenstadium bezeichnet. Sie sind pluripotent, das heißt, sie sind nur im Kontext mit einer bereits vorhandenen Blastozyste in der Lage, an einer Embryonalentwicklung teilzuhaben [188]. Ohne den Einfluß von Wachstumsfaktoren differenzieren ES Zellen spontan. Eine solche spontane Ausreifung resultiert immer in einem Gemisch verschiedener Zelltypen. Durch den Einsatz spezifischer Wachstums- und Differenzierungsfaktoren kann eine spezielle Differenzierung induziert werden. Dies ist für spezifische regenerative Therapien von Bedeutung. Die Gewinnung reiner Zelltypen ist wichtig, da bei einer Transplantation noch vorhandene ES Zellen durch ihr pluripotentes Potential zur Bildung von Fremdgewebe führen können. Man spricht in einem solchen Fall von Teratomen oder Teratokarzinomen [189].

Adulte Stammzellen sind gewebespezifisch, sie haben die Kapazität zur Selbsterneuerung und zur Entwicklung spezialisierter Zelltypen. Adulte Stammzellen haben eine hohe Plastizität, sie haben jedoch nicht das gleiche Entwicklungspotential wie embryonale oder fötale Stammzellen. Der entscheidende Vorteil adulter Stammzellen ist, daß Patienten sich selbst Zellen spenden können und die Behandlung mit solchen autologen Zellen keine Abstoßungsreaktionen hervorruft.

Bei Patienten mit unheilbaren hämatologischen Erkrankungen, Neoplasien, primären immundefizienten Erkrankungen oder metabolischen Störungen kann eine Behandlung mit autologen oder heterologen hämatopoetischen Stammzellen eine geeignete Therapie sein. Hämatopoetische Stammzellen residieren im Knochenmark, eine von 10.000 Blutzellen ist eine Stammzelle [190]. Da das Immunsystem körperfremde Zellen erkennt und abstößt ist es eine genaue immunologische Typisierung von Empfänger und Spender notwendig. Hämatopoetische Stammzellen können auch aus peripherem Blut oder aus dem Blut der Nabelschnur gewonnen werden. Auch hier treten jedoch Schwierigkeiten auf. Bei der Gewinnung aus peripherem Blut kann es schwierig sein, die Stammzellen zu mobilisieren [191]. Im Falle des Nabelschnurblutes ist dessen Verfügbarkeit und die beschränkte Anzahl der so isolierbaren Zellen ein begrenzender Faktor [192]. Diese Probleme verdeutlichen, wie wichtig es ist, einmal isolierte hämatopoetische Stammzellen *ex vivo* zu expandieren. Man erreicht dies durch den kurzzeitigen Einsatz von Zytokinen und Wachstumsfaktoren. Zytokine, die humane hämatopoetische Stammzellen regulieren, sind Stammzellen Faktor (SCF), Flt3/Flt2 Ligand (FL) und IL-6, HIL-6, IL-11, IL-12, LIF, Granulozyten Kolonie stimulierender Faktor (G-SCF) und Thrombopoetin (TPO). Eine Kombination verschiedener Faktoren hat sich bei der *ex vivo* Expansion als am effektivsten herausgestellt [193].

Embryonen, die homozygot eine Mutation im gp130 Gen haben weisen eine stark verminderte Anzahl pluripotenter hämatopoetischer Vorläuferzellen in der Leber auf [194]. Aufgrund dieser Beobachtung wurde untersucht, wie sich eine Stimulation von gp130 auf hämatopoetische Stammzellen auswirkt. Eine Stimulation hämatopoetischer Stammzellen mit IL-6 alleine zeigte keinerlei Wirkung. Der kombinierte Einsatz von IL-6 und IL-3 dagegen resultierte in einer Proliferationsförderung [24, 25]. Auch andere Untersuchungen kamen zu dem Ergebnis, daß eine kontinuierliche Aktivierung von gp130 einen starken Einfluß auf die Expansion hämatopoetischer Vorläuferzellen hat, bei einer zeitgleichen Behandlung der Zellen mit SCF [81]. Auch für humane hämatopoetische Vorläuferzellen konnte der synergistische Effekt einer gp130 Aktivierung und einer SCF Behandlung gezeigt werden [195].

Eine Möglichkeit, gp130 zu aktivieren, ist die Stimulation mit IL-6. Nicht alle Zellen exprimieren jedoch die für eine solche Stimulation notwendigen Rezeptoren. In Zellen, die den IL-6R nicht exprimieren, kann gp130 nicht durch IL-6 aktiviert werden. Hämatopoetische Stammzellen exprimieren keinen IL-6R und zählen daher nicht zu den natürlichen Zielzellen von IL-6 [183, 195, 196]. Zu einem ähnlichen Ergebnis kamen Sui et al, die zeigten, daß nur 30-50 % der CD34-positiven Zellen aus Nabelschnurblut den IL-6R exprimieren [25]. CD34 ist ein Membranmolekül, das auf 1-3 % der hämatopoetischen Zellen exprimiert wird. Diese Zellpopulation ist dazu in der Lage, das gesamte hämatopoetische System zu rekonstituieren. Sie sind daher hämatopoetische Stammzellen. Gp130 wird auf allen CD34-positiven Zellen exprimiert [183]. Durch den kombinierten Einsatz von IL-6 und löslichem IL-6R (sIL-6R) konnte das Problem der fehlenden Rezeptorexpression gelöst werden. Der Einsatz des Designerzytokins HIL-6, ein Fusionsprotein aus IL-6 und dem sIL-6R [153], löste zudem das Problem der hohen Mengen an notwendigem IL-6 (50 ng/ml) und IL-6R (1280 ng/ml). Bei der Untersuchung doppelt transgener Mäuse, die sowohl IL-6 als auch den sIL-6R überexprimieren, wurde eine starke Expansion extramedullärer hämatopoetischer Vorläuferzellen in der Leber und der Milz beobachtet.

Es wäre interessant, die Auswirkungen von konstitutiv aktivem gp130 in hämatopoetischen Vorläuferzellen zu untersuchen. Die Verwendung des konstitutiv aktiven L-gp130 würde die gesamte Problematik der Rezeptorexpression umgehen. Man wäre in diesem Fall nicht nur völlig unabhängig vom IL-6R, sondern auch von einer Behandlung der Zellen mit IL-6. Eine Transfektion von ES Zellen und hämatopoetischen Vorläuferzellen mit L-gp130 könnte die Frage klären, ob die dauerhafte gp130 Aktivierung in einer dauerhaften Expansion dieser Zellen resultiert.

Neben der Expansion von Stammzellen ist es von Bedeutung, Stammzellen in einem pluripotenten Differenzierungsstadium zu erhalten. Zuverlässige Aussagen über das Potential von zytokinbehandelten Vorläuferzellen können nur im Mausmodell gemacht werden. Der Mausstamm CB-17 SCID (*severe combined immunodeficiency disease*) ist dafür geeignet. Diese Mäuse entwickeln aufgrund einer autosomal rezessiven Mutation keine reifen B- und T-Lymphozyten und sind daher immundefizient [172]. Entsprechend kommt es bei diesen Mäusen nicht zu einer Abstoßungsreaktion gegenüber Zellen oder Geweben fremder Mäuse oder Zellen und Geweben anderer Spezies. Durch die Injektion von Knochenmarkszellen gesunder Mäuse können SCID Mäuse geheilt werden, sie entwickeln dann normale B- und T-Lymphozyten. Mit der Transplantation von SCID Mäusen wird die Fähigkeit von Zellen zur Rekonstituierung des

hämatopoetischen Systems untersucht. Besitzt eine Zelle die Fähigkeit, reife myeloide und lymphoide Zellen über mehrere Wochen nach einer Transplantation im hämatologisch kompromittierten Empfänger zu generieren, wird sie per Definition als Stammzelle bezeichnet.

Läßt man ES Zellen unbehandelt, so differenzieren sie spontan und verlieren ihre Selbsterneuerungskapazität. Die Kultivierung der ES Zellen mit LIF führt dazu, die Zellen in einem undifferenzierten Zustand zu halten. LIF ist ein Zytokin der IL-6 Familie, das über gp130 wirkt. ES Zellen, die mit einem aktivierbaren STAT3 transfiziert wurden, blieben nach der Aktivierung des STAT3 ohne Stimulation mit LIF oder einem anderen Faktor in einem undifferenzierten Zustand [197]. Konsistent mit diesem Ergebnis, waren mit dominant negativem STAT3 transfizierte hämatopoetische Stammzellen nicht mehr dazu befähigt, lymphoide und myeloide Zellen in bestrahlten Mäusen zu generieren [198]. Eine solche Blockierung des endogenen STAT3 wurde auch in embryonalen Stammzellen untersucht, die konstitutiv dominant negatives STAT3 exprimieren. Diese Zellen neigen verstärkt zur Differenzierung [199]. Die Selbsterneuerungskapazität pluripotenter embryonaler Stammzellen wird also auch durch STAT3 vermittelt. Versuche, Mäuse mit *ex vivo* expandierten hämatopoetischen Vorläuferzellen zu repopulieren zeigten, daß mit IL-3 und IL-1, IL-6 und SCF behandelte Zellen zwar eine kurzfristige Rekonstitution der Tiere bewirkten, längerfristig ließ sich dieser Effekt jedoch nicht erreichen [200, 201]. Diese Defekte bei der Rekonstituierung werden mit einer Aktivierung des Zellzyklus und einer veränderten Integrin-Expression erklärt [202]. Bei mit IL-6/sIL-6R, SCFR, FL und TPO behandelten Zellen ergab sich dieses Problem nicht [200, 201].

Die Proliferation von Stammzellen und die Bewahrung des Stammzellpotentials sind wahrscheinlich zwei molekulare Mechanismen, die unter anderem durch die intrazelluläre Verteilung von gp130 aktivierbaren Signal-Komponenten reguliert werden. Die Bedeutung von gp130-vermittelten Signalen auf die Selbsterneuerungskapazität von hämatopoetischen Stammzellen ist bekannt. Für murine hämatopoetische Stammzellen ist eine Aktivierung von gp130 notwendig, um die Stammzellaktivität zu erhalten [24]. Dieser Effekt kann durch alle gp130 aktivierenden Liganden erreicht werden. Verschiedene Zytokine werden erfolgreich eingesetzt, um eine Differenzierung von hämatopoetischen Vorläufer- und Stammzellen zu verhindern: LIF [203], CNTF [204], OSM [205] und IL-6/sIL-6R [206]. Für HIL-6 wurde gezeigt, daß in einem Bereich von 10-100 ng/ml die Selbsterneuerungskapazität der Zellen erhalten bleibt. Diese Zellen konnten bestrahlte NOID/SCID Mäuse repopulieren. Die Fähigkeit pluripotenter muriner hämatopoetischer Stammzellen, Kolonien zu bilden (*colony formiung cell*

assay), ist davon zu unterscheiden. Diese CFC Versuche sind ein Maß für die Selbsterneuerungskapazität der Zellen. Bei HIL-6 ist diese Kolonienbildung bei Konzentrationen von 0.01-1000 ng/ml zu beobachten [24].

Da das chimäre L-gp130 in Zellen zu einer konstitutiven Aktivierung von STAT3 führt, kann man darüber spekulieren, welchen Einfluß das aktive Protein auf ES Zellen haben könnte. Es wäre interessant zu untersuchen, ob das konstitutiv aktiven gp130 in transfizierten ES Zellen Auswirkungen auf die Selbsterneuerungskapazität hat. Vielleicht bleiben solche Zellen in einem induzierbaren, pluripotenten bzw. totipotenten Zustand. Da die Zytokinkonzentrationen eine so wichtige Rolle spielen, wäre ein induzierbares System eines konstitutiv aktiven gp130 jedoch eventuell eher geeignet, die Auswirkung auf die Selbsterneuerungskapazität zu testen.

4.5 Biotechnologischer Einsatz von L-gp130: Expansion von faktorabhängigen Zelllinien und primären Zellen?

Zytokine und Wachstumsfaktoren sind für die Kultur von primären Zellen und die Generierung von Zelllinien unersetzlich. Ein wichtiges Zytokin in diesem Zusammenhang ist IL-6. Es wurde ursprünglich als B-Zellen stimulierender Faktor entdeckt (*B cell stimulating factor* BCSF) [207]. IL-6 beeinflusst das Wachstum von Hybridomzellen und die Antikörperproduktion durch diese Zellen [208]. Monoklonale Antikörper werden zunehmend interessanter für klinische Therapien [209]. Die Produktion in großen Mengen ist jedoch sehr aufwendig und kostenintensiv. Für die Herstellung monoklonaler Antikörper müssen sogenannte Hybridomzelllinien hergestellt werden. Dafür werden die Plasmazellen, die den gewünschten Antikörper synthetisieren, unter Einsatz von Polyethylenglykol mit Tumorzellen fusioniert. Die als Heterokaryon bezeichneten resultierenden Zellen enthalten die Kerne und somit die Erbinformationen beider Ausgangszellen. Durch den zufälligen Verlust von Chromosomen im Laufe anschließender Zellteilungen entsteht nach einiger Zeit wieder eine mononukleäre Zelle. Diese enthält Chromosomen beider Ausgangszellen. Diese Fusionierung ist nötig, um den Plasmazellen die Fähigkeit zu unbegrenztem Wachstum zu verleihen, eine Eigenschaft der Tumorzellen. Die Fähigkeit, einen monoklonalen Antikörper zu produzieren, stammt von den Plasmazellen. Primäre Zellen sterben innerhalb von 7-10 Tagen in der Zellkultur. Hybridomzelllinien können dagegen unendlich lange kultiviert werden.

Die hohen Kosten rekombinanter, gereinigter Zytokine sind ein wichtiger Faktor, der ihren großindustriellen Einsatz bisher erschwert. Eine Transfektion mit L-gp130 könnte den Einsatz

von IL-6 überflüssig machen und Zelllinien, die von IL-6 bzw. gp130 vermittelten Signalen abhängig sind, daher auch für die Produktion im größeren Maßstab interessant machen. Vielleicht können Hybridomzellen, die mit dem aktiven L-gp130 transfiziert sind, zytokinunabhängig wachsen. Das würde die Kosten bei der Produktion monoklonaler Antikörper drastisch senken.

Man könnte auch primäre Zellen mit dem konstitutiv aktiven L-gp130 transfizieren und untersuchen, ob man die Zellen damit zu einem längeren oder sogar unbegrenzten Wachstum unter Zellkulturbedingungen verhelfen kann. Es ist denkbar, daß das permanente gp130 Signal das Wachstum solcher Zellen ermöglicht.

Ein chimäres gp130 aus einer anti-HEL (*hen egg lysozyme*) Antikörperdomäne, einer Domäne des EpoR und dem intrazellulären Bereich von gp130, ermöglichte transfizierten Zellen ein HEL-abhängiges Wachstum. Damit konnte das teure Zytokin durch das billige Hühnereiweiß-Lysozym ersetzt werden [186]. Der Einsatz von L-gp130 würde den Einsatz eines Liganden völlig überflüssig machen.

4.6 Hat gp130 onkogenes Potential?

Die veränderte extrazelluläre Domäne des Rezeptors L-gp130 ermöglicht eine ligandenunabhängige dauerhafte Aktivierung gp130 vermittelter Signale. Wenn man Zellen mit dem Plasmid für diesen chimären Rezeptor transfiziert, kann man die Bedeutung einer permanenten gp130 Aktivierung auf die biologischen Prozesse dieser Zellen untersuchen. Es wäre interessant zu untersuchen, ob z.B. transfizierte B-Zellen mit entartetem Wachstum reagieren. Transfizierte Multiple Myelomzellen könnte man daraufhin untersuchen, ob sie zytokinunabhängig proliferieren können. IL-6 abhängige Myelomzelllinien könnten daraufhin analysiert werden, ob sie durch die Transfektion mit L-gp130 von IL-6 unabhängig werden können. Mit dem aktiven L-gp130 Rezeptor hat man ein Werkzeug, um das transformierende Potential von gp130 zu untersuchen.

Das onkogene Potential von aktiven STAT Proteinen ist mittlerweile mehrfach bestätigt. Seit einigen Jahren werden STAT-Proteine daher auch als Ziele für mögliche Krebstherapien ins Auge gefaßt [210]. Wenn man etwas über die biologischen Konsequenzen von konstitutiv aktivem gp130 lernen könnte, wird nach weiteren Untersuchungen mit Sicherheit auch gp130 ein Zielmolekül solcher Überlegungen werden.

5 Zusammenfassung

Zytokine sind niedrigmolekulargewichtige, lösliche Proteine, die bei der interzellulären Kommunikation im Immun- und Nervensystem eine bedeutende Rolle spielen. Das Transmembranprotein gp130 ist die gemeinsame Rezeptoruntereinheit aller IL-6 artigen Zytokine. Nach der Ligandenbindung kommt es zu einer Dimerisierung der Rezeptoruntereinheiten und zur Auslösung der Signaltransduktion. Durch das Glykoprotein 130 vermittelte Signale induzieren die Transkription von Zielgenen über die Aktivierung der Transkriptionsfaktoren STAT1 und STAT3. Die konstitutive Aktivierung von STAT3 ist assoziiert mit einer Reihe humaner Krebserkrankungen.

In dieser Arbeit sollte die Bedeutung von konstitutiv aktivem gp130 untersucht werden. Dazu wurden zwei chimäre gp130 Rezeptoren auf cDNA Ebene konstruiert und exprimiert. Für das Protein Δ -gp130 wurde der extrazelluläre Bereich des Wildtyp gp130 trunkiert. Bei dem Protein L-gp130 wurde der extrazelluläre Bereich des Wildtyprezeptors durch den Leuzin-Zipper aus dem humanen *c-Jun* Gen ersetzt. Beide Proteine wurden exprimiert, aber nur L-gp130 wird richtig prozessiert und konnte in der Zellmembran transfizierter Zellen nachgewiesen werden.

Das Protein L-gp130 wird phosphoryliert und ist damit aktiv. Transiente Transfektionen eukaryotischer Zellen zeigten, daß eine Expression von L-gp130 in der Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors STAT3 resultiert. Diese Aktivierung ist ligandenunabhängig. Das durch L-gp130 stimulationsunabhängig aktivierte STAT3 ist biologisch aktiv, es bindet an eine spezifische DNA Sequenz und ist in der Lage, in einem Reportergentest einen Promotor zu aktivieren.

Um die Auswirkungen des konstitutiv aktiven gp130 Moleküls unabhängig von endogenen Signalen untersuchen zu können, wurden BAF/3 Zellen stabil transfiziert. Die Transfektion der murinen Prä-B-Zellen wurde mit einem retroviralen System bewerkstelligt. BAF/3 Zellen sind hinsichtlich Überleben und Proliferation essentiell auf das Zytokin IL-3 angewiesen. Der IL-3 vermittelte Signalweg aktiviert unter anderem den Transkriptionsfaktor STAT5. Die Transfektion von BAF/3 Zellen mit dem Wildtyp gp130 resultiert in der Unabhängigkeit transfizierter Zellen von IL-3. Solche Zellen sind stattdessen essentiell von IL-6/sIL-6R bzw. von Hyper-IL-6 (HIL-6) abhängig. HIL-6 ist ein Designerzytokin aus IL-6, das über einen flexiblen Linker mit dem löslichen IL-6R verbunden ist. Sowohl IL-6/sIL-6R als auch HIL-6 aktivieren die Proteine STAT1 und STAT3. Mit dem permanent aktiven L-gp130 transfizierte Zellen überleben und

proliferieren zytokinunabhängig. Das dauerhaft gp130 vermittelte Signal bewirkt auch in diesen Zellen die Aktivierung von STAT3.

Mit dem konstitutiv aktiven L-gp130 Rezeptorsystem steht nun erstmals ein System zur Verfügung, die Auswirkungen eines permanent gp130 vermittelten Signals in Zellen zu untersuchen. Der entscheidende Vorteil gegenüber anderen Systemen ist dabei die völlige Unabhängigkeit von der Stimulation durch einen Liganden.

Das Modell eines konstitutiv aktiven gp130 vermittelten Signals kann zur Beantwortung wissenschaftlicher Fragestellungen verwendet werden. Die Auswirkungen auf adulte oder embryonale Stammzellen sowie ein Einsatz im biotechnologischen Bereich bei der Kultivierung zytokinabhängiger Zelllinien wird diskutiert. Weiterhin ist die Hypothese des onkogenen Potentials eines dauerhaft aktiven gp130 vermittelten Signals nicht allein von wissenschaftlichem, sondern im Hinblick auf neue blockierende Therapien, auch von großem medizinischem Interesse.

Summary

Cytokines are soluble proteins of low molecular weight which exert important functions via the regulation of intercellular communication in the immune and nervous system. The transmembrane receptor gp130 is the common subunit of all IL-6 type cytokines. Ligand binding induces the dimerization of receptor subunits which leads to the transduction of signals. The glykoprotein 130 transduces signals which result in the activation of the signal transducers and activators of transcription proteins STAT1 and STAT3. The constitutive activation of STAT3 has been reported to be associated with a variety of human cancers.

We investigated the consequences of a constitutive active gp130 molecule. To achieve this, two chimeric gp130 receptors have been constructed and expressed. The truncation of the extracellular part of the wildtype receptor lead to construct Δ -gp130. For the protein L-gp130 the extracellular region of the wildtype receptor has been replaced by the leucine zipper region of the human c-jun protein. Both proteins were expressed but only L-gp130 was properly processed by the cell and could be detected in the plasmamembrane of transfected cells.

L-gp130 was phosphorylated and therefore active. Transfection experiments with eukaryotic cells showed that the expression of L-gp130 results in a ligand-independent phosphorylation of STAT3. Resulting active STAT3 molecules are biologically active which could be shown by binding studies with specific DNA sequences. Additionally, these transcription factors were able to induce promoter activity in a reporter gene assay.

To be independent from endogenous signals we established a stable BAF/3 cell line expressing the active L-gp130 molecule. We obtained stable cells with the help of a retroviral transfection system. Concerning survival and proliferation, BAF/3 cells are vitally dependent upon the cytokine IL-3. IL-3 signaling activates the transcription factor STAT5 instead. IL-6/sIL-6R as well as Hyper-IL-6 lead to the activation of STAT3. Hyper-IL-6 is a Designer Cytokine consisting of IL-6 and the soluble IL-6R. Thus the transfection of BAF/3 cells with the wildtype gp130 receptor results in a switch concerning the dependence from IL-3 to IL-6/sIL-6R or HIL-6. Successfully L-gp130 transfected BAF/3 cells grew and proliferated independently from any cytokine. In L-gp130-BAF/3 cells the permanent activation of the gp130 transduced signal leads to the activation of STAT3 proteins.

With the constitutively active L-gp130 we now for the first time have the opportunity to directly investigate the consequences of disregulated permanent gp130 transduced signals in cells. The advantage of this model lies in the independence from a ligand-induced stimulation.

The model can help to answer a series of scientific questions. The effects of a constitutively active gp130 signal upon adult or embryonic stem cells can be investigated. From the biotechnological point of view, L-gp130 could possibly be used to cultivate cytokine dependent cells like hybridomas which are being used to produce monoclonal antibodies. The hypothetical oncogenic potential of a permanent gp130 signal is not only of a scientific but with respect to the search for new therapeutic targets also of a considerable medical interest.

6 Literaturverzeichnis

1. Kishimoto, T., Taga, T. and S. Akira (1994) Cytokine Signal Transduction. *Cell*, **76** (2): 253-62.
2. Taga, T. and T. Kishimoto (1997) Gp130 and the Interleukin-6 Family of Cytokines. *Annu. Rev. Immunol.*, **15**: 797-819.
3. Hibi, M., Murakami, M., Saito, M., Hirano, T., Taga, T. and T. Kishimoto (1990) Molecular cloning and expression of an IL-6 signal transducer, gp130. *Cell*, **63**(6): 1149-57.
4. Fourcin, M., Chevalier, S., Lebrun, J. J., Kelly, P., Pouplard, A., Wijdenes, J. and H. Gascan (1994) Involvement of gp130/interleukin-6 receptor transducing component in interleukin-11 receptor. *Eur J. Immunol.*, **24**(1): 277-80.
5. Ip, N.Y., Nye, S. H., Boulton, T. G., Davis, S., Taga, T., Li, Y., Birren, S. J., Yasukawa, K., Kishimoto, T., Anderson, D. J., et al. (1992). CNTF and LIF act on neuronal cells via shared signaling pathways that involve the IL-6 signal transducing receptor component gp130. *Cell*, **69**(7): 1121-32.
6. Tomida, M., Yamamoto Yamaguchi, Y. and M. Hozumi (1984) Purification of a factor inducing differentiation of mouse myeloid leukemic M1 cells from conditioned medium of mouse fibroblast L929 cells. *J. Biol. Chem.*, **259**(17): 10978-82.
7. Ferrara, N., Winer, J. and W.J. Henzel (1992) Pituitary follicular cells secrete an inhibitor of aortic endothelial cell growth: identification as leukemia inhibitory factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**(2): 698-702.
8. Gearing, D.P., Comeau, M. R., Friend, D. J., Gimpel, S. D., Thut, C. J., McGourty, J., Brasher, K. K., King, J. A., Gillis, S., Mosley, B., et al. (1992) The IL-6 signal transducer, gp130: an oncostatin M receptor and affinity converter for the LIF receptor. *Science*, **255**(5050): 1434-7.
9. Gearing, D.P. and A.G. Bruce (1992) Oncostatin M binds the high-affinity leukemia inhibitory factor receptor. *New Biol.*, **4**(1): 61-5.
10. Pennica, D., Shaw, K. J., Swanson, T. A., Moore, M. W., Shelton, D. L., Zioncheck, K. A., Rosenthal, A., Taga, T., Paoni, N. F., and W.I. Wood (1995) Cardiotrophin-1. Biological

activities and binding to the leukemia inhibitory factor receptor/gp130 signaling complex. *J. Biol. Chem.*, **270**(18): 10915-10922.

11. Pennica, D., King, K. L., Shaw, K. J., Luis, E., Rullamas, J., Luoh, S. M., Darbonne, W. C., Knutzon, D. S., Yen, R., Chien, K. R. et al. (1995) Expression cloning of cardiotrophin 1, a cytokine that induces cardiac myocyte hypertrophy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**(4): 1142-1146.
12. Senaldi, G., Varnum, B.C., Sarmiento, U., Starnes, C., Lile, J., Scully, S., Guo, J., Elliott, G., McNinch, J., Shaklee, C.L., Freeman, D., Manu, F., Simonet, W.S., Boone, T. and M.S. Chang (1999) Novel neurotrophin-1/B cell-stimulating factor-3: a cytokine of the IL-6 family. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **96**: 11458-11463.
13. Pflanz, S., Hibbert, L., Mattson, J., Rosales, R., Vaisberg, E., Bazan, J. F., Phillips, J. H., McClanahan, T. K., de Waal Malefyt, R. and R.A. Kastelein (2004) WSX-1 and glycoprotein 130 constitute a signal-transducing receptor for IL-27. *J. Immunol.*, **172**(4): 2225-31.
14. Lesser, S.S. and D.C. Lo (2000) CNTF II, I presume? *Nat. Neurosci.*, **3**(9): 851-2.
15. Robinson, R.C., Grey, L. M., Staunton, D., Vankelecom, H., Vernallis, A. B., Moreau, J. F., Stuart, D. I., Heath, J. K. and E.Y. Jones (1994) The crystal structure and biological function of leukemia inhibitory factor: implications for receptor binding. *Cell*, **77**(7): 1101-16.
16. McDonald, N.Q., Panayotatos, N. and W.A. Hendrickson (1995) Crystal structure of dimeric human ciliary neurotrophic factor determined by MAD phasing. *EMBO J.*, **14**: 2689-2699.
Akira, S., Taga, T. and T. Kishimoto (1993) Interleukin-6 in biology and medicine. *Adv. Immunol.*, **54**: 1-78.
17. Akira, S., Taga, T. and T. Kishimoto (1993) Interleukin-6 in biology and medicine. *Adv. Immunol.*, **54**: 1-78.
18. Hibi, M., Nakajima, K. and T. Hirano (1996) IL-6 cytokine family and signal transduction: a model of the cytokine system. *J. Mol. Med.*, **74**: 1-12.
19. Andus, T., Geiger, T., Hirano, T., Northoff, H., Ganter, U., Bauer, J., Kishimoto, T. and P.C. Heinrich (1987) Recombinant human B cell stimulatory factor 2 (BSF-2/IFN-beta 2) regulates beta-fibrinogen and albumin mRNA levels in Fao-9 cells. *FEBS Lett.*, **221**(1): 18-22.
20. Gauldie, J., Richards, C., Harnish, D., Lansdorp, P. and H. Baumann (1987) Interferon beta 2/B-cell stimulatory factor type 2 shares identity with monocyte-derived hepatocyte-

stimulating factor and regulates the major acute phase protein response in liver cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84(20): 7251-5.

21. Heinrich, P.C., Castell, J.V. and T. Andus (1990) Interleukin-6 and the acute phase response. *Biochem. J.*, **265**(3): 621-36.
22. 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 S. Rose-John (1991) Interleukin-6, its hepatic receptor and the acute phase response of the liver, in *Molecular Aspects of Inflammation*, L.F. H. Sies, G. Zimmer, Editor., Springer-Verlag: Berlin, Heidelberg, New York: 129-145.
23. Kopf, M., Baumann, H., Freer, G., Freudenberg, M., Lamers, M., Kishimoto, T., Zinkernagel, R., Bluethmann, H. and G. Kohler (1994) Impaired immune and acute-phase responses in interleukin-6-deficient mice. *Nature*, **368**(6469): 339-42.
24. Audet, J., Miller, C.L., Rose-John, S., Piret, J.M. and C.J. Eaves (2001) Distinct role of gp130 activation in promoting self-renewal divisions by mitogenically stimulated murine hematopoietic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**: 1757-1762.
25. Sui, X., Tsuji, K., Tanaka, R., Tajima, S., Muraoka, K., Ebihara, Y., Ikebuchi, K., Yasukawa, K., Taga, T., Kishimoto, T. et al. (1995) gp130 and c-Kit signalings synergize for ex vivo expansion of human primitive hemopoietic progenitor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **92**(7): 2859-63.
26. Okada, C., Takahashi, K., Soda, R., Matsuoka, T., Nanba, K., Araki, H., Kimura, I. and T. Kishimoto (1988) [Studies on immunoglobulin molecules bound to basophils in the late asthmatic response]. *Arerugi*, **37**(1): 5-11.
27. Lotz, M., Jirik, F., Kabouridis, P., Tsoukas, C., Hirano, T., Kishimoto, T. and D.A. Carson (1988) B cell stimulating factor 2/interleukin 6 is a costimulant for human thymocytes and T lymphocytes. *J. Exp. Med.*, **167**(3): 1253-8.
28. Garman, R.D., Jacobs, K. A., Clark, S. C. and D.H. Raulet (1987) B-cell-stimulatory factor 2 (beta 2 interferon) functions as a second signal for interleukin 2 production by mature murine T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**(21): 7629-33.
29. Satoh, T., Nakamura, S., Taga, T., Matsuda, T., Hirano, T., Kishimoto, T. and Y. Kaziro (1988) Induction of neuronal differentiation in PC12 cells by B-cell stimulatory factor 2/interleukin 6. *Mol. Cell Biol.*, **8**(8): 3546-9.

30. Greenfield, E.M., Gornik, S. A., Horowitz, M. C., Donahue, H. J. and S.M. Shaw (1993) Regulation of cytokine expression in osteoblasts by parathyroid hormone: rapid stimulation of interleukin-6 and leukemia inhibitory factor mRNA. *J. Bone Miner. Res.*, **8**(10): 1163-71.
31. Tamura, T., Udagawa, N., Takahashi, N., Miyaura, C., Tanaka, S., Yamada, Y., Koishihara, Y., Ohsugi, Y., Kumaki, K., Taga, T., Kishimoto, T. and T. Suda (1993) Soluble interleukin-6 receptor triggers osteoclast formation by interleukin 6. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**(24): 11924-8.
32. Udagawa, N., Takahashi, N., Katagiri, T., Tamura, T., Wada, S., Findlay, D. M., Martin, T. J., Hirota, H., Taga, T., Kishimoto, T. and T. Suda (1995) Interleukin (IL)-6 induction of osteoclast differentiation depends on IL-6 receptors expressed on osteoblastic cells but not on osteoclast progenitors. *J. Exp. Med.*, **182**(5): 1461-8.
33. Ikebuchi, K., Wong, G.G., Clark, S.C., Ihle, J.M., Hirai, Y. and M. Ogawa (1987) Interleukin 6 enhancement of interleukin 3-dependent proliferation of multipotential hematopoietic progenitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **84**: 9035-9039.
34. Bernad, A., Kopf, M., Kulbacki, R., Weich, N., Koehler, G. and J.C. Gutierrez Ramos (1994) Interleukin-6 is required in vivo for the regulation of stem cells and committed progenitors of the hematopoietic system. *Immunity*, **1**(9): 725-31.
35. Peters, M., Müller, A. and S. Rose-John (1998) Interleukin-6 and soluble Interleukin-6 Receptor: Direct Stimulation of gp130 and Hematopoiesis. *Blood*, **92**: 3495-3504.
36. Rao, V.N., Huebner, K., Isobe, M., ar-Rushdi, A., Croce, C. M. and E.S. Reddy (1989) elk, tissue-specific ets-related genes on chromosomes X and 14 near translocation breakpoints. *Science*, **244**(4900): 66-70.
37. Bonni, A., Sun, Y., Nadal Vicens, M., Bhatt, A., Frank, D. A., Rozovsky, I., Stahl, N., Yancopoulos, G. D. and M.E. Greenberg (1997) Regulation of gliogenesis in the central nervous system by the JAK-STAT signaling pathway. *Science*, **278**(5337): 477-83.
38. Heinrich, P.C., Behrmann, I., Haan, S., Hermanns, H. M., Muller-Newen, G and F. Schaper (2003) Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem. J.*, **374**: 1-20.
39. Bazan, J.F. (1990) Shared architecture of hormone binding domains in type I and II interferon receptors [letter]. *Cell*, **61**(5): 753-4.

40. Bazan, J.F. (1990) Haemopoietic receptors and helical cytokines. *Immunol. Today*, **11**(10): 350-4.
41. Bazan, J.F. (1990) Structural design and molecular evolution of a cytokine receptor superfamily. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**(18): 6934-8.
42. Murakami, M., Hibi, M., Nakagawa, N., Nakagawa, T., Yasukawa, K., Yamanishi, K., Taga, T. and T. Kishimoto (1993) IL-6-induced homodimerization of gp130 and associated activation of a tyrosine kinase. *Science*, **260**(5115): 1808-10.
43. Hibi, M., Nakajima, K. and T. Hirano (1996) IL-6 cytokine family and signal transduction: a model of the cytokine system. *J. Mol. Med.*, **74**: 1-12.
44. Guschin, D., Rogers, N., Briscoe, J., Witthuhn, B., Watling, D., Horn, F., Pellegrini, S., Yasukawa, K., Heinrich, P., Stark, G. R. et al. (1995) A major role for the protein tyrosine kinase JAK1 in the JAK/STAT signal transduction pathway in response to interleukin-6. *EMBO J.*, **14**(7): 1421-9.
45. Kaptein, A., Paillard, V. and M. Saunders (1996) Dominant negative stat3 mutant inhibits interleukin-6-induced Jak-STAT signal transduction. *J. Biol. Chem.*, **271**(11): 5961-4.
46. Shuai, K., Ziemiecki, A., Wilks, A. F., Harpur, A. G., Sadowski, H. B., Gilman, M. Z. and J.E. Darnell (1993) Polypeptide signalling to the nucleus through tyrosine phosphorylation of Jak and Stat proteins. *Nature*, **366**(6455): 580-3.
47. Akira, S., Nishio, Y., Inoue, M., Wang, X. J., Wei, S., Matsusaka, T., Yoshida, K., Sudo, T., Naruto, M. and T. Kishimoto (1994) Molecular cloning of APRF, a novel IFN-stimulated gene factor 3 p91-related transcription factor involved in the gp130-mediated signaling pathway. *Cell*, **77**(1): 63-71.
48. Lütticken, C., Wegenka, U. M., Yuan, J., Buschmann, J., Schindler, C., Ziemiecki, A., Harpur, A. G., Wilks, A. F., Yasukawa, K., Taga, T., Heinrich, P.C. and F. Horn (1994) Association of transcription factor APRF and protein kinase Jak1 with the interleukin-6 signal transducer gp130. *Science*, **263**(5143): 89-92.
49. 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 G.D. Yancopoulos (1994) Association and activation of Jak-Tyk kinases by CNTF-LIF-OSM-IL-6 beta receptor components. *Science*, **263**(5143): 92-5.

50. Ihle, J.N. (2001) The Stat family in cytokine signaling. *Curr. Opin. Cell Biol.*, **13**(2): 211-7.
51. Elson, G.C., Lelievre, E., Guillet, C., Chevalier, S., Plun-Favreau, H., Froger, J., Suard, I., de Coignac, A.B., Delneste, Y., Bonnefoy, J.Y., Gauchat, J.F. and H. Gascan (2000) CLF associates with CLC to form a functional heteromeric ligand for the CNTF receptor complex. *Nat. Neurosci.*, **3**: 867-872.
52. Lelievre, E., Plun-Favreau, H., Chevalier, S., Froger, J., Guillet, C., Elson, G. C., Gauchat, J. F. and H. Gascan (2001) Signaling pathways recruited by the cardiotrophin-like cytokine/cytokine-like factor-1 composite cytokine: specific requirement of the membrane-bound form of ciliary neurotrophic factor receptor alpha component. *J. Biol. Chem.*, **276**(25): 22476-84. Epub 2001 Apr 6.
53. Robledo, O., Fourcin, M., Chevalier, S., Guillet, C., Auguste, P., Pouplard Barthelaix, A., Pennica, D. and H. Gascan (1997) Signaling of the cardiotrophin-1 receptor. Evidence for a third receptor component. *J. Biol. Chem.*, **272**(8): 4855-63.
54. Koshelnick, Y., Ehart, M., Hufnagl, P., Heinrich, P. C. and B.R. Binder (1997) Urokinase receptor is associated with the components of the JAK1/STAT1 signaling pathway and leads to activation of this pathway upon receptor clustering in the human kidney epithelial tumor cell line TCL-598. *J. Biol. Chem.*, **272**(45): 28563-7.
55. Podar, K., Tai, Y. T., Lin, B. K., Narsimhan, R. P., Sattler, M., Kijima, T., Salgia, R., Gupta, D., Chauhan, D. and K.C. Anderson (2002) Vascular endothelial growth factor-induced migration of multiple myeloma cells is associated with beta 1 integrin- and phosphatidylinositol 3-kinase-dependent PKC alpha activation. *J. Biol. Chem.*, **277**(10): 7875-81. Epub 2001 Dec 20.
56. Sehgal, P.B., Guo, G. G., Shah, M., Kumar, V. and K. Patel (2002) Cytokine signaling: STATS in plasma membrane rafts. *J. Biol. Chem.*, **277**(14): 12067-74. Epub 2002 Jan 28.
57. Moritz, R.L., Hall, N. E., Connolly, L. M. and R.J. Simpson (2001) Determination of the disulfide structure and N-glycosylation sites of the extracellular domain of the human signal transducer gp130. *J. Biol. Chem.*, **276**(11): 8244-53. Epub 2000 Nov 29.
58. Liu, F., Liu, Y., Li, D., Zhu, Y., Ouyang, W., Xie, X. and B. Jin (2002) The transcription co-repressor TLE1 interacted with the intracellular region of gp130 through its Q domain. *Mol. Cell. Biochem.*, **232**(1-2): 163-7.

59. 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 R.D. Schreiber (1998) Disruption of the Jak1 gene demonstrates obligatory and nonredundant roles of the Jaks in cytokine-induced biologic responses. *Cell*, **93**(3): 373-83.
60. Haan, C., Heinrich, P.C. and I. Behrmann (2002), Structural requirements of the interleukin-6 signal transducer gp130 for its interaction with Janus kinase 1: the receptor is crucial for kinase activation. *Biochem. J.*, **361**(Pt 1): 105-11.
61. Gerhartz, C., Heesel, B., Sasse, J., Hemmann, U., Landgraf, C., Schneider-Mergener, J., Horn, F., Heinrich, P. C. and L. Graeve (1996) Differential activation of acute phase response factor/STAT3 and STAT1 via the cytoplasmic domain of the interleukin 6 signal transducer gp130. I. Definition of a novel phosphotyrosine motif mediating STAT1 activation. *J. Biol. Chem.*, **271**(22): 12991-8.
62. Hemmann, U., Gerhartz, C., Heesel, B., Sasse, J., Kurapkat, G., Grötzinger, J., Wollmer, A., Zhong, Z., Darnell, J. E., Jr., Graeve, L., Heinrich, P. C. and F. Horn (1996) Differential activation of acute phase response factor/Stat3 and Stat1 via the cytoplasmic domain of the interleukin 6 signal transducer gp130. II. Src homology SH2 domains define the specificity of stat factor activation. *J. Biol. Chem.*, **271**(22): 12999-3007.
63. Stahl, N., Farruggella, T. J., Boulton, T. G., Zhong, Z., Darnell, J. E., Jr. and G.D. Yancopoulos (1995) Choice of STATs and other substrates specified by modular tyrosine-based motifs in cytokine receptors. *Science*, **267**(5202): 1349-53.
64. Haan, S., Hemmann, U., Hassiepen, U., Schaper, F., Schneider-Mergener, J., Wollmer, A., Heinrich, P. C. and J. Grotzinger (1999) Characterization and binding specificity of the monomeric STAT3-SH2 domain. *J. Biol. Chem.*, **274**(3): 1342-8.
65. Schmitz, J., Weissenbach, M., Haan, S., Heinrich, P. C. and F. Schaper (2000) SOCS3 exerts its inhibitory function on interleukin-6 signal transduction through the SHP2 recruitment site of gp130. *J. Biol. Chem.*, **275**(17): 12848-56.
66. Yoshida, K., Taga, T., Saito, M., Suematsu, S., Kumanogoh, A., Tanaka, T., Fujiwara, H., Hirata, M., Yamagami, T., Nakahata, T., Hirabayashi, T., Yoneda, Y., Tanaka, K., Wang, W.Z., Mori, C., Shiota, K., Yoshida, N. and T. Kishimoto (1996) Targeted disruption of gp130, a common signal transducer for the interleukin 6 family of cytokines, leads to myocardial and hematological disorders. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, **93**(1): 407-11.

67. Dittrich, E., Haft, C. R., Muys, L., Heinrich, P. C. and L. Graeve (1996) A di-leucine motif and an upstream serine in the interleukin-6 (IL-6) signal transducer gp130 mediate ligand-induced endocytosis and down-regulation of the IL-6 receptor. *J. Biol. Chem.*, **271**(10): 5487-5494.
68. Gibson, R.M., Schiemann, W. P., Prichard, L. B., Reno, J. M., Ericsson, L. H. and N.M. Nathanson (2000) Phosphorylation of human gp130 at Ser-782 adjacent to the Di-leucine internalization motif. Effects on expression and signaling. *J. Biol. Chem.*, **275**(29): 22574-82.
69. Novick, D., Engelmann, H., Wallach, D. and M. Rubinstein (1989) Soluble cytokine receptors are present in normal human urine. *J. Exp. Med.*, **170**(4): 1409-14.
70. Müller-Newen, G., Kohne, C. and P.C. Heinrich (1996) Soluble receptors for cytokines and growth factors. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, **111**(2): 99-106.
71. Honda, M., Yamamoto, S., Cheng, M., Yasukawa, K., Suzuki, H., Saito, T., Osugi, Y., Tokunaga, T. and T. Kishimoto (1992) Human soluble IL-6 receptor: its detection and enhanced release by HIV infection. *J. Immunol.*, **148**: 2175-2180.
72. Rose-John, S. and P.C. Heinrich (1994) Soluble receptors for cytokines and growth factors: generation and biological function. *Biochem. J.*, **300**: 281-90.
73. Lust, J.A., Donovan, K.A., Kline, M.P., Greipp, P.R., Kyle, R.A. and N.J. Maihle (1992) Isolation of an mRNA encoding a soluble form of the human interleukin-6 receptor. *Cytokine*, **4**: 96-100.
74. Lust, J.A., Jelinek, D. F., Donovan, K. A., Frederick, L. A., Huntley, B. K., Braaten, J. K. and N.J. Maihle (1995) Sequence, expression and function of an mRNA encoding a soluble form of the human interleukin-6 receptor (sIL-6R). *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, **194**: 199-206.
75. Müllberg, J., Schooltink, H., Stoyan, T., Heinrich, P. C. and S. Rose-John (1992) Protein kinase C activity is rate limiting for shedding of the interleukin-6 receptor. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **189**(2): 794-800.
76. Müllberg, J., Dittrich, E., Graeve, L., Gerhartz, C., Yasukawa, K., Taga, T., Kishimoto, T., Heinrich, P. C. and S. Rose-John (1993) Differential shedding of the two subunits of the interleukin-6 receptor. *FEBS Lett.*, **332**(1-2): 174-8.

77. Müllberg, J., Schooltink, H., Stoyan, T., Gunther, M., Graeve, L., Buse, G., Mackiewicz, A., Heinrich, P. C. and S. Rose-John (1993) The soluble interleukin-6 receptor is generated by shedding. *Eur. J. Immunol.*, **23**(2): 473-80.
78. Müllberg, J., Oberthur, W., Lottspeich, F., Mehl, E., Dittrich, E., Graeve, L., Heinrich, P. C. and S. Rose-John (1994) The soluble human IL-6 receptor. Mutational characterization of the proteolytic cleavage site. *J. Immunol.*, **152**(10): 4958-68.
79. Althoff, K., Reddy, P., Peschon, J., Voltz, N., Rose-John, S. and J. Müllberg (2000) Contribution of the Amino Acid Sequence at the Cleavage Site to the Cleavage Pattern of Transmembrane Proteins. *Eur. J. Biochem.*, **267**: 2624-2631.
80. Matthews, V., Schuster, B., Schütze, S., Kallen, K.-J. and S. Rose-John (2003) Cholesterol depletion of the plasma membrane triggers shedding of the human interleukin-6 receptor by TACE and independently of PKC. *J. Biol. Chem.*, **278**(40): 38829-39.
81. Peters, M., Schirmacher, P., Goldschmitt, J., Odenthal, M., Peschel, C., Dienes, H.P., Fattori, E., Ciliberto, G., Meyer zum Büschenfelde, K.H. and S. Rose-John (1997) Extramedullary expansion of hematopoietic progenitor cells in IL-6/sIL-6R double transgenic mice. *J. Exp. Med.*, **185**: 755-766.
82. Romano, M., Sironi, M., Toniatti, C., Polentarutti, N., Fruscella, P., Ghezzi, P., Faggioni, R., Luini, W., van Hinsbergh, V., Sozzani, S., Bussolino, F., Poli, V., Ciliberto, G. and A. Mantovani (1997) Role of IL-6 and its soluble receptor in induction of chemokines and leukocyte recruitment. *Immunity*, **6**: 315-325.
83. März, P., Heese, K., Dimitriadis-Schmutz, B., Rose-John, S. and U. Otten (1999) Role of Interleukin-6 and soluble IL-6 Receptor in Region Specific Induction of Astrocytic Differentiation and Neurotrophin Expression. *Glia*, **26**: 191-200.
84. März, P., Otten, U. and S. Rose-John (1999) Neuronal Activities of IL-6 Type Cytokines often Depend on Soluble Cytokine Receptors. *Eur. J. Neurosci.*, **11**: 2995-3004.
85. Mackiewicz, A., Schooltink, H., Heinrich, P. C. and S. Rose-John (1992) Complex of soluble human IL-6-receptor/IL-6 up-regulates expression of acute-phase proteins. *J. Immunol.*, **149**(6): 2021-7.
86. Peters, M., Jacobs, S., Ehlers, M., Vollmer, P., Müllberg, J., Wolf, E., Brem, G., Meyer zum Büschenfelde, K. H. and S. Rose-John (1996) The function of the soluble interleukin 6 (IL-

- 6) receptor in vivo: sensitization of human soluble IL-6 receptor transgenic mice towards IL-6 and prolongation of the plasma half-life of IL-6. *J. Exp. Med.*, **183**(4): 1399-406.
87. Narazaki, M., Yasukawa, K., Saito, T., Ohsugi, Y., Fukui, H., Koishihara, Y., Yancopoulos, G. D., Taga, T. and T. Kishimoto (1993) Soluble forms of the interleukin-6 signal-transducing receptor component gp130 in human serum possessing a potential to inhibit signals through membrane-anchored gp130. *Blood*, **82**(4): 1120-6.
88. Jostock, T., Müllberg, J., Özbek, S., Atreya, R., Blinn, G., Voltz, N., Fischer, M., Neurath, M.F. and S. Rose-John (2001) Soluble gp130 is the natural inhibitor of soluble IL-6R transsignaling responses. *Eur. J. Biochem.*, **268**: 160-167.
89. Kawano, M., Hirano, T., Matsuda, T., Taga, T., Horii, Y., Iwato, K., Asaoku, H., Tang, B., Tanabe, O., Tanaka, H., et al. (1988) Autocrine generation and requirement of BSF-2/IL-6 for human multiple myelomas. *Nature*, **332**(6159): 83-5.
90. Van Snick, J., Vink, A., Cayphas, S. and C. Uyttenhove (1987) Interleukin-HP1, a T cell-derived hybridoma growth factor that supports the in vitro growth of murine plasmacytomas. *J. Exp. Med.*, **165**(3): 641-9.
91. Jernberg Wiklund, H., Pettersson, M., Carlsson, M. and K. Nilsson (1992) Increase in interleukin 6 (IL-6) and IL-6 receptor expression in a human multiple myeloma cell line, U-266, during long-term in vitro culture and the development of a possible autocrine IL-6 loop. *Leukemia*, **6**(4): 310-8.
92. Dankbar, B., Padro, T., Leo, R., Feldmann, B., Kropff, M., Mesters, R. M., Serve, H., Berdel, W. E. and J. Kienast (2000) Vascular endothelial growth factor and interleukin-6 in paracrine tumor-stromal cell interactions in multiple myeloma. *Blood*, **95**(8): 2630-6.
93. Karadag, A., Oyajobi, B. O., Apperley, J. F., Russell, R. G. and P.I. Croucher (2000) Human myeloma cells promote the production of interleukin 6 by primary human osteoblasts. *Br. J. Haematol.*, **108**(2): 383-90.
94. Barille, S., Collette, M., Bataille, R. and M. Amiot (1995) Myeloma cells upregulate interleukin-6 secretion in osteoblastic cells through cell-to-cell contact but downregulate osteocalcin. *Blood*, **86**(8): 3151-9.
95. Klein, B., Zhang, X. G., Jourdan, M., Content, J., Houssiau, F., Aarden, L., Piechaczyk, M. and R. Bataille (1989) Paracrine rather than autocrine regulation of myeloma-cell growth and differentiation by interleukin-6. *Blood*, **73**(2): 517-26.
-

96. Barille, S., Collette, M., Thabard, W., Bleunven, C., Bataille, R. and M. Amiot (2000) Soluble IL-6R alpha upregulated IL-6, MMP-1 and MMP-2 secretion in bone marrow stromal cells. *Cytokine*, **12**(9): 1426-9.
97. Holliday, L.S., Welgus, H. G., Fliszar, C. J., Veith, G. M., Jeffrey, J. J. and S.L. Gluck (1997) Initiation of osteoclast bone resorption by interstitial collagenase. *J. Biol. Chem.*, **272**(35): 22053-8.
98. Vacca, A., Ribatti, D., Presta, M., Minischetti, M., Iurlaro, M., Ria, R., Albini, A., Bussolino, F. and F. Dammacco (1999) Bone marrow neovascularization, plasma cell angiogenic potential, and matrix metalloproteinase-2 secretion parallel progression of human multiple myeloma. *Blood*, **93**(9): 3064-73.
99. Niida, S., Kaku, M., Amano, H., Yoshida, H., Kataoka, H., Nishikawa, S., Tanne, K., Maeda, N. and H. Kodama (1999) Vascular endothelial growth factor can substitute for macrophage colony-stimulating factor in the support of osteoclastic bone resorption. *J. Exp. Med.*, **190**(2): 293-8.
100. Hilbert, D.M., Kopf, M., Mock, B. A., Kohler, G. and S. Rudikoff (1995) Interleukin 6 is essential for in vivo development of B lineage neoplasms. *J. Exp. Med.*, **182**(1): 243-8.
101. Dedera, D.A., Urashima, M., Chauhan, D., LeBrun, D.P., Bronson, R.T. and K.C. Anderson (1996) Interleukin-6 is required for pristane-induced plasma cell hyperplasia in mice. *Br. J. Haematol.*, **94**(1): 53-61.
102. Lattanzio, G., Libert, C., Aquilina, M., Cappelletti, M., Ciliberto, G., Musiani, P. and V. Poli (1997) Defective development of pristane-oil-induced plasmacytomas in interleukin-6-deficient BALB/c mice. *Am. J. Pathol.*, **151**: 689-696.
103. Schirmacher, P., Peters, M., Ciliberto, G., Fattori, E., Lotz, J., Meyer zum Büschenfelde, K.H. and S. Rose-John (1998) Hepatocellular Hyperplasia, Plasmacytoma Formation, and Extracellular Hematopoiesis in Interleukin (IL)-6/Soluble IL-6 Receptor Double-Transgenic Mice. *Am. J. Pathol.*, **153**: 639-648.
104. Suzuki, H., Yasukawa, K., Saito, T., Goitsuka, R., Hasegawa, A., Ohsugi, Y., Taga, T. and T. Kishimoto (1992) Anti-human interleukin-6 receptor antibody inhibits human myeloma growth in vivo. *Eur. J. Immunol.*, **22**(8): 1989-93.
105. Tsunenari, T., Akamatsu, K., Kaiho, S., Sato, K., Tsuchiya, M., Koishihara, Y., Kishimoto, T. and Y. Ohsugi (1996) Therapeutic potential of humanized anti-interleukin-6

receptor antibody: antitumor activity in xenograft model of multiple myeloma. *Anticancer Res.*, **16**(5a): 2537-44.

106. Hallek, M., Bergsagel, P.L. and K.C. Anderson (1998) Multiple myeloma: increasing evidence for a multistep transformation process. *Blood*, **91**(1): 3-21.

107. Bataille, R., Barlogie, B., Lu, Z. Y., Rossi, J. F., Lavabre Bertrand, T., Beck, T., Wijdenes, J., Brochier, J. and B. Klein (1995) Biologic effects of anti-interleukin-6 murine monoclonal antibody in advanced multiple myeloma. *Blood*, **86**(2): 685-91

108. Van Zaanen, H.C., Lokhorst, H.M., Aarden, L.A., Rensink, H.J., Warnaar, S.O. and M.H. Van Oers (1998) Blocking interleukin-6 activity with chimeric anti-IL6 monoclonal antibodies in multiple myeloma: effects on soluble IL6 receptor and soluble gp130. *Leuk. Lymphoma*, **31**: 551-558.

109. Moreau, P., Harousseau, J. L., Wijdenes, J., Morineau, N., Milpied, N. and R. Bataille (2000) A combination of anti-interleukin 6 murine monoclonal antibody with dexamethasone and high-dose melphalan induces high complete response rates in advanced multiple myeloma. *Br. J. Haematol.*, **109**(3): 661-4.

110. Chang, Y., Cesarman, E., Pessin, M.S., Lee, F., Culpepper, J., Knowles, D.M. and P.S. Moore (1994) Identification of herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-associated Kaposi's sarcoma. *Science*, **266**: p. 1865-1869.

111. Rettig, M.B., Ma, H. J., Vescio, R. A., Pold, M., Schiller, G., Belson, D., Savage, A., Nishikubo, C., Wu, C., Fraser, J., Said, J. W. and J.R. Berenson (1997) Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus infection of bone marrow dendritic cells from multiple myeloma patients. *Science*, **276**(5320): 1851-1854.

112. Hoischen, S.H., Vollmer, P., März, P., Özbek, S., Götze, K., Jostock, T., Geib, T.

Müllberg, J., Mechttersheimer, S., Fischer, M., Grötzinger, J., Galle, P.R. and S. Rose-John (2000) Human Herpesvirus 8 Interleukin-6 Homologue triggers gp130 on neuronal and hematopoietic cells. *Eur. J. Biochem.*, **267**: 3604-3612.

113. Müllberg, J., Geib, T., Jostock, T., Hoischen, S.H., Vollmer, P., Voltz, N., Heinz, D., Galle, P.R., Klouche, M. and S. Rose-John (2000) IL-6-Receptor Independent Stimulation of Human gp130 by Viral IL-6. *J. Immunol.*, **164**: 4672-4677.

114. Berenson, J.R., Sjak-Shie, N.N. and R.A. Vescio (2000) The role of human and viral cytokines in the pathogenesis of multiple myeloma. *Semin. Cancer Biol.*, **10**(5): 383-91.

115. Zhang, X.G., Gaillard, J. P., Robillard, N., Lu, Z. Y., Gu, Z. J., Jourdan, M., Boiron, J. M., Bataille, R. and B. Klein (1994) Reproducible obtaining of human myeloma cell lines as a model for tumor stem cell study in human multiple myeloma. *Blood*, 83(12): 3654-63.
116. Chauhan, D., Uchiyama, H., Akbarali, Y., Urashima, M., Yamamoto, K., Libermann, T. A. and K.C. Anderson (1996) Multiple myeloma cell adhesion-induced interleukin-6 expression in bone marrow stromal cells involves activation of NF-kappa B. *Blood*, 87(3): 1104-12.
117. Darnell, J.E., Kerr, I.M. and G.R. Stark (1994) JAK-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. *Science*, 264: 1415-1421.
118. Leaman, D.W., Leung, S., Li, X. and G.R. Stark (1996) Regulation of STAT-dependent pathways by growth factors and cytokines. *Faseb J.*, 10(14): 578-88.
119. Yu, C.L., Meyer, D. J., Campbell, G. S., Larner, A. C., Carter Su, C., Schwartz, J. and R. Jove (1995) Enhanced DNA-binding activity of a Stat3-related protein in cells transformed by the Src oncoprotein. *Science*, 269(5220): 81-3.
120. Ihle, J.N., Witthuhn, B. A., Quelle, F. W., Yamamoto, K. and O. Silvennoinen. (1995) Signaling through the hematopoietic cytokine receptors. *Annu. Rev. Immunol.*, 13: 369-98.
121. Smithgall, T.E. (1998) Signal transduction pathways regulating hematopoietic differentiation. *Pharmacol. Rev.*, 50(1): 1-19.
122. Watson, C.J. and W.R. Miller (1995) Elevated levels of members of the STAT family of transcription factors in breast carcinoma nuclear extracts. *Br. J. Cancer*, 71(4): 840-4.
123. Sartor, C.I., Dziubinski, M. L., Yu, C. L., Jove, R. and S.P. Ethier (1997) Role of epidermal growth factor receptor and STAT-3 activation in autonomous proliferation of SUM-102PT human breast cancer cells. *Cancer Res.*, 57(5): 978-87.
124. Garcia, R., Yu, C. L., Hudnall, A., Catlett, R., Nelson, K. L., Smithgall, T., Fujita, D. J., Ethier, S. P and R. Jove (1997) Constitutive activation of Stat3 in fibroblasts transformed by diverse oncoproteins and in breast carcinoma cells. *Cell Growth Differ.*, 8(12): 1267-76.
125. Catlett-Falcone, R., Landowski, T.H., Oshiro, M.M., Turkson, J., Levitzki, A., Savino, R., Ciliberto, G., Moscinski, L., Fernandez-Luna, J.L., Nunez, G., Dalton, W.S. and R. Jove (1999) Constitutive activation of Stat3 signaling confers resistance to apoptosis in human U266 myeloma cells. *Immunity*, 10: 105-115.

126. Gouilleux-Gruart, V., Debierre-Grockiego, F., Gouilleux, F., Capiod, J. C., Claisse, J. F., Delobel, J. and L. Prin (1997) Activated Stat related transcription factors in acute leukemia. *Leuk. Lymphoma*, **28**(1-2): 83-8.
127. Weber-Nordt, R.M., Egen, C., Wehinger, J., Ludwig, W., Gouilleux-Gruart, V., Mertelsmann, R. and J. Finke (1996) Constitutive activation of STAT proteins in primary lymphoid and myeloid leukemia cells and in Epstein-Barr virus (EBV)-related lymphoma cell lines. *Blood*, **88**(3): 809-16.
128. Garcia, R. and R. Jove (1998) Activation of STAT transcription factors in oncogenic tyrosine kinase signaling. *J. Biomed. Sci.*, **5**: 79-85.
129. Bowman, T., Garcia, R., Turkson, J. and Jove, R. (2000) STATs in oncogenesis. *Oncogene*, **19**(21): 2474-88.
130. Chauhan, D., Kharbanda, S., Ogata, A., Urashima, M., Teoh, G., Robertson, M., Kufe, D. W. and K.C. Anderson (1997) Interleukin-6 inhibits Fas-induced apoptosis and stress-activated protein kinase activation in multiple myeloma cells. *Blood*, **89**(1): 227-34.
131. Schwarze, M.M. and R.G. Hawley (1995) Prevention of myeloma cell apoptosis by ectopic bcl-2 expression or interleukin 6-mediated up-regulation of bcl-xL. *Cancer Res.*, **55**(11): 2262-5.
132. Altmeyer, A., Simmons, R. C., Krajewski, S., Reed, J. C., Bornkamm, G. W. and S. Chen-Kiang (1997) Reversal of EBV immortalization precedes apoptosis in IL-6-induced human B cell terminal differentiation. *Immunity*, **7**(5): 667-77.
133. Tu, Y., Renner, S., Xu, F., Fleishman, A., Taylor, J., Weisz, J., Vescio, R., Rettig, M., Berenson, J., Krajewski, S., Reed, J.C. and A. Lichtenstein (1998) BCL-X expression in multiple myeloma: possible indicator of chemoresistance. *Cancer Res.*, **58**: 256-262.
134. Takeda, K., Noguchi, K., Shi, W., Tanaka, T., Matsumoto, M., Yoshida, N., Kishimoto, T. and S. Akira (1997) Targeted disruption of the mouse Stat3 gene leads to early embryonic lethality. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**(8): 3801-4.
135. Sano, S., Itami, S., Takeda, K., Tarutani, M., Yamaguchi, Y., Miura, H., Yoshikawa, K., Akira, S. and J. Takeda (1999) Keratinocyte-specific ablation of Stat3 exhibits impaired skin remodeling, but does not affect skin morphogenesis. *EMBO J.*, **18**(17): 4657-68.
136. Takeda, K., Kaisho, T., Yoshida, N., Takeda, J., Kishimoto, T. and S. Akira (1998) Stat3 activation is responsible for IL-6-dependent T cell proliferation through preventing apoptosis:
-

generation and characterization of T cell-specific Stat3-deficient mice. *J. Immunol.*, **161**(9): 4652-60.

137. Bromberg, J.F., Wrzeszczynska, M.H., Devgan, G., Zhao, Y., Pestell, R.G., Albanese, C. and J.E. Darnell (1999) Stat3 as an oncogene. *Cell*, **98**: 295-303.

138. Kiuchi, N., Nakajima, K., Ichiba, M., Fukada, T., Narimatsu, M., Mizuno, K., Hibi, M. and T. Hirano (1999) STAT3 Is Required for the gp130-mediated Full Activation of the c-myc Gene. *J. Exp. Med.*, **189**: 63-73.

139. Schwaller, J., Frantsve, J., Aster, J., Williams, I. R., Tomasson, M. H., Ross, T. S., Peeters, P., Van Rompaey, L., Van Etten, R. A., Ilaria, R., Jr., Marynen, P. and D.G. Gilliland (1998) Transformation of hematopoietic cell lines to growth-factor independence and induction of a fatal myelo- and lymphoproliferative disease in mice by retrovirally transduced TEL/JAK2 fusion genes. *EMBO J.*, **17**(18): 5321-33.

140. Behncken, S.N., Billestrup, N., Brown, R., Amstrup, J., Conway-Campbell, B. and M.J. Waters (2000) Growth hormone (GH)-independent dimerization of GH receptor by a leucine zipper results in constitutive activation. *J. Biol. Chem.*, **275**(22): 17000-7.

141. Patel, N., Herrman, J. M., Timans, J. C. and R.A. Kastelein (1996) Functional replacement of cytokine receptor extracellular domains by leucine zippers. *J. Biol. Chem.*, **271**(48): 30386-91.

142. Chinenov, Y. and T.K. Kerppola (2001) Close encounters of many kinds: Fos-Jun interactions that mediate transcription regulatory specificity. *Oncogene*, **20**(19): 2438-52.

143. Kim, B.M. and M.G. Oakley (2002) A general method for selection and screening of coiled coils on the basis of relative helix orientation. *J. Am. Chem. Soc.*, **124**(28): 8237-44.

144. Rasmussen, R., Benvegna, D., O'Shea, E. K., Kim, P. S. and T. Alber (1991) X-ray scattering indicates that the leucine zipper is a coiled coil. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**(2): 561-4.

145. Landschulz, W.H., Johnson, P.F. and S.L. McKnight (1988) The leucine zipper: a hypothetical structure common to a new class of DNA binding proteins. *Science*, **240**(4860): 1759-64.

146. O'Shea, E.K., Rutkowski, R., Stafford, W. F., 3rd and P.S. Kim (1989) Preferential heterodimer formation by isolated leucine zippers from fos and jun. *Science*, **245**(4918): 646-8.

147. Palacios, R. and M. Steinmetz (1985) Il-3-dependent mouse clones that express B-220 surface antigen, contain Ig genes in germ-line configuration, and generate B lymphocytes in vivo. *Cell*, **41**(3): 727-34.
148. Hirano, T., Taga, T., Yamasaki, K., Matsuda, T., Yasukawa, K., Hirata, Y., Yawata, H., Tanabe, O., Akira, S. and T. Kishimoto (1989) Molecular cloning of the cDNAs for interleukin-6/B cell stimulatory factor 2 and its receptor. *Ann. N Y Acad. Sci.*, **557**: 167-78, discussion 178-80.
149. Vollmer, P., Waley, I., Rose-John, S. and S. Bhakdi (1996) Novel pathogenic mechanism of microbial metalloproteinases: liberation of membrane-anchored molecules in biologically active form exemplified by studies with the human interleukin-6 receptor. *Infect. Immun.*, **64**(9): 3646-51.
150. Ketteler, R., Glaser, S., Sandra, O., Martens, U. M. and U. Klingmuller (2002) Enhanced transgene expression in primitive hematopoietic progenitor cells and embryonic stem cells efficiently transduced by optimized retroviral hybrid vectors. *Gene Ther.*, **9**(8): 477-87.
151. Giraud, S., Bienvenu, F., Avril, S., Gascan, H., Heery, D. M. and O. Coqueret (2002) Functional interaction of STAT3 transcription factor with the coactivator NcoA/SRC1a. *J. Biol. Chem.*, **277**(10): 8004-11. Epub 2001 Dec 31.
152. Hanahan, D (1983) Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *J. Mol. Biol.*, **166**(4): 557-80.
153. Fischer, M., Goldschmitt, J., Peschel, C., Kallen, K.J., Brakenhoff, J.P.J., Wollmer, A., Grötzinger, J. and S. Rose-John (1997) A designer cytokine with high activity on human hematopoietic progenitor cells. *Nature Biotech.*, **15**: 142-145.
154. van Dam, M., Mullberg, J., Schooltink, H., Stoyan, T., Brakenhoff, J. P., Graeve, L. Heinrich, P. C. and S. Rose-John (1993) Structure-function analysis of interleukin-6 utilizing human/murine chimeric molecules. Involvement of two separate domains in receptor binding. *J. Biol. Chem.*, **268**(20): 15285-90.
155. Mullis, K.B. and F.A. Faloona (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.*, **155**: 335-50.
156. Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K. B., Horn, G. T., Erlich, H. A. and N. Arnheim (1985) Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, **230**(4732): 1350-4.

157. Lee, J.C., Hapel, A.J. and J.N. Ihle (1982) Constitutive production of a unique lymphokine (IL 3) by the WEHI-3 cell line. *J. Immunol.*, **128**(6): 2393-8.
158. Gearing, D.P., Ziegler, S. F., Comeau, M. R., Friend, D., Thoma, B., Cosman, D., Park, L. and B. Mosley (1994) Proliferative responses and binding properties of hematopoietic cells transfected with low-affinity receptors for leukemia inhibitory factor, oncostatin M, and ciliary neurotrophic factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**(3): 1119-23.
159. Wahlfors, J.J. and R.A. Morgan (1999) Production of minigene-containing retroviral vectors using an alphavirus/retrovirus hybrid vector system. *Hum. Gene Ther.* **10**(7): 1197-206.
160. Rigby, P.G. (1969) Prolongation of survival of tumour-bearing animals by transfer to "immune" RNA with DEAE-dextran. *Nature*, **221**(184): 968-9.
161. Prasher, D.C., Eckenrode, V. K., Ward, W. W., Prendergast, F. G. and M.J. Cormier (1992) Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent protein. *Gene*, **111**(2): 229-33.
162. Boussif, O., Lezoualc'h, F., Zanta, M. A., Mergny, M. D., Scherman, D., Demeneix, B. and J.P. Behr (1995) A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**(16): 7297-301.
163. Pear, W.S., Nolan, G. P., Scott, M. L. and D. Baltimore (1993) Production of high-titer helper-free retroviruses by transient transfection. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**(18): 8392-6.
164. Bahnson, A.B., Dunigan, J. T., Baysal, B. E., Mohny, T., Atchison, R. W., Nimgaonkar, M. T., Ball, E. D. and J.A. Barranger (1995) Centrifugal enhancement of retroviral mediated gene transfer. *J. Virol. Methods*, **54**(2-3): 131-43.
165. Kozak, M. (1981) Possible role of flanking nucleotides in recognition of the AUG initiator codon by eukaryotic ribosomes. *Nucleic Acids Res.*, **9**(20): 5233-52.
166. Moloney, J.B. (1960) Properties of a leukemia virus. *Natl.Cancer Inst.Monogr.*, **4**: 7-37
167. Moloney, J.B. (1960) Biological studies on a lymphoid-leukemia virus extracted from sarcoma 37.I. origin and introductory investigations. *J.Natl.Cancer Inst.*, **24**: 933-51
168. Laker, C., Meyer, J., Schopen, A., Friel, J., Heberlein, C., Ostertag, W. and C. Stocking (1998) Host cis-mediated extinction of a retrovirus permissive for expression in embryonal stem cells during differentiation. *J. Virol.*, **72**(1): 339-48.

169. Livnah, O., Stura, E. A., Middleton, S. A., Johnson, D. L., Jolliffe, L. K. and I.A. Wilson (1999) Crystallographic evidence for preformed dimers of erythropoietin receptor before ligand activation. *Science*, **283**(5404): 987-90.
170. Nehls, S., Snapp, E. L., Cole, N. B., Zaal, K. J., Kenworthy, A. K., Roberts, T. H., Ellenberg, J., Presley, J. F., Siggia, E. and J. Lippincott-Schwartz (2000) Dynamics and retention of misfolded proteins in native ER membranes. *Nat Cell Biol*, **2**(5): 288-95.
171. Rodriguez-Tarduchy, Collins, G.M. and A. Lopez-Rivas (1990) Regulation of apoptosis in interleukin-3-dependent hemopoietic cells by interleukin-3 and calcium ionophores. *EMBO J.*, **9**(9): 2997-3002.
172. Kuby, J. (1997) Immunology. 3rd ed. New York.
173. Cone, R.D. and R.C. Mulligan (1984) High-efficiency gene transfer into mammalian cells: generation of helper-free recombinant retrovirus with broad mammalian host range. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **81**(20): 6349-53.
174. Movassagh, M., Boyer, O., Burland, M. C., Leclercq, V., Klatzmann, D. and F.M. Lemoine (2000) Retrovirus-mediated gene transfer into T cells: 95% transduction efficiency without further in vitro selection. *Hum. Gene Ther.*, **11**(8): 1189-200.
175. Pannell, D. and J. Ellis (2001) Silencing of gene expression: implications for design of retrovirus vectors. *Rev. Med. Virol.*, **11**(4): 205-17.
176. Jahner, D., Stuhlmann, H., Stewart, C. L., Harbers, K., Lohler, J., Simon, I. and R. Jaenisch (1982) De novo methylation and expression of retroviral genomes during mouse embryogenesis. *Nature*, **298**(5875): 623-8.
177. Asche, W., Colletta, G., Warnecke, G., Nobis, P., Pennie, S., King, R. M. and W. Ostertag (1984) Lack of retrovirus gene expression in somatic cell hybrids of friend cells and teratocarcinoma cells with a teratocarcinoma phenotype. *Mol. Cell Biol.*, **4**(5): 923-30.
178. Cedar, H. (1988) DNA methylation and gene activity. *Cell*, **53**(1): 3-4.
179. Challita, P.M. and D.B. Kohn (1994) Lack of expression from a retroviral vector after transduction of murine hematopoietic stem cells is associated with methylation in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**(7): 2567-71.
180. Gautsch, J.W. (1980) Embryonal carcinoma stem cells lack a function required for virus replication. *Nature*, **285**(5760): 110-2.

181. Hoeben, R.C., Migchielsen, A. A., van der Jagt, R. C., van Ormondt, H. and A.J. van der Eb (1991) Inactivation of the Moloney murine leukemia virus long terminal repeat in murine fibroblast cell lines is associated with methylation and dependent on its chromosomal position. *J. Virol.*, **65**(2): 904-12.
182. Loh, T.P., Sievert, L.L. and R.W. Scott, (1990) Evidence for a stem cell-specific repressor of Moloney murine leukemia virus expression in embryonal carcinoma cells. *Mol. Cell Biol.*, **10**(8): 4045-57.
183. Tajima, S., Tsuji, K., Ebihara, Y., Sui, X., Tanaka, R., Muraoka, K., Yoshida, M., Yamada, K., Yasukawa, K., Taga, T., Kishimoto, T. and T. Nakahata (1996) Analysis of interleukin-6 receptor and gp130 expressions and proliferative capability of human CD34+ cells. *J. Exp. Med.*, **184**: 1357-1364.
184. Zohlh fer, D., Graeve, L., Rose-John, S., Schooltink, H., Dittrich, E. and P.C. Heinrich (1992) The hepatic interleukin-6 receptor. Down-regulation of the interleukin-6 binding subunit (gp80) by its ligand. *FEBS Lett.*, **306**(2-3): 219-222.
185. Li, Z.Y., Otto, K., Richard, R. E., Ni, S., Kirillova, I., Fausto, N., Blau, C. A. and A. Lieber (2002) Dimerizer-induced proliferation of genetically modified hepatocytes. *Mol. Ther.*, **5**(4): 420-6.
186. Kawahara, M., Natsume, A., Terada, S., Kato, K., Tsumoto, K., Kumagai, I., Miki, M., Mahoney, W., Ueda, H. and T. Nagamune (2001) Replacing factor-dependency with that for lysozyme: affordable culture of IL-6-dependent hybridoma by transfecting artificial cell surface receptor. *Biotechnol. Bioeng.*, **74**(5): 416-23.
187. Beier, H.M. (2000) Die Erkenntnisse  ber nat rliche und experimentelle Totipotenz ebnet den Weg f r neue Perspektiven in der Transplantationsmedizin. *Nova Acta Leopoldina NF.*, **83**(318): 37-54.
188. Amit, M., Carpenter, M. K., Inokuma, M. S., Chiu, C. P., Harris, C. P., Waknitz, M. A., Itskovitz-Eldor, J. and J.A. Thomson (2000) Clonally derived human embryonic stem cell lines maintain pluripotency and proliferative potential for prolonged periods of culture. *Dev. Biol.*, **227**(2): 271-8.
189. Stevens, L.C. (1983) The origin and development of testicular, ovarian, and embryo-derived teratomas. In *Teratocarcinoma Stem Cells*, L.M. Silver, Martin, G.R., Strickland, S., Editor. Cold Spring Harbor Laboratory Press: Cold Spring Harbor, New York. p. 23-36.

190. Osawa, M., Hanada, K., Hamada, H. and H. Nakauchi (1996) Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell. *Science*, **273**(5272): 242-5.
191. Platzbecker, U., Prange-Krex, G., Bornhauser, M., Koch, R., Soucek, S., Aikele, P., Haack, A., Haag, C., Schuler, U., Berndt, A., Rutt, C., Ehninger, G. and K. Holig (2001) Spleen enlargement in healthy donors during G-CSF mobilization of PBPCs. *Transfusion*, **41**(2): 184-9.
192. Erices, A., Conget, P and J.J. Minguell (2000) Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *Br. J. Haematol.*, **109**(1): 235-42.
193. Heike, T. and T. Nakahata (2002), Ex vivo expansion of hematopoietic stem cells by cytokines. *Biochim. Biophys. Acta*, **1592**(3): 313-21.
194. Yoshida, K., Taga, T., Saito, M., Suematsu, S., Kumanogoh, A., Tanaka, T., Fujiwara, H., Hirata, M., Yamagami, T., Nakahata, T., Hirabayashi, T., Yoneda, Y., Tanaka, K., Wang, W. Z., Mori, C., Shiota, K., Yoshida, N. and T. Kishimoto (1996) Targeted disruption of gp130, a common signal transducer for the interleukin 6 family of cytokines, leads to myocardial and hematological disorders. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**(1): 407-11.
195. Gotze, K.S., Ramirez, M., Tabor, K., Small, D., Matthews, W. and C.I. Civin (1998) Flt3high and Flt3low CD34+ progenitor cells isolated from human bone marrow are functionally distinct. *Blood*, **91**(6): 1947-58.
196. Kawashima, I., Zanjani, E. D., Almada-Porada, G., Flake, A. W., Zeng, H. and M. Ogawa (1996) CD34+ human marrow cells that express low levels of Kit protein are enriched for long-term marrow-engrafting cells. *Blood*, **87**(10): 4136-42.
197. Matsuda, T., Nakamura, T., Nakao, K., Arai, T., Katsuki, M., Heike, T. and T. Yokota (1999) STAT3 activation is sufficient to maintain an undifferentiated state of mouse embryonic stem cells. *EMBO J.*, **18**: 4261-4269.
198. Oh, I.H. and C.J. Eaves (2002) Overexpression of a dominant negative form of STAT3 selectively impairs hematopoietic stem cell activity. *Oncogene*, **21**(31): 4778-87.
199. Boeuf, H., Hauss, C., Graeve, F. D., Baran, N. and C. Kedinger (1997) Leukemia inhibitory factor-dependent transcriptional activation in embryonic stem cells. *J. Cell. Biol.*, **138**(6): 1207-17.

200. Bhatia, M., Wang, J. C. Y., Kapp, U., Bonnet, D. and J.E. Dick (1997) Purification of primitive human hematopoietic cells capable of repopulating immune-deficient mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**(10): 5320-5.
201. Conneally, E., Cashman, J., Petzer, A. and C.J. Eaves (1997) Expansion in vitro of transplantable human cord blood stem cells demonstrated using a quantitative assay of their lympho-myeloid repopulating activity in NOD/SCID mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**: 9836-9841.
202. Peters, S.O., Kittler, E. L., Ramshaw, H. S. and P.J. Quesenberry (1996) Ex vivo expansion of murine marrow cells with interleukin-3 (IL-3), IL-6, IL-11, and stem cell factor leads to impaired engraftment in irradiated hosts. *Blood*, **87**(1): 30-7.
203. Williams, R.L., Hilton, D. J., Pease, S., Willson, T. A., Stewart, C. L., Gearing, D. P., Wagner, E. F., Metcalf, D., Nicola, N. A. and N.M. Gough (1988) Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells. *Nature*, **336**(6200): 684-7.
204. Conover, J.C., p, N. Y., Poueymirou, W. T., Bates, B., Goldfarb, M. P., DeChiara, T. M., and G.D. Yancopoulos (1993) Ciliary neurotrophic factor maintains the pluripotentiality of embryonic stem cells. *Development*, **119**(3): 559-65.
205. Rose, T.M., Weiford, D. M., Gunderson, N. L., and A.G. Bruce (1994) Oncostatin M (OSM) inhibits the differentiation of pluripotent embryonic stem cells in vitro. *Cytokine*, **6**(1): 48-54.
206. Yoshida, K., Chambers, I., Nichols, J., Smith, A., Saito, M., Yasukawa, K., Shoyab, M., Taga, T. and T. Kishimoto (1994) Maintenance of the pluripotential phenotype of embryonic stem cells through direct activation of gp130 signalling pathways. *Mech. Dev.*, **45**: 163-171.
207. Ely, J.M., Prystowsky, M. B., Eisenberg, L., Quintans, J., Goldwasser, E., Glasebrook, A. L. and F.W. Fitch (1981) Alloreactive cloned T cell lines. V. Differential kinetics of IL 2, CSF, and BCSF release by a cloned T amplifier cell and its variant. *J. Immunol.*, **127**(6): 2345-9.
208. Makishima, F., Terada, S., Mikami, T. and E. Suzuki (1992) Interleukin-6 is antiproliferative to a mouse hybridoma cell line and promotive for its antibody productivity. *Cytotechnology*, **10**(1): 15-23.
209. Chapman, A.P., Antoniow, P., Spitali, M., West, S., Stephens, S. and D.J. King (1999) Therapeutic antibody fragments with prolonged in vivo half-lives. *Nat. Biotechnol.*, **17**(8): 780-3.

210. Catlett-Falcone, R., Dalton, W.S. and R. Jove (1999) STAT proteins as novel targets for cancer therapy. Signal transducer an activator of transcription. *Curr. Opin. Oncol.*, **11**(6): 490-6.

7 Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
A	Ampere
ADAM	a disintegrin like metalloproteinase
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
AP	Alkalische Phosphatase
AP-1	activator protein 1
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
Aqua dest.	destilliertes Wasser
bp	Basenpaare
BCSF	B-cell stimulating factor
Bq	Bequerel
BSA	bovine serum albumin, Rinderserumalbumin
bZIP	basic zipper
C	Cytosin
CD	cluster of determination, Oberflächenantigen
cDNA	complementary DNA
Ci	Curie
CLC	Cardiotrophin-like cytokine
CNTF	Ciliary neurotrophic factor
CNTFR	Ciliary neurotrophic factor Rezeptor
cpm	counts per minute
CT-1	Cardiotrophin-1
Cy3	Indocarbocyanin
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
DEAE	Diethylaminoethyl

DEPC	Diethylpyrocarbonat
Δ -gp130	gp130 ohne extrazelluläre Domänen
DMEM	Dulbecco' s Modified Eagle' s Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	epidermal growth factor
Epo	Erythropoetin
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ES	embryonic stem cell, embryonale Stammzelle
FACS	fluorescence activated cell sorter, Durchflußzytometrie
FCS	Fetal calf serum
FITC	Fluoreszeinthiocyanat
Fos	osteosarcoma oncogene
FosB	osteosarcoma oncogene B
Flt3-L	FMS-related tyrosine kinase 3 ligand
Fra-1	fos-like antigen 1
g	Gramm
G	Guanin
GH	growth hormone
GFP	green fluorescent protein
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen Kolonie stimulierender Faktor
gp	Glykoprotein
gp130	Glykoprotein 130
h	Stunde
HEL	hen egg lysozyme

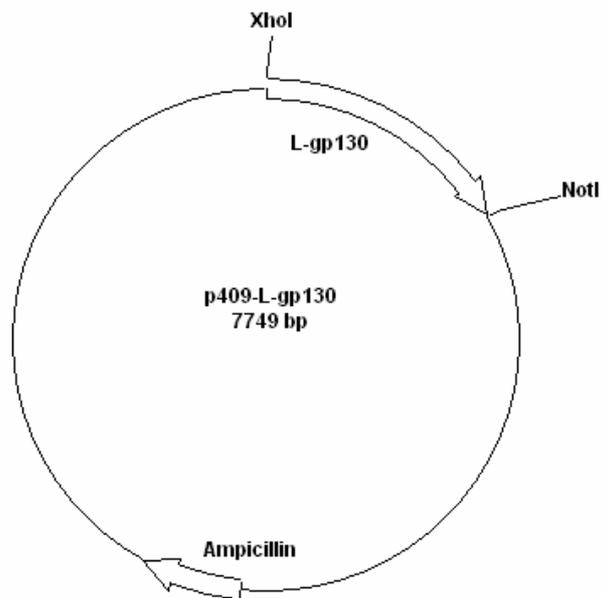
HIL-6	Hyper-Interleukin-6, Fusionsprotein aus IL-6 und IL-6R
Ig	Immunoglobulin
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IL-3	Interleukin 3
IL-6	Interleukin 6
IL-6R	Interleukin-6-Rezeptor
IP	Immunpräzipitation
Jak	Janus Tyrosinkinase
Jun	jun oncogene
JunB	junB oncogene
JunD	jun-proto-oncogene related gene d 1
KA	Assoziationskonstante
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LB	Luria Bertoni Broth, Bakterienmedium
L-gp130	Leuzin-gp130
LIF	Leukemia Inhibitory Factor
LIFR	LIF Rezeptor
log	Logarithmus
M	Mol/l
m	milli
μ	mikro
mAb	monoklonaler Antikörper
MAPK	Mitogen activated protein kinase
Mcl-1	myeloid cell leukemia-1
min	Minute
MOPS	N-Morpholinopropansulfonsäure
mRNA	Messenger-RNA

multi-CSF	multilineage stimulating factor
myc	myelocytomatosis oncogene
n	nano
NF	nuclear factor
NNT-1	novel Neurotrophin-1
OD	Optische Dichte
OSM	Oncostatin M
OSMR	Oncostatin M Rezeptor
P	pico
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphate buffered Saline, Phosphatpuffer
PCR	Polymerase chain reaction, Polymerasekettenreaktion
PDGF	platelet derived growth factor
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
PI-3Kinase	Phosphatidylinositol 3-Kinase
PMA	4- β -phorbol-12-myristate-13-acetate
PNK	Polynukleotidkinase
POD	Peroxidase
Pro-B-Zelle	progenitor B cell
Ras	Ratten Sarkoma Protein
RNA	Ribonukleinsäure
RNAase	Ribonuklease
rpm	rounds per minute, Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SCf	stem cell factor
SCID	severe combined immunodeficiency disease, Mausstamm CB-17
SDS	Sodium dodecyl sulfate, Natriumdodecylsulfat
sIL-6R	soluble IL-6-Rezeptor, löslicher IL-6R

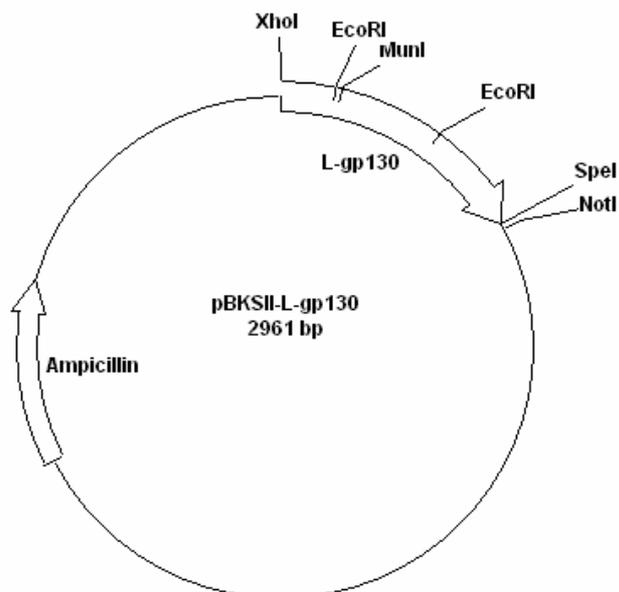
SSC	Standard Salz Citrat
STAT	signal transducer and activator of transcription
T	Thymidin
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethyldiamin
TM	mittlere Schmelztemperatur
TPO	Thrombopoetin
Tris	Tris-Hydroxymethylaminomethan
Tween 20	Poly(oxyethylen)n-sorbitan-monolaurat
U	Unit
ü. N.	über Nacht
UV	ultraviolett
V	Volt
vIL-6	virales IL-6
Vol	Volumen
WB	Western-Blot
WSX-1	IL-27 Rezeptor
WT	Wildtyp
α	anti-
Δ	delta-
Ψ	psi

8 Anhang

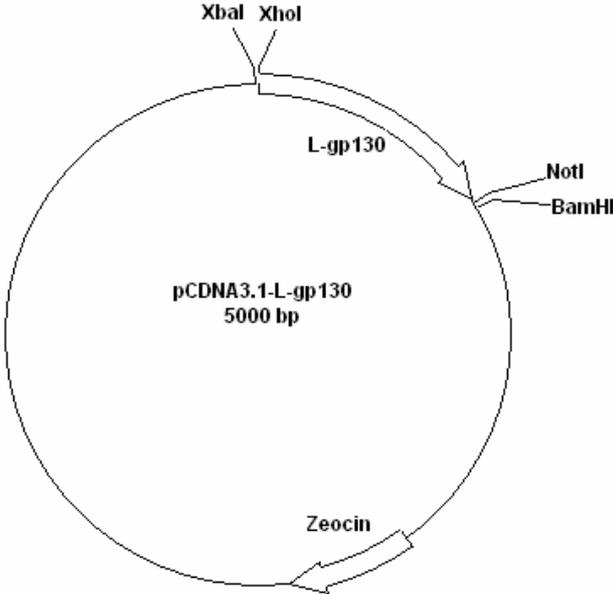
L-gp130 im p409 Vektor (Immunex):



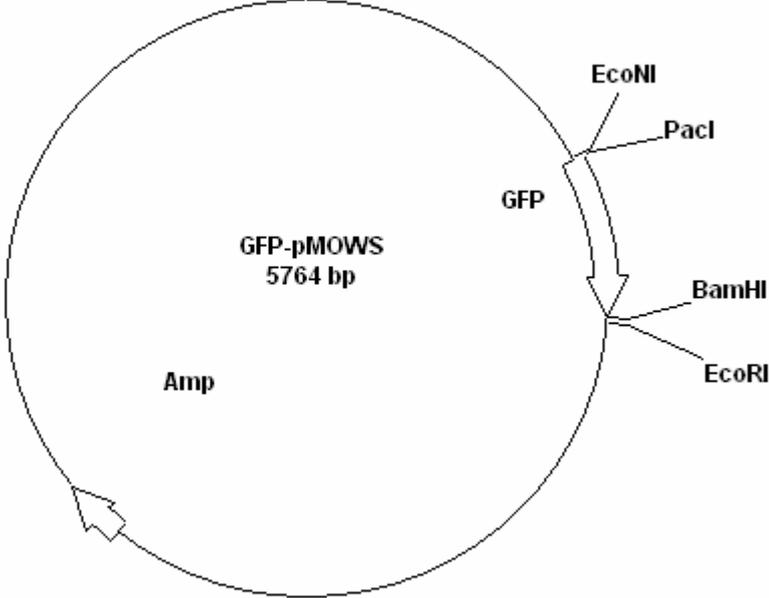
L-gp130 im pBluescript II KS Vektor (Stratagene):



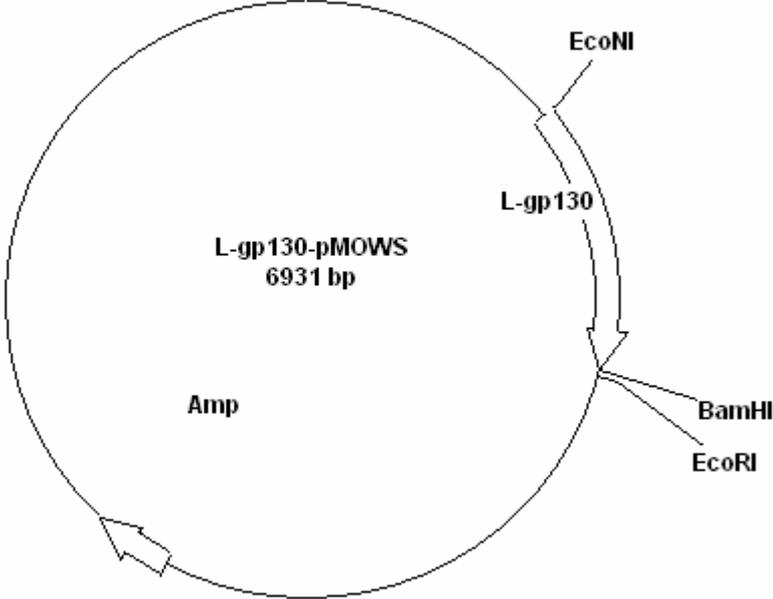
L-gp130 im pCDNA3.1 Vektor (Invitrogen):

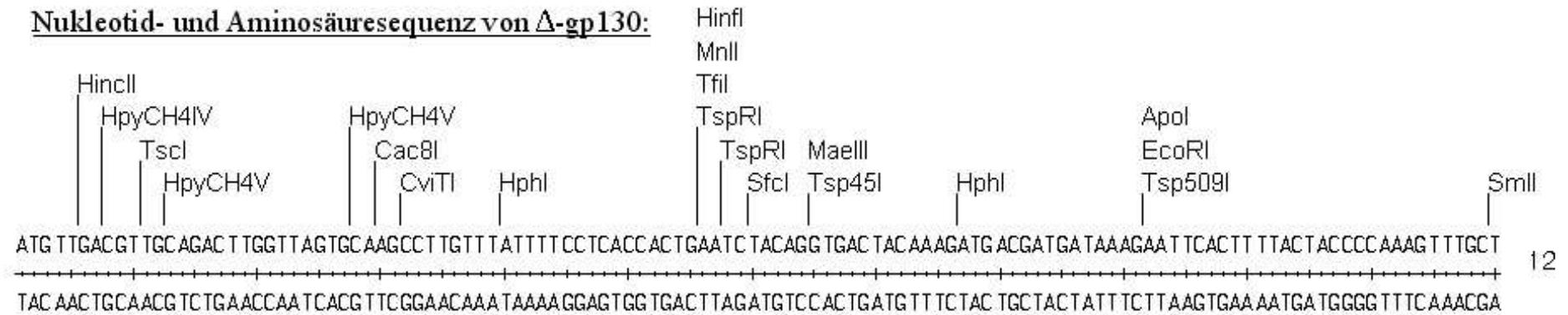


GFP im pMOWS Vektor (Prof. Klingmüller, DKFZ Heidelberg):



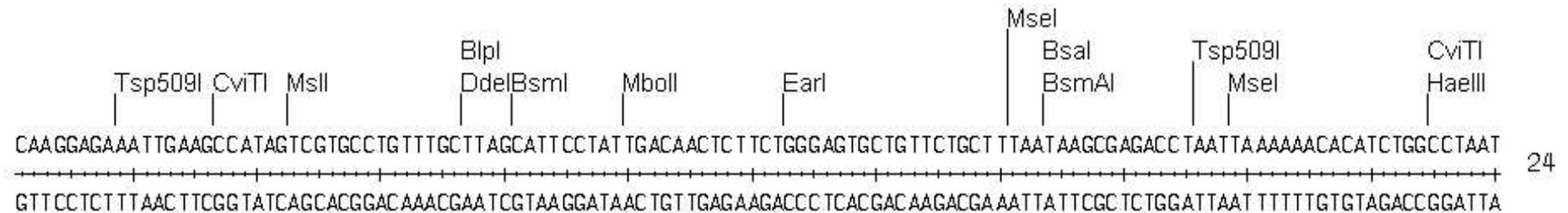
L-gp130 im pMOWS Vektor (Prof. Klingmüller, DKFZ Heidelberg):



Nukleotid- und Aminosäuresequenz von Δ -gp130:

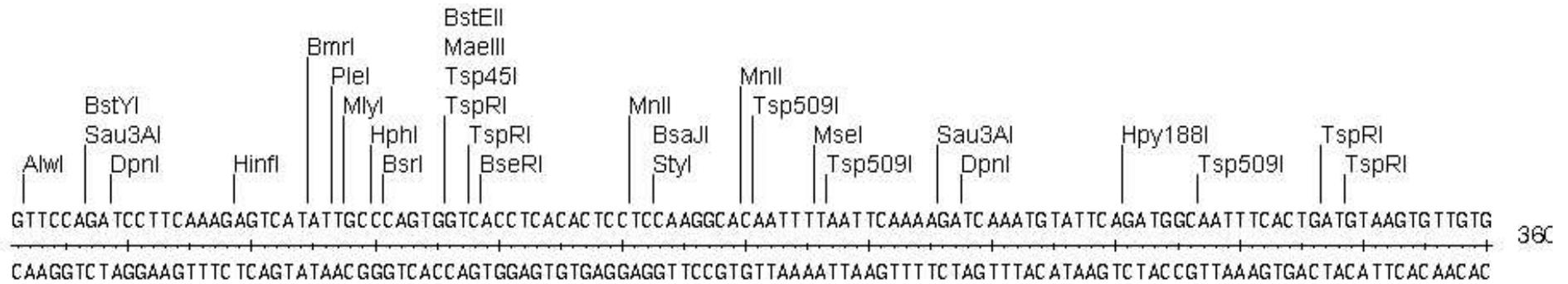
Met Leu Thr Leu Gln Thr Trp Leu Val Gln Ala Leu Phe Ile Phe Leu Thr Thr Glu Ser Thr Gly Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Glu Phe Thr Phe Thr Thr Pro Lys Phe Ala
Cys Arg Cys Arg Leu Gly Cys Lys Pro Cys Leu Phe Ser Ser Pro Leu Asn Leu Gln Val Thr Thr Lys Met Thr Met Ile Lys Asn Ser Leu Leu Leu Pro Gln Ser Leu Leu
Asn Val Asp Val Ala Asp Leu Val Ser Ala Ser Leu Val Tyr Phe Pro His His Ile Tyr Arg Leu Gln Arg Arg Arg Ile His Phe Tyr Tyr Pro Lys Val Cys

Ile Asn Val Asn Cys Val Gln Asn Thr Cys Ala Lys Asn Ile Lys Arg Val Val Ser Asp Val Pro Ser Leu Ser Ser Ser Ser Leu Ser Asn Val Lys Val Val Gly Phe Asn Ala
His Gln Arg Gln Leu Ser Pro His Leu Gly Gln Lys Asn Glu Glu Gly Ser Phe Arg Cys Thr Val Val Phe Ile Val Ile Ile Phe Phe Glu Ser Lys Ser Gly Trp Leu Lys Ser
Thr Ser Thr Ala Ser Lys Thr Leu Ala Leu Arg Thr Lys Gly Trp Gln Ile Leu His Ser Cys Leu His Arg His Tyr Leu Ile Lys Gly Leu Thr Gln Glu

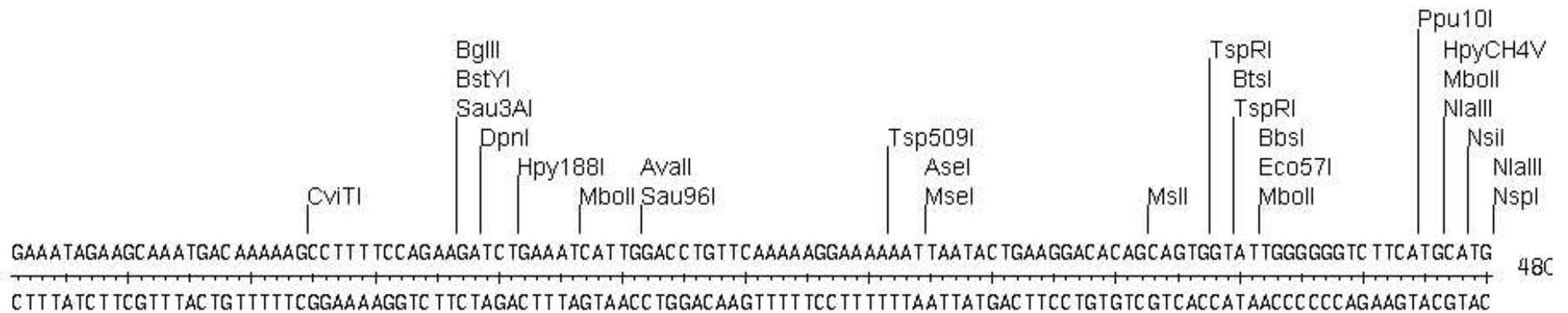


Gln Gly Glu Ile Glu Ala Ile Val Val Pro Val Cys Leu Ala Phe Leu Leu Thr Thr Leu Leu Gly Val Leu Phe Cys Phe Asn Lys Arg Asp Leu Ile Lys Lys His Ile Trp Pro Asn
Lys Glu Lys Leu Lys Pro Ser Cys Leu Phe Ala His Ser Tyr Gln Leu Phe Trp Glu Cys Cys Ser Ala Leu Ile Ser Glu Thr Leu Lys Asn Thr Ser Gly Leu Met
Ser Arg Arg Asn Ser His Ser Arg Ala Cys Leu Leu Ser Ile Pro Ile Asp Asn Ser Ser Gly Ser Ala Val Leu Leu Ala Arg Pro Asn Lys Thr His Leu Ala

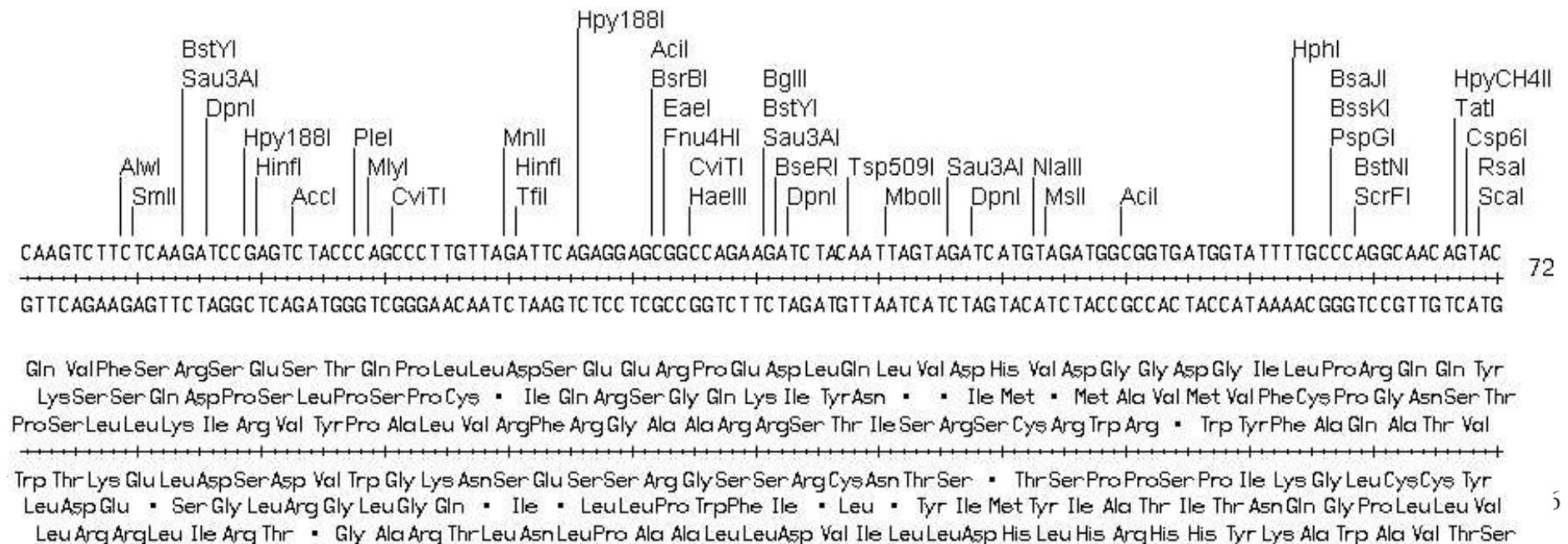
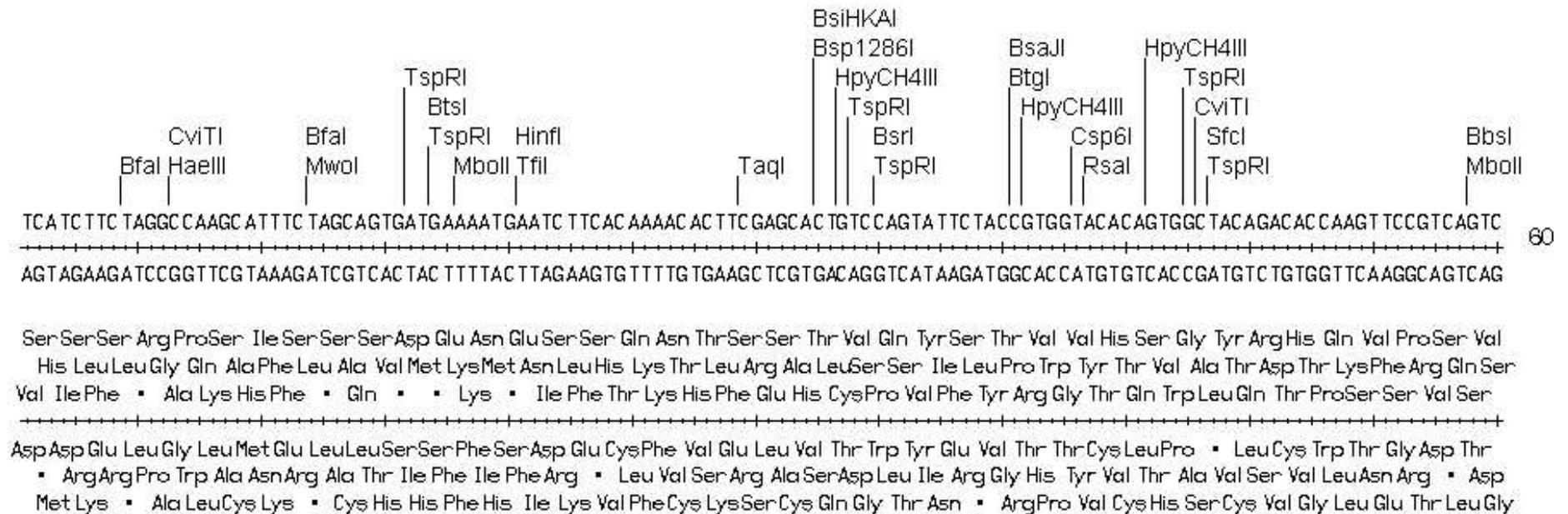
Pro Ser Ile Ser Ala Met Thr Thr Gly Thr Gln Lys Ala Asn Arg Asn Val Val Arg Arg Pro Thr Ser Asn Gln Lys Leu Leu Arg Ser Arg Ile Leu Phe Cys Met Gln Gly Leu
Leu Ser Phe Asn Phe Gly Tyr Asp His Arg Asn Ala Cys Glu Gln Cys Ser Lys Gln Ser His Gln Glu Ala Lys Ile Leu Ser Val Asn Phe Phe Val Asp Pro Arg Ile
Leu Leu Phe Gln Leu Trp Leu Arg Ala Gln Lys Ser Leu Met Gly Ile Ser Leu Glu Glu Pro Leu Ala Thr Arg Ser Tyr Ala Leu Gly Leu Phe Val Cys Arg Ala His

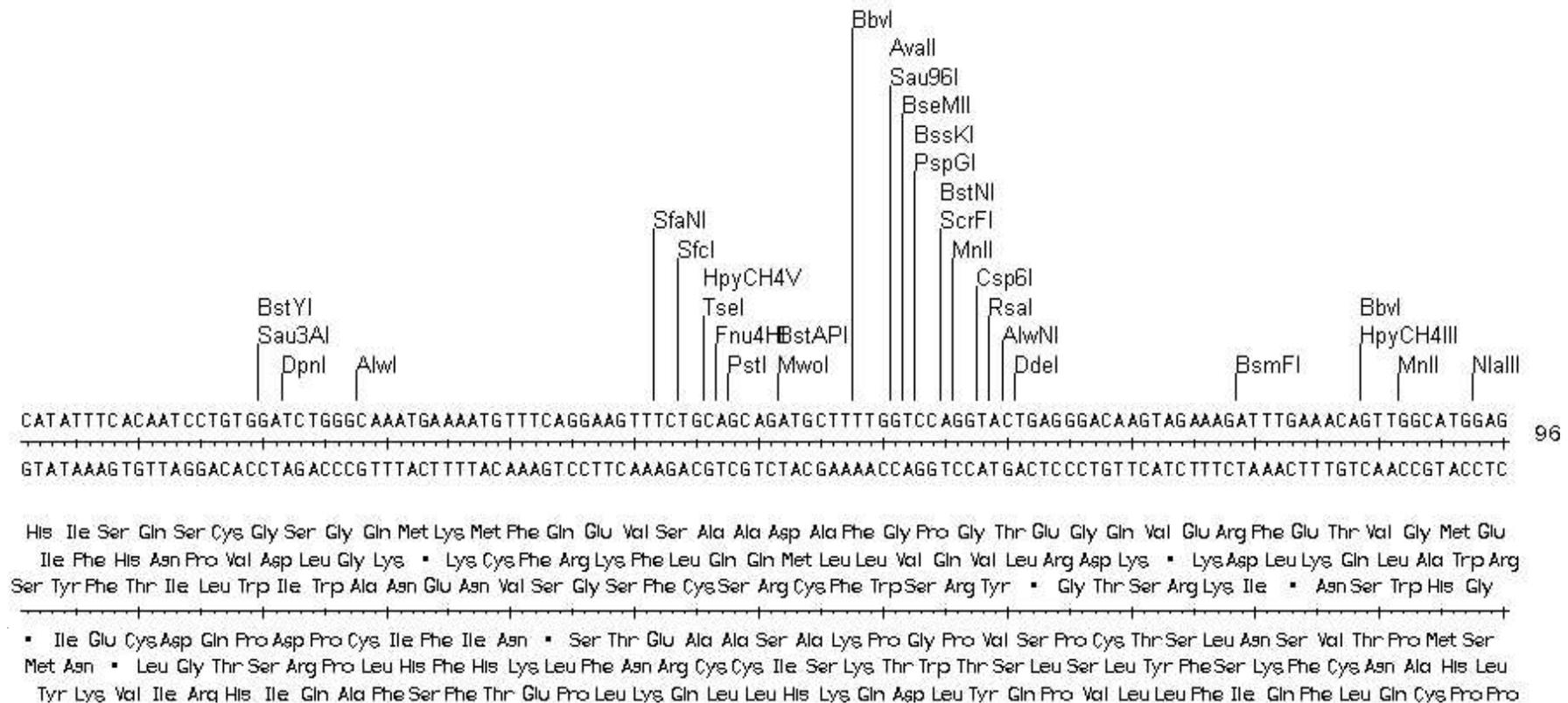
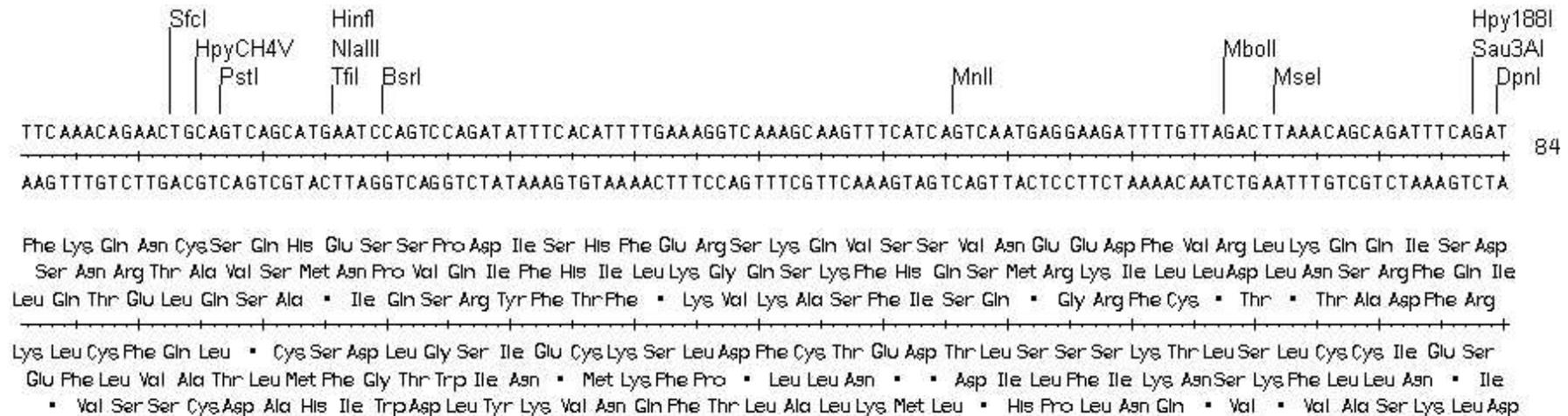


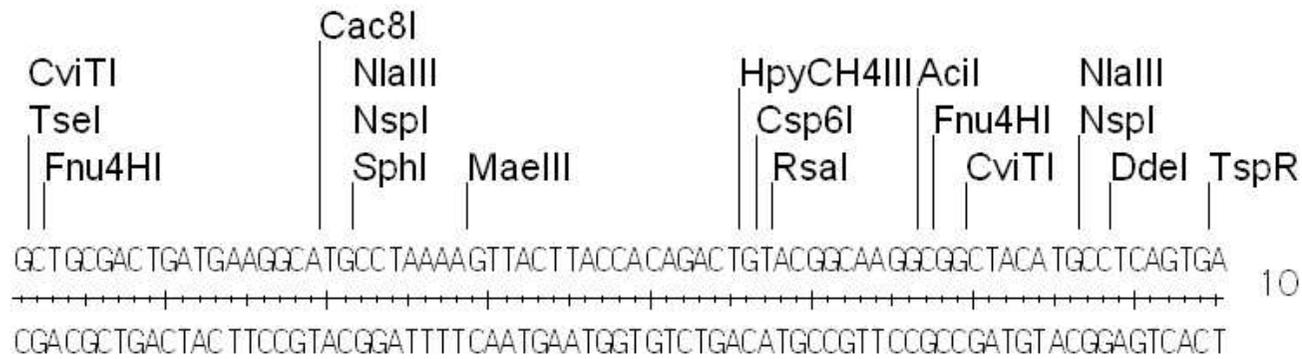
Val ProAsp ProSer LysSer His Ile Ala Gln TrpSer ProHis Thr ProPro ArgHis AsnPhe AsnSer LysAsp Gln Met TyrSer Asp Gly AsnPhe Thr Asp Val Ser Val Val
 Phe Gln Ile Leu Gln Arg Val Ile LeuProSer Gly His Leu ThrLeuLeuGln Gly Thr Ile Leu Ile Gln Lys Ile LysCys Ile Gln Met Ala Ile SerLeuMet Val LeuTrp
 CysSer ArgSerPhe Lys GluSer TyrCys Pro Val Val ThrSer His SerSer Lys Ala GlnPhe Phe Lys ArgSer Asn ValPhe Arg Trp GlnPhe His Cys LysCysCys
 Thr GlySer Gly GluPheLeu Ile Ala TrpHis Asp Gly Val Gly Gly LeuCysLeuLysLeu GluPheSer Ile Tyr Glu SerProLeuLys Val Ser Thr LeuThr Thr
 Asn Trp Ile Arg Leu ThrMet Asn Gly LeuPro Arg Val Ser Arg TrpPro Val Ile Lys Ile Phe Ile LeuHis Ile Ile Ala Ile GluSer Ile Tyr Thr AsnHis
 Glu LeuAspLysLeuSer Asp Tyr Gln Gly Thr Thr Val Glu Cys Glu GluLeu Ala CysAsn AsnLeuLeuAspPhe Thr AsnLeuHis CysAsn Gln His LeuHis GlnPro



Glu Ile Glu Ala AsnAsp LysLysProPhe Pro Glu AspLeuLysSerLeuAspLeuPhe Lys Lys Glu Lys Ile Asn Thr Glu Gly His SerSer Gly Ile Gly GlySerSer CysMet
 Lys Lys Gln Met Thr LysSerLeuPhe Gln Lys Ile AsnHis Trp Thr CysSer Lys ArgLysLysLeu Ile LeuLysAsp Thr Ala Val Val LeuGly Gly LeuHis AlaCys
 Gly AsnArgSerLys Gln Lys AlaPhe Ser ArgArgSer Glu Ile Ile Gly Pro Val Gln Lys Gly LysAsn Tyr Arg Thr Gln Gln Trp Tyr Trp Gly ValPheMetHis
 Ser Ile Ser AlaPheSer LeuPhe Gly Lys GlySerSer ArgPhe AspAsnSer ArgAsnLeuPheSerPhe Ile Leu Val SerProCysLeuLeuPro Ile ProProAsp Glu His Met
 Phe TyrPheCys Ile ValPheLeuArg Lys TrpPhe Ile GlnPhe Gln Val Gln GluPheLeuPhePheAsn Ile SerPheSer Val Ala Thr Thr AsnProProArg Ala His
 Phe LeuLeuLeuHis CysPhe Ala Lys Glu LeuLeuAspSer Ile MetProGly Thr PheProPhePhe Tyr Gln Leu Val CysCys His Tyr Gln Pro Thr LysMetCysThr

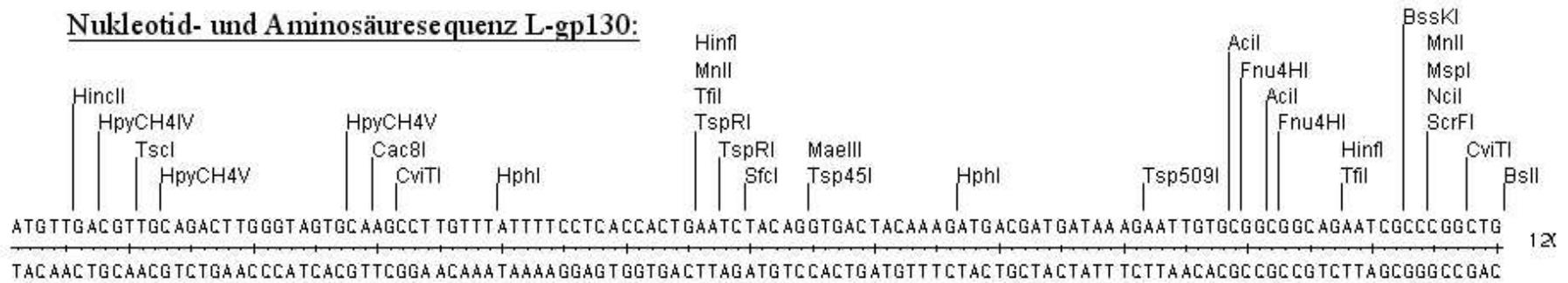




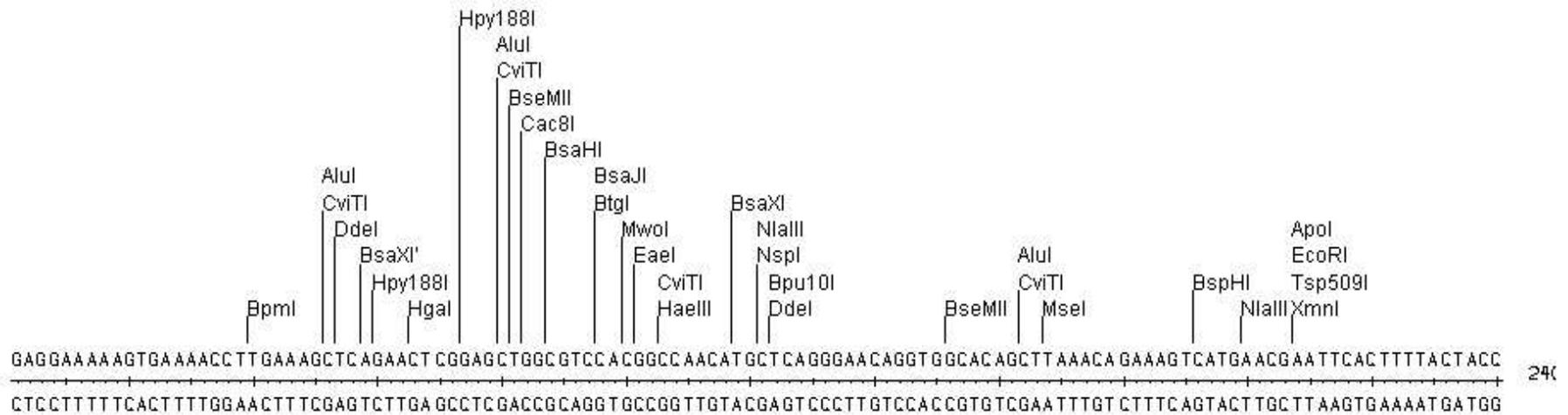


AlaAlaThrAspGluGlyMetPrdLysSerTyrLeuProGlnThrValArgGlnGlyGlyTyrMetProGln •
 LeuArgLeuMetLysAlaCysLeuLysValThrTyrHisArgLeuTyrGlyLysAlaAlaThrCysLeuSerGlu
 GlyCysAsp • • ArgHisAla • LysLeuLeuThrThrAspCysThrAlaArgArgLeuHisAlaSerVal
 +-----+
 AlaAlaValSerSerPrdMetGlyLeuLeu • LysGlyCysValThrArgCysPrdPro • MetGly • His
 SerArgSerIlePheAlaHisArgPheThrVal • TrpLeuSerTyrPrdLeuAlaAlaValHisArgLeuSer
 GlnSerGlnHisLeuCysAla • PheAsrSerValValSerGlnValAlaLeuArgSerCysAlaGluThrPhe

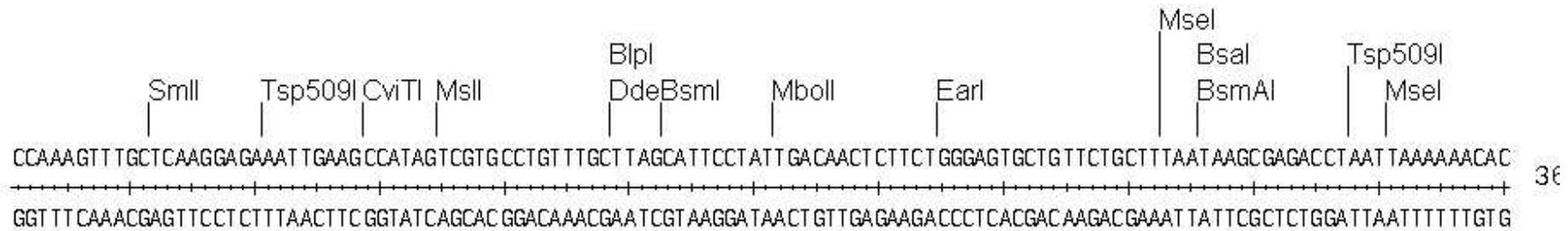
Nukleotid- und Aminosäuresequenz L-gp130:



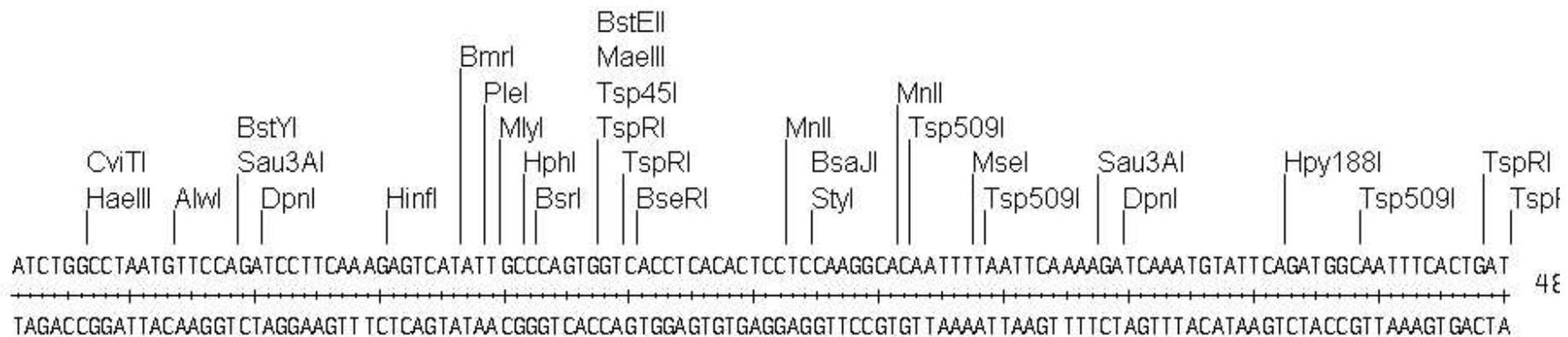
Met Leu Thr Leu Gln Thr Trp Val Val Gln Ala Leu Phe Ile Phe Leu Thr Thr Glu Ser Thr Gly Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Glu Leu Cys Gly Gly Arg Ile Ala Arg Leu
Cys • Arg Cys Arg Leu Gly • Cys Lys Pro Cys Leu Phe Ser Ser Pro Leu Aon Leu Gln Val Thr Thr Lys Met Thr Met Ile Lys Aon Cys Ala Ala Ala Glu Ser Pro Gly Trp
Aon Val Asp Val Ala Asp Leu Gly Ser Ala Ser Leu Val Tyr Phe Pro His His • Ile Tyr Arg • Leu Gln Arg • Arg • Arg Ile Val Arg Arg Gln Aon Arg Pro Ala
Ile Aon Val Aon Cys Val Gln Thr Thr Cys Ala Lys Aon Ile Lys Arg Val Val Ser Asp Val Pro Ser • Leu Ser Ser Ser Ser Leu Ser Aon His Pro Pro Leu Ile Ala Arg Ser
His Gln Arg Gln Leu Ser Pro Tyr His Leu Gly Gln Lys Aon Glu Glu Gly Ser Phe Arg Cys Thr Val Val Phe Ile Val Ile Ile Phe Phe Gln Ala Ala Ala Ser Asp Gly Pro Gln
Thr Ser Thr Ala Ser Lys Pro Leu Ala Leu Arg Thr • Lys Gly • Trp Gln Ile • Leu His Ser Cys Leu His Arg His Tyr Leu Ile Thr Arg Arg Cys Phe Arg Gly Ala Pro



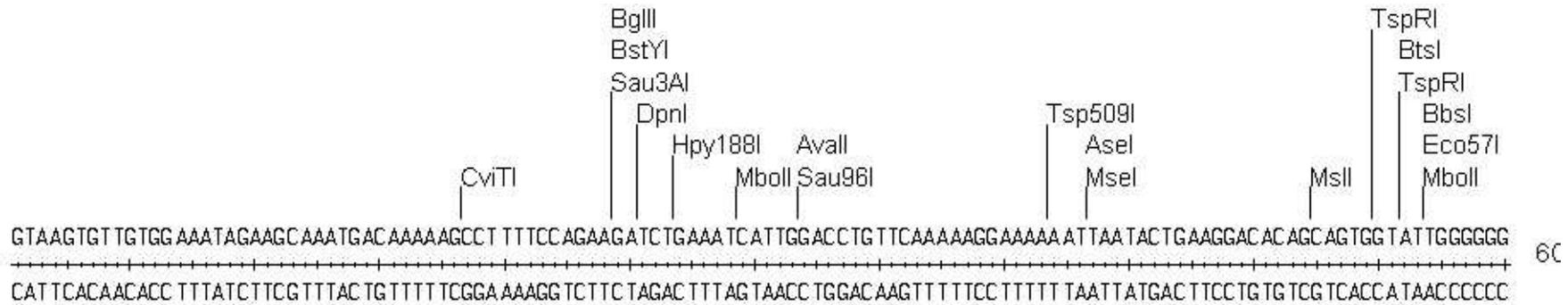
Glu Glu Lys Val Lys Thr Leu Lys Ala Gln Aon Ser Glu Leu Ala Ser Thr Ala Aon Met Leu Arg Glu Gln Val Ala Gln Leu Lys Gln Lys Val Met Aon Glu Phe Thr Phe Thr Thr
Arg Lys Lys • Lys Pro • Lys Leu Arg Thr Arg Ser Trp Arg Pro Arg Pro Thr Cys Ser Gly Aon Arg Trp His Ser Leu Aon Arg Lys Ser • Thr Aon Ser Leu Leu Leu Pro
Gly Gly Lys Ser Glu Aon Leu Glu Ser Ser Glu Leu Gly Ala Gly Val His Gly Gln His Ala Gln Gly Thr Gly Gly Thr Ala • Thr Glu Ser His Glu Arg Ile His Phe Tyr Tyr
Ser Ser Phe Thr Phe Val Lys Phe Ala • Phe Glu Ser Ser Ala Asp Val Ala Leu Met Ser Leu Ser Cys Thr Ala Cys Ser Leu Cys Phe Thr Met Phe Ser Aon Val Lys Val Val
Leu Phe Phe His Phe Gly Gln Phe Ser Leu Val Arg Leu Gln Arg Gly Arg Gly Val His Glu Pro Phe Leu His Cys Leu Lys Phe Leu Phe Asp His Val Phe Glu Ser Lys Ser Gly
Pro Phe Leu Ser Phe Arg Ser Leu Glu Ser Ser Pro Ala Pro Thr Trp Pro Trp Cys Ala • Pro Val Pro Pro Val Ala • Val Ser Leu • Ser Arg Ile • Lys • Gly



ProLysPheAlaGlnGlyGluIleGluAlaIleValValProValCysLeuAlaPheLeuLeuThrThrLeuLeuGlyValLeuPheCysPheAsnLysArgAspLeuIleLysLysHis
 GlnSerLeuLeuLysGluLysLeuLysPro • SerCysLeuPheAla • HisSerTyr • GlnLeuPheTrpGluCysCysSerAlaLeuIleSerGluThr • LeuLysAsnThr
 ProLysValCysSerArgArgAsn • SerHisSerArgAlaCysLeuLeuSerIleProIleAspAsnSerSerGlySerAlaValLeuLeu • • AlaArgProAsn • LysThr
 GlyPheAsnAla • ProSerIleSerAlaMetThrThrGlyThrGlnLysAlaAsnArgAsnValValArgArgProThrSerAsnGlnLysLeuLeuArgSerArgIleLeuPheCys
 TrpLeuLysSerLeuSerPheAsnPheGlyTyrAspHisArgAsnAla • CysGlu • GlnCysSerLysGlnSerHisGlnGluAlaLysIleLeuSerVal • AsnPhePheVal
 LeuThrGlnGluLeuLeuPheGlnLeuTrpLeuArgAlaGlnLysSerLeuMetGlyIleSerLeuGluGluProLeuAlaThrArgSer • TyrAlaLeuGlyLeu • PheValCys

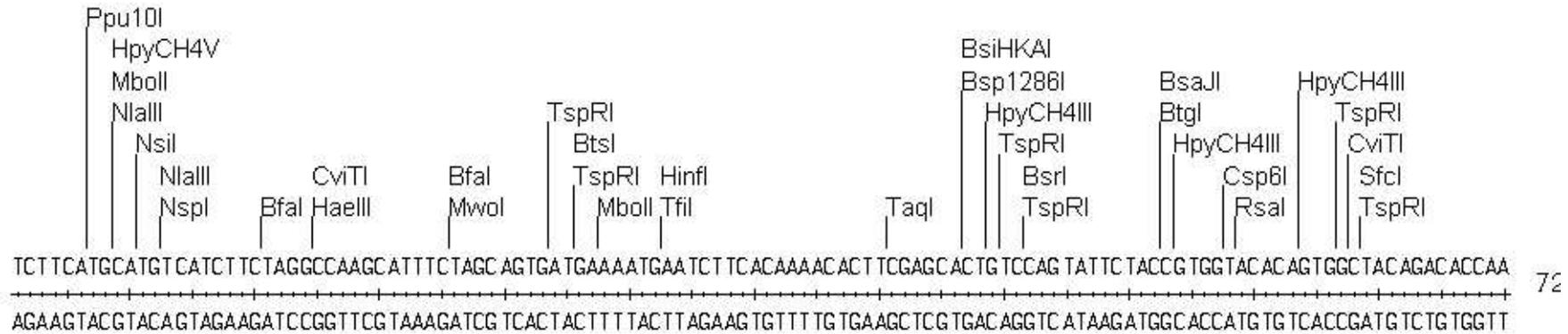


IleTrpProAsnValProAspProSerLysSerHisIleAlaGlnTrpSerProHisThrProProArgHisAsnPheAspSerLysAspGlnMetTyrSerAspGlyAsnPheThrAsp
 SerGlyLeuMetPheGlnIleLeuGlnArgValIleLeuProSerGlyHisLeuThrLeuLeuGlnGlyThrIleLeuIleGlnLysIleLysCysIleGlnMetAlaIleSerLeuMet
 HisLeuAla • CysSerArgSerPheLysGluSerTyrCysProValValThrSerHisSerSerLysAlaGlnPhe • PheLysArgSerAsnValPheArgTrpGlnPheHis •
 MetGlnGlyLeuThrGlySerGlyGluPheLeu • IleAlaTrpHisAspGly • ValGlyGlyLeuCysLeuLysLeuGluPheSer • IleTyrGluSerProLeuLysValSer
 AspProArgIleAsnTrpIleArg • LeuThrMetAsnGlyLeuPro • ArgValSerArgTrpProValIleLysIle • PheIleLeuHisIle • IleAlaIleGluSerIle
 ArgAla • HisGluLeuAspLysLeuSerAspTyrGlnGlyThrThrValGluCysGluGluLeuAlaCysAsn • AsnLeuLeuAspPheThrAsnLeuHisCysAsn • GlnHis



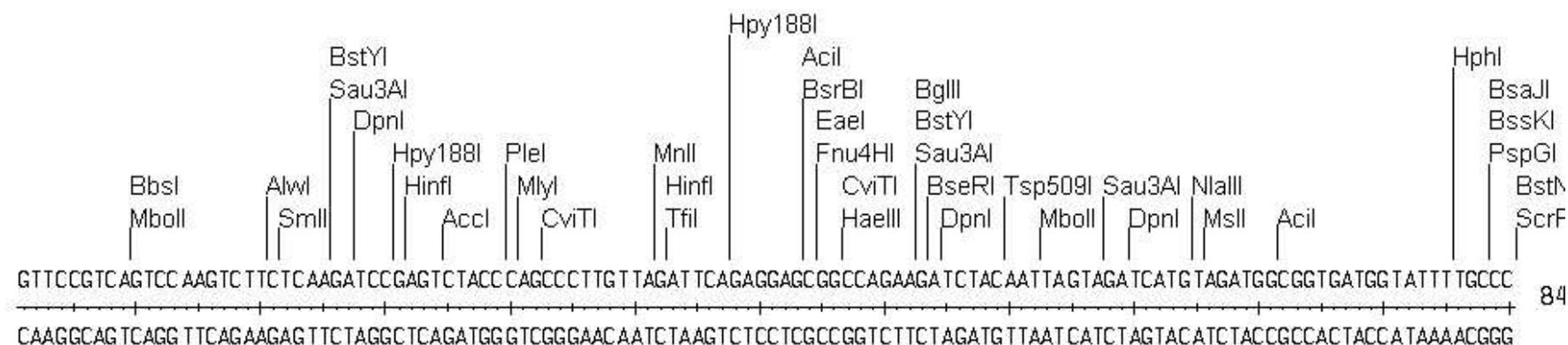
Val Ser Val Val Glu Ile Glu Ala Asn Asp Lys Lys Pro Phe Pro Glu Asp Leu Lys Ser Leu Asp Leu Phe Lys Lys Glu Lys Ile Asn Thr Glu Gly His Ser Ser Gly Ile Gly Gly
 Val Leu Trp Lys Lys Gln Met Thr Lys Ser Leu Phe Gln Lys Ile Asn His Trp Thr Cys Ser Lys Arg Lys Lys Leu Ile Leu Lys Asp Thr Ala Val Val Leu Gly Gly
 Cys Lys Cys Cys Gly Asn Arg Ser Lys Gln Lys Ala Phe Ser Arg Arg Ser Glu Ile Ile Gly Pro Val Gln Lys Gly Lys Asn Tyr Arg Thr Gln Gln Trp Tyr Trp Gly

Thr Leu Thr Thr Ser Ile Ser Ala Phe Ser Leu Phe Gly Lys Gly Ser Ser Arg Phe Asp Asn Ser Arg Asn Leu Phe Ser Phe Ile Leu Val Ser Pro Cys Leu Leu Pro Ile Pro Pro
 Tyr Thr Asn His Phe Tyr Phe Cys Ile Val Phe Leu Arg Lys Trp Phe Ile Gln Phe Gln Val Gln Glu Phe Leu Phe Phe Asn Ile Ser Phe Ser Val Ala Thr Thr Asn Pro Pro
 Leu His Gln Pro Phe Leu Leu Leu His Cys Phe Ala Lys Glu Leu Leu Asp Ser Ile Met Pro Gly Thr Phe Pro Phe Phe Tyr Gln Leu Val Cys Cys His Tyr Gln Pro Thr

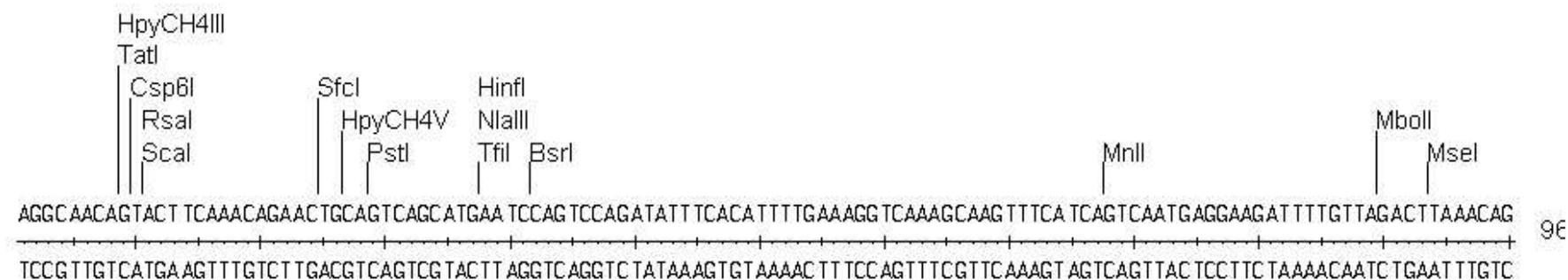


Ser Ser Cys Met Ser Ser Ser Arg Pro Ser Ile Ser Ser Ser Asp Glu Asn Glu Ser Ser Gln Asn Thr Ser Ser Thr Val Gln Tyr Ser Thr Val Val His Ser Gly Tyr Arg His Gln
 Leu His Ala Cys His Leu Leu Gly Gln Ala Phe Leu Ala Val Met Lys Met Asn Leu His Lys Thr Leu Arg Ala Leu Ser Ser Ile Leu Pro Trp Tyr Thr Val Ala Thr Asp Thr Lys
 Val Phe Met His Val Ile Phe Ala Lys His Phe Gln Lys Ile Phe Thr Lys His Phe Glu His Cys Pro Val Phe Tyr Arg Gly Thr Gln Trp Leu Gln Thr Pro

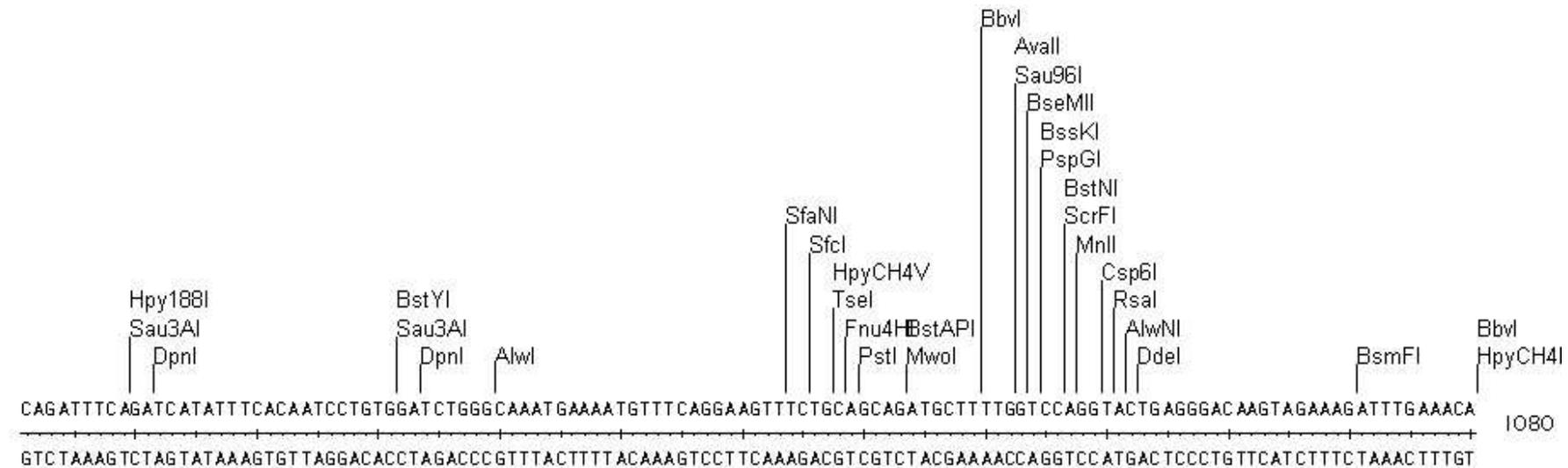
Asp Glu His Met Asp Asp Glu Leu Gly Leu Met Glu Leu Leu Ser Ser Phe Ser Asp Glu Cys Phe Val Glu Leu Val Thr Trp Tyr Glu Val Thr Thr Cys Leu Pro Leu Cys Trp
 Arg Ala His Arg Arg Pro Trp Ala Asn Arg Ala Thr Ile Phe Ile Phe Arg Leu Val Ser Arg Ala Ser Asp Leu Ile Arg Gly His Tyr Val Thr Ala Val Ser Val Leu
 Lys Met Cys Thr Met Lys Ala Leu Cys Lys Cys His His Phe His Ile Lys Val Phe Cys Lys Ser Cys Gln Gly Thr Asn Arg Pro Val Cys His Ser Cys Val Gly Leu



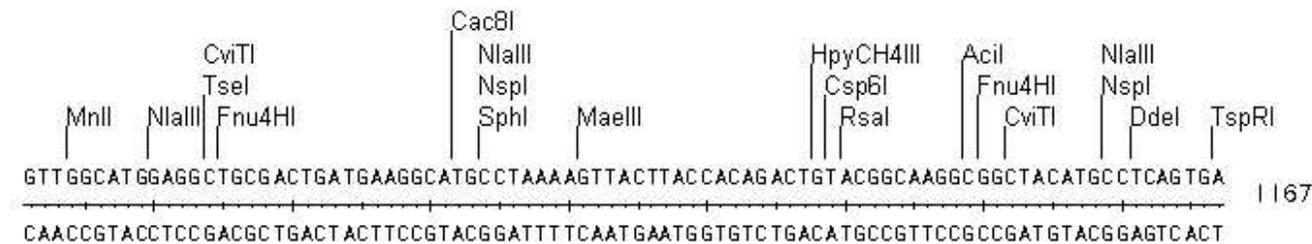
Val Pro Ser Val Gln Val Phe Ser Arg Ser Glu Ser Thr Gln Pro Leu Leu Asp Ser Glu Glu Arg Pro Glu Asp Leu Gln Leu Val Asp His Val Asp Gly Gly Asp Gly Ile Leu Pro
Phe Arg Gln Ser Lys Ser Ser Gln Asp Pro Ser Leu Pro Ser Pro Cys • Ile Gln Arg Ser Gly Gln Lys Ile Tyr Asn • • Ile Met • Met Ala Val Met Val Phe Cys Pro
Ser Ser Val Ser Pro Ser Leu Leu Lys Ile Arg Val Tyr Pro Ala Leu Val Arg Phe Arg Gly Ala Ala Arg Arg Ser Thr Ile Ser Arg Ser Cys Arg Trp Arg • Trp Tyr Phe Ala
Thr Gly Asp Thr Trp Thr Lys Glu Leu Asp Ser Asp Val Trp Gly Lys Asn Ser Glu Ser Ser Arg Gly Ser Ser Arg Cys Asn Thr Ser • Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ile Lys Gly
Asn Arg • Asp Leu Asp Glu • Ser Gly Leu Arg Gly Leu Gly Gln • Ile • Leu Leu Pro Trp Phe Ile • Leu • Tyr Ile Met Tyr Ile Ala Thr Ile Thr Asn Gln Gly
Glu Thr Leu Gly Leu Arg Arg Leu Ile Arg Thr • Gly Ala Arg Thr Leu Asn Leu Pro Ala Ala Leu Leu Asp Val Ile Leu Leu Asp His Leu His Arg His His Tyr Lys Ala Trp



Arg Gln Gln Tyr Phe Lys Gln Asn Cys Ser Gln His Glu Ser Ser Pro Asp Ile Ser His Phe Glu Arg Ser Lys Gln Val Ser Ser Val Asn Glu Glu Asp Phe Val Arg Leu Lys Gln
Gly Asn Ser Thr Ser Asn Arg Thr Ala Val Ser Met Asn Pro Val Gln Ile Phe His Ile Leu Lys Gly Gln Ser Lys Phe His Gln Ser Met Arg Lys Ile Leu Leu Asp Leu Asn Ser
Gln Ala Thr Val Leu Gln Thr Glu Leu Gln Ser Ala • Ile Gln Ser Arg Tyr Phe Thr Phe • Lys Val Lys Ala Ser Phe Ile Ser Gln • Gly Arg Phe Cys • Thr • Thr
Leu Cys Cys Tyr Lys Leu Cys Phe Gln Leu • Cys Ser Asp Leu Gly Ser Ile Glu Cys Lys Ser Leu Asp Phe Cys Thr Glu Asp Thr Leu Ser Ser Ser Lys Thr Leu Ser Leu Cys
Pro Leu Leu Val Glu Phe Leu Val Ala Thr Leu Met Phe Gly Thr Trp Ile Asn • Met Lys Phe Pro • Leu Leu Asn • • Asp Ile Leu Phe Ile Lys Asn Ser Lys Phe Leu
Ala Val Thr Ser • Val Ser Ser Cys Asp Ala His Ile Trp Asp Leu Tyr Lys Val Asn Gln Phe Thr Leu Ala Leu Lys Met Leu • His Pro Leu Asn Gln • Val • Val Ala



Gln Ile Ser Asp His Ile Ser Gln Ser Cys Gly Ser Gly Gln Met Lys Met Phe Gln Glu Val Ser Ala Ala Asp Ala Phe Gly Pro Gly Thr Glu Gly Gln Val Glu Arg Phe Glu Thr
 Arg Phe Gln Ile Ile Phe His Asn Pro Val Asp Leu Gly Lys • Lys Cys Phe Arg Lys Phe Leu Gln Gln Met Leu Leu Val Gln Val Leu Arg Asp Lys • Lys Asp Leu Lys Gln
 Ala Asp Phe Arg Ser Tyr Phe Thr Ile Leu Trp Ile Trp Ala Asn Glu Asn Val Ser Gly Ser Phe Cys Ser Arg Cys Phe Trp Ser Arg Tyr • Gly Thr Ser Arg Lys Ile • Asn
 Cys Ile Glu Ser • Ile Glu Cys Asp Gln Pro Asp Pro Cys Ile Phe Ile Asn • Ser Thr Glu Ala Ala Ser Ala Lys Pro Gly Pro Val Ser Pro Cys Thr Ser Leu Asn Ser Val
 Leu Asn • Ile Met Asn • Leu Gly Thr Ser Arg Pro Leu His Phe His Lys Leu Phe Asn Arg Cys Cys Ile Ser Lys Thr Trp Thr Ser Leu Ser Leu Tyr Phe Ser Lys Phe Cys
 Ser Lys Leu Asp Tyr Lys Val Ile Arg His Ile Gln Ala Phe Ser Phe Thr Glu Pro Leu Lys Gln Leu Leu His Lys Gln Asp Leu Tyr Gln Pro Val Leu Leu Phe Ile Gln Phe Leu



Val Gly Met Glu Ala Ala Thr Asp Glu Gly Met Pro Lys Ser Tyr Leu Pro Gln Thr Val Arg Gln Gly Gly Tyr Met Pro Gln •
 Leu Ala Trp Arg Leu Arg Leu Met Lys Ala Cys Leu Lys Val Thr Tyr His Arg Leu Tyr Gly Lys Ala Ala Thr Cys Leu Ser Glu
 Ser Trp His Gly Gly Cys Asp • • Arg His Ala • Lys Leu Leu Thr Thr Asp Cys Thr Ala Arg Arg Leu His Ala Ser Val
 Thr Pro Met Ser Ala Ala Val Ser Ser Pro Met Gly Leu Leu • Lys Gly Cys Val Thr Arg Cys Pro Pro • Met Gly • His
 Asn Ala His Leu Ser Arg Ser Ile Phe Ala His Arg Phe Thr Val • Trp Leu Ser Tyr Pro Leu Ala Ala Val His Arg Leu Ser
 Gln Cys Pro Pro Gln Ser Gln His Leu Cys Ala • Phe Asn Ser Val Val Ser Gln Val Ala Leu Arg Ser Cys Ala Glu Thr Phe

9 Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Stefan Rose-John für die interessante Themenstellung, die Bereitstellung von Arbeitsmitteln und die intensive wissenschaftliche Betreuung meiner Arbeit.

Herrn Prof. Dr. Rüdiger Schulz-Friedrich danke ich für die freundliche Übernahme des Erstgutachtens.

Frau Dr. Marie-Luise Kruse gilt mein herzlicher Dank für die hervorragende Unterstützung am LSM, für hilfreiche wissenschaftliche Diskussionen und für die freundliche Aufnahme in Ihrem Labor.

Ich danke Frau Prof. Dr. Ursula Klingmüller für die Bereitstellung des retroviralen Vektors pMOWS und für die freundliche Aufnahme in Ihrem Labor in Heidelberg.

Ich danke dem gesamten Biochemie Altbau-Team, insbesondere dem „Anfangsteam“ in Kiel: Kajo Kallen, Radek Sedlacek, Petra Regenhard und Thorsten Sadowski und Marina Kovaleva. Den „Norddeutschen“ Andreas Ludwig, Björn Schuster, Christian Hundhausen und Björn Rabe danke ich für die nette Labor- und Arbeitsatmosphäre. Marie-Luise Kruse, Ingo Bußmeyer, Krzysztof Paliga und Petra Regenhard danke ich für das Korrekturlesen meiner Arbeit. Michael Pachta, Cord Gudegast und Jonas Völcker danke ich für die professionelle Hilfe bei allen PC-Notfällen. Ich danke Elisa Hebel für Literaturrecherchen.

Ich danke allen meinen Freunden, die mich unterstützt haben, insbesondere Ingo Bußmeyer, Emine Dogru-Mattern und Pia Scholz.

Meine Eltern und meine Schwestern Astrid und Kerstin haben mich in allen Phasen dieser Arbeit mit viel Verständnis liebevoll begleitet: Danke!

Ich danke Daniel Cisowski für sein Verständnis und seine Unterstützung sowie die professionelle Hilfe bei Computerproblemen und der Formatierung dieser Arbeit.

10 Lebenslauf

Name	Sigrid Lang
Geburtsdatum und -ort	10.02.1972 in Ludwigshafen am Rhein
Staatangehörigkeit	deutsch

Schule	1978-1980 Grundschule in Neuhofen 1980-1982 Grundschule in Tawern 1982-1991 Staatliches Gymnasium Konz
Studium	
1991-1992	Studium an der Universität Mannheim: Germanistik und Geschichte für LaG
1992-1995	Studium an der Universität Kaiserslautern: Biologie
1995-1998	Studium an der Johannes Gutenberg-Universität Mainz Biologie
1998-1999	Diplomarbeit bei Prof. Dr. Rose-John: „Molekulare Charakterisierung eines neuen, potentiell zytokin-induzierten, neuronalen Gens“
2000-2004	Anfertigung der vorliegenden Arbeit bei Prof. Dr. Rose-John an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel