

**Studien zur physiologischen Funktion löslicher
Zytokinrezeptoren und zur Wirkungsweise viral kodierter
Zytokine**

Dissertation
zur Erlangung des Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“

am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg Universität
in Mainz

Thomas Jostock
geb. in Trier

Mainz 2001

Tag der mündlichen Prüfung: 18.05.2001

Inhaltsverzeichnis

I. Einleitung	1
1. Zytokine.....	1
2. Interleukin-6 (IL-6)	3
3. Der IL-6-Rezeptor-Komplex.....	5
4. Löslicher IL-6R (sIL-6R) und lösliches gp130 (sgp130).....	9
5. Karposi Sarkoma assoziiertes Herpesvirus (KSHV) und virales Interleukin-6 (vIL-6) ...	13
6. Zielsetzung der Arbeit.....	16
II. Material und Methoden.....	17
1. Material	17
1.1 Chemikalien	17
1.2 Enzyme	17
1.3 Antikörper	17
1.4 Radiochemikalien	17
1.5 Zytokine	18
1.6 Fc-Fusionsproteine.....	18
1.7 Zelllinien	18
2. Methoden.....	19
2.1 Standardmethoden zur Modifikation und Klonierung rekombinanter DNA	19
2.2 Konstruktion von humanem sgp130Fc	19
2.3 Konstruktion von murinem sgp130Fc	20
2.4 Konstruktion von humanem sgp130his	21
2.5 Zellkultur.....	22
2.6 Transiente Transfektion von COS-7-Zellen.....	22
2.7 Aufreinigung der sgp130-Proteine aus COS-7-Zellüberständen	22
2.8 Metabolische Markierung und Immunpräzipitation	23
2.9 SDS-PAGE und Fluorographie/Silberfärbung.....	23
2.10 Proliferationstests.....	24
2.11 Stimulation von HepG2-Zellen.....	24
2.12 Isolation und Stimulation von humanen Lamina propria mononukleären Zellen	24
2.13 Analyse des phosphorylierten STAT3 in Hepatomzellen.....	25

III. Ergebnisse.....	26
1. Untersuchungen zur biologischen Funktion von löslichem gp130	26
1.1 Konstruktion der sgp130-Expressionsplasmide.....	26
1.2 Expression und Aufreinigung der sgp130-Proteine.....	27
1.3 Charakterisierung der sgp130-Proteine.....	28
1.4 Inhibition der gp130-abgängigen Proliferation von BAF/3-Zellen	31
1.5 Inhibition der Akute-Phase-Protein-Synthese in HepG2-Hepatomzellen	35
1.6 Inhibition des antiapoptotischen Effektes von IL-6 auf Lamina propria mononukleäre Zellen von Morbus Crohn Patienten	38
2. Untersuchungen zur Zusammensetzung des Rezeptor-Komplexes von viralem IL-6	40
2.1 Expression und Aufreinigung von rekombinantem vIL-6	40
2.2 Interaktion von vIL-6 mit Komponenten des IL-6-Rezeptor-Komplexes	41
2.3 Biologische Aktivität von vIL-6 auf BAF/3-Zellen.....	43
2.4 Inhibition der vIL-6-induzierten Proliferation von BAF/3-Zellen durch sgp130Fc und einen neutralisierenden gp130-Antikörper.....	45
2.5 vIL-6-induzierte Akute-Phase-Protein-Synthese in humanen Hepatomzellen (HepG2)	47
2.6 vIL-6-induzierte STAT3-Phosphorylierung in hmanen Hepatomzellen (HepG2)	49
IV. Diskussion	51
1. Lösliches gp130 ist der natürliche Inhibitor des sIL-6R-"Transsignaling"	51
1.1 Konstruktion, Expression, Aufreinigung und Charakterisierung der sgp130-Proteine.....	51
1.2 Ternäre Komplexbildung und Speziesrestriktionen von sgp130, sIL-6R und IL-6.....	52
1.3 Lösliches gp130 inhibiert spezifisch die IL-6/sIL-6R-induzierte Proliferation von BAF/3-Zellen	53
1.4 Die LIF-, OSM- und CNTF-induzierte Proliferation von BAF/3-Zellen wird durch sgp130 nicht oder nur teilweise gehemmt	54
1.5 Lösliches gp130 inhibiert die sIL-6R-abhängige Akute-Phase-Protein-Synthese in Humanen Hepatomzellen (HepG2).....	55
1.6 Der antiapoptotische Effekt von IL-6 auf Lamina propria T-Zellen bei Morbus Crohn wird durch sIL-6R vermittelt und ist durch sgp130 hemmbar.....	56
1.7 Die Rolle von sIL-6R und sgp130 bei der Pathogenese verschiedener Krankheiten ..	57
1.8 Die physiologische Funktion von sgp130.....	58
1.9 Das therapeutische Potential von sgp130Fc	59

2. Virales IL-6 stimuliert humanes gp130 IL-6R-unabhängig.....	60
2.1 Expression und Aufreinigung von vIL-6.....	60
2.2 Virales IL-6 interagiert direkt mit gp130.....	61
2.3 Die Induktion der Proliferation von BAF/3-Zellen durch vIL-6 ist IL-6R-unabhängig	61
2.4 Die vIL-6-induzierte Proliferation von BAF/3-Zellen wird über gp130 vermittelt.....	62
2.5 Die Aktivierung von humanen Hepatomzellen (HepG2) durch vIL-6 erfolgt durch direkte Stimulation von gp130.....	63
2.6 Die Rolle von vIL-6 in der Pathogenese von KSHV-assoziierten Krankheiten.....	63
V. Zusammenfassung	65
VI. Literaturverzeichnis.....	67
VII. Anhang	84
1. Abkürzungsverzeichnis	84

I. Einleitung

1. Zytokine

Komplexe Vorgänge wie Stoffwechsel, Zellteilung und Differenzierung von Zellen erfordern in vielzelligen Organismen effektive Mechanismen des Informationsaustausches zwischen Zellen und Organen. Neben Zell-Zell-Kontakten spielen dabei humorale Mediatoren eine wichtige Rolle. Zu den humoralen Mediatoren zählen neben Hormonen die Zytokine. Zytokine sind eine heterogene Gruppe von Proteinen, die von einer Vielzahl von Zellen, darunter Makrophagen, Monozyten, Endothelzellen, Fibroblasten sowie B- und T-Lymphozyten sekretiert werden. Zu ihren Aufgaben gehören u. a. die Kontrolle von zellulären und humoralen Immunantworten, Entzündungsprozessen, Akute-Phase-Antworten, Chemotaxis, Tumorrogression und Hämatopoese (Kishimoto et al. 1994). Dabei zeigen Zytokine autokrine, parakrine und auch endokrine Wirkungen, wenn sie in die Zirkulation gelangen.

Zu den Zytokinen zählt man Interleukine, Interferone, Wachstumsfaktoren, koloniestimulierende Faktoren, Tumor-Nekrose-Faktoren und Chemokine. Es handelt sich um sezernierte Proteine, die ihre Wirkung über spezifische Rezeptoren auf der Membran von Zielzellen entfalten. Die Rezeptoren der meisten Zytokine setzen sich aus einer ligandenbindenden α -Untereinheit und einer signaltransduzierenden β -Untereinheit zusammen.

Die Einteilung der Zytokine und deren Rezeptoren in Familien erfolgte aufgrund der Tertiärstrukturvorhersage (Bazan 1990a; Bazan 1990b; Bazan 1990c). Innerhalb einer Familie nutzen häufig mehrere Mitglieder die gleiche signaltransduzierende Rezeptoruntereinheit, was zu einem redundanten Wirkungsspektrum führt.

Ein Beispiel für eine solche Familie ist die der Interleukin-6-artigen Zytokine. Sie setzt sich aus Interleukin-6 (IL-6) (Hibi et al. 1990), IL-11 (Fourcin et al. 1994), „Ciliary Neurotrophic Factor“ (CNTF) (Ip et al. 1992), „Cardiotrophin-1“ (CT-1) (Pennica et al. 1995a; Pennica et al. 1995b), „Leukemia Inhibitory Factor“ (LIF) (Tomida et al. 1984; Ferrara et al. 1992), „Novel Neurotrophin-1“ (NNT-1) (Senaldi et al. 1999) und Onkostatine-M (OSM) (Gearing et al. 1992a; Gearing et al. 1992b) zusammen. Alle verwenden das Glykoprotein 130 (gp130) als Signaltransduktionskomponente.

Eine gemeinsame biologische Aktivität mehrerer Mitglieder dieser Familie ist die Induktion der Transkription von Akute-Phase-Genen in Hepatozyten (Baumann et al. 1987; Baumann et

al. 1990; Heinrich et al. 1990; Baumann et al. 1991; Richards et al. 1992). In Abb. 1 sind die Zytokinwirkungen während der Akute-Phase-Reaktion, einer Reaktion des Körpers auf Störungen der Homeostase durch Infektion, Verletzung oder Tumoren dargestellt. Daraus geht hervor, daß die Produktion und Freisetzung eines Zytokins maßgeblich durch andere Zytokine und Hormone reguliert wird.

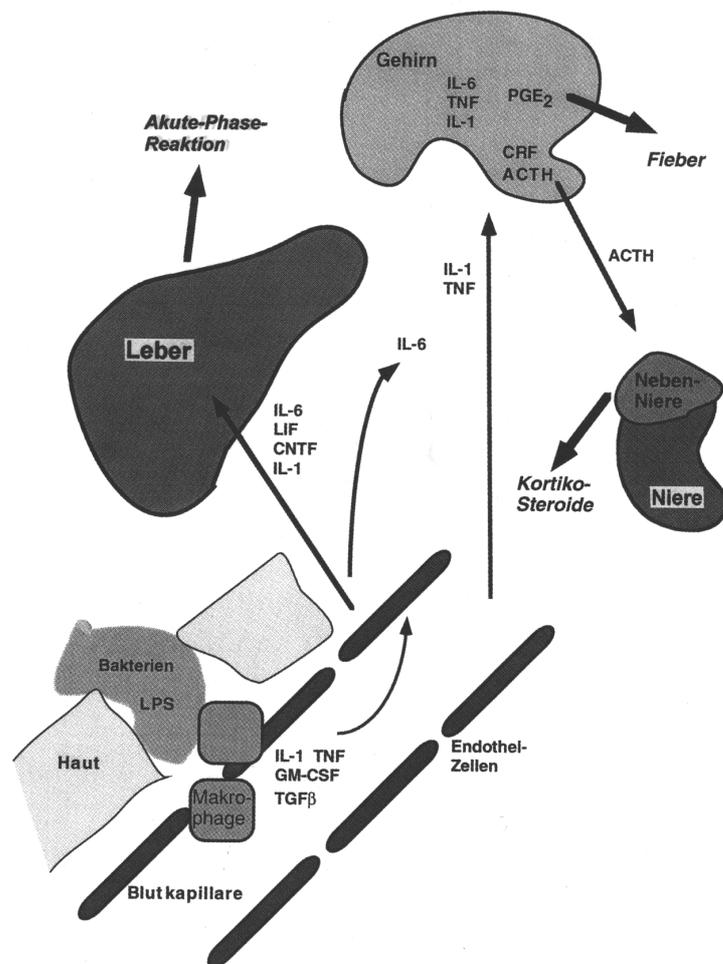


Abb. 1: Zytokinproduktion und Zytokinwirkung im Rahmen der Akute-Phase-Reaktion

Die Abbildung zeigt schematisch, wie durch eingedrungene Bakterien aktivierte Makrophagen über die Ausschüttung von Zytokinen eine systemische Reaktion auslösen, an der auch Leber, Gehirn und Nebenniere beteiligt sind. ACTH: „Adrenocorticotropin“; LPS: Lipopolysaccharid; TNF: Tumor Nekrose Faktor; PGE₂: Prostaglandin E₂; CRF: „Corticotropin Releasing Factor“; CNTF: „Ciliary Neurotrophic Factor“; GM-CSF: „Granulocyte/Macrophage-Colony Stimulating Factor“; TGFβ: „Tumor Growth Factor β“; LIF: „Leukemia Inhibitory Factor“; IL: Interleukin. (Roeb und Rose-John, 1996).

Als Ergebnis der Zytokin- und Hormonkaskade kommt es u. a. zu einem dramatischen Anstieg der Konzentration einiger Plasmaproteine, die Akute-Phase-Proteine genannt werden und von der Leber sezerniert werden (Koj et al. 1974; Kushner 1982; Heinrich et al. 1990; Heinrich et al. 1991). Zu ihnen gehören u. a. C-reaktives Protein (CRP), Fibrinogen, Haptoglobin und Antichymotrypsin (ACT). Viele Akute-Phase-Proteine wirken als Proteinase-Inhibitoren, andere als Blutgerinnungsfaktoren oder Komplementkomponenten. Viele Zytokine zeigen andererseits ein pleiotropes Wirkungsspektrum, d. h. je nach Zielzelltyp und Differenzierungszustand der Zielzelle können die Effekte eines Zytokins sehr verschieden sein. LIF z. B. fördert in einigen Zelltypen die Differenzierung, wie die Differenzierung der murinen leukämischen Zelllinie M1 zu Monozyten, und hemmt sie in anderen Zelltypen, wie die Differenzierung von embryonalen Stammzellen (Smith et al. 1988; Williams et al. 1988).

2. Interleukin-6 (IL-6)

IL-6 ist ein Zytokin mit einem weiten Spektrum an biologischen Aktivitäten (Abb. 2). Es induziert die Differenzierung von B-Zellen zu Antikörper-sezernierenden Plasmazellen (Hirano et al. 1986) und wirkt als Wachstumsfaktor für Plasmazytom- und Myelomzellen (Van Snick et al. 1987; Kawano et al. 1988). IL-6 induziert bei T-Zellen die IL-2-Produktion und Zellwachstum, sowie die Differenzierung von zytotoxischen T-Zellen (Garman et al. 1987; Lotz et al. 1988; Okada et al. 1988). Darüber hinaus ist IL-6 beteiligt an der Regulation der Akute-Phase-Protein-Synthese (Andus et al. 1987; Gauldie et al. 1987), der Hämatopoese (Ikebuchi et al. 1987), der Differenzierung von Makrophagen (Miyaura et al. 1988), sowie der neuronalen Differenzierung (Sato et al. 1988). Weiterhin bewirkt IL-6 bei Megakaryozyten die Differenzierung zu Trombozyten (Akira et al. 1993).

IL-6 wird hauptsächlich von Fibroblasten, Endothelzellen und Monozyten/Makrophagen produziert. Weitere Zelltypen wie Chondrozyten, Astrozyten, glatte Muskelzellen, Keratinozyten, Mesangialzellen, T- und B-Zellen synthetisieren IL-6 nach geeigneter Stimulation (Akira et al. 1993; Hibi et al. 1996). Stimulatoren für die IL-6 Synthese und Sekretion sind Lipopolysaccharide, Viren und Zytokine (IL-1, Tumor-Nekrose-Faktor- α (TNF- α) und γ -Interferon (IFN- γ)).

Die IL-6-Serumkonzentration liegt bei gesunden Personen unterhalb von 10 pg/ml (Akira et al. 1993). Bei verschiedenen infektiösen, entzündlichen oder neoplastischen Erkrankungen

wie Plasmazytome, Castleman'sche Krankheit (Brandt et al. 1990), Mesangioproliferative Glomeronephritis (Horii et al. 1989), Osteoporose (Jilka et al. 1992), Kachexie (Strassmann et al. 1992), rheumatoide Arthritis (Hermann et al. 1989), Sepsis (Hack et al. 1989) und AIDS (Poli et al. 1990) findet man erhöhte IL-6-Konzentrationen im Serum (Kallen et al. 1997).

Die cDNA des humanen IL-6 wurde 1986 kloniert (Haegeman et al. 1986; Hirano et al. 1986; Zilberstein et al. 1986). Das reife humane IL-6-Protein besteht nach Abspaltung des Signalpeptids aus 184 Aminosäuren und enthält zwei Disulfidbrücken. Es wurden sechs verschiedene Glykosylierungsformen mit einem Molekulargewicht zwischen 20 und 30 kDa beschrieben (May et al. 1988a; May et al. 1988b; Gross et al. 1989), die alle die gleiche biologische Aktivität besitzen (Akira et al. 1993).

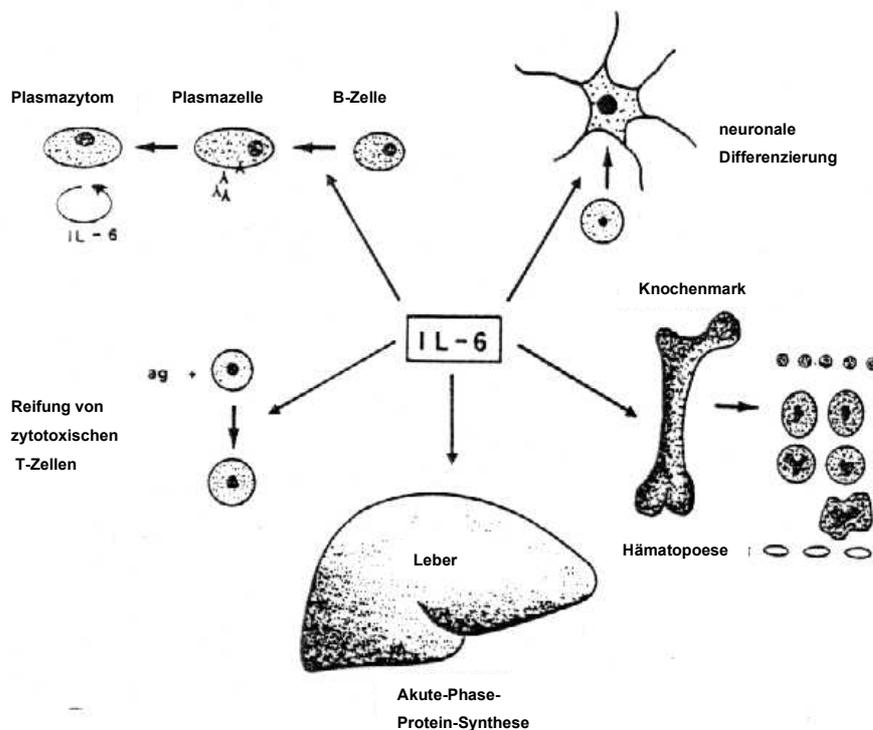


Abb. 2: Pleiotrophismus von Interleukin-6

Die Abbildung zeigt die verschiedenen Funktionen von Interleukin-6 bei Hämatopoese, Akute-Phase-Reaktion, Neuronaler Differenzierung, B-Zell- und T-Zell-Reifung.

Sequenzvergleiche und Vergleiche der Intron/Exon-Struktur, sowie Vorhersagen zur Sekundärstruktur führten zur Zuordnung von IL-6 zur hämatopoetischen Zytokinfamilie (Bazan 1990a; Bazan 1991). Dabei handelt es sich um eine Gruppe α -helikaler Zytokine, der u. a. Wachstums-Hormon, Prolaktin, Erythropoietin, Granulozyten-Kolonie-stimulierender Faktor, LIF und IL-6 angehören (Bazan 1990a). Obwohl innerhalb dieser Gruppe nur eine

Homologie der Aminosäuresequenz von unter 20% besteht, wurde für deren Mitglieder eine gemeinsame Tertiärstruktur vorhergesagt, die sich an Röntgenstrukturanalysen von „Growth Hormone“ orientiert (De Vos et al. 1992). Es handelt sich dabei um eine 4-Helix-Bündel-Struktur („4 Helix Bundle“) aus 4 antiparallelen Helices (A,B,C und D), einem langen A-B-Loop, einem kurzen B-C-Loop und einem langen C-D-Loop. NH₂- und COOH-Terminus liegen in unmittelbarer Nähe zueinander (Robinson et al. 1994; McDonald et al. 1995). 1997 gelang es die Tertiärstruktur von IL-6 aufzuklären (Abb. 3), welche die für hämatopoetische Zytokine charakteristischen vier antiparallelen Helices aufweist (Xu et al. 1997; Somers et al. 1997).

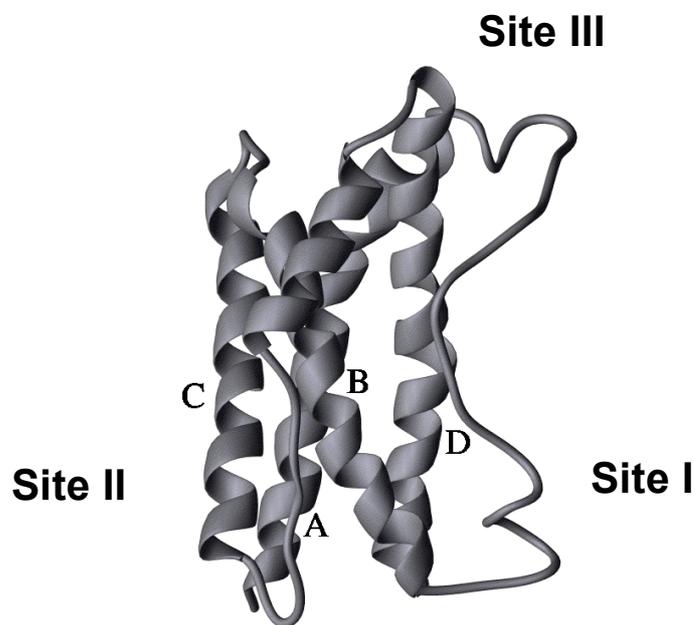


Abb. 3: Tertiärstruktur von IL-6

Tertiärstruktur von IL-6 (Xu et al. 1997). A,B,C,D: antiparallele α -Helices. Site I-III: Interaktionsstellen mit IL-6R (I) bzw. gp130 (II, III).

3. Der IL-6-Rezeptor-Komplex

Der IL-6-Rezeptor-Komplex setzt sich aus zwei verschiedenen Untereinheiten zusammen. Zunächst bindet IL-6 mit einer Affinität von ca. $K_D = 1$ nM an den spezifischen IL-6-Rezeptor (IL-6R) auf der Zelloberfläche. Dabei handelt es sich um ein ca. 80 kDa großes membranständiges Glykoprotein (Zohlnhöfer et al. 1992). Dieser Rezeptor/Ligand-Komplex bindet anschließend mit einer Affinität von ca. $K_D = 10$ pM an ein weiteres

Transmembranprotein, die ca. 130 kDa große signaltransduzierende Untereinheit, ebenfalls ein Glykoprotein (gp130) (Taga et al. 1989). Die Rekrutierung eines zweiten gp130-Moleküls und die damit einhergehende Homodimerisierung von gp130 führt zur Initiation der intrazellulären Signaltransduktionskaskade (Abb. 4) (Murakami et al. 1993). Nur der Komplex aus IL-6 und IL-6R bindet gp130, nicht jedoch IL-6 alleine (Taga et al. 1989).

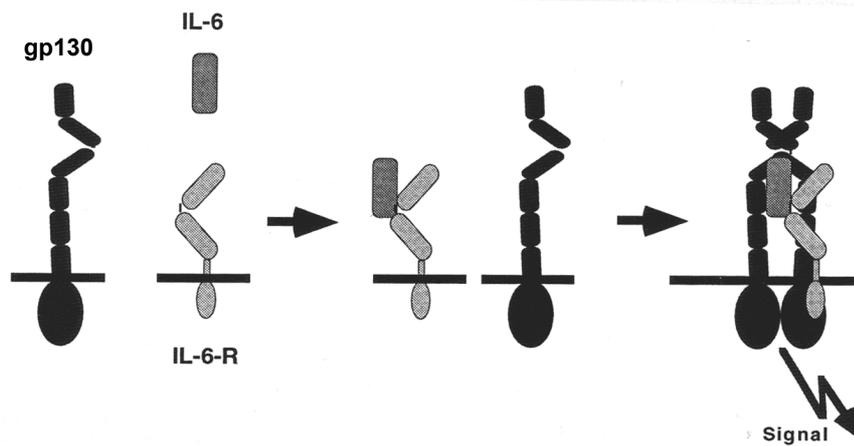


Abb. 4: Bildung des IL-6-Rezeptor-Komplexes

Zunächst bindet IL-6 an den spezifischen IL-6-Rezeptor (IL-6R) auf der Zelloberfläche. Der IL-6/IL-6R-Komplex bindet an gp130 und induziert dessen Homodimerisierung und die damit einhergehende Signaltransduktion.

Mit dem zytoplasmatischen Teil von gp130 sind konstitutiv Janus-Tyrosinkinasen (JAKs) assoziiert. Diese Tyrosinkinasen werden bei der Homodimerisierung von gp130 aktiviert und phosphorylieren intrazelluläre Tyrosinreste von gp130 (Murakami et al. 1993; Hibi et al. 1996). Die Phosphotyrosine dienen als Bindungsstelle für STAT-Faktoren („Signal Transducer and Activator of Transcription“). Im Falle von gp130 binden STAT1 und STAT3 an die Phosphotyrosine und werden von den Janus-Tyrosinkinasen phosphoryliert. Die phosphorylierten STAT1- und STAT3-Proteine bilden Homo- und Heterodimere, die in den Kern transloziert werden und dort als Transkriptionsfaktoren die Aktivität von Zielgenen modulieren (Akira et al. 1994; Boulton et al. 1994; Lütticken et al. 1994; Stahl et al. 1994; Hibi et al. 1996).

Neben STAT-Proteinen wird ein weiterer Transkriptionsfaktor, NF-IL-6 („Nuclear Factor IL-6“), aktiviert (Abb. 5). Die zur Aktivierung dieses Faktors notwendige

Signaltransduktionskaskade verläuft über RAS, RAF, und MAPK (Bonni et al. 1997; Ihara et al. 1997). Der zyttoplasmatische Teil vom IL-6R trägt nicht zur Signaltransduktion bei.

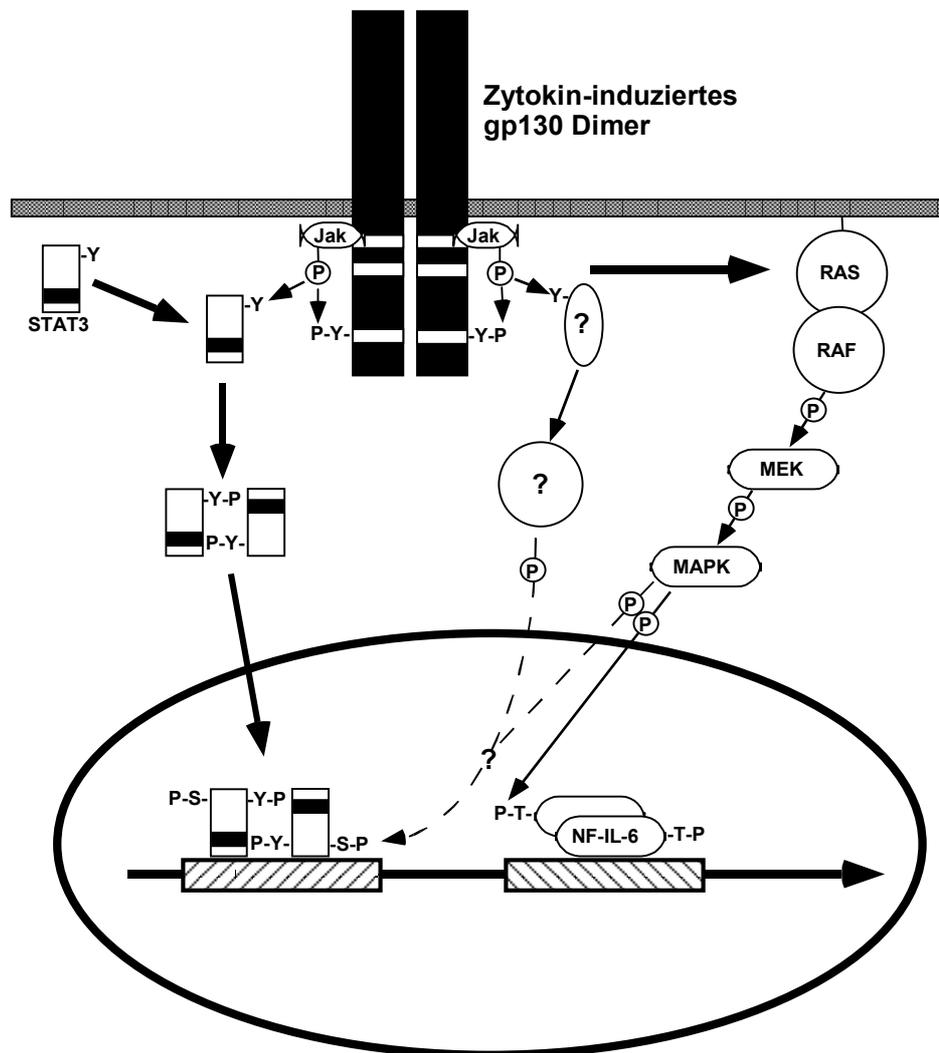


Abb. 5: Die Signaltransduktionskaskade nach gp130 Stimulation

Die Dimerisierung von gp130 führt zur Aktivierung von JAK-Kinasen und zur Aktivierung der RAS/RAF/MAPK-Kaskade. Die „?“ symbolisieren bisher unbekannte oder vermutete Komponenten. Phosphorylierte und dimerisierte STAT-Faktoren und NF-IL-6 aktivieren Zielgene im Zellkern.

Der IL-6R und gp130 werden der hämatopoetischen Rezeptorfamilie zugeordnet (Bazan 1990a; Bazan 1990c). Weitere Mitglieder dieser Familie sind u. a. die Rezeptoren von Prolaktin, Erythropoietin, Wachstumshormon, CNTF und LIF. Bei den Mitgliedern dieser Familie handelt es sich um Typ-I-Membranproteine mit extrazellulärem NH₂-Terminus. Sie setzen sich aus Fibronectin-Typ-III (FNIII)- und Immunglobulin-(Ig)-ähnlichen Domänen

zusammen. Der Aufbau dieser Rezeptoren ist am Beispiel von gp130 und IL-6R in Abb. 6 schematisch dargestellt.

Die ligandenbindenden Module der Rezeptoren setzen sich aus zwei FNIII-Domänen zusammen und zeichnen sich durch konservierte Cysteine in der einen, und ein Tryptophan-Serin-X-Tryptophan-Serin Sequenzmotiv in der anderen FNIII-Domäne aus. Jede der Domänen umfaßt ca. 100 Aminosäuren und zeigt eine Tertiärstruktur mit sieben β -Faltblättern. Weitere Übereinstimmungen finden sich in den intrazellulären Domänen der signaltransduzierenden Untereinheiten. Drei konservierte Sequenzmotive, die als Box 1-3 bezeichnet werden, dienen als Bindungsstellen für Janus-Tyrosinkinasen und STAT-Faktoren.

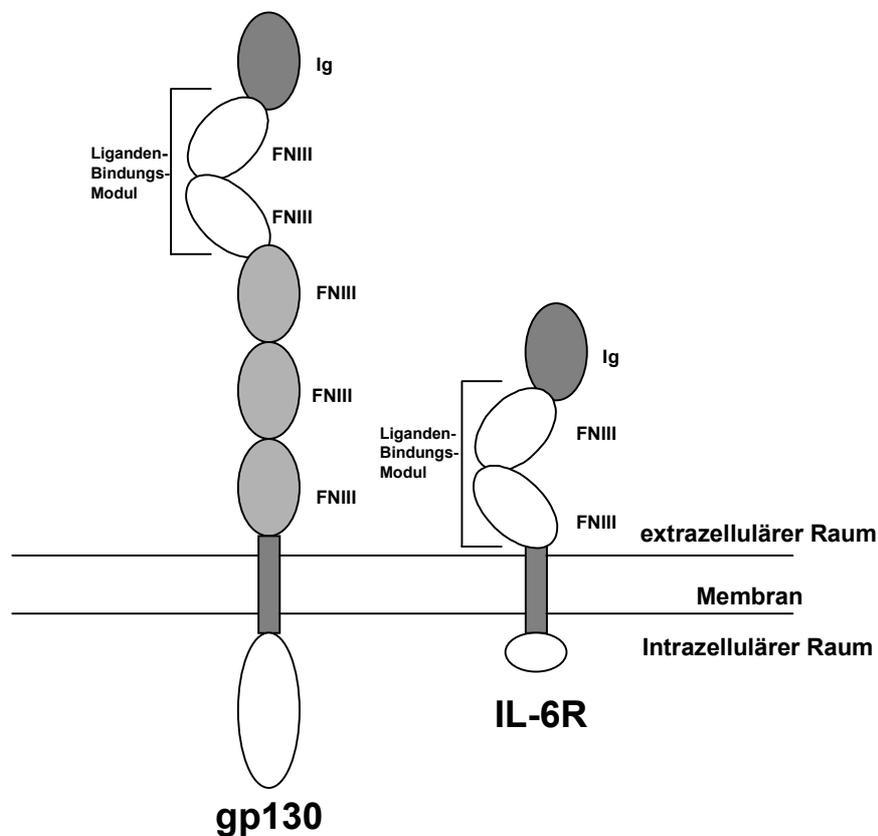


Abb. 6: Schematische Struktur von IL-6R und gp130

FNIII: Fibronectin-ähnliche Domäne; Ig: Immunglobulin-ähnliche Domäne.

Alle Zytokine der IL-6-Familie aktivieren Zielzellen unter Beteiligung von gp130 (Bazan 1990a; Bazan 1990c). IL-6 und IL-11 verwenden beide ein gp130-Homodimer zur Signaltransduktion. Alle anderen Familienmitglieder (CNTF, CT-1, NNT-1, LIF und OSM) verwenden ein Heterodimer aus gp130 und dem strukturell verwandten LIFR (Gearing et al. 1991). OSM kann alternativ auch ein Heterodimer aus gp130 und OSMR bilden (Mosley et

al. 1996). LIF und OSM interagieren direkt mit den signaltransduzierenden Untereinheiten, während CNTF, NNT-1, IL-11, IL-6 und vermutlich auch CT-1 (Pennica et al. 1995b) einen spezifischen Rezeptor zur Interaktion mit gp130 und/oder LIFR benötigen. Interessanterweise verwenden sowohl CNTF, als auch das kürzlich identifizierte NNT-1 den CNTFR als α -Untereinheit des Rezeptor-Komplexes (Abb. 7) (Elson et al. 2000).

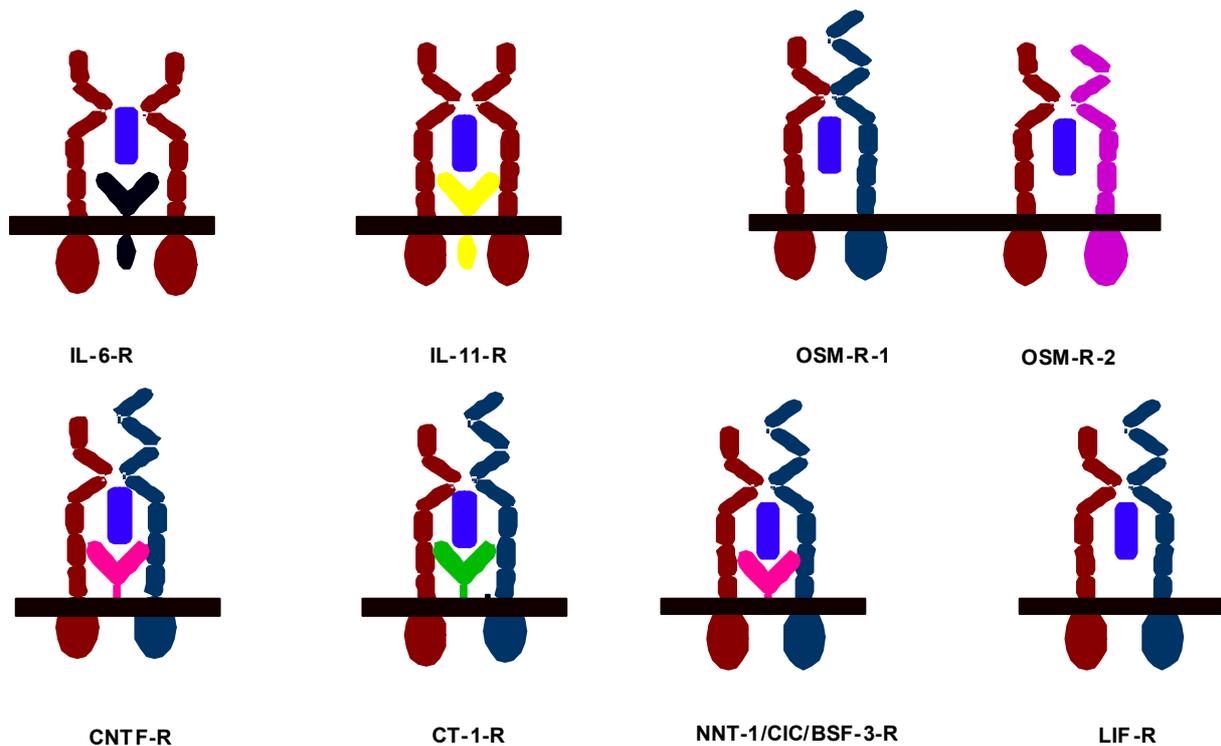


Abb. 7: Die Rezeptor-Komplexe der IL-6 Familie

Bei allen Familienmitgliedern ist gp130 an der Signaltransduktion beteiligt, entweder als Homodimer oder als Heterodimer mit LIFR bzw. OSMR.

4. Löslicher IL-6R (sIL-6R) und lösliches gp130 (sgp130)

Neben der membrangebundenen Form des IL-6R gibt es auch lösliche Formen. Diese können entweder durch Transkription einer alternativ gespleißten mRNA oder durch proteolytische Abspaltung der extrazellulären Domäne („Shedding“) gebildet werden (Lust et al. 1992; Müllberg et al. 1992; Müllberg et al. 1993b; Horiuchi et al. 1994; Rose-John et al. 1994). Löslicher IL-6R (sIL-6R) liegt in humanem Plasma in einer Konzentration von 30-70 ng/ml vor (Honda et al. 1992; Müller-Newen et al. 1996).

Der aus differentiellem Spleißen hervorgegangene sIL-6R unterscheidet sich am COOH-Terminus in 14 Aminosäuren vom membranständigen Rezeptor und enthält keine

Transmembrandomäne (Lust et al. 1992; Lust et al. 1995). Man findet diese Spleiß-Variante des IL-6R im Serum von Menschen (Müller-Newen et al. 1996), ihre Bedeutung und Regulation ist noch unklar.

Die limitierte Proteolyse beim „Shedding“ des IL-6R erfolgt durch eine bislang unbekannte membranständige Metalloprotease, die durch Phorbolester wie PMA stimulierbar, und Hydroxamate hemmbar ist (Müllberg et al. 1992; Müllberg et al. 1993a; Müllberg et al. 1993b; Müllberg et al. 1995). Die „Shedding-Protease“ steht unter der Kontrolle von Protein-Kinase-C und spaltet den Rezeptor nahe der Transmembrandomäne (Müllberg et al. 1994). Porenbildende bakterielle Toxine können das „Shedding“ des IL-6R induzieren (Walev et al. 1996) und von Bakterien sezernierte Metalloproteasen können membranständigen IL-6R in eine lösliche Form überführen (Vollmer et al. 1996).

Der sIL-6R bindet IL-6 mit der gleichen Affinität wie die membransändige Form (Stoyan et al. 1993; Rose-John and Heinrich 1994). Der Komplex aus IL-6 und sIL-6R kann die Homodimerisierung von gp130 auf Zellen genauso induzieren, wie ein Komplex aus IL-6 mit membrangebundenem IL-6R (Taga et al. 1989; Honda et al. 1992). Somit wirkt der sIL-6R agonistisch und ermöglicht die Stimulation von Zellen, die zwar gp130, jedoch keinen IL-6R auf der Oberfläche exprimieren. Solche Zellen können in Abwesenheit von sIL-6R nicht auf IL-6 reagieren (Mackiewicz et al. 1992). Dieses Szenario, bei dem eine Zelle durch Freisetzung eines löslichen Rezeptors eine andere Zelle, die den Rezeptor nicht exprimiert, responsiv für den Liganden macht, wurde „Transsignaling“ genannt (Abb. 8) (Rose-John and Heinrich 1994). Während gp130 auf allen Körperzellen zu finden ist, wird der IL-6R hauptsächlich von Hepatozyten und Monozyten exprimiert. Der sIL-6R erweitert somit das Spektrum an Zielzellen für IL-6 beträchtlich. Inzwischen sind auch lösliche agonistische Rezeptoren für IL-11 und CNTF bekannt (Taga and Kishimoto 1997), die meisten anderen löslichen Zytokinrezeptoren wirken jedoch antagonistisch und bilden biologisch inaktive Komplexe mit dem Zytokin (Rose-John and Heinrich 1994).

Inzwischen sind zahlreiche zelluläre Aktivitäten von IL-6 bekannt, die von der Anwesenheit des sIL-6R abhängig sind. Versuche mit humanen Nabelschnur-Endothelzellen haben gezeigt, daß eine Behandlung mit IL-6 und sIL-6R die Produktion von Chemokinen induziert, nicht aber eine Behandlung mit IL-6 ohne sIL-6R (Romano et al. 1997). Das Auswachsen von Neuriten bei neuronalen Zellen (PC-12) und das Überleben primärer Neuronen wird durch IL-6 und sIL-6R gefördert, nicht jedoch durch IL-6 alleine (März et al. 1998; März et al. 1999). Darüber hinaus spielt der Komplex aus IL-6 und sIL-6R eine Rolle bei der Osteoklasten-Bildung (Tamura et al. 1993) und der Aktivierung von glatten Muskelzellen

(Klouche et al. 1999). In Anwesenheit von sIL-6R inhibiert IL-6 die Proliferation von fibroblastischen Synovialzellen, die von Patienten mit rheumatoider Arthritis stammen (Norihiro et al. 2000). Bei frühen hämatopoetischen Stammzellen führt die Kombination von IL-6 und sIL-6R zu einer deutlich stärkeren *in vitro* Expansion als IL-6 alleine und wirkt in Kombination mit IL-3 vermutlich hemmend auf die Differenzierung der Stammzellen (Sui et al. 1995; Fischer et al. 1997; Zandstra et al. 1997; Audet et al. 2001). Bei transgenen Mäusen, die IL-6 und sIL-6R in der Leber überexprimieren, kommt es zu einer massiven extramedullären Hämatopoese in Leber und Milz der adulten Tiere, wobei ein hoher Anteil der gebildeten Zellen hämatopoetische Stammzellen sind. Bei Tieren, die nur IL-6 oder sIL-6R in der Leber überexprimieren, bleibt dieser Effekt aus (Peters, 1996; Peters, 1997a; Peters, 1997b).

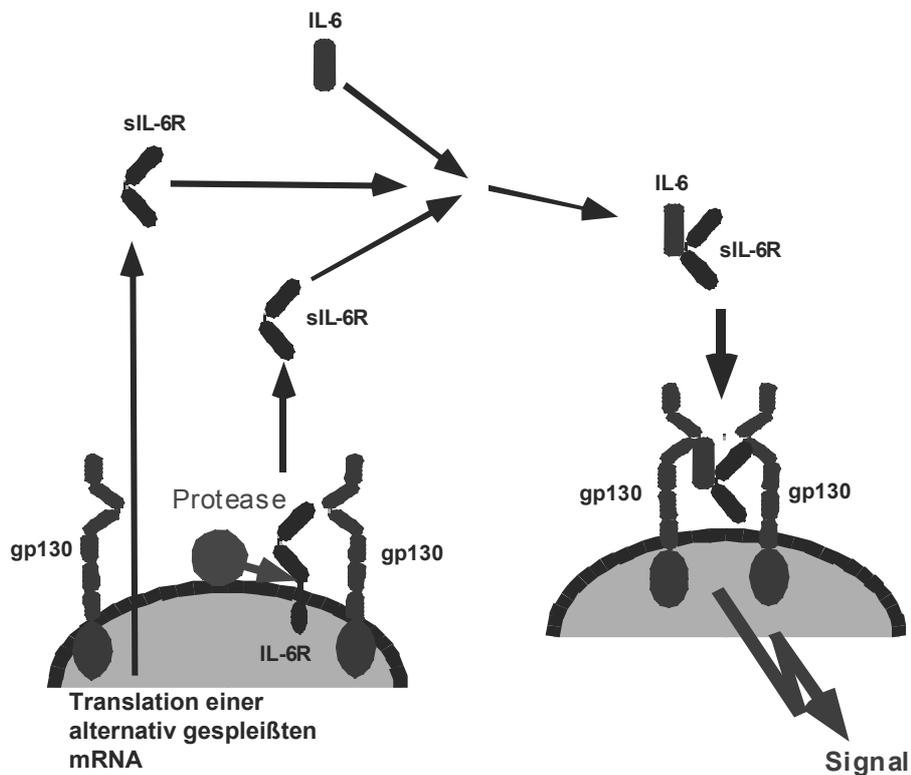


Abb. 8: „Transsignaling“ durch den löslichen IL-6R

Eine IL-6R exprimierende Zelle setzt löslichen IL-6R frei. Der lösliche IL-6R bindet IL-6 und induziert die Homodimerisierung von gp130 auf einer Zielzelle, die selbst keinen IL-6R exprimiert.

Für die Expansion von hämatopoetischen Stammzellen werden hohe Konzentrationen von IL-6 und sIL-6R benötigt (Sui et al. 1995). Ein kürzlich generiertes Fusionsprotein aus IL-6 und sIL-6R, das „Hyper-IL-6“ (H-IL-6) genannt wurde, zeigt bei der *ex vivo* Expansion von

hämatopoetischen Vorläuferzellen eine 100fach höhere Aktivität als IL-6 in Kombination mit sIL-6R (Chebath et al. 1997; Fischer et al. 1997). „Hyper-IL-6“ besteht aus IL-6 und dem Zytokinbindungs-Modul des IL-6R, die kovalent durch einen flexiblen 13 Aminosäuren langen Linker verbunden sind (Abb. 9). Die sehr viel höhere Aktivität des Fusionsproteins kommt vermutlich dadurch zustande, daß die Interaktion von IL-6 mit IL-6R vor allem durch die Dissoziationsrate bestimmt wird (Wells et al. 1993), so daß die durchschnittliche Halbwertszeit des IL-6/sIL-6R-Komplexes kürzer ist als die Zeit, die zum Aufbau des signaltransduzierenden IL-6/sIL-6R/gp130-Komplexes nötig ist.

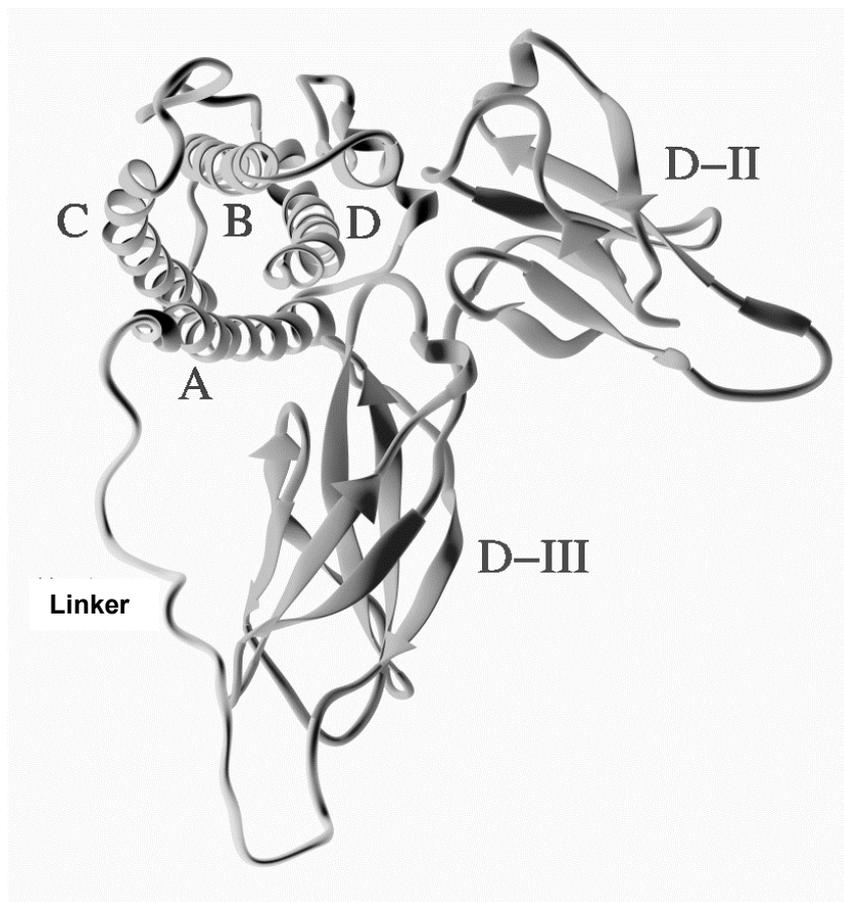


Abb. 9: Dreidimensionales Modell von „Hyper-IL-6“ (H-IL-6)

H-IL-6 ist ein Fusionsprotein aus IL-6 und sIL-6R, die durch einen flexiblen Linker verbunden sind. A, B, C, D: Antiparallele α -Helices von IL-6; D-I, D-II: Fibronectin-ähnliche Domänen des Zytokinbindungs-Moduls des IL-6R.

Auch die signaltransduzierende Rezeptoruntereinheit gp130 existiert in löslicher Form (sgp130) und liegt mit ca. 300 ng/ml in humanem Plasma in relativ hoher Konzentration vor (Narazaki et al. 1993; Müller-Newen et al. 1998). Vermutlich wird sgp130 durch Translation

alternativ gespleißter mRNAs gebildet (Diamant et al. 1997). Zwei Varianten mit 110 und 90 kDa Molekulargewicht wurden identifiziert (Narazaki et al. 1993; Zhang et al. 1998), die aus der extrazellulären Region von gp130 ohne Transmembran- und zytoplasmatische Domäne bestehen. Es konnte gezeigt werden, daß sgp130 mit IL-6 und sIL-6R lösliche Komplexe bilden kann und neutralisierend wirkt (Narazaki et al. 1993; Müller-Newen et al. 1998).

In Patienten mit rheumatoider Arthritis wurde kürzlich eine weitere Variante von sgp130 identifiziert, die 50 kDa groß ist und in der Synovialflüssigkeit und im Plasma vorliegt. Es handelt sich ebenfalls um eine Spleißvariante, die gp130-RAPS genannt wurde und aus der Ig-ähnlichen Domäne sowie den zwei Fibronectin-ähnlichen Domänen des Zytokinbinungs-Moduls von gp130 besteht (Tanaka et al. 2000).

Die löslichen Komponenten des IL-6-Rezeptor-Komplexes sind in verschiedenen Krankheiten disreguliert. Erhöhte sIL-6R-Spiegel findet man u. a. bei juveniler chronischer Arthritis (Keul et al. 1998), systemischer Sklerose (Hasegawa et al. 1999) und multipler Sklerose (Padberg et al. 1999), die sgp130 Plasmakonzentration ist bei systemischer Sklerose (Hasegawa et al. 1999), multipler Sklerose (Padberg et al. 1999), Melanom-Patienten (Montero-Julian et al. 1997) und Fibromyalgie (Maes et al. 1999) erhöht.

5. Karposi Sarkom assoziiertes Herpesvirus (KSHV) und virales Interleukin-6 (vIL-6)

Das Karposi Sarkom ist eine multifokale proliferative Läsion, die vor allem bei AIDS-Patienten auftritt. Etwa 10 – 15 % aller AIDS-Patienten entwickeln solche Tumoren, was zu der Vermutung führte, daß in diesen Fällen ein infektiöses Agens für die Ausbildung eines Karposi Sarkoms verantwortlich ist (Neipel et al. 1997a). Die ursprüngliche Form des Sarkoms (klassisches KS) tritt vor allem in Südosteuropa und Zentralafrika auf, wobei vorrangig jüngere Menschen betroffen sind.

Als mögliche Verursacher der Karposi Sarkome wurden u. a. das Hepatitis-B-Virus, das humane Cytomegalovirus (CMV) und das humane Herpesvirus-Typ-6 angenommen. Jedoch konnte bei keinem der Erreger der Verdacht bestätigt werden. Schließlich gelang es in KS-Geweben von AIDS-Patienten ein bislang unbekanntes Virus nachzuweisen (Chang et al. 1994). Es handelte sich um ein neues Mitglied der γ -2-Herpesviren (Rhadinoviren) und wurde Karposi Sarkom assoziiertes Herpesvirus (KSHV) bzw. humanes Herpesvirus-Typ-8 (HHV8)

genannt. Inzwischen wurde gezeigt, daß KSHV in über 90 % aller Karposi Sarkom Läsionen präsent ist (Chang et al. 1994; Staskus et al. 1999).

Darüber hinaus wurde KSHV auch in Patienten mit Castleman'scher Krankheit und pleuralen Effusions-Lymphomen gefunden (Cesarman et al. 1995; Soulier et al. 1995; Nador et al. 1996; Staskus et al. 1997; Staskus et al. 1999). Bei Castleman'scher Krankheit handelt es sich um eine seltene B-Zell-lymphoproliferative Störung, die auch mit einem erhöhten Risiko der Ausbildung eines Karposi Sarkoms einhergeht. Allerdings konnte bisher weder bei Castleman'scher Krankheit, noch bei pleuralen Effusions-Lymphomen eine pathogene Rolle von KSHV nachgewiesen werden. Interessanterweise wurde gezeigt, daß dentritische Zellen aus dem Knochenmark von Patienten mit multiplen Myelomen mit KSHV infiziert sind (Rettig et al. 1997). Seither gibt es eine kontroverse Debatte über die Assoziation von KSHV mit multiplen Myelomen (Berenson et al. 1999; Tarte et al. 1999).

Das Genom von KSHV ist 165 Kb groß und enthält 81 offene Leserahmen (ORF). Einige der ORFs zeigen Homologien zu bekannten zellulären humanen Genen. Dazu zählt neben antiapoptotischen Faktoren (Bcl-2), Regulatoren des Zellzyklus (Cyclin-D), Chemokinen (MIP-II) und neben anderen Zytokinen (IL-1 β , OSM) auch IL-6 (Moore et al. 1996; Neipel et al. 1997a; Neipel et al. 1997b). Die von KSHV kodierte virale Form von IL-6 (vIL-6) zeigt in der Aminosäuresequenz eine 25%ige Übereinstimmung mit humanem IL-6. Virales IL-6 ist also keineswegs identisch mit humanem IL-6, zeigt aber deutliche Homologien zu den humanen Zytokinen der IL-6-Familie, wobei die größte Ähnlichkeit zu IL-6 selbst besteht.

Zelllinien, die von Karposi Sarkomen stammen, produzieren deutlich mehr humanes IL-6 als gesunde Zellen des gleichen Gewebes (Chang et al. 1996). Darüber hinaus führt eine Stimulation von KS-Spindelzellen mit rekombinantem humanem IL-6 zu einem Anstieg der Proliferation (Miles et al. 1990). Es lag also nahe anzunehmen, daß vIL-6 eine dem humanem IL-6 analoge Aktivität besitzt und die Vermehrung der KSHV-Wirtszellen in Karposi Sarkomen stimuliert.

Mittlerweile wurden verschiedene biologische Aktivitäten von vIL-6 beschrieben, die mit denen des humanen IL-6 übereinstimmen. Virales IL-6 stimuliert, wie humanes IL-6 auch, die Proliferation von murinen Hybridomzellen (B9) und humanen Myelomzellen (INA) (Moore et al. 1996; Molden et al. 1997; Burger et al. 1998). Kürzlich wurde gezeigt, daß mit vIL-6 transfizierte NIH3T3-Zellen, nach Injektion in Mäuse, Angiogenese und Hämatopoese induzieren. Daraus wurde gefolgert, daß vIL-6 eine wichtige Rolle bei der Pathogenese von KSHV-assoziierten Krankheiten spielt.

Die nur 25%ige Sequenzidentität von vIL-6 mit humanem IL-6 und eine 4000fach niedrigere Aktivität bei der Stimulation von Myelomzellen als humanes IL-6 warfen die Frage auf, ob vIL-6 die gleichen Rezeptorkomponenten wie humanes IL-6 verwendet. In humanen Hepatomzellen (HepG2) führt eine Stimulation mit vIL-6 zur Phosphorylierung der Janus-Tyrosinkinase Jak1, die auch bei der Aktivierung von gp130 durch IL-6 phosphoryliert wird. Dieser Befund, und der inhibitorische Effekt von neutralisierenden gp130-Antikörpern auf die Aktivität von vIL-6, spricht für eine Beteiligung von gp130 an der Signaltransduktion von vIL-6 (Molden et al. 1997).

Die Frage, ob der IL-6R an der Signalauslösung auf Zielzellen von vIL-6 beteiligt ist, wird kontrovers diskutiert. An zwei von vier Positionen, die für die Interaktion von IL-6 mit IL-6R entscheidend sind, gibt es in vIL-6 Aminosäure-Austausche (Phe 74 Gly; Arg 182 Asp) (Neipel et al. 1997a). Bei humanem IL-6 führen Aminosäure-Austausche an diesen Positionen zu einer starken Verminderung der Affinität zu IL-6R (Ehlers et al. 1995; Grötzinger et al. 1997). Die vIL-6 responsiven Myelom- und Hybridomzellen exprimieren sowohl gp130, als auch IL-6R. Molden et al (Molden et al. 1997) konnten zeigen, daß die Stimulation von HepG2 Zellen mit vIL-6 nicht durch neutralisierende IL-6R-Antikörper beeinträchtigt wird, und daß vIL-6 in Zellen, die nur gp130 und keinen IL-6R exprimieren, die Phosphorylierung von STAT3 induziert, was für eine IL-6R-unabhängige Signaltransduktion spricht. Burger et al. berichten dagegen, daß die Aktivität von vIL-6 durch einen IL-6R-Antagonisten (Sant7) inhibiert wird, was wiederum für eine Beteiligung des IL-6R am Rezeptor-Komplex von vIL-6 spricht. Bisher konnte weder für IL-6R, noch für gp130 eine direkte physische Interaktion mit vIL-6 gezeigt werden.

6. Zielsetzung der Arbeit

Lösliches gp130 (sgp130) liegt in hoher Konzentration in humanem Plasma vor und kann ternäre Komplexe mit IL-6 und löslichem IL-6R (sIL-6R) bilden. Es ist unklar, welche Rolle sgp130 bei der Regulation von IL-6-Antworten oder von Aktivitäten anderer Zytokine der IL-6-Familie spielt.

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit sollten rekombinante Versionen von sgp130 konstruiert, exprimiert und aufgereinigt werden, um Effekte von sgp130 auf IL-6 und sIL-6R, sowie weitere Zytokine der IL-6-Familie zu untersuchen.

Der zweite Teil der Arbeit beschäftigt sich mit dem vom Karposi Sarkom assoziierten Herpesvirus (KSHV) kodierten viralen IL-6 (vIL-6), welches homolog zu humanem IL-6 ist und analoge biologische Aktivitäten zeigt. Es konnte vorher gezeigt werden, daß gp130 für die Signaltransduktion von vIL-6 benötigt wird, während nach wie vor unklar ist, ob IL-6R an der Signaltransduktion beteiligt ist.

Mit Hilfe von rekombinantem vIL-6 und sgp130 und geeigneten Zellkultursystemen sollte geklärt werden, ob vIL-6 direkt mit gp130 oder IL-6R interagiert, und ob der IL-6R für die biologische Aktivität von vIL-6 essentiell ist.

II. Material und Methoden

1. Material

1.1 Chemikalien

Es wurden, soweit erhältlich, ausschließlich Chemikalien des Reinheitsgrades *pro analysi* der Firmen Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Sigma (Deisenhofen) und Aldrich (Steinheim) verwendet.

1.2 Enzyme

Restriktionsendonukleasen wurden von Hybaid (Heidelberg), Biolabs (Schwalbach) oder Roche (Mannheim) bezogen. Alkalische Phosphatase, T4-DNA-Polymerase und Polynukleotidkinase stammen von Roche (Mannheim). Taq-DNA-Polymerase wurde von Peqlab (Erlangen) bezogen.

1.3 Antikörper

Der polyklonale Antikörper gegen humanes Antichymotrypsin aus Kaninchen stammte von Dako (Hamburg). Der neutralisierende monoklonale Antikörper gegen humanen IL-6R wurde freundlicherweise von M.F. Neurath zur Verfügung gestellt (Atreya et al. 2000). Das polyklonale Antiserum gegen virales IL-6 aus Kaninchen wurde von S. Hoischen bereitgestellt (Hoischen et al. 2000). Der neutralisierende gp130-Antikörper (GPX7), war ein Geschenk von Dr. Yasukawa (Tosoh, Tokyo, Japan) (Müllberg et al. 2000). Der Phospho-STAT3-Antikörper (y705) stammte von Biolabs (Schwalbach).

1.4 Radiochemikalien

Tran-³⁵S-Label (44 TBq/mmol) wurde von ICN (Meckenheim), [6-³H]thymidine (74 GBq/mmol) von Amersham International (Aylesbury, UK) bezogen.

1.5 Zytokine

IL-6 und „Hyper-IL-6“ (H-IL-6) wurden von M. Fischer exprimiert und aufgereinigt wie beschrieben (Arcone et al. 1991; Fischer et al. 1997). „Hyper-IL-6“ ist ein Fusionsprotein aus IL-6 und dem zytokinbindenden Modul des löslichen IL-6R, die über einen flexiblen Peptidlinker verbunden sind (Fischer et al. 1997). Humanes LIF wurde von B. Oppmann in *E. coli* exprimiert, humanes CNTF von P. März, ebenfalls in *E. coli*. Humanes OSM wurde von R&D-Systems (Wiesbaden) bezogen. Humaner löslicher IL-6R wurde von S. Özbek in *E. coli* exprimiert, wie beschrieben (Mackiewicz et al. 1992). Virales IL-6 (vIL-6_{his}) wurde von T. Geib konstruiert und von N. Voltz in COS-7-Zellen exprimiert und aufgereinigt wie in (Müllberg et al. 2000) beschrieben. Die vIL-6-DNA stammte von F. Neipel und B. Fleckenstein (Universität Erlangen).

1.6 Fc-Fusionsproteine

Fc-Fusionsproteine werden durch die Fusion des konstanten Teils einer schweren IgG-Kette an ein anderes Protein generiert. Die hier verwendete für den humanen IgG-1-Fc-Teil kodierende cDNA („Mutein“, Fanslow et al. 1992) enthält Mutationen in den Bindungsstellen für Komplementkomponenten und Fc-Rezeptoren und stammt von der Immunex Corporation (Seattle, USA).

IL-6Fc und H-IL-6Fc wurden im Rahmen meiner Diplomarbeit konstruiert und produziert wie beschrieben (Jostock et al. 1999).

sIL-6RFc und R27080Fc wurden von J. Müllberg konstruiert und produziert wie beschrieben (Müllberg et al. 1999; Müllberg et al. 2000). R27080 ist ein vom humanen Cytomegalovirus kodiertes Glykoprotein, dessen Funktion noch unbekannt ist (Müllberg et al. 1999).

1.7 Zelllinien

Die SV40-transformierte Affennierenzelllinie COS-7 (ECACC-Nr. 87021302) und die humane Hepatomzelllinie HepG2 (ATCC HB 8058) wurden von der „American Type Culture Collection“ bezogen. Die stabil mit IL-6 transfizierten HepG2-Zellen (HepG2/IL-6) sind in (Mackiewicz et al. 1992) beschrieben. Die murine Prä-B-Zelllinie BAF/3, stabil transfiziert mit gp130 (BAF/gp130), mit gp130 und IL-6R (BAF/gp130/IL-6R) und mit gp130, LIFR und

CNTFR (BAF/gp130/LIFR/CNTFR) wurde vorher beschrieben (Fischer et al. 1997; Kallen et al. 1999; Vollmer et al. 1999).

2. Methoden

2.1 Standardmethoden zur Modifikation und Klonierung rekombinanter DNA

Techniken, wie die Herstellung und Transformation kompetenter Bakterien, Restriktionsendonuklease-Behandlung von Plasmiden, Kinasierung und Ligation von DNA-Fragmenten und die Gewinnung von Plasmid-DNA wurden nach Standardmethoden (Sambrook et al. 1989) durchgeführt. Größere Mengen Plasmid-DNA wurden unter Verwendung des „QIAGEN-Maxi-Kits“ (QIAGEN, Hilden) extrahiert. DNA-Fragmente wurden nach Agarosegelelektrophorese unter Verwendung des „QIAEX-Kits“ (QIAGEN, Hilden) aufgereinigt.

2.2 Konstruktion von humanem sgp130Fc

Zur Generierung des humanen sgp130Fc-Fusionsproteins wurde die für die extrazelluläre Domäne von humanem gp130 kodierende cDNA (Hibi et al. 1990) unter Verwendung eines synthetischen Oligonukleotid-Adapters an die konstante Region einer humanen schweren IgG1-Kette (Fanslow et al. 1992) fusioniert. Dazu wurden aus der humanen gp130-cDNA die für Transmembrandomäne (TM) und zytoplasmatischen Teil kodierenden Sequenzen, unter Verwendung der Restriktionsenzyme EcoRI und BamHI ausgeschnitten und durch einen synthetischen Oligonukleotid-Adapter mit entsprechenden kohäsiven Enden ersetzt. Der aus zwei kinasierten und hybridisierten Oligonukleotiden bestehende Adapter enthält eine BglII und eine NotI Schnittstelle, so daß die für die konstante Region einer schweren IgG-Kette kodierende cDNA als BglII/NotI-Fragment unter Berücksichtigung des Leserahmens in den Adapter inkloniert werden konnte (Abb. 10). Als Expressionsvektor für Säugerzellen wurde pDC409 (Giri et al. 1994) gewählt.

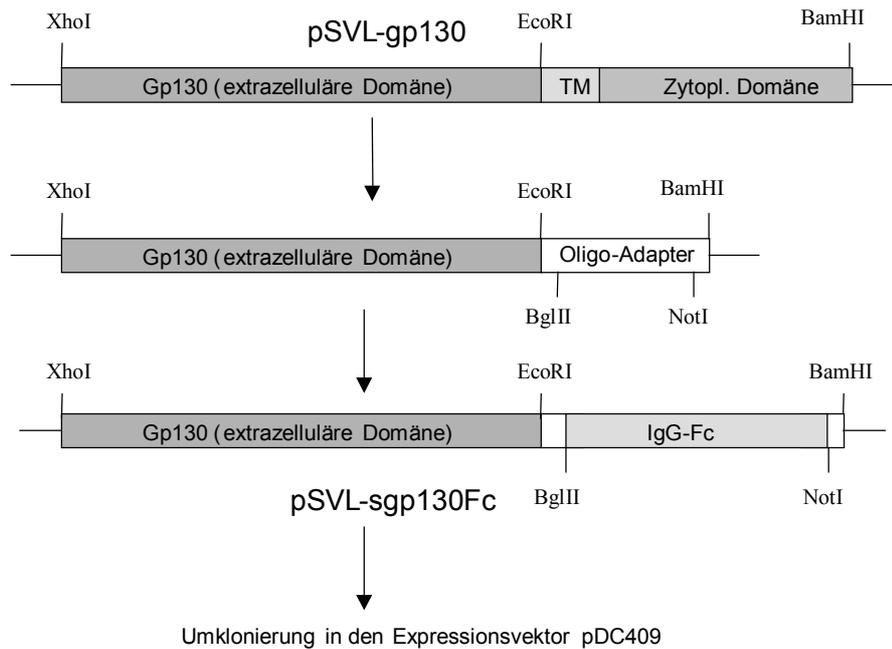


Abb. 10: Klonierung von sgp130Fc

Aus der humanen gp130 cDNA im Plasmid pSVL (Amersham/Pharmacia, Freiburg) wurden Transmembrandomäne (TM) und zytoplasmatische Domäne ausgeschnitten und durch einen synthetischen Oligonukleotid-Adapter ersetzt. In diesen wurde die für den Fc-Teil codierende cDNA einkloniert.

2.3 Konstruktion von murinem sgp130Fc

Zunächst wurde der Fc-Teil als BglII/NotI-Fragment in BamHI/NotI verdauten pSK-Blueskript-Vektor (Stratagene, Heidelberg) kloniert, wobei die von BamHI und BglII generierten kohäsive Enden kompatibel sind. Die Anwesenheit einer SallI- und einer EcoRI-Schnittstelle in der multiplen Klonierungsregion von pSK-Bluescript ermöglichte es dann, die für die extrazelluläre Domäne von murinem gp130 kodierende cDNA als SallI/EcoRI-Fragment unter Berücksichtigung des Leserahmens an den Fc-Teil zu fusionieren. Anschließend wurde das komplette Konstrukt als SallI/NotI-Fragment in den Expressionsvektor pDC409 überführt (Abb. 11).

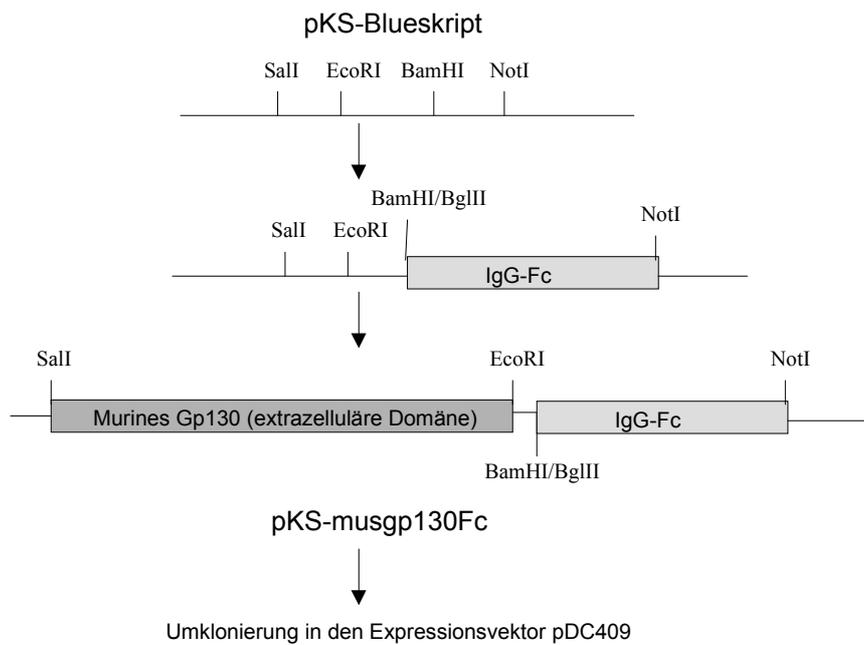


Abb. 11: Klonierung von murinem sgp130Fc

Der Fc-Anteil wurde als BglII/NotI-Fragment in pKS-Blueskript kloniert. Anschließend wurde die gp130-Ektodomäne als SalI/EcoRI-Fragment einkloniert und das gesamte Konstrukt als SalI/NotI-Fragment in pDC409 umkloniert.

2.4 Konstruktion von humanem sgp130his

Um ein sgp130 Konstrukt mit „Hexahistidin-Tag“ zu erhalten, wurde die Fc-Region aus der humanen sgp130Fc cDNA mit BglII und NotI ausgeschnitten und durch einen Oligonukleotid-Adapter mit entsprechenden kohäsiven Enden ersetzt. Der Oligoadapter aus hybridisierten und kinasierten synthetischen Oligonukleotiden enthält die Sequenz für sechs aufeinanderfolgende Histidine gefolgt von einem Stop-Codon (Abb. 12).

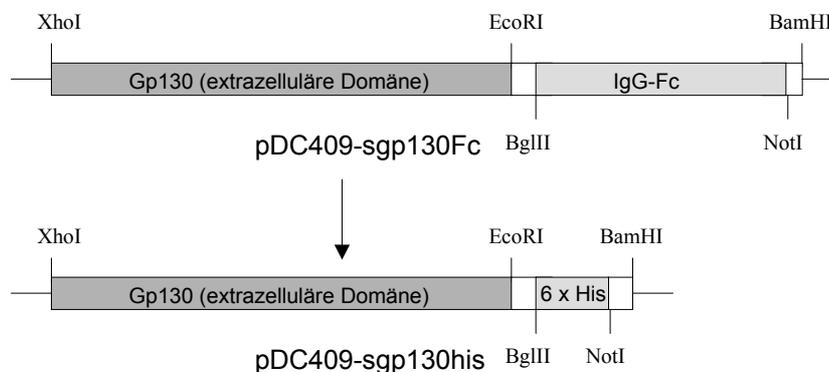


Abb. 12: Klonierung von humanem sgp130his

Der Fc-Teil im humanem sgp130Fc wurde durch einen Oligonukleotid-Adapter ersetzt, der für sechs Histidine kodiert.

2.5 Zellkultur

COS-7-, HepG2- und HepG2/IL-6-Zellen wurden in DMEM mit Glutamax (Gibco, Eggenstein), supplementiert mit 50 U/ml Penicilin, 50 µg/ml Streptomycin (beides Gibco) und 10% FCS (Seromed, Berlin), in wassergesättigter Atmosphäre bei 5% CO₂ kultiviert. Den Kulturmedien für BAF/gp130 Zellen wurden außerdem 5 ng/ml H-IL-6 (Fischer et al. 1997), für BAF/gp130/IL-6R 5 ng/ml IL-6 und für BAF/gp130/LIFR/CNTFR 5 ng/ml CNTF zugesetzt.

2.6 Transiente Transfektion von COS-7-Zellen

Transiente Transfektionen wurden nach der DEAE-Dextran-Methode (McMahan et al. 1991) durchgeführt. COS-7-Zellen wurden einen Tag vor der Transfektion passagiert. Die subkonfluenten Zellen wurden auf 58 cm² Zellkulturschalen mit 5 µg Plasmid-DNA in chloroquinhaltigem Medium (75 µM, Sigma, Deisenhofen) mit DEAE-Dextran (0.3 mg/ml, Sigma) 4-6 Stunden inkubiert. Nach einer 7-minütigen Inkubation der Zellen mit DMSO-haltigem Medium (10%, Sigma) wurden die Zellen in DMEM mit FCS kultiviert.

Eine metabolische Markierung transfizierter Zellen erfolgte 48 Stunden nach der Transfektion.

Zur Produktion von gp130-Proteinen wurden die Zellen 24 Stunden nach der Transfektion in DMEM mit 0.5% FCS kultiviert und an Tag 3 und 6 nach Transfektion wurden die Zellüberstände geerntet.

2.7 Aufreinigung der gp130-Proteine aus COS-7-Zellüberständen

Fc-Fusions-Proteine von humanem und murinem gp130 aus 0.5 – 1 l Kulturmedium transient transfizierter COS-7-Zellen wurde an eine 1 ml Protein-A-Sepharose-Säule (Amersham, Uppsala, Schweden) gebunden. Die Säule wurde exzessiv mit PBS gewaschen. Die Fusions-Proteine wurden in 1 ml Fraktionen mit 12.5 mM Zitronensäure eluiert und sofort durch Zugabe von 100 µl 0.5 M HEPES (pH 9) neutralisiert. Sgp130his aus Überständen transfizierter COS-7-Zellen wurde an eine Nickel-Chelat-Säule (Amersham) gebunden und mit 100 mM Imidazol in 1 ml großen Fraktionen eluiert.

Protein enthaltende Fraktionen wurden durch SDS-PAGE (Laemmli 1970) und anschließende Silberfärbung identifiziert, vereinigt und gegen PBS („Phosphate buffered saline“: 140 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 6.5 mM Na₂PO₄, 1.5 mM KH₂PO₄) dialysiert. Die Konzentration der Proteine wurde unter Verwendung eines „BCA-Protein-Assays“ (Pierce, Rockford, IL) ermittelt.

2.8 Metabolische Markierung und Immunpräzipitation

48 Stunden nach der Transfektion wurden COS-7-Zellen für 45 Minuten in Cystein/Methionin-freiem Medium inkubiert und anschließend durch Zugabe von 50 µCi/ml Tran-³⁵S-Label (ICN Biomedicals GmbH, Meckenheim) für 4-8 Stunden bei 37 °C metabolisch markiert.

Sezernierte Proteine wurden mit 1 µg/ml entsprechender Antikörper oder Fc-Fusionsproteine in 1 ml Volumen für mindestens 1 Stunde immunpräzipitiert. Die Immunkomplexe wurden mit Protein-A-Sepharose aus dem Kulturmedium gefällt und mit PBS und Waschpuffer gewaschen. Die Detektion der gefällten Proteine erfolgte durch SDS-PAGE und Fluorographie.

2.9 SDS-PAGE und Fluorographie/Silberfärbung

Die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese zur eindimensionalen Auftrennung von Proteinen wurde nach Laemmli (Laemmli 1970) durchgeführt. Metabolisch markierte Proteine wurden durch Fluorographie nachgewiesen. Dazu wurden die Gele in einer Lösung aus 40% Methanol und 10% Essigsäure für 30 Minuten fixiert und anschließend für 20 Minuten mit der fluorographischen Intensivierungslösung „Amplify“ (Amersham) inkubiert. Nach dem Trocknen wurden die Gele auf einem Röntgenfilm bei -70 °C exponiert. Unmarkierte Proteine wurden durch Silberfärbung nachgewiesen. Dazu wurden die Gele 5 Minuten in 40% Methanol/10% Essigsäure und 5 Minuten in 10% Ethanol/15% Essigsäure fixiert. Nach zweimaligem Waschen erfolgte eine 30-sekündige Inkubation in Reduktionslösung (4 g/l Farmer'scher Abschwächer). Nach erneutem intensiven Waschen erfolgte eine 12-minütige Inkubation in Färbelösung (2 g/l Silbernitrat) bevor die Gele in 29 g/l Natriumcarbonat / 1% Formaldehyd entwickelt wurden. Die Entwicklung wurde mit 7% Essigsäure gestoppt.

2.10 Proliferationstests

BAF/gp130, BAF/gp130/IL-6R und BAF/gp130/IL-6R/LIFR Zellen (5×10^3 Zellen/Well einer 96-Well-Platte) wurden 68 Stunden mit Zytokinen stimuliert und anschließend für 4 Stunden mit ^3H -Thymidin (0.25 mCi/Well) inkubiert. Die Zellen wurden in einem „Micro Cell Harvester“ (SKATRON, Norway) auf Glasfaserfilter (Wallac, Finland) geerntet. Anschließend wurden die Glasfaserfilter in Szintillatorflüssigkeit (Rotiszint, Roth, Karlsruhe) getränkt und die ^3H -Thymidin-Inkorporation in einem „Liquid Szintillation Counter“ (WALLAC, Finland) gemessen.

2.11 Stimulation von HepG2-Zellen

HepG2- und HepG2/IL-6-Zellen wurden am Tag vor der Zytokinstimulation passagiert. Vor der Zytokinstimulation erfolgte eine einstündige Hungerphase in FCS-freiem Medium. Anschließend wurden die Zellen für 18 Stunden mit Zytokinen stimuliert und die Sekretion des Akute-Phase-Proteins Antichymotrypsin durch metabolische Markierung und Immunpräzipitation analysiert.

2.12 Isolation und Stimulation von humanen Lamina propria mononukleären Zellen

Aus entzündetem Darmgewebe von Morbus Crohn Patienten wurde die Lamina propria entfernt, zerkleinert und nach einem 30-minütigen Verdau mit Kollagenase (Sigma), DNase-I (Boehringer Ingelheim) durch ein $40 \mu\text{m}$ poriges Sieb gegeben. Nach Lyse der Erythrozyten in ACK-Lysepuffer wurden die mononukleären Zellen durch Ficoll-Gradienten-Zentrifugation isoliert wie beschrieben (Atreya et al. 2000). Anschließend wurden sie in RPMI-1640 Medium (Gibco) mit 0.05 mM 2-Mercaptoethanol und 10% FCS kultiviert. Die Zellen wurden mit C-Reaktivem Protein (10 $\mu\text{g/ml}$, Sigma) und 4β -Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (50 ng/ml, Sigma) als Stimuli für sIL-6R Freisetzung und Phytohaemagglutinin (10 $\mu\text{g/ml}$, Sigma) als T-Zell-Stimulus in der Anwesenheit oder Abwesenheit von humanem sgp130Fc oder neutralisierendem monoklonalem IL-6R-Antikörper inkubiert. Nach 48 Stunden wurde der Anteil früh-apoptotischer Zellen durch FACS-Analyse unter Verwendung des Annexin-V-FITC-Apoptose-Detektions-Kit-I (Pharmingen, San Diego, CA) bestimmt.

Annexin-V bindet hochaffin an Phosphatidylserin, welches bei apoptotischen Zellen früh von der inneren zur äußeren Plasmamembranschicht transloziert wird, so daß diese Zellen in einer FACS-Analyse Annexin-V-positiv sind. Da Phosphatidylserin aber auch im Verlauf einer Zellnekrose auf der Oberfläche erscheint, wurde eine Doppelfärbung mit Annexin-V-FITC und dem Vitalfarbstoff Propidiumjodid durchgeführt, welcher nekrotische und tote Zellen anfärbt. Bei der anschließenden FACS-Analyse sind frühe Apoptotische Zellen Annexin-V-positiv und Propidiumjodid-negativ, während nekrotische und tote Zellen Annexin-V- und Propidiumjodid-positiv sind.

2.13 Analyse des phosphorylierten STAT3 in Hepatomzellen

HepG2/IL-6-Zellen wurden nahezu bis zur Konfluenz kultiviert und 4 h vor der Stimulation mit Zytokinen in Serum-freiem Medium inkubiert. Nach 15-minütiger Stimulation der wurden die Zellen mit PBS gewaschen und in Laemmli-Puffer lysiert. Die Proteine des Lysats wurden durch 10%ige SDS-PAGE aufgetrennt und durch Elektroblothing auf eine Nitrozellulosemembran überführt. Der Nachweis des phosphorylierten STAT3 erfolgte mit einem Phospho-STAT3-spezifischen Antikörper. Die Detektion wurde mittels eines Peroxidase-konjugierten Zweitantikörpers durchgeführt, indem die Peroxidaseaktivität durch Chemilumineszenz gemessen wurde (ECL Western-Blot-Reagens, Amersham, Upsalla, Schweden).

III. Ergebnisse

1. Untersuchungen zur biologischen Funktion von löslichem gp130

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit wurden Untersuchungen zur Funktion der löslichen Form des Signaltransduktionsproteins gp130 (sgp130) durchgeführt. Die membrangebundene Form von gp130 fungiert als Rezeptorkomponente und Signaltransduktor für die Zytokine der IL-6-Familie (vgl. Einleitung: 3. Der IL-6-Rezeptor-Komplex). Anhand rekombinanter sgp130-Proteine und geeigneter Zellsysteme wurde im folgenden untersucht, welche Rolle sgp130 bei der Regulation von IL-6-Antworten und Antworten weiterer Zytokine der IL-6-Familie spielt.

1.1 Konstruktion der sgp130-Expressionsplasmide

Um Untersuchungen zur Funktion von sgp130 vornehmen zu können, wurden verschiedene rekombinante Versionen von sgp130 generiert. Zum einen wurden Fc-Fusionsproteine von humanem und murinem sgp130 konstruiert (sgp130Fc). Dazu wurde auf cDNA-Ebene die konstante Region einer humanen schweren IgG1-Kette an den COOH-Terminus der extrazellulären Domäne von humanem und murinem gp130 fusioniert. Die resultierenden Fusionsproteine dimerisieren durch den Fc-Anteil und lassen sich an Protein-A-Sepharose aufreinigen, da humanes IgG-Fc mit hoher Affinität an Protein-A bindet (Abb. 13A).

Zum anderen wurde eine Version von sgp130 mit „Hexahistidin-Tag“ am COOH-Terminus generiert (sgp130his). Dazu wurde eine für sechs aufeinanderfolgende Histidine codierende Sequenz an den COOH-Terminus der gp130-Ektodomäne fusioniert, was eine Aufreinigung des Proteins an Ni-Chelatsäulen ermöglichte (Abb. 13B).

Alle Konstrukte wurden in einen Expressionsvektor für Säugerzellen kloniert. Aufgrund des NH₂-terminalen Signalpeptids von gp130 (Transmembranprotein), wurden die rekombinanten sgp130-Proteine von den exprimierenden Zellen nach der Translation sezerniert, da sie durch das Fehlen einer Transmembrandomäne nicht in der Zellmembran verankert werden konnten.

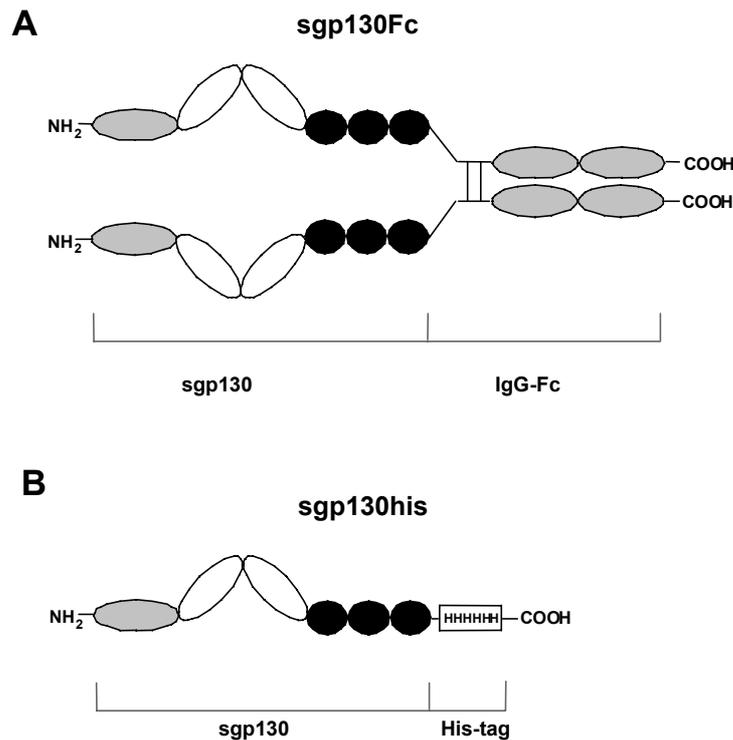


Abb. 13: Rekombinante sgp130-Proteine

Schematische Darstellung eines sgp130Fc-Dimers (A) und von sgp130his (B). Schwarz: FNIII-Domänen; Weiß: Zytokin-Bindungsmodul; Grau: Ig-(ähnliche) Domänen.

1.2 Expression und Aufreinigung der sgp130-Proteine

Die rekombinanten gp130-Proteine wurden transient in COS-7-Zellen exprimiert und aus den Zellüberständen aufgereinigt. Die Transfektionseffizienz wurde regelmäßig überprüft, sie lag in der Regel bei 50-80%.

Die Fc-Fusionsproteine wurden an einer Protein-A-Sepharose-Säule aus den gesammelten Zellüberständen aufgereinigt, gegen PBS dialysiert und durch SDS-PAGE und anschließende Silberfärbung analysiert (Abb. 14A). Die Aufreinigung erfolgte durch Bindung der Fc-Proteine an die Protein-A-Sepharose-Säule und anschließende Elution mit 12.5 mM Zitronensäure. Um Schädigungen der Proteine durch den niedrigen pH-Wert zu vermeiden, wurden die Elutionsfraktionen schnellstmöglich mit 1/10 Volumen 0.5 M HEPES neutralisiert. Sowohl humanes (Abb 14A, Spur 1) als auch murines sgp130Fc (Spur 2) konnten annähernd bis zur Homogenität aufgereinigt werden. Das Molekulargewicht lag jeweils bei ca. 140 kDa für das monomere Protein.

Lösliches sgp130his wurde an eine Ni-Chelatsäule gebunden und anschließend mit Imidazolhaltigem Puffer in Fraktionen von 1 ml eluiert. Aliquots der Elutionsfraktionen wurden durch SDS-PAGE und Silberfärbung auf Anwesenheit von sgp130his getestet (Abb. 14B). Auch bei dieser Reinigungsmethode konnte ein hoher Reinheitsgrad erzielt werden. Sgp130his hat ein Molekulargewicht von ca. 100 kDa. Die Banden, die von Proteinen mit höherem und niedrigerem Molekulargewicht herrühren, tauchen in positiven und negativen Fraktionen gleichermaßen auf, es handelt sich also nicht um degradiertes sgp130his, sondern um unspezifisch miteluierte Proteine. Positive Fraktionen wurden vereinigt und gegen PBS dialysiert.

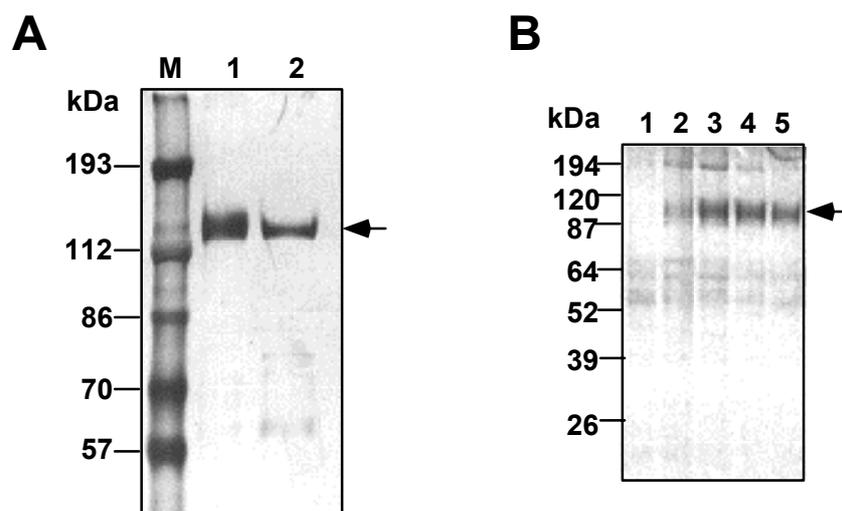


Abb. 14: Aufreinigung der sgp130-Proteine

Die aufgereinigten sgp130-Proteine wurden durch SDS-PAGE und anschließende Silberfärbung analysiert. (A) 100 ng humanes sgp130Fc (Spur 1) und 20 ng murines sgp130Fc (Spur 2) wurden aufgetragen. (B) 5 μ l Aliquots der sgp130his-Elutionsfraktionen wurden geladen. Eine negative (1) und vier positive Fraktionen (2-5) sind gezeigt.

1.3 Charakterisierung der sgp130-Proteine

Die Bildung ternärer Komplexe aus IL-6, sIL-6R und sgp130 wurde schon gezeigt (Taga et al. 1989; Horsten et al. 1995). Um die Interaktion von sgp130Fc und sgp130his mit dem IL-6/sIL-6R Komplex zu analysieren, wurde das Fusionsprotein „Hyper-IL-6“ (H-IL-6) verwendet. H-IL-6 besteht aus IL-6 und der ligandenbindenden Region des IL-6R, die über einen Peptidlinker kovalent verbunden sind (vgl. Abb 9) und kann wie der IL-6/sIL-6R Komplex gp130 direkt aktivieren (Fischer et al. 1997).

Um Bindungsstudien durchzuführen, wurde H-IL-6 metabolisch markiert. Dazu wurden COS-7-Zellen transient mit H-IL-6-cDNA transfiziert und nach einer „Hungerphase“ in Methionin- und Cystein-freiem Medium für 8 h mit ^{35}S -Methionin und ^{35}S -Cystein inkubiert. Alle während dieser Inkubationsphase synthetisierten Proteine enthalten in ihren Cysteinen und Methioninen das radioaktive Schwefel-Isotop und können durch Fluorographie visualisiert werden.

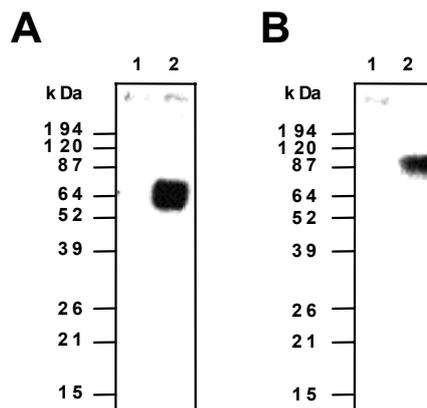


Abb. 15: Interaktion der sgp130-Proteine mit dem IL-6/sIL-6R-Komplex

(A) Metabolisch markiertes „Hyper-IL-6“ wurde aus 200 μl Kulturmedium von transfizierten COS-7 Zellen mit 0.5 μg humanem sgp130Fc (Spur 2) oder R27080Fc als negativ Kontrolle (Spur 1) immunpräzipitiert. (B) Metabolisch markiertes sgp130his wurde aus 200 μl Kulturmedium von transfizierten COS-7 Zellen mit 0.5 μg Hyper-IL-6Fc (Spur 2) oder irrelevantem R27080Fc (Spur 1) immunpräzipitiert. Die Immunkomplexe wurden durch SDS-PAGE und Fluorographie analysiert. Beide sgp130-Proteine binden den IL-6/sIL-6R-Komplex.

Metabolisch markiertes H-IL-6 wurde mit humanem sgp130Fc inkubiert. Anschließend wurde das sgp130Fc mit Protein-A-Sepharose immunpräzipitiert. Dabei wurde radioaktiv markiertes H-IL-6 mit sgp130Fc, welches über den Fc-Anteil an Protein-A-Sepharose bindet, kopräzipitiert (Abb. 15A, Spur 2), während mit einem irrelevanten Fc-Fusionsprotein (R27080Fc) (Müllberg et al. 1999) kein H-IL-6 kopräzipitiert wurde (Abb. 15 A, Spur 1).

Andererseits konnte radioaktiv markiertes sgp130his mit einem Fc-Fusionsprotein von „Hyper-IL-6“ (H-IL-6Fc) (Jostock et al. 1999) kopräzipitiert werden (Abb. 15B, Spur 2), nicht jedoch mit R27080Fc (Spur 1). Somit konnte gezeigt werden, daß sowohl sgp130Fc als auch sgp130his spezifisch an ihren natürlichen Interaktionspartner, den IL-6/sIL-6R-Komplex binden.

Humanes IL-6 bindet sowohl an humanen IL-6R als auch an murinen IL-6R, wenn auch mit niedrigerer Affinität (van Snick 1990). Murines IL-6 hingegen bindet nur an murinen IL-6R

und nicht an humanen IL-6R. Mit Hilfe der Fc-Fusionsproteine von humanem und murinem sgp130, wurde die Speziespezifität der ternären Komplexbildung von IL-6, sIL-6R und sgp130 untersucht. Dazu wurde metabolisch markierter humaner oder muriner sIL-6R mit murinem oder humanem sgp130Fc, in der Anwesenheit oder Abwesenheit von murinem oder humanem IL-6 an Protein-A-Sepharose immunpräzipitiert (Abb. 16).

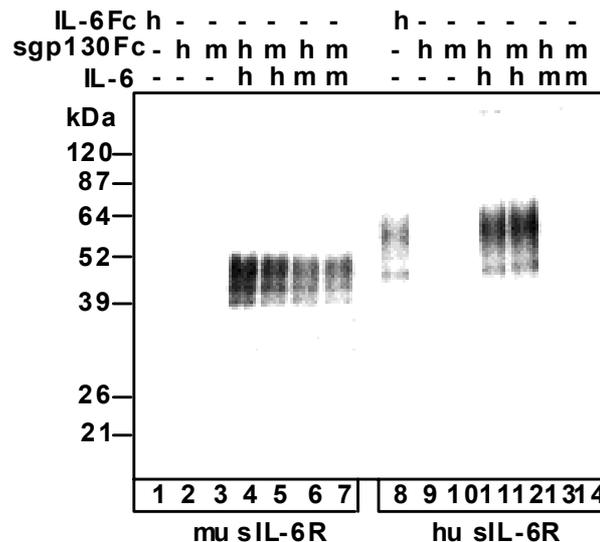


Abb. 16: Komplexe aus humanem und murinem sgp130 mit dem IL-6/sIL-6R-Komplex

Metabolisch markierter muriner sIL-6R (Spur 1-7) oder humaner sIL-6R (Spur 8-14) wurden aus 250 µl Zellüberstand von transfizierten COS-7-Zellen mit 1 µg murinem sgp30Fc (m), humanem sgp130Fc (h) oder humanem IL-6Fc immunpräzipitiert, wie angegeben. Die Präzipitation erfolgte in Anwesenheit oder Abwesenheit von 350 ng humanem IL-6 (h) oder murinem IL-6 (m) in einem Gesamtvolumen von 500 µl. Die Immunkomplexe wurden durch SDS-PAGE und Fluorographie analysiert. Das Bandenmuster reflektiert verschiedene Glykosylierungsformen des humanen und murinen sIL-6R. Es existieren keine Speziesrestriktionen in der Interaktion von murinem und humanem sgp130 mit dem IL-6/sIL-6R-Komplex.

In Abwesenheit von IL-6 wurde erwartungsgemäß kein sIL-6R mit sgp130Fc kopräzipitiert (Spuren 2, 3, 9 und 10). Muriner sIL-6R bildete mit allen Kombinationen von humanem und murinem IL-6 und sgp130Fc ternäre Komplexe (Spur 4-7), unabhängig davon ob humanes oder murines sgp130Fc verwendet wurde. Humaner sIL-6R kann wie erwartet nur in Anwesenheit von humanem IL-6 (Spur 11-12), nicht jedoch bei Anwesenheit von murinem IL-6 kopräzipitiert werden (Spur 9-10). Dabei spielt es aber keine Rolle, ob das sgp130Fc murinen (Spur 12) oder humanen (Spur 11) Ursprungs ist. Offensichtlich existieren also keine Speziesrestriktionen in der Interaktion von murinem und humanem gp130 mit murinem und

humanem sIL-6R. Interessanterweise wurde nur humaner sIL-6R mit einem Fc-Fusionsprotein von humanem IL-6 (IL-6Fc) (Jostock et al. 1999) kopräzipitiert (Spur 8), nicht aber muriner sIL-6R (Spur 1), was für eine niedrige Affinität von humanem IL-6 zu murinem IL-6R in Abwesenheit von gp130 spricht. gp130 scheint die Interaktion von humanem IL-6 und murinem IL-6R maßgeblich zu stabilisieren.

1.4 Inhibition der gp130-abgängigen Proliferation von BAF/3-Zellen

Nachdem gezeigt wurde, daß die rekombinanten sgp130-Proteine mit dem IL-6/sIL-6R-Komplex interagieren, galt es zu klären, ob sgp130 auch biologische Effekte auf Zellen zeigt, d. h. mit der biologischen Aktivität von IL-6 und sIL-6R interferiert. Dazu wurde die murine Prä-B-Zelllinie BAF/3 verwendet, die weder gp130 noch IL-6R exprimiert, und IL-3-abhängig wächst. Stabil mit humaner gp130-cDNA transfizierte BAF/3-Zellen (BAF/gp130) wachsen auch in Abwesenheit von IL-3, nach Stimulation von gp130 mit IL-6/sIL-6R oder H-IL-6. Stabil mit gp130- und IL-6R-cDNAs transfizierte BAF/3-Zellen (BAF/gp130/IL-6R) proliferieren nach alleiniger Gabe von humanem IL-6.

BAF/gp130-Zellen wurden mit H-IL-6 und steigenden Mengen sgp130Fc oder sgp130his stimuliert und nach 68 h die Proliferationsraten als ³H-Thymidin-Inkorporation in die DNA bestimmt. Dazu wurden die Zellen 4 h mit ³H-Thymidin inkubiert. Während dieser Inkubationsphase wird ³H-Thymidin von allen Zellen, die sich in der S-Phase des Zellzyklus befinden, in die synthetisierte DNA eingebaut und die Menge an inkorporiertem ³H-Thymidin ist ein Maß für die Proliferationsrate der Zellen.

Die H-IL-6-stimulierte Proliferation von BAF/gp130-Zellen wurde sowohl von sgp130Fc als auch sgp130his dosisabhängig inhibiert (Abb. 17). Dabei zeigte sgp130Fc eine 10fach höhere Effektivität als sgp130his, was vermutlich durch eine höhere Affinität des dimeren Fc-Fusionsproteins zu H-IL-6 bedingt ist. Eine 50%ige Inhibition der Proliferation wird im Falle von sgp130Fc bei einer Konzentration von etwa 5 ng/ml erzielt, während 50 ng/ml sgp130his benötigt werden um die Proliferationsrate zu halbieren. Im Falle von sgp130Fc reichte bereits ein 5facher molarer Überschuß aus, um die H-IL-6-induzierte Proliferation der BAF/gp130-Zellen vollständig zu inhibieren.

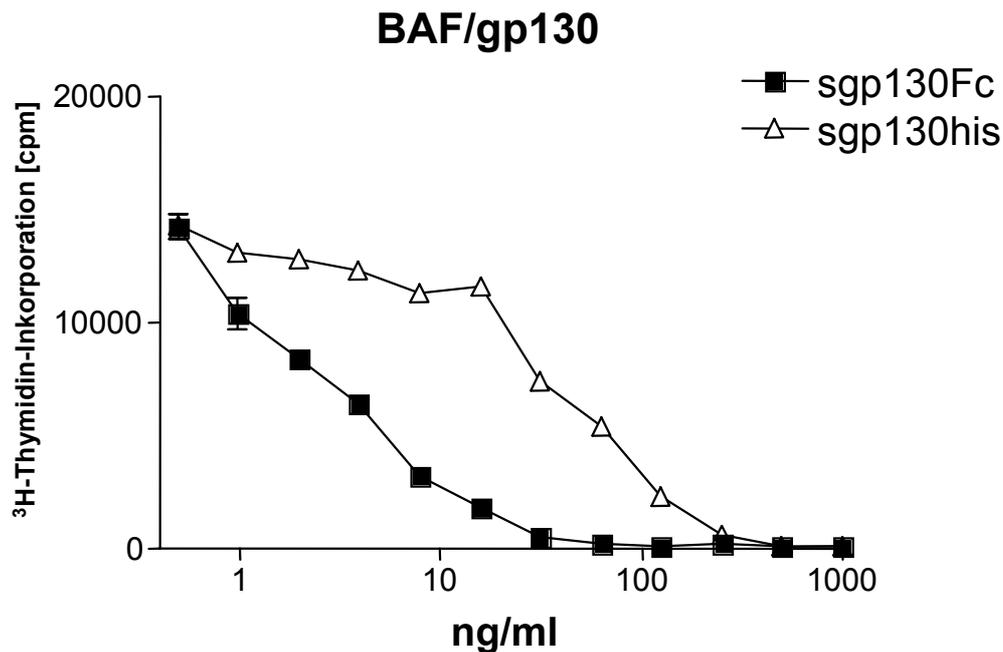


Abb. 17: Inhibition der H-IL-6-induzierten Proliferation von BAF/gp130-Zellen

Proliferation von BAF/gp130-Zellen nach Stimulation mit 5 ng/ml „Hyper-IL-6“ (H-IL-6) und steigenden Mengen sgp130Fc oder sgp130his.

Die Zellen wurden 68 h stimuliert und dann 4 h mit ^3H -Thymidin inkubiert. Anschließend wurden die Zellen auf Glasfaserfilter geerntet und die ^3H -Thymidin-Inkorporation durch Szintillationszählung analysiert. Die Daten representieren Mittelwerte \pm Standardabweichung von drei parallelen Experimenten. Die Standardabweichung ist nur gezeigt, wenn sie größer als die verwendeten Symbole war. Beide sgp130-Proteine inhibieren die H-IL-6-induzierte Proliferation.

Im Gegensatz dazu zeigte auf BAF-Zellen, die gp130 und IL-6R auf der Oberfläche exprimieren, weder sgp130Fc noch sgp130his einen inhibitorischen Effekt auf die IL-6-induzierte Proliferation (Abb. 18). Selbst sehr hohe Konzentrationen an sgp130 führten nicht zu einer signifikanten Abnahme der Zellproliferation nach IL-6-Stimulation.

Diese Ergebnisse zeigen klar, daß sgp130 spezifisch die Aktivität des IL-6/sIL-6R-Komplexes inhibiert, während Antworten, die über membranständigen IL-6R vermittelt werden, durch sgp130 nicht beeinträchtigt werden.

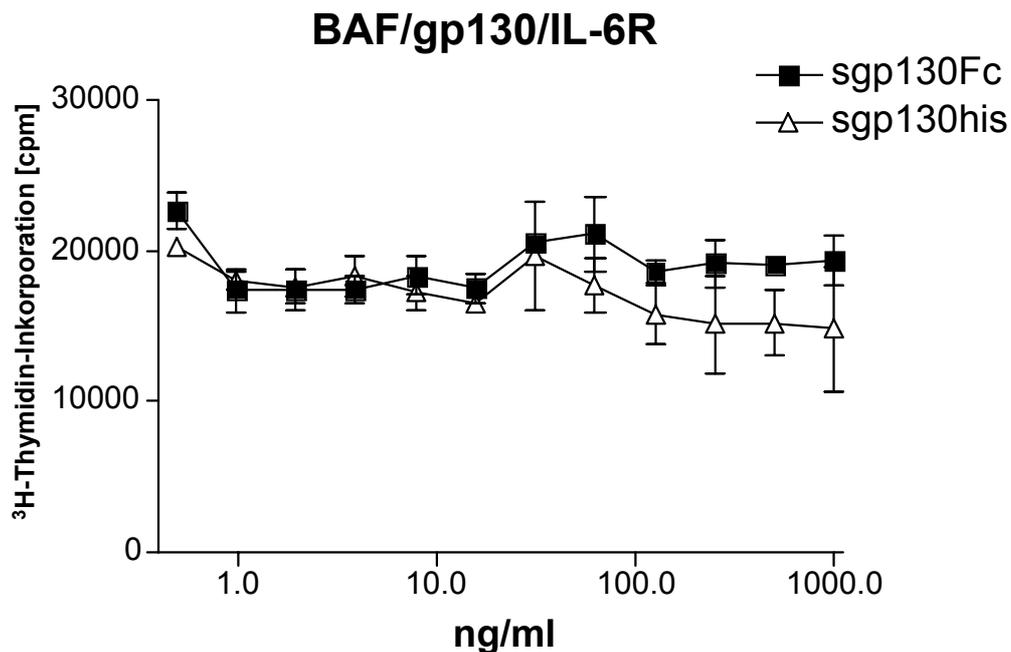


Abb. 18: Effekt von sgp130 auf die IL-6-induzierte Proliferation von BAF/gp130/IL-6R-Zellen

Proliferation von BAF/gp130/IL6R-Zellen nach Stimulation mit 1 ng/ml IL-6 und steigenden Konzentrationen sgp130Fc oder sgp130his.

Die Zellen wurden 68 h stimuliert und dann 4 h mit ^3H -Thymidin inkubiert. Anschließend wurden die Zellen auf Glasfaserfilter geerntet und die ^3H -Thymidin-Inkorporation durch Szintillationszählung analysiert. Die Daten representieren Mittelwerte +/- Standardabweichung von drei parallelen Experimenten. Keines der sgp130-Proteine inhibiert die IL-6-induzierte Proliferation.

In einem weiteren Experiment wurde untersucht, ob der Effekt von sgp130 auf die BAF-Zellproliferation in gleichem Maße auftritt, wenn man statt H-IL-6, IL-6 in Kombination mit sIL-6R verwendet. H-IL-6 und IL-6/sIL-6R wurden dabei in Konzentrationen eingesetzt, die zu vergleichbar starker Proliferation von BAF/gp130-Zellen führen. Es zeigte sich, daß sgp130Fc IL-6 und sIL-6R in ähnlicher Weise inhibiert wie H-IL-6 (Abb. 19). Eine Konzentration von 20 ng/ml sgp130Fc führt zu einer 50%igen Inhibition der Proliferation, induziert durch 10 ng/ml H-IL-6 oder 100 ng/ml IL-6 plus 50 ng/ml sIL-6R.

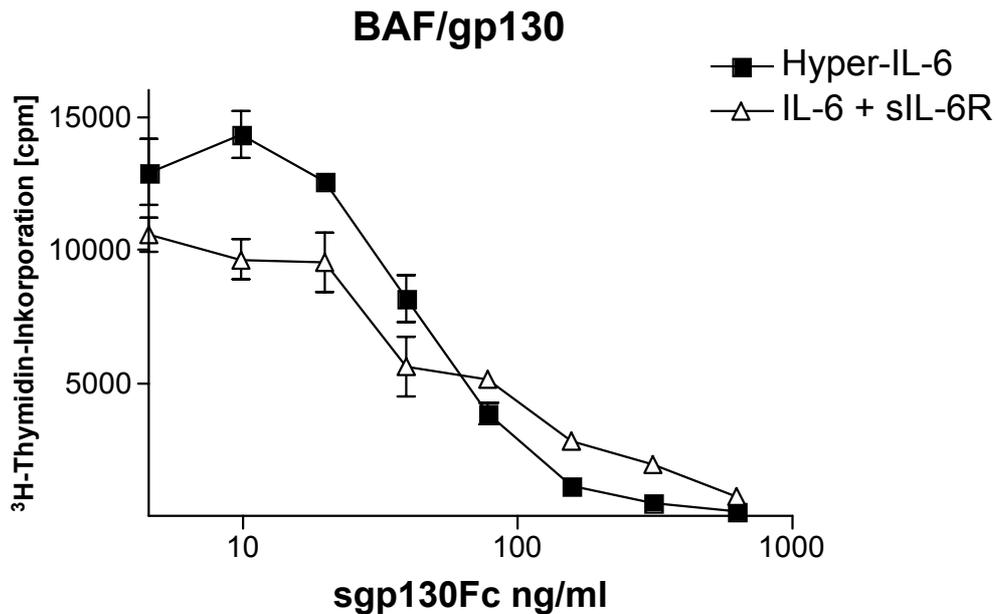


Abb. 19: Inhibition von H-IL-6 und IL-6/sIL-6R durch sgp130

Proliferation von BAF/gp130 Zellen nach Stimulation mit 100 ng/ml IL-6 plus 50 ng/ml sIL-6R und steigenden Mengen sgp130Fc oder nach Stimulation mit 10 ng/ml H-IL-6 und steigenden Mengen sgp130Fc. Die Zellen wurden 68 h stimuliert, anschließend 4 h mit ³H-Thymidin inkubiert und auf Glasfaserfilter geerntet. Die ³H-Thymidin-Inkorporation wurde in einem Szintillationszähler gemessen. Die Daten repräsentieren Mittelwerte +/- Standardabweichung von drei parallelen Experimenten. H-IL-6- und IL-6/sIL-6R-induzierte Proliferation werden gleichermaßen durch sgp130 inhibiert.

Gp130 ist nicht nur an der Signaltransduktion von IL-6 beteiligt, sondern u. a. auch an der von „Leukemia Inhibitory Factor“ (LIF), Onkostatin-M (OSM) und „Ciliary Neurotrophic Factor“ (CNTF). LIF und OSM verwenden ein Heterodimer aus gp130 und LIFR zur Signaltransduktion. CNTF nutzt ebenfalls ein gp130/LIFR-Heterodimer zur Signaltransduktion, benötigt aber eine zusätzliche ligandenbindende Rezeptoruntereinheit, den CNTFR. Dieser trägt analog zum IL-6R selbst nicht zur intrazellulären Signaltransduktion bei (vgl. Einleitung: Abb. 7)

Um den Effekt von sgp130 auf diese IL-6-artigen Zytokine zu untersuchen wurden BAF/3-Zellen mit H-IL-6, LIF, CNTF oder OSM stimuliert, die gp130, LIFR und CNTFR auf der Oberfläche exprimieren (BAF/gp130/LIFR/CNTFR), also alle für diese Zytokine relevanten Rezeptor-Untereinheiten (Abb. 20).

Sgp130Fc hatte keinen Effekt auf die CNTF-stimulierte Proliferation der BAF/gp130/LIFR/CNTFR-Zellen. Die LIF und OSM induzierte Proliferation wurde jedoch

bei hohen sgp130Fc-Konzentrationen teilweise inhibiert. Verglichen, mit der Inhibition von H-IL-6 durch sgp130Fc ist die Inhibition von LIF und OSM aber etwa um den Faktor 5000 schwächer (Abb. 20). Somit scheint sgp130 offensichtlich präferentiell sIL-6R-vermittelte Aktivitäten zu inhibieren, während andere Zytokine der IL-6-Familie in ihrer Aktivität relativ unbeeinflusst bleiben.

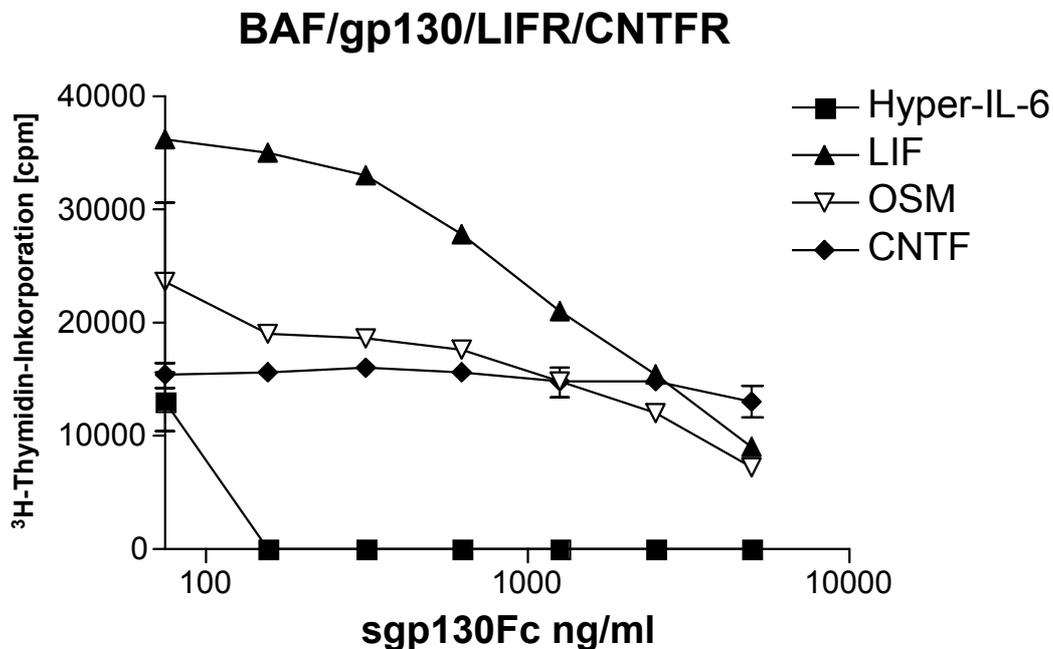


Abb. 20: Effekt von sgp130 auf die biologische Aktivität von IL-6-artigen Zytokinen

Proliferation von BAF/gp130/LIFR/CNTFR Zellen nach Stimulation mit 10 ng/ml H-IL-6, 1 ng/ml LIF, 10 ng/ml OSM oder 0.5 ng/ml CNTF und steigenden Mengen sgp130Fc. Nach 68-stündiger Stimulation wurden die Zellen 4 h mit ^3H -Thymidin inkubiert und anschließend auf Glasfaserfilter geerntet. Die ^3H -Thymidin Inkorporation wurde durch Szintillationszählung gemessen. Bei den Daten handelt es sich um Mittelwerte \pm Standardabweichung von drei parallelen Experimenten. Sgp130 inhibiert präferentiell die IL-6/sIL-6R-induzierte Proliferation, andere IL-6-artige Zytokine werden kaum oder gar nicht inhibiert.

1.5 Inhibition der Akute-Phase-Protein-Synthese in HepG2-Hepatomzellen

Hepatozyten und Hepatomzellen (z.B. HepG2) synthetisieren nach Stimulation mit IL-6 Akute-Phase-Proteine wie Haptoglobin, C-reaktives Protein (CRP) und Antichymotrypsin (ACT) (Gauldie et al. 1987). Den gleichen Effekt erzielt man durch eine Stimulation mit dem IL-6/sIL-6R-Komplex (Mackiewicz et al. 1992).

Um den Einfluß von sgp130 auf die Induktion der Produktion von Akute-Phase-Proteinen durch Hepatomzellen zu untersuchen, wurden HepG2-Zellen mit IL-6 oder H-IL-6 in der

Anwesenheit oder Abwesenheit von sgp130Fc stimuliert. Anschließend wurden die Zellen 4 h metabolisch markiert und die Sekretion des Akute-Phase-Proteins ACT wurde durch Immunpräzipitation, SDS-PAGE und Fluorographie analysiert (Abb. 21).

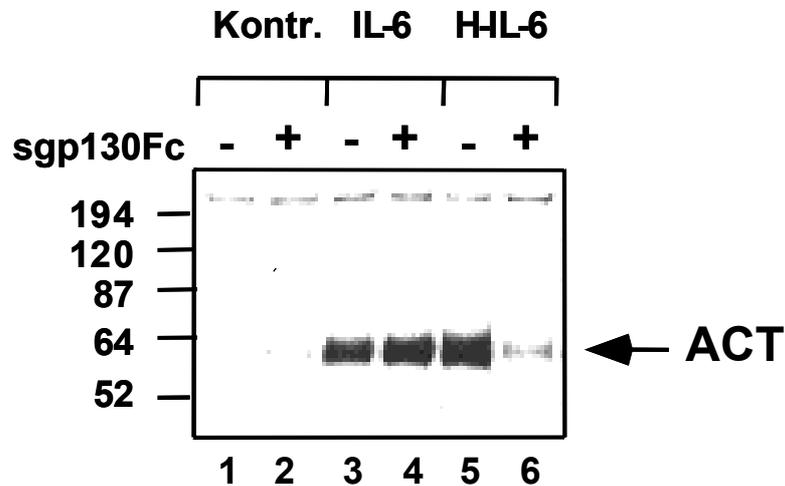


Abb. 21: Inhibition der Akute-Phase-Protein-Synthese in humanen Hepatomzellen (HepG2)

HepG2-Zellen wurden mit 100 ng/ml IL-6 oder H-IL-6 für 18 h in der Anwesenheit oder Abwesenheit von 1 µg/ml sgp130Fc stimuliert. Unstimulierte Zellen, die mit oder ohne sgp130Fc behandelt wurden, dienen als Kontrolle (Kontr.). Die ACT-Sekretion wurde mittels Immunpräzipitation, SDS-PAGE und Fluorographie analysiert. Sgp130 inhibiert selektiv die IL-6/sIL-6R-induzierte Akute-Phase-Protein-Synthese, während die IL-6-induzierte, über membranständigen IL-6R vermittelte Akute-Phase-Protein-Synthese nicht inhibiert wird.

Auch hier zeigte sgp130Fc wie in Abb. 18 keinerlei inhibitorischen Effekt auf die Stimulation mit IL-6 (Abb. 21: Spuren 3 und 4). Die H-IL-6-induzierte Sekretion von ACT konnte jedoch effektiv mit sgp130Fc inhibiert werden (Spuren 5 und 6). Unstimulierte Zellen zeigen keine ACT-Sekretion (Spuren 1 und 2). Diese Ergebnisse unterstreichen die Erkenntnis aus den Experimenten mit BAF/3-Zellen, daß sgp130 selektiv sIL-6R-vermittelte IL-6-Antworten inhibiert.

HepG2-Zellen, die stabil mit IL-6 transfiziert wurden (HepG2/IL-6) sezernieren konstitutiv hohe Mengen von IL-6. Dennoch sind diese Zellen nicht responsiv für IL-6 alleine, da bei ihnen die Oberflächenexpression von IL-6R herunterreguliert ist (Mackiewicz et al. 1992). Eine Stimulation mit sIL-6R führt jedoch zur Produktion von Akute-Phase-Proteinen (Mackiewicz et al. 1992), da gp130 nach wie vor exprimiert wird.

Um den Effekt von sgp130 auf Hepatomzellen ohne membrangebundenen IL-6R zu untersuchen, wurden HepG2/IL-6-Zellen mit sIL-6R oder H-IL-6 stimuliert, entweder in der Anwesenheit oder in der Abwesenheit eines Überschusses an sgp130Fc. Als Kontrolle dienten unstimulierte Zellen. Als Indikator für die Induktion der Produktion von Akute-Phase-Proteinen, wurde wiederum die ACT-Sekretion analysiert (Abb. 22).

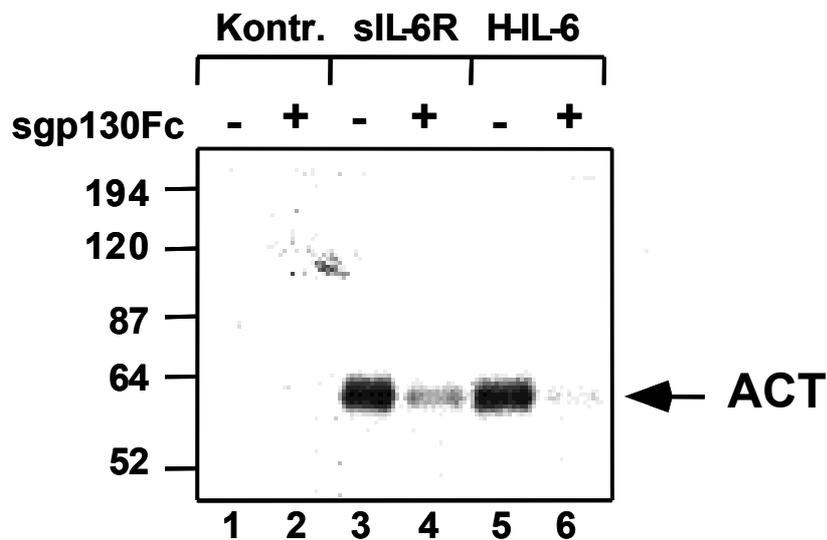


Abb. 22: Inhibition der Akute-Phase-Protein-Synthese in HepG2/IL-6 Zellen

HepG2/IL-6-Zellen wurden mit 100 ng/ml sIL-6R oder H-IL-6 in der An- oder Abwesenheit von 1 µg/ml sgp130Fc 18 h stimuliert. Unstimulierte Zellen mit und ohne sgp130Fc-Behandlung dienten als Kontrolle. Die ACT-Sekretion wurde durch Immunpräzipitation, SDS-PAGE und Fluorographie analysiert. Die sIL-6R-vermittelte Akute-Phase-Protein-Synthese wird durch sgp130 inhibiert.

Die H-IL-6-induzierte Sekretion von ACT durch HepG2/IL-6-Zellen wurde in gleichem Maße durch sgp130Fc inhibiert, wie die der HepG2-Zellen (Abb. 22 Spur 4, 5). Auch die durch sIL-6R induzierte ACT-Sekretion wurde effektiv durch sgp130Fc inhibiert (Spur 3, 4). Unstimulierte Zellen sekretierten kein ACT (Spur 1, 2). Somit wurde erneut bestätigt, daß sgp130 effizient den IL-6/sIL-6R-Komplex inhibiert, sowohl das Fusionsprotein (H-IL-6), als auch die Kombination der Einzelkomponenten (IL-6, von HepG2/IL-6 sekretiert, plus sIL-6R).

1.6 Inhibition des antiapoptotischen Effektes von IL-6 auf Lamina propria mononukleäre Zellen von Morbus Crohn Patienten

Um das Potential von sgp130Fc in einem Krankheits-bezogenen Modell zu testen, wurde der antiapoptotische Effekt von IL-6 auf Lamina Propria T-Zellen von Morbus Crohn Patienten untersucht.

Morbus Crohn ist eine chronische inflammatorische Darmerkrankung, deren Auslöser unbekannt ist. Es wurde spekuliert, daß eine Aktivierung des mukosalen Immunsystems durch bakterielle Antigene und eine konsekutive pathologische Zytokinproduktion eine Schlüsselrolle bei der Pathogenese spielen (Atreya et al. 2000). Kürzlich wurde gezeigt, daß die Blockade der IL-6 Antwort zu einem Anstieg der Apoptose von Lamina propria T-Zellen führt (Atreya et al. 2000). IL-6 hat also einen antiapoptotischen Effekt auf diese Zellen, was vermutlich wesentlich zur chronischen Entzündungsreaktion des mukosalen Immunsystems beiträgt. In einem Mausmodell für Morbus Crohn, der TNBS induzierten Colitis, führt eine *in vivo* Blockade des IL-6 Signals durch einen neutralisierenden IL-6R-Antikörper zu einer deutlichen Verminderung der Krankheitssymptome (Atreya et al. 2000).

Um zu untersuchen, ob der antiapoptotische Effekt von IL-6 über löslichen oder membrangebundenen IL-6R vermittelt wird, wurden Lamina propria mononukleäre Zellen (LPMC) von Morbus Crohn Patienten isoliert und in Kultur genommen. Die Zellen wurden 48 h mit sgp130Fc oder einem neutralisierenden IL-6R-Antikörper behandelt, anschließend wurde der Anteil apoptotischer Zellen (Annexin-V-positive und Propidiumjodid-negative Zellen) durch FACS-Analyse bestimmt. Unbehandelte Zellen zeigten einen Anteil von ca. 60% apoptotischer Zellen. Die Behandlung mit sgp130Fc führte zu einem signifikanten Anstieg der Apoptoserate (Abb. 23). Der beobachtete Anstieg der Apoptoserate um 10% bei sgp130Fc Behandlung entspricht in etwa dem Anstieg nach Inkubation mit dem neutralisierenden IL-6R Antikörper (Abb. 23). Ein Anstieg der Apoptoserate um 10% korreliert sehr gut mit dem Grad der Apoptoseabnahme bei Lamina propria Lymphozyten von Morbus Crohn Patienten (Boirivant et al. 1999; Ina et al. 1999; Atreya et al. 2000). Die ähnliche Effizienz von sgp130Fc und IL-6R-Antikörper spricht dafür, daß der antiapoptotische Effekt von IL-6 bei Morbus Crohn durch sIL-6R vermittelt wird und nicht durch membranständigen IL-6R, da sgp130Fc selektiv sIL-6R-abhängige Antworten inhibiert, während der IL-6R-Antikörper löslichen und membranständigen IL-6R gleichermaßen neutralisiert. Der sIL-6R spielt also vermutlich eine wichtige Rolle bei der Apoptoseresistenz von LPMC bei Morbus Crohn.

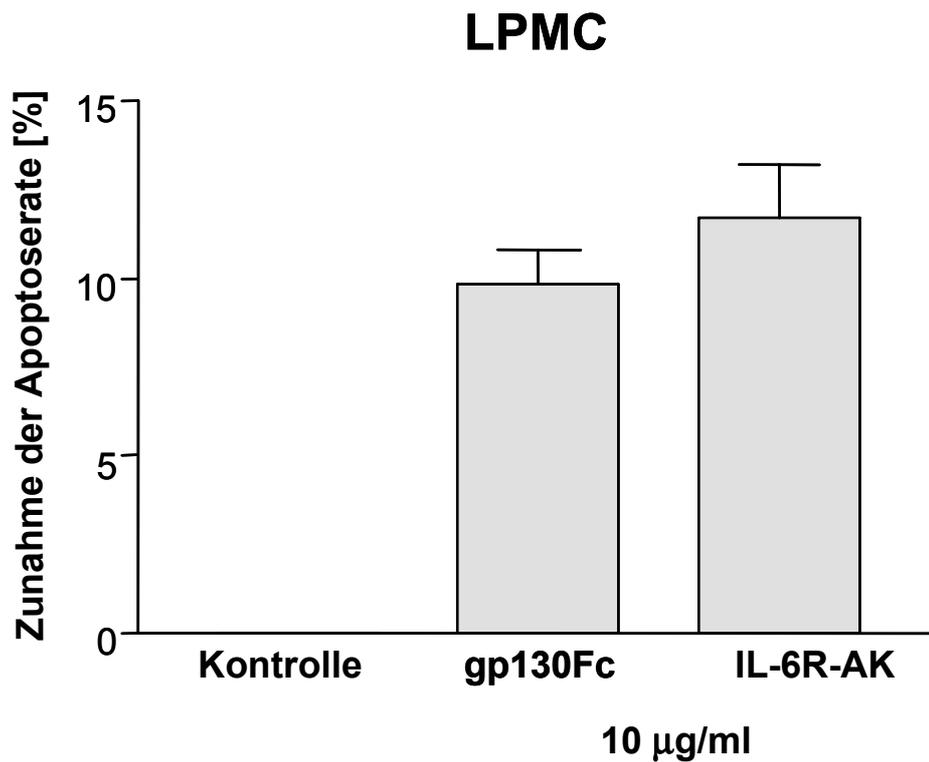


Abb. 23: Apoptose von LPMC von Morbus Crohn Patienten nach Behandlung mit sgp130Fc

Die LPMC wurden isoliert und für 48 h in der An- oder Abwesenheit von 10 µg/ml sgp130Fc oder 10 µg/ml eines neutralisierenden IL-6R-Antikörpers kultiviert. Anschließend wurden die Zellen für Annexin-V und Propidiumjodid angefärbt und durch FACS analysiert. Der Anstieg des Anteils apoptotischer Zellen (Annexin-V-positiv und Propidiumjodid-negativ) ist gezeigt. Die Werte repräsentieren das Ergebnis von Doppelbestimmungen mit dem Standardfehler als vertikalen Balken. Der antiapoptotische Effekt von IL-6 auf LPMC von Morbus Crohn Patienten ist sIL-6R-abhängig und durch sgp130 inhibierbar.

2. Untersuchungen zur Zusammensetzung des Rezeptor-Komplexes von viralem IL-6

Der zweite Teil der vorliegenden Arbeit beschäftigt sich mit einem vom Karposi Sarkom assoziierten Herpesvirus (KSHV) kodierten, zu humanem IL-6 homologen Zytokin (vIL-6). Das virale IL-6 zeigt zu humanem IL-6 analoge Aktivitäten und benötigt gp130 zur Signaltransduktion. Bisher ungeklärt ist die Frage, ob IL-6R zur Signaltransduktion von vIL-6 benötigt wird oder ob vIL-6 direkt gp130 aktivieren kann. Im folgenden sollte geklärt werden, ob vIL-6 in Abwesenheit des IL-6R an gp130 binden kann und ob IL-6R für die biologische Aktivität von vIL-6 von Bedeutung ist.

2.1 Expression und Aufreinigung von rekombinantem vIL-6

Um Untersuchungen zum Rezeptor-Komplex von vIL-6 durchführen zu können, wurde rekombinantes vIL-6 exprimiert und aufgereinigt. Ein Expressionsvektor mit der für vIL-6 kodierenden cDNA und einem „Hexahistidin-Tag“ am COOH-Terminus (Müllberg et al. 2000) wurde transient in COS-7-Zellen transfiziert. Die sechs Histidine am COOH-Terminus des rekombinanten vIL-6 erlaubten eine Aufreinigung aus den Zellüberständen durch Ni-Affinitäts-Chromatographie. Positive Fraktionen wurden vereinigt und gegen PBS dialysiert. Anschließend wurde das aufgereinigte vIL-6 durch SDS-PAGE und Silberfärbung analysiert (Abb. 24). Das rekombinante vIL-6 erscheint als Doppelbande von 24-26 kDa, die vermutlich differentiell glykosylierte Formen von vIL-6 repräsentiert.

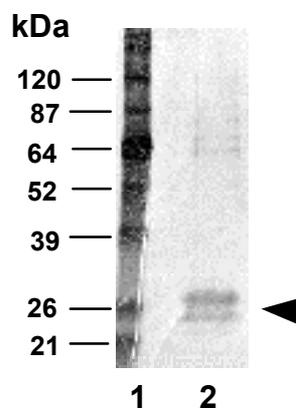


Abb. 24: Rekombinantes vIL-6-Protein

Rekombinantes vIL-6 wurde mit einem COOH-terminalen „Hexahistidin-Tag“ exprimiert und an einer Ni-Chelat Säule aufgereinigt. Das aufgereinigte vIL-6 wurde durch SDS-PAGE und Silberfärbung analysiert. Spur 1: Marker, Spur 2: vIL-6.

2.2 Interaktion von vIL-6 mit Komponenten des IL-6-Rezeptor-Komplexes

Zunächst sollte geklärt werden, ob es direkte Protein-Protein-Wechselwirkungen von vIL-6 mit gp130 und/oder IL-6R gibt. Dazu wurden Immunpräzipitationen von metabolisch markiertem vIL-6, nach Inkubation mit entsprechenden Fc-Fusionsproteinen durchgeführt (Abb. 25). Die Proteinkomplexe wurden mit Protein-A-Sepharose präzipitiert.

Das radioaktiv markierte vIL-6 konnte aus dem Überstand transfizierter COS-7-Zellen mit einem Antiserum aus Kaninchen präzipitiert werden, daß gegen bakteriell exprimiertes vIL-6 generiert worden war (Spur 1) (Hoischen et al. 2000). Die Inkubation mit IL-6Fc, führte erwartungsgemäß nicht zu einer Kopräzipitation von vIL-6 (Spur 2), vIL-6 bindet also nicht humanes IL-6. Bei Verwendung von sgp130Fc wird vIL-6 jedoch kopräzipitiert, was für eine direkte Interaktion von vIL-6 mit der extrazellulären Domäne von gp130 spricht (Spur 3). Im Gegensatz dazu ist ein Fc-Fusionsprotein der extrazellulären Domäne des IL-6R (sIL-6RFc) nicht in der Lage vIL-6 kopräzipitieren. Somit scheint vIL-6 nicht an den IL-6R zu binden.

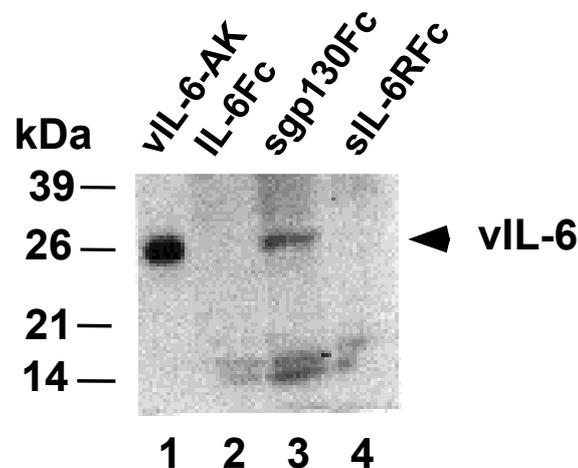


Abb. 25: Interaktion von vIL-6 mit IL-6R-Untereinheiten

Metabolisch markiertes vIL-6 wurde aus Zellüberständen mit einem polyklonalem Antikörper (1), IL-6Fc (2), sgp130Fc (3) oder sIL-6RFc (4) präzipitiert. Die zwei Proteinbanden bei 16 und 17 kDa sind unspezifisch und erscheinen bei allen Immunpräzipitationen mit den verschiedenen Fc-Fusionsproteinen. Die Analyse der Immunkomplexe erfolgte durch SDS-PAGE und Fluorographie. Virales IL-6 bindet direkt gp130, nicht jedoch IL-6R und IL-6.

Analoge Immunpräzipitationen wurden auch mit radioaktiv markiertem IL-6 und H-IL-6 durchgeführt, um deren Bindungseigenschaften mit denen von vIL-6 direkt zu vergleichen

(Abb. 26). Metabolisch markiertes humanes IL-6 wurde mit sIL-6RFc aus dem Kulturmedium transfizierter Zellen präzipitiert, während mit sgp130Fc kein IL-6 gefällt wurde (Abb. 26A). Mit IL-6Fc wurde erwartungsgemäß ebenfalls kein IL-6 kopräzipitiert. IL-6 interagiert also mit IL-6R Fc, bindet aber nicht direkt an sgp130Fc.

Im Gegensatz dazu konnte metabolisch markiertes H-IL-6, als Model für den Komplex aus IL-6 und sIL-6R, mit sgp130Fc präzipitiert werden, nicht jedoch mit sIL-6RFc oder IL-6Fc (Abb. 26B). Virales IL-6 zeigt somit Bindungseigenschaften, die denen von H-IL-6 entsprechen und sich von denen des humanen IL-6 unterscheiden.

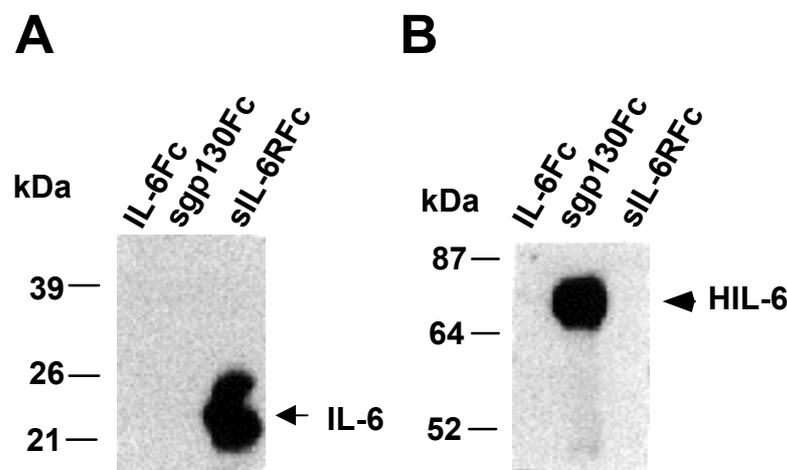


Abb. 26: Spezifität der Fc-Fusionsproteine

(A) Metabolisch markiertes humanes IL-6 wurde aus dem Kulturmedium transfizierter Zellen mit IL-6Fc, sgp130Fc oder sIL-6RFc immunpräzipitiert. (B) Metabolisch markiertes H-IL-6 wurde mit IL-6Fc, sgp130Fc oder sIL-6RFc aus dem Kulturmedium transfizierter Zellen präzipitiert. Die Immunkomplexe wurden mit Protein-A-Sepharose gefällt und durch SDS-PAGE und Fluorographie analysiert. Die Bindungseigenschaften von vIL-6 (Abb. 25) unterscheiden sich von denen des humanen IL-6 (A) und entsprechen denen des humanen IL-6/sIL-6R-Komplexes (B).

Nachdem gezeigt worden war, daß vIL-6 direkt mit gp130 interagiert, stellte sich die Frage, ob vIL-6 die gleichen gp130-Bindungsstellen wie der IL-6/sIL-6R-Komplex verwendet. Um dieser Frage nachzugehen wurde metabolisch markiertes vIL-6 in der An- oder Abwesenheit eines Überschusses an unmarkiertem IL-6 oder H-IL-6 mit sgp130Fc präzipitiert (Abb. 27). Es zeigte sich, daß die Bindung von vIL-6 an sgp130Fc nicht durch einen Überschuß an unmarkiertem humanem IL-6 beeinträchtigt wird (Spur 2). Die Anwesenheit eines Überschusses an unmarkiertem H-IL-6 führte jedoch zu einer kompletten Inhibition der

Interaktion von vIL-6 mit sgp130Fc (Spur 3). Virales IL-6 und der IL-6/sIL-6R-Komplex scheinen also um die gleichen Bindungsstellen an humanem gp130 zu konkurrieren.

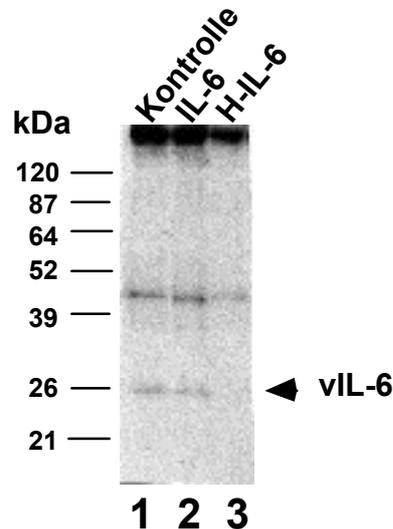


Abb. 27: Konkurrenz der Bindung von vIL-6 an gp130 durch H-IL-6

Metabolisch markiertes vIL-6 wurde in Ab- oder Anwesenheit von 5 µg/ml humanem IL-6 oder 5 µg/ml H-IL-6 mit 0.5 µg/ml sgp130Fc immunpräzipitiert. Die Proteinkomplexe wurden mit Protein-A-Sepharose präzipitiert und durch SDS-PAGE und Fluorographie analysiert. H-IL-6 und vIL-6 konkurrieren um die gp130-Bindung.

2.3 Biologische Aktivität von vIL-6 auf BAF/3-Zellen

Nach dem Nachweis der direkten Bindung von vIL-6 an gp130, war es von Interesse, ob der IL-6R dennoch für die biologische Aktivität von vIL-6 benötigt wird oder nicht. Zur Untersuchung dieser Frage wurden wiederum BAF/3-Zellen verwendet, die stabil mit humaner gp130 cDNA (BAF/gp130) oder mit humaner gp130 und IL-6R cDNA transfiziert sind (BAF/gp130/IL6R) und nach gp130-Stimulation proliferieren.

BAF/gp130-Zellen, wurden mit steigenden Mengen IL-6, H-IL-6 oder vIL-6 stimuliert. Anschließend wurde die Proliferation der Zellen analysiert. Dazu wurden sie für 4 h mit ³H-Thymidin inkubiert, bevor die ³H-Thymidin-Inkorporation in der DNA als Maß für die DNA-Synthese-Aktivität und Proliferation der Zellen gemessen wurde (Abb. 28). Wie erwartet proliferierten die BAF/gp130-Zellen nach Stimulation mit steigenden Mengen H-IL-6. Humanes IL-6 hingegen, welches in Abwesenheit von IL-6R nicht an gp130 bindet, ist nicht in der Lage eine Proliferation der Zellen zu induzieren. Im Gegensatz dazu führt die

Stimulation mit vIL-6 zu einer dosisabhängigen Proliferation der BAF/gp130-Zellen. Die Anwesenheit des IL-6R ist also offensichtlich nicht für die biologische Aktivität von vIL-6 notwendig. Virales IL-6 zeigte eine 20-50fach niedrigere biologische Aktivität als H-IL-6, was in guter Übereinstimmung mit der niedrigeren Affinität von vIL-6 zu gp130 ist (vgl. Abb. 25).

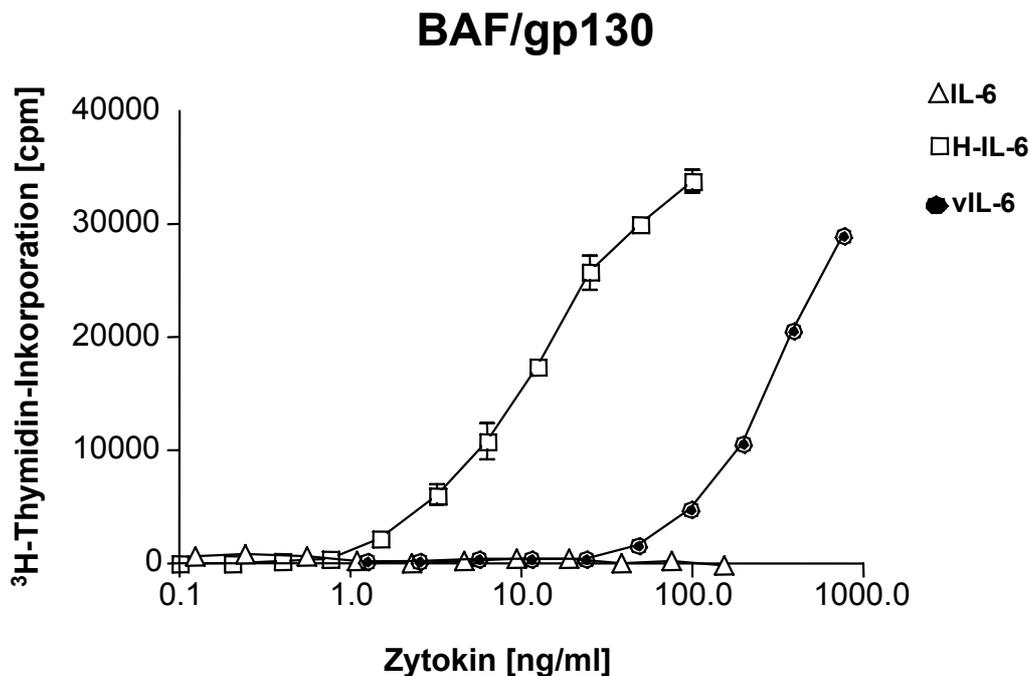


Abb. 28: Biologische Aktivität von vIL-6 in Abwesenheit des IL-6R

BAF/gp130-Zellen wurden 72 h mit steigenden Mengen humanem IL-6, H-IL-6 oder vIL-6 stimuliert. Anschließend wurden die Zellen für 4 h mit ^3H -Thymidin inkubiert, dann auf Glasfaserfilter geerntet und die ^3H -Thymidin-Inkorporation in einem Szintillationszähler gemessen. Die vIL-6 induzierte Proliferation ist IL-6R-unabhängig.

Zum Vergleich wurden Zellen, die neben gp130 auch IL-6R auf der Oberfläche exprimieren (BAF/gp130/IL-6R), ebenfalls mit humanem IL-6, H-IL-6 oder vIL-6 stimuliert (Abb. 29). Alle drei Stimuli führten zu einer dosisabhängigen Proliferation der Zellen. Dabei waren die biologischen Aktivitäten von H-IL-6 und vIL-6 vergleichbar zu denen auf BAF/gp130-Zellen. Die Verfügbarkeit von IL-6R auf der Zelloberfläche erhöht also nicht die biologische Aktivität von vIL-6. Interessanterweise ist IL-6 auf diesen Zellen bei der Proliferationsinduktion effizienter als H-IL-6, was darauf zurückzuführen ist, daß BAF/gp130/IL-6R Zellen mehr IL-6R exprimieren als gp130 (Jostock et al. 1999; Vollmer et al. 1999).

Die Halbmaximale Proliferationsrate wurde sowohl auf Zellen mit, als auch auf Zellen ohne IL-6R auf der Oberfläche bei etwa 300 ng/ml vIL-6 erreicht. Damit ist vIL-6 in der Induktion der BAF/3-Zellproliferation etwa 50-100fach weniger effizient als H-IL-6.

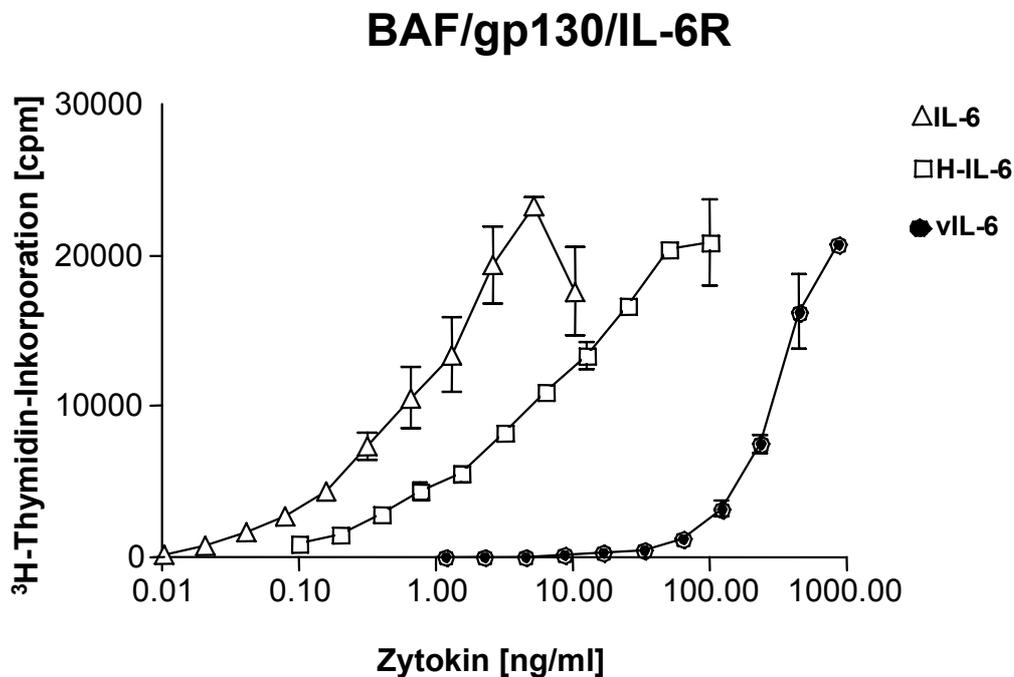


Abb. 28: Biologische Aktivität von vIL-6 bei Anwesenheit des IL-6R

BAF/gp130/IL-6R-Zellen wurden mit steigenden Mengen humanem IL-6, H-IL-6 und vIL-6 stimuliert. Die Proliferation der Zellen wurde durch Messung der ^3H -Thymidin-Inkorporation in die DNA bestimmt. Die Anwesenheit von IL-6R auf der Zelloberfläche hat keinen Einfluß auf die vIL-6-induzierte Proliferation (vgl. Abb. 27).

2.4 Inhibition der vIL-6-induzierten Proliferation von BAF/3-Zellen durch sgp130Fc und einen neutralisierenden gp130-Antikörper

Die Tatsache, daß vIL-6 direkt an gp130 bindet und auf Zellen biologisch aktiv ist, die gp130 exprimieren, legt nahe, daß die biologische Aktivität von vIL-6 direkt durch gp130 vermittelt wird. Daher wurde untersucht, ob sgp130Fc die biologische Aktivität von vIL-6 inhibiert.

BAF/gp130-Zellen wurden in Anwesenheit steigender Mengen sgp130Fc mit vIL-6 oder H-IL-6 stimuliert. Anschließend wurde die Proliferationsrate der Zellen analysiert (Abb. 30). Die Zugabe von sgp130Fc führte in beiden Fällen zu einer dosisabhängigen Inhibition der zytokininduzierten Proliferation. Somit wird vIL-6, im Gegensatz zu humanem IL-6 (vgl. Abb. 18), kompetitiv durch lösliches gp130 inhibiert, was dafür spricht, daß vIL-6 seine

biologische Aktivität, so wie der IL-6/sIL-6R-Komplex, durch direkte Stimulation von gp130 entfaltet.

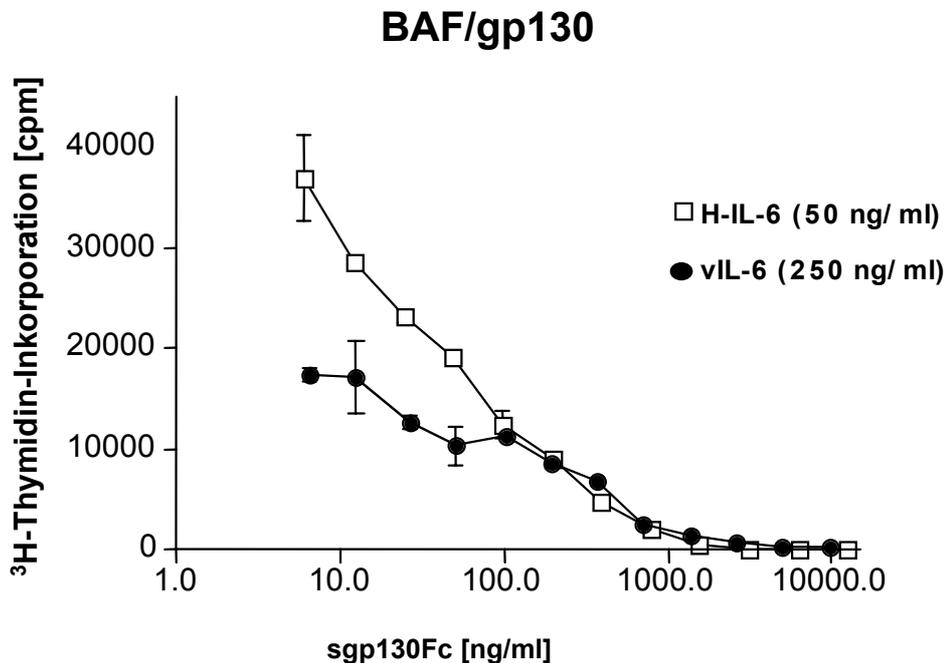


Abb. 30: Inhibition der vIL-6-induzierten Proliferation durch sgp130Fc

BAF/gp130-Zellen wurden mit 50 ng/ml H-IL-6 oder 250 ng/ml vIL-6 stimuliert und mit steigenden Mengen sgp130Fc behandelt. Die Proliferation der Zellen wurde durch Messung der ^3H -Thymidin-Inkorporation in die DNA bestimmt. Die vIL-6-induzierte Proliferation wird durch sgp130 inhibiert.

Um zu zeigen, daß vIL-6 über membranständiges gp130 wirkt wurde untersucht, ob ein neutralisierender gp130-Antikörper (GPX7) die vIL-6-induzierte Proliferation inhibiert. Die Zugabe steigender Mengen des Antikörpers führte zu einer dosisabhängigen Hemmung der H-IL-6-induzierten und der vIL-6-induzierten Proliferation von BAF/gp130-Zellen (Abb. 31). Damit ist gezeigt, daß die vIL-6-induzierte Proliferation der BAF/gp130-Zellen, durch das auf der Zelloberfläche befindliche gp130 vermittelt wird, so wie die H-IL-6-induzierte Proliferation.

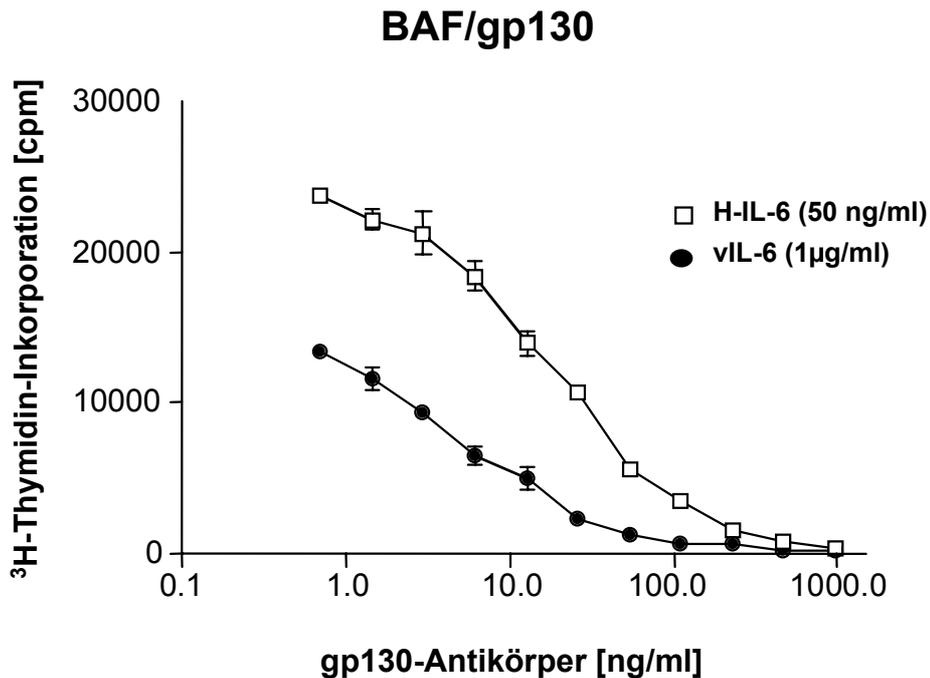


Abb. 31: Inhibition der vIL-6-induzierten Proliferation durch einen neutralisierenden gp130-Antikörper

BAF/gp130-Zellen wurden für 72 h in Anwesenheit steigender Mengen eines gegen gp130 gerichteten neutralisierenden monoklonalen Antikörpers (GPX7) mit 50 ng/ml H-IL-6 oder 1 µg/ml vIL-6 stimuliert. Die Proliferation der Zellen wurde durch Messung der ³H-Thymidin-Inkorporation in die DNA bestimmt. Die vIL-6-induzierte Proliferation wird durch neutralisierende gp130-Antikörper inhibiert, d. h. vIL-6 aktiviert Zellen durch gp130-Stimulation.

2.5 vIL-6-induzierte Akute-Phase-Protein Synthese in humanen Hepatomzellen (HepG2)

Eine Zytokin-vermittelte Stimulation von gp130 löst bei Hepatozyten und Hepatomzellen die Produktion und Sezernierung von Akute-Phase-Proteinen aus (vgl. Abb. 21). Um die Induktion von Akute-Phase-Proteinen durch vIL-6, humanes IL-6 und H-IL-6 zu vergleichen, wurden humane Hepatomzellen (HepG2) in der An- oder Abwesenheit eines sgp130Fc-Überschusses mit den Zytokinen stimuliert und die Sekretion des Akute-Phase-Proteins Antichymotrypsin (ACT) analysiert. Dazu wurden die Zellen nach der Stimulation metabolisch markiert und ACT wurde aus dem Kulturmedium immunpräzipitiert (Abb. 32 Spur 1-8). Parallel dazu wurden auch HepG2/IL-6-Zellen nach dem gleichen Muster stimuliert (Abb. 32 Spur 8-16). Die stabil mit IL-6 transfizierten HepG2/IL-6-Zellen

exprimieren keinen IL-6R auf der Zelloberfläche und sind daher nicht responsiv für IL-6 alleine (Mackiewicz et al. 1992).

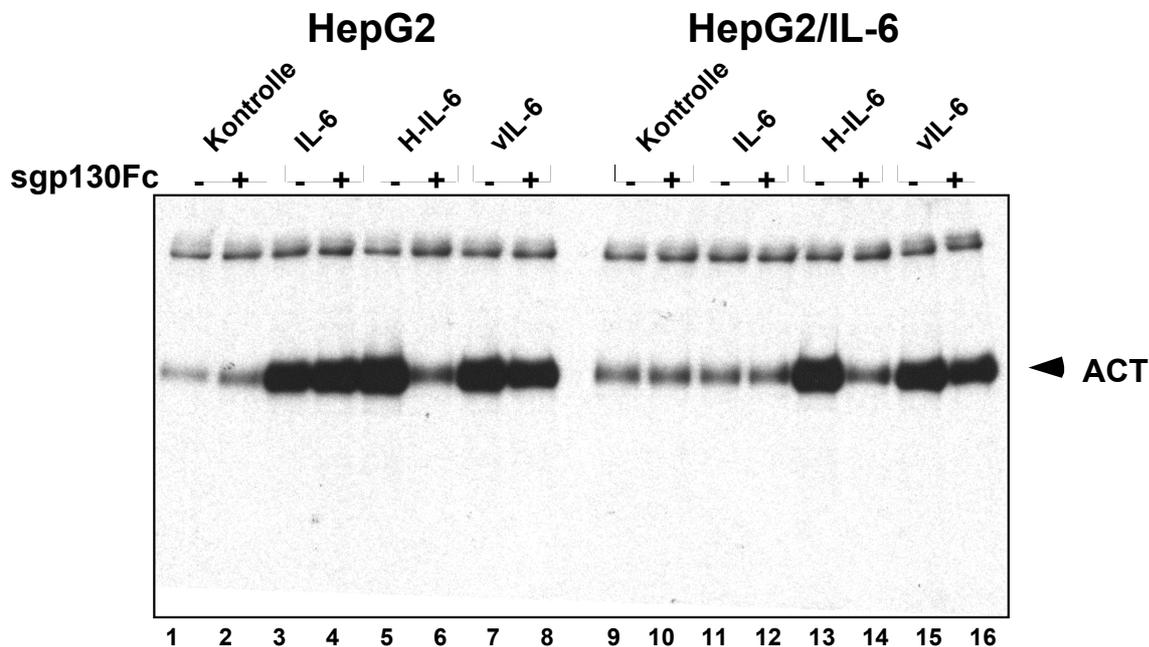


Abb. 32: Akute-Phase-Induktion in humanen Hepatomzellen (HepG2)

HepG2- und HepG2/IL-6-Zellen wurden mit 100 ng/ml IL-6, H-IL-6 oder vIL-6 in der Ab- oder Anwesenheit von 1 μ g/ml sgp130Fc für 18 h stimuliert. Unstimulierte Zellen mit oder ohne sgp130Fc-Behandlung dienten als Kontrolle. Die ACT-Sekretion wurde nach metabolischer Markierung der Zellen durch Immunpräzipitation, SDS-PAGE und Fluorographie analysiert. Die vIL-6 induzierte Akute-Phase-Protein-Synthese ist IL-6R-unabhängig und durch sgp130 inhibierbar.

Verglichen mit der ACT-Sekretion unstimulierter HepG2-Zellen (Spur 1), führte die Stimulation mit Humanem IL-6, H-IL-6 und vIL-6 jeweils zu einer deutlichen Zunahme der ACT-Sekretion (Spur 3, 5, 7). Die Behandlung mit sgp130Fc hatte erwartungsgemäß keinen Effekt auf unbehandelte und IL-6-stimulierte HepG2-Zellen (Spur 2, 4; vgl. auch Abb. 21), führte aber zur nahezu kompletten Inhibition der H-IL-6-induzierten ACT-Sekretion (Spur 6; vgl. Abb. 21). Auch die durch vIL-6-Stimulation hervorgerufene Produktion von ACT wurde sichtbar durch sgp130Fc gehemmt (Spur 8), wenn auch schwächer, als im Falle von H-IL-6, was gut mit der niedrigeren Affinität von vIL-6 zu sgp130Fc korreliert (vgl. Abb. 25).

Bei HepG2/IL-6-Zellen führte die Stimulation mit IL-6 aufgrund des Fehlens von IL-6R auf der Zelloberfläche erwartungsgemäß nicht zur Zunahme der ACT-Sekretion (Spur 11), während H-IL-6 eine starke Erhöhung der ACT-Syntheserate induziert (Spur 13). Die vIL-6-

Stimulation hatte bei HepG2/IL-6-Zellen, trotz des Fehlens von IL-6R, eine gleich starke ACT-Induktion zur Folge, wie bei HepG2-Zellen (Spur 15). Das Inhibitionsprofil von sgp130Fc entsprach dem bei HepG2-Zellen beobachteten.

Diese Ergebnisse sprechen erneut für eine IL-6R-unabhängige gp130-Stimulation durch vIL-6.

2.6 vIL-6-induzierte STAT3-Phosphorylierung in hmanen Hepatomzellen (HepG2)

Die zytokininduzierte Homodimerisierung von gp130 auf Zellen, führt zur intrazellulären Aktivierung von Janus-Tyrosinkinasen, welche STAT3 phosphorylieren. Das phosphorylierte STAT3 dimerisiert und wird in den Nukleus transloziert, wo es als Transkriptionsfaktor wirkt. Um zu demonstrieren, daß die Stimulation von Zellen mit vIL-6 zur intrazellulären Phosphorylierung und Aktivierung von STAT3 führt, wurden HepG2/IL-6-Zellen (kein Membran-IL-6R) verwendet. Die Zellen wurden mit IL-6, H-IL-6 oder vIL-6 stimuliert und anschließend lysiert. Phosphoryliertes STAT3 im Zellysat wurde durch SDS-PAGE und „Western-Blotting“ detektiert (Abb. 33).

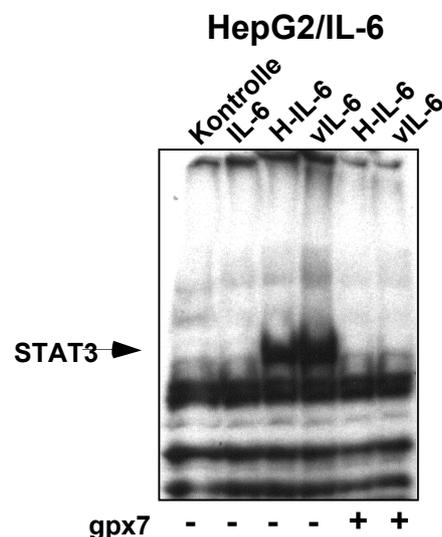


Abb. 33: STAT3-Aktivierung in HepG2/IL-6-Zellen durch vIL-6

HepG2/IL-6-Zellen wurden mit 100 ng/ml IL-6, H-IL-6 oder vIL-6 in der An- oder Abwesenheit von 1 µg/ml eines neutralisierenden gp130-Antikörpers (GPX7) für 15 min stimuliert. Anschließend wurden die Zellen lysiert und die Proteine durch SDS-PAGE aufgetrennt und auf einer Nitrozellulosemembran immobilisiert. Phosphoryliertes STAT3 wurde durch „Western-Blotting“ mit einem phosphospezifischen Antikörper über Chemilumineszenz detektiert. Die vIL-6-induzierte STAT3-Phosphorylierung ist IL-6R-unabhängig und wird durch neutralisierende gp130-Antikörper inhibiert.

In unstimulierten und IL-6-stimulierten HepG2/IL-6-Zellen konnte kein phosphoryliertes STAT3 detektiert werden. Im Gegensatz dazu führte die Inkubation der Zellen mit H-IL-6 oder vIL-6 zur Phosphorylierung von STAT3. Diese STAT3-Phosphorylierung konnte durch einen neutralisierenden Antikörper, der gegen gp130 gerichtet ist, komplett blockiert werden. Diese Ergebnisse zeigen, daß die Aktivierung von Zellen durch vIL-6 nicht durch zellgebundenen IL-6R vermittelt wird sondern daß vIL-6 und H-IL-6 vermutlich den gleichen zellulären Aktivierungsmechanismus via gp130 verwenden.

IV. Diskussion

1. Lösliches gp130 ist der natürliche Inhibitor des sIL-6R-„Transsignaling“

In der vorliegenden Arbeit wurden Studien zur Rolle von sgp130 bei der Regulation von IL-6-Antworten und Aktivitäten anderer Zytokine der IL-6-Familie durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden rekombinante Versionen von sgp130 konstruiert, heterolog exprimiert und aufgereinigt. Anhand der rekombinanten sgp130-Proteine konnte in verschiedenen Zellsystemen gezeigt werden, daß sgp130 selektiv sIL-6R-vermittelte IL-6 Antworten inhibiert, während durch membranständigen IL-6R vermittelte Antworten unbeeinträchtigt bleiben.

1.1 Konstruktion, Expression, Aufreinigung und Charakterisierung der sgp130-Proteine

Um Untersuchungen zur physiologischen Funktion von sgp130 durchführen zu können wurden Fc-Fusionsproteine von humanem und murinem sgp130, sowie ein humanes sgp130 mit „Hexahistidin-Tag“ am COOH-Terminus konstruiert.

Fc-Fusionsproteine erhalten durch den Fc-Teil die Eigenschaft, hochaffin an Protein-A von *Staphylococcus aureus* zu binden und können daher effektiv an einer Protein-A-Matrix aufgereinigt werden. Zudem eignen sie sich hervorragend zur Analyse von Protein-Protein-Interaktionen durch Immunpräzipitationen, da Bindungspartner des Fc-Fusionsproteins an Protein-A-Sepharose kopräzipitiert werden.

Der Fc-Teil führt aber auch zur Dimerisierung des Fusionsproteins, so daß man nicht ausschließen konnte, daß es zu Beeinträchtigungen der Bindung an die physiologischen Liganden und der biologischen Aktivität kommt. Daher wurde zusätzlich das sgp130 mit „Hexahistidin-Tag“ konstruiert, welches als Monomer exprimiert wird. Die sechs aufeinanderfolgenden Histidine am COOH-Terminus binden an Nickel-Atome, so daß sgp130_{his} durch Ni-Affinitäts-Chromatographie aufgereinigt werden konnte.

Als Expressionssystem wurden Säugerzellen (COS-7) gewählt. Die Expression rekombinanter Proteine in Säugerzellen hat gegenüber mikrobieller Expression den Vorteil, daß die

Wirtszellen säugerspezifische postrtranslationale Modifikationen der Proteine, wie Glykosylierung, vornehmen. Bei bakterieller Expression dagegen findet keine Glykosylierung statt, und bei Hefen als Wirtszellen, kommt es meist zur Hyperglykosylierung des Proteins. Auch im Hinblick auf eine mögliche *in vivo* Applikation von sgp130 ist die Expression in Säugerzellen sinnvoll, da „natürlich“ glykosylierte Proteine meist resistenter gegen Degradation sind und eine höhere Plasma-Halbwertszeit haben. Das gilt insbesondere für Fc-Fusionsproteine, die oft eine deutlich höhere Plasma-Halbwertszeit aufweisen, als ihre Gegenstücke ohne Fc-Anteil (Zheng et al. 1997; Jostock et al. 1999).

Durch transiente Transfektion der Konstrukte in COS-7-Zellen konnten ausreichende Mengen der Proteine produziert werden, die Ausbeute lag bei ca. 1 mg aufgereinigtes Protein aus einem Liter Kulturmedium. Der Reinheitsgrad der aufgereinigten Proteine war sehr hoch, im silbergefärbten Gel traten nur sehr wenige Verunreinigungen durch andere Proteine zutage (Abb. 14). Sowohl sgp130Fc, als auch sgp130his zeigten darüberhinaus Bindung an ihren physiologischen Liganden, den IL-6/sIL-6R-Komplex in Form von H-IL-6 (Abb. 15). Die rekombinanten sgp130-Proteine waren somit geeignet, Untersuchungen zur Funktion von sgp130 vorzunehmen.

1.2 Ternäre Komplexbildung und Speziesrestriktionen von sgp130, sIL-6R und IL-6

Die Analyse der ternären Komplexbildung von sgp130 mit IL-6 und sIL-6R ergab, daß sgp130, so wie membrangebundenes gp130 (Taga et al. 1989), nur in Anwesenheit von sIL-6R mit IL-6 interagiert (Abb. 16), was frühere Beobachtungen bestätigt (Narazaki et al. 1993; Müller-Newen et al. 1998). IL-6 alleine zeigte keinerlei Bindung an sgp130.

Murines und humanes IL-6 zeigen 42 % Homologie auf Protein-Ebene (Tanabe et al. 1988). Dieser Grad an Homologie führt dazu, daß humanes IL-6 sowohl murinen als auch humanen IL-6R bindet (van Snick 1990); murines IL-6 bindet hingegen nur murinen IL-6R und nicht humanen IL-6R. Es existiert somit eine strikte Speziespezifität auf Seiten des humanen IL-6R gegenüber der Bindung von IL-6. Im Gegensatz dazu zeigten sowohl murines sgp130, als auch humanes sgp130, keinerlei Speziespezifität bei der Interaktion mit dem IL-6/sIL-6R-Komplex (Abb. 16). Murines sgp130Fc und humanes sgp130Fc zeigten in den Präzipitationen identische Bindungseigenschaften. Somit ist humanes sgp130Fc ebensogut für Analysen im Maussystem (z.B. *in vivo* Applikation) geeignet wie murines sgp130Fc und umgekehrt.

1.3 Lösliches gp130 inhibiert spezifisch die IL-6/sIL-6R-induzierte Proliferation

Die Experimente zum Einfluß von sgp130 auf die IL-6- oder IL-6/sIL-6R-induzierte Proliferation von BAF/3-Zellen zeigten klar, daß sgp130 spezifisch IL-6-Antworten inhibiert, die durch sIL-6R-„Transsignaling“ vermittelt werden, während IL-6-Antworten über membranständigen IL-6R unbeeinträchtigt bleiben (Abb. 17, 18). Eine mögliche Erklärung für die selektive Hemmung des „Transsignalings“ durch sgp130 ist in Abb. 34 illustriert. Sobald IL-6 an den membrangebundenen IL-6R auf der Zelloberfläche bindet, lagern sich zwei Moleküle gp130 an den IL-6/IL-6R-Komplex an und stabilisieren diesen Komplex, da die Affinität der Bindung von gp130 an den IL-6/IL-6R-Komplex mit 50 pM (Taga and Kishimoto 1997) deutlich höher ist, als die 1 nM Affinität der Bindung von IL-6 an IL-6R (Yamasaki et al. 1988). Dadurch hat lösliches gp130 aufgrund der sterischen Behinderung keinen Zugang mehr zu dem IL-6/IL-6R-Komplex auf der Zelloberfläche. Da sgp130 keine meßbare Affinität zu IL-6 alleine hat, wird die IL-6-Antwort über membranständigen IL-6R durch sgp130 nicht behindert (Abb. 34A). Der Komplex aus IL-6 mit löslichem IL-6R kann jedoch sowohl membrangebundenes gp130, als auch lösliches gp130 binden. Daher führt ein molarer Überschuß an sgp130 zu kompetitiver Inhibition der sIL-6R-„Transsignaling“-Antwort (Abb. 34B).

Die Tatsache, daß sgp130 ausschließlich IL-6-Antworten inhibiert, die über sIL-6R vermittelt werden, könnte erklären, warum früher beobachtete inhibitorische Effekte von sgp130 auf IL-6-Aktivitäten nur mäßig waren (Narazaki et al. 1993; Müller-Newen et al. 1998). In diesen Studien wurde kein Unterschied zwischen IL-6-Antworten via membrangebundenem und löslichem Rezeptor gemacht.

Das Fc-Fusionsprotein von sgp130 war sehr viel effektiver in der Inhibition der biologischen Aktivität des IL-6/sIL-6R-Komplexes, als sgp130his (Abb. 17). Dafür ist vermutlich der dimere Charakter des sgp130Fc-Proteins verantwortlich. Da der IL-6/sIL-6R-Komplex auch auf Zellen mit zwei gp130-Molekülen interagiert und diese dimerisiert, hat das durch den Fc-Anteil vorgeformte gp130-Dimer möglicherweise mehr Bindungsstellen für den Komplex, und damit eine höhere Affinität, als ein sgp130-Monomer. Die flexible „Hinge-Region“ am Übergang vom Fc-Teil zum fusionierten sgp130 erlaubt anscheinend eine räumliche Anordnung der beiden gp130-Ektodomänen im sgp130Fc, die der zweier gp130-Moleküle im IL-6-Rezeptor-Komplex entspricht oder zumindest nahe kommt.

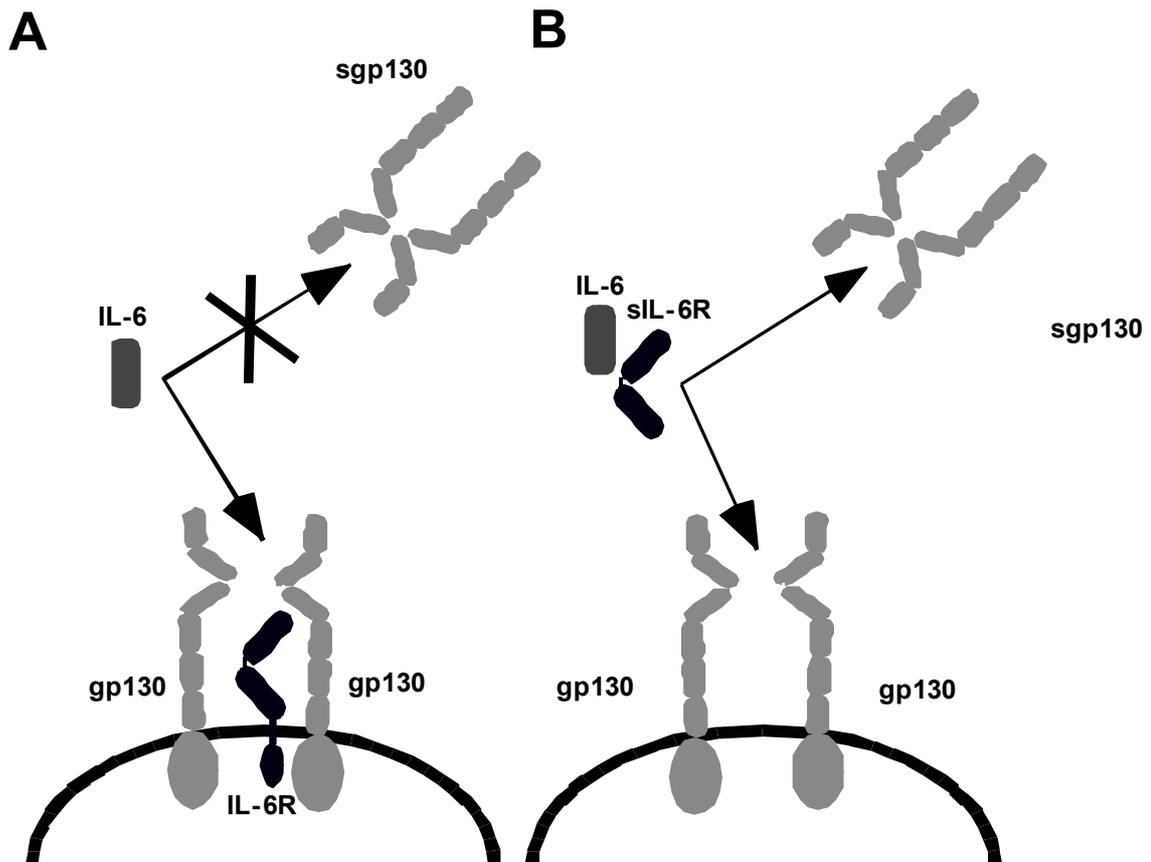


Abb. 34: Schematische Darstellung des Inhibitions-Mechanismus von sgp130

(A) sgp130 hat keinen Zugang zu IL-6 assoziiert mit IL-6R und zwei Molekülen membranständigem gp130. (B) Der IL-6/sIL-6R-Komplex kann sowohl membrangebundenes als auch lösliches gp130 binden. Daher führt ein molarer Überschuss an sgp130 zu kompetitiver Inhibition des IL-6/sIL-6R-Komplexes.

1.4 Die LIF-, OSM- und CNTF-induzierte Proliferation wird durch sgp130 nicht oder nur teilweise gehemmt

Auf Zellen, die neben gp130 auch LIFR und CNTFR exprimieren, zeigte sich, daß gp130 präferentiell sIL-6R-vermittelte Aktivitäten inhibiert, während andere Zytokine der IL-6-Familie (LIF, OSM, CNTF) kaum oder gar nicht durch sgp130 in ihrer biologischen Aktivität beeinträchtigt werden (Abb. 20).

Die schwache Inhibition von OSM- und LIF-vermittelten Antworten durch sgp130, sowie die vollständige Wirkungslosigkeit bei der Blockierung von CNTF-Antworten (Abb. 20), stimmt

gut mit den publizierten Bindungs-Charakteristiken von sgp130 überein. LIF und OSM verwenden zur Signaltransduktion beide ein Heterodimer aus gp130 und LIFR. Dabei interagieren beide direkt mit gp130 und LIFR, ohne Beteiligung einer zusätzlichen Rezeptoruntereinheit, wie etwa IL-6R im Falle von IL-6. Dementsprechend konnte auch eine Bindung von sgp130 an LIF und OSM gezeigt werden (Modrell et al. 1994; Zhang et al. 1998). Die Tatsache, daß verglichen mit H-IL-6, bei LIF und OSM extrem hohe Mengen an sgp130 notwendig sind, um eine teilweise Inhibition hervorzurufen, spiegelt die niedrige Affinität von sgp130 zu LIF und OSM wieder (Zhang et al. 1998). Bei CNTF hingegen, welches ebenfalls via eines gp130/LIFR-Heterodimers signalisiert, allerdings unter Beteiligung des CNTFR, konnte keine Bindung des Liganden an sgp130 nachgewiesen werden (Modrell et al. 1994). Das erklärt, warum sgp130 keinen Effekt, auf die CNTF-induzierte Proliferation von BAF/3 Zellen hat (Abb. 20).

IL-11 und IL-6 verwenden beide ein gp130-Homodimer zur Signaltransduktion. Dabei ist jeweils eine weitere ligandenbindende Untereinheit zur Bildung des signalisierenden Rezeptorkomplexes notwendig. Im Falle des IL-11 handelt es sich dabei um den IL-11-Rezeptor, der wie IL-6R auch in einer löslichen Form vorkommt und im Komplex mit IL-11 gp130-Dimerisierung induziert (Baumann et al. 1996). Man kann daher davon ausgehen, daß sgp130 auch ein Antagonist des IL-11/sIL-11R-Komplexes ist.

Es ist von Interesse, daß es auch eine lösliche Form des LIFR gibt (Zhang et al. 1998). Im Zusammenspiel mit sgp130 könnte löslicher LIFR als potenter Antagonist von LIF und OSM durch die Bildung löslicher trimerer Komplexe wirken. Zusätzlich könnte die Kombination von sgp130 und sLIFR inhibierend auf die Komplexe von CNTF mit sCNTFR, NNT-1 mit sCNTFR, sowie CT-1 mit einem postulierten sCT-1R wirken. Das Verhältnis von sgp130 zu sLIFR könnte somit entscheidend für inhibitorische Effekte auf verschiedene Zytokine der IL-6-Familie sein.

1.5 Lösliches gp130 inhibiert die sIL-6R-abhängige Akute-Phase-Protein-Synthese in humanen Hepatomzellen (HepG2)

Die Ergebnisse aus den Versuchen mit BAF/3-Zellen konnten in einem weiteren Zellsystem bestätigt werden. Die gp130-abhängige Induktion der Akute-Phase-Protein-Synthese in Hepatomzellen (HepG2) wurde von sgp130 nur dann inhibiert, wenn sie über sIL-6R vermittelt wurde (Abb 21, 22). Diese Beobachtung konnte inzwischen auch *in vivo* nachvollzogen werden. In transgenen Mäusen, die sgp130 stark überexprimieren (Betz et al.

1998), ist die durch IL-6/sIL-6R (in Form von H-IL-6) induzierte Akute-Phase-Reaktion der Leber nahezu komplett blockiert, während eine IL-6 induzierte Akute-Phase-Reaktion normal verläuft (Guido Blinn, unveröffentlichte Ergebnisse). Lösliches gp130 ist also ein geeignetes Werkzeug, um zu unterscheiden, welche IL-6-Antworten über sIL-6R-„Transsignaling“ und welche über den membrangebundenen IL-6R vermittelt werden. Das gilt insbesondere für rekombinantes sgp130Fc, da es deutlich effektiver in der selektiven Hemmung des IL-6/sIL-6R-Komplexes ist als monomeres sgp130.

1.6 Der antiapoptotische Effekt von IL-6 auf Lamina propria T-Zellen bei Morbus Crohn wird durch sIL-6R vermittelt und ist durch sgp130 hemmbar

Die Anwendung von sgp130Fc als experimentelles Werkzeug zur Unterscheidung von sIL-6R- und IL-6R-vermittelten IL-6-Antworten erfolgte in einem krankheitsrelevanten System, anhand isolierter Lamina propria mononukleärer Zellen (LPMC) von Morbus Crohn Patienten. Morbus Crohn ist eine chronisch entzündliche Darmerkrankung, bei der eine erhöhte Apoptose-Resistenz der Lamina propria T-Zellen eine Schlüsselrolle zu spielen scheint (Boirivant et al. 1999; Ina et al. 1999). Kürzlich wurde gezeigt, daß eine gp130-Stimulation durch IL-6 einen antiapoptotischen Effekt auf Lamina propria T-Zellen von Morbus Crohn Patienten hat (Atreya et al. 2000).

Um zu untersuchen, ob der antiapoptotische Effekt von IL-6 auf Lamina propria T-Zellen von Morbus Crohn Patienten durch membrangebundenen oder löslichen IL-6R vermittelt wird, wurden Lamina Propria Mononukleäre Zellen (LPMC) von Crohn Patienten isoliert, welche T-Zellen und Monozyten/Makrophagen enthalten und *in vitro* mit sgp130Fc oder einem neutralisierenden IL-6R-Antikörper behandelt. Es zeigte sich, daß sowohl sgp130Fc, als auch der Antikörper, eine Zunahme der Apoptoserate der Zellen induzieren (Abb. 23). Dabei war die Effizienz von sgp130Fc ähnlich hoch, wie die des IL-6R-Antikörpers. Da sgp130Fc selektiv sIL-6R-vermittelte Antworten inhibiert, während der Antikörper löslichen, wie membrangebundenen IL-6R gleichermaßen inhibiert, kann daraus gefolgert werden, daß der antiapoptotische Effekt von IL-6 auf LPMC von Morbus Crohn Patienten durch sIL-6R-„Transsignaling“ vermittelt wird.

Tatsächlich findet man im Serum und in der Darm-Mukosa von Morbus Crohn Patienten erhöhte Konzentrationen von IL-6 und sIL-6R (Mitsuyama et al. 1995; Hosokawa et al. 1999) und LPMC von Morbus Crohn Patienten produzieren hohe Mengen sIL-6R (Atreya et al.

2000). Da die T-Zellen der Lamina propria wenig oder keinen IL-6R auf der Oberfläche exprimieren, im Zuge der Morbus Crohn Erkrankung aber extrem große Mengen IL-6 sekretieren (Atreya et al. 2000), führt die Anwesenheit von sIL-6R zur Stimulation von gp130 auf den T-Zellen und zur Aktivierung von antiapoptotischen Genen wie BCL-2 und BCL-XL (Atreya et al. 2000). Als sIL-6R-produzierende Zellen in der Mukosa von Morbus Crohn Patienten, kommen vor allem gewebspezifische Makrophagen in Frage, von denen man weiß, daß sie sIL-6R von der Oberfläche durch Shedding freisetzen, wenn sie mit C-reaktivem Protein (CRP) stimuliert werden (Jones et al. 1999). Da CRP zu den Akute-Phase-Proteinen zählt, ist ein Szenario denkbar, bei dem eine initiale Entzündung des Darms zur Freisetzung von IL-6 durch Lamina propria T-Zellen und zum Ansteigen des IL-6-Spiegels im Serum führt. In der Leber induziert IL-6 dann die Produktion von Akute-Phase-Proteinen inklusive CRP. Das CRP wiederum stimuliert bei mukosalen Makrophagen die Freisetzung von sIL-6R, wodurch die mukosalen T-Zellen vor Apoptose geschützt werden, was dazu beiträgt, daß die Entzündungsreaktion chronisch wird.

1.7 Die Rolle von sIL-6R und sgp130 bei der Pathogenese weiterer Krankheiten

Neben Morbus Crohn gibt es weitere Krankheiten, die mit erhöhten sIL-6R-Konzentrationen korreliert sind. Dazu zählen systemische Sklerose (Keul et al. 1998) und chronische Arthritis (Hasegawa et al. 1999). Bei rheumatoider Arthritis geht man davon aus, daß erhöhte IL-6- und sIL-6R-Spiegel maßgeblich an der Pathogenese beteiligt sind (Kotake et al. 1996; Alonzi et al. 1998). Zusätzlich wurden in Patienten mit rheumatoider Arthritis kürzlich Autoantikörper gegen sgp130 identifiziert, die neutralisierend wirken (Tanaka et al. 2000). Dadurch wird der pathogene Effekt des IL-6/sIL-6R-Komplexes vermutlich erheblich verstärkt, da der Autoantikörper die inhibitorische Wirkung von sgp130 auf IL-6/sIL-6R zumindest teilweise aufhebt.

Auch sgp130 ist bei verschiedenen Krankheiten dysreguliert. Erhöhte sgp130-Konzentrationen wurden für systemische Sklerose (Hasegawa et al. 1998), multiple Sklerose (Padberg et al. 1999) und bei Melanom Patienten (Montero-Julian et al. 1997) beschrieben.

Um Aussagen über eine Beteiligung von IL-6 an der Pathogenese verschiedener Krankheiten treffen zu können ist also neben der Ermittlung der IL-6-Konzentrationen auch die systematische Bestimmung der Konzentrationen an sIL-6R und sgp130 notwendig, da diese maßgeblich Einfluß auf die Aktivität und das Spektrum potentieller Zielzellen haben.

1.8 Die physiologische Funktion von sgp130

Im Plasma gesunder Personen findet man sgp130-Konzentrationen von 100-300 ng/ml (Narazaki et al. 1993; Diamant et al. 1997; Montero-Julian et al. 1997; Zhang et al. 1998). IL-6 hingegen liegt in Konzentrationen von 1-10 pg/ml vor (Akira et al. 1993), sIL-6R in Konzentrationen von 40-60 ng/ml (Honda et al. 1992). Es gibt also unter physiologischen Bedingungen einen Überschuß an sIL-6R und sgp130. Die systemische Freisetzung von IL-6 führt daher zur Bildung niedrig affiner IL-6/sIL-6R-Komplexe, welche anschließend hochaffin mit sgp130 assoziieren. Dies führt zur Inhibition des agonistischen IL-6/sIL-6R-Komplexes.

Dieser Mechanismus zeigt die physiologische Funktion von sgp130 auf. Alle Zellen des Körpers exprimieren gp130, während nur wenige Zelltypen IL-6R auf der Oberfläche tragen (Taga and Kishimoto 1997). In Abwesenheit von sIL-6R sind nur Zellen responsiv für IL-6, die membrangebundenen IL-6R exprimieren. Im Gegensatz dazu sind alle Zellen potentielle Zielzellen des IL-6/sIL-6R-Komplexes, da sie gp130 exprimieren. Unter diesem Aspekt ist es schwer zu verstehen, wie die Spezifität von IL-6-Antworten aufrechterhalten wird. Da sgp130 spezifisch den IL-6/sIL-6R-Komplex inhibiert, verhindert der sgp130-Überschuß eine systemische Stimulation von Zellen durch den IL-6/sIL-6R-Komplex.

Es kann davon ausgegangen werden, daß IL-6/sIL-6R-„Transsignaling“-Ereignisse hauptsächlich lokal begrenzt auftreten (Peters et al. 1997a), wie zum Beispiel bei der Aktivierung von Endothelzellen zur Rekrutierung von Leukozyten (Romano et al. 1997). Dabei stimulieren periphere Lymphozyten am Ort einer lokalen Entzündungsreaktion Endothelzellen durch IL-6/sIL-6R, Chemokine freizusetzen, welche zur Rekrutierung von Leukozyten aus der Zirkulation zum Entzündungsherd führen. Blicke der Wirkungsbereich des sIL-6R-„Transsignaling“ in diesem Falle nicht lokal begrenzt, wäre nicht gewährleistet, daß nur Endothelzellen in der direkten Umgebung des Entzündungsherdes dazu aktiviert werden, Leukozyten anzulocken. Bei der lokalen Begrenzung von sIL-6R-Aktivitäten spielt sgp130 vermutlich eine Schlüsselrolle. Der sgp130 Überschuß im Serum führt dazu, daß sIL-6R-„Transsignaling“ nur in der unmittelbaren Umgebung der sIL-6R-produzierenden Zellen stattfindet, wo die Konzentration an IL-6/sIL-6R-Komplexen über die inhibitorische Kapazität von sgp130 hinausgeht.

Zu einer systemischen „Transsignaling“-Reaktion würde es nur bei einer signifikanten Verschiebung des Verhältnisses von sIL-6R-Konzentration zu sgp130-Konzentration zugunsten des sIL-6R kommen. Es ist daher notwendig eine systematische Bestimmung der

Spiegel von IL-6, sIL-6R und sgp130 vorzunehmen, um Aussagen über die agonistische Aktivität von IL-6 bei entsprechenden Fragestellungen zu treffen, da eine Veränderung der IL-6-Konzentration durch parallele Modulation der sIL-6R- und sgp130-Konzentrationen erheblich verstärkt oder gehemmt wird. Man sollte daher bei Krankheitsbildern, die mit einer veränderten IL-6-Expression einhergehen, auch eine Beteiligung von sIL-6R und sgp130 überprüfen.

1.9 Das therapeutische Potential von sgp130Fc

Die Induktion der Apoptose von LPMC aus Morbus Crohn Patienten hat gezeigt, daß sgp130Fc ein therapeutisches Potential hat. Mit Hilfe von sgp130Fc können bei Krankheiten wie z.B. Morbus Crohn oder rheumatoider Arthritis, pathogene Mechanismen, die durch sIL-6R vermittelt werden, selektiv inhibiert werden. Inzwischen konnte in Mausmodellen für Morbus Crohn gezeigt werden, daß die Inhibition des sIL-6R-„Transsignaling“ durch sgp130Fc *in vivo* zu einer deutlichen Regression des Krankheitsbildes führt (Atreya et al. 2000). Ein Einsatz von sgp130Fc als Therapeutikum ist also durchaus denkbar. Es gibt bereits Beispiele für therapeutisch wirksame Fc-Fusionsproteine von löslichen Zytokinrezeptoren, die pathogene Zytokinwirkungen inhibieren. Ein Fc-Fusionsprotein des p55-TNF-Rezeptors befindet sich in einer klinischen Studie zur Vorbeugung von Sepsis (Maladorno et al. 1996) und ein Fc-Fusionsprotein des löslichen p75-TNFR ist seit geraumer Zeit unter dem Namen ENBREL als Medikament zur Behandlung von rheumatoider Arthritis zugelassen und erfolgreich im Einsatz (Mori et al. 1996). Zur Zeit laufen verschiedene Studien zum Einsatz von ENBREL bei anderen Krankheiten mit pathogener TNF-Aktivität, wie z.B. chronisch entzündliche Darmerkrankungen. In einem Mausmodell für Morbus Crohn wurde der Effekt von sgp130Fc mit dem neutralisierenden IL-6R- und TNF-Antikörper verglichen (Atreya et al. 2000). In dieser Studie zeigte sgp130Fc die gleiche Effizienz in der Reduktion der Krankheitssymptome, wie die IL-6R- und TNF-Antikörper. Eine kombinierte Applikation von ENBREL und sgp130Fc könnte demnach eine sehr erfolgversprechende Therapie zur Behandlung von Morbus Crohn sein.

Der Fc-Anteil im sgp130Fc Protein entspricht dem in ENBREL verwendeten und zeichnet sich dadurch aus, daß Bindungsstellen für Fc γ -Rezeptoren und Komplement-Komponenten durch gezielte Punktmutationen zerstört wurden (Fanslow et al. 1992, siehe Material und Methoden 1.6). Ungewollte Effektormechanismen wie Komplementaktivierung und Opsonisierung, die durch den Fc-Teil von IgG-1-Antikörpern hervorgerufen werden können, sind durch eine

Behandlung mit sgp130Fc also nicht zu befürchten. Im Falle des sgp130Fc hat der Fc-Anteil vielmehr den entscheidenden Vorteil, daß er eine Dimerisierung von sgp130 bewirkt und damit die Effektivität der IL-6/sIL-6R-Inhibition stark erhöht. Darüberhinaus könnte der Fc-Teil zu einer Erhöhung der Plasma-Halbwertszeit des Proteins führen, wie für ein IL-10-Fc-Fusionsprotein gezeigt wurde (Zheng et al. 1997).

Eine sgp130Fc Produktion in größerem Maßstab für *in vivo* Applikationen ist machbar. Inzwischen wurden stabil transfizierte Säugerszelllinien generiert, die kontinuierlich sgp130Fc exprimieren und sezernieren (N. Voltz und J. Müllberg, nicht publizierte Ergebnisse).

2. Virales IL-6 stimuliert humanes gp130 IL-6R-unabhängig

Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit wurden Untersuchungen zur Wirkungsweise und Rezeptorzusammensetzung des vom Karposi Sarkom assoziierten Herpesvirus (KSHV) kodierten viralen IL-6 durchgeführt. Virales IL-6 zeigt biologische Aktivitäten, die denen des humanem IL-6 entsprechen und trägt möglicherweise entscheidend zur Pathogenese KSHV-assoziiierter Krankheiten wie multiplen Myelomen und primären Effusions Lymphomen bei.

Es konnte gezeigt werden, daß gp130 an der Signaltransduktion von vIL-6 beteiligt ist, während eine mögliche Beteiligung des IL-6R bei der gp130-Stimulation durch virales IL-6 kontrovers diskutiert wird (siehe Einleitung). Eine Bindung von vIL-6 an IL-6R oder gp130 konnte noch nicht nachgewiesen werden. In der vorliegenden Arbeit wurden unter Verwendung rekombinanter Proteine Studien zu Protein-Protein-Interaktionen von vIL-6 mit IL-6R und gp130 vorgenommen und in geeigneten Zellsystemen die Beteiligung des IL-6R an der Vermittlung von vIL-6-Aktivitäten überprüft.

2.1 Expression und Aufreinigung von vIL-6

Virales IL-6 wurde in Säugerszellen exprimiert und aus dem Kulturmedium aufgereinigt. Ein COOH-terminales Histidin-Hexamer erlaubte die Aufreinigung durch Nickel-Affinitätschromatographie.

Die Säugerszellexpression hatte den Vorteil, daß das so generierte vIL-6 am ehesten der physiologisch auftretenden Form entspricht. Bakteriell exprimierte Proteine bleiben unglykosyliert und sind häufig nicht oder falsch gefaltet, da keine Disulfidbrücken angelegt

werden. Bakteriell exprimiertes humanes IL-6 muß z. B. durch einen langen Dialyseprozeß in einem chaotropen Reagenz mit einem Redoxsystem langsam zurückgefaltet werden um korrekte Disulfidbrücken-Bindungen zu erhalten.

Das transient in COS-7-Zellen exprimierte vIL-6 zeigte einen hohen Reinheitsgrad und liegt vermutlich in zwei differentiell glykosylierten Isoformen vor (Abb. 24).

2.2 Virales IL-6 interagiert direkt mit gp130

Eine zentrale Fragestellung dieser Arbeit war, ob es eine direkte Interaktion von vIL-6 mit gp130 gibt. In Immunpräzipitationen mit sgp130Fc konnte vIL-6 kopräzipitiert werden (Abb. 25), d. h. vIL-6 bindet, anders als humanes IL-6, direkt an die extrazelluläre Domäne von gp130. Im Gegensatz dazu konnte vIL-6 nicht mit sIL-6Rfc kopräzipitiert werden, d. h. vIL-6 bindet nicht oder nur niedrigaffin an IL-6R. Somit hat vIL-6 andere Bindungseigenschaften als humanes IL-6, welches an IL-6R bindet und in Abwesenheit von IL-6R nicht mit gp130 interagiert (Abb. 26A). Virales IL-6 zeigt vielmehr Bindungseigenschaften, die denen des IL-6/sIL-6R-Komplexes oder H-IL-6 entsprechen (Abb. 26B), auch wenn die Affinität der gp130 Bindung von vIL-6 deutlich niedriger zu sein scheint, als die von H-IL-6 (Abb. 25 und 26).

Die Tatsache, daß vIL-6 und IL-6/sIL-6R (H-IL-6) um die Bindung von gp130 konkurrieren, deutet darauf hin, daß vIL-6 und IL-6/sIL-6R möglicherweise an identischen Kontaktstellen mit gp130 interagieren. Inzwischen konnte ein Komplex aus vIL-6 mit den drei NH₂-terminalen gp130-Domänen kristallisiert und die Röntgenstruktur analysiert werden (Chow et al. 2001). Der Komplex besteht aus zwei Molekülen vIL-6 und zwei Molekülen gp130. Dabei interagieren die vIL-6-Bereiche mit gp130, die den „Sites“ II und III des humanen IL-6 entsprechen (vgl. Abb 3). Wenn (s)IL-6R an „Site“ I des humanen IL-6 gebunden ist, sind „Site“ II und III die Interaktionsstellen des humanen IL-6 mit gp130 (Grötzinger et al. 1997). Demnach entsprechen die gp130-Kontaktstellen von vIL-6 denen des humanen IL-6 im IL-6/(s)IL-6R-Komplex.

2.3 Die Induktion der Proliferation durch vIL-6 ist IL-6R-unabhängig

Nach dem Nachweis der direkten Bindung von vIL-6 an gp130 wurde untersucht, ob vIL-6 Zellen stimulieren kann, die keinen IL-6R exprimieren. In Übereinstimmung mit den Studien von Molden et al. (Molden et al. 1997), in denen gezeigt wurde, daß die Stimulation von gp130-exprimierenden BAF/3-Zellen in Abwesenheit des IL-6R zur Aktivierung von STAT-

Proteinen führt, konnte in der vorliegenden Arbeit nachgewiesen werden, daß die Induktion der Proliferation von BAF/3-Zellen durch vIL-6 unabhängig vom IL-6R erfolgt (Abb 28). Die Anwesenheit von IL-6R auf der Oberfläche von gp130-exprimierenden BAF/3-Zellen hat keinen Einfluß auf die vIL-6-induzierte Proliferation der Zellen (Abb. 28 und 29). Virales IL-6 zeigt auf BAF/3-Zellen die gleichen Eigenschaften wie der IL-6/sIL-6R-Komplex, allerdings mit einer deutlich niedrigeren biologischen Aktivität.

Diese Ergebnisse stehen im Widerspruch zu den kürzlich von Burger et al. publizierten Daten (Burger et al. 1998). Darin wird gezeigt, daß die vIL-6-induzierte Proliferation von IL-6-responsiven, humanen Myelom-Zellen durch einen IL-6R-Antagonisten teilweise inhibiert wird. Der verwendete Antagonist entfaltet seine Wirkung durch Okkupation des IL-6R, daher wurde gefolgert, daß der IL-6R an der Vermittlung der vIL-6-Antwort beteiligt ist.

Der Antagonist bewirkte nur eine teilweise Inhibition und es wurde bakteriell exprimiertes vIL-6 verwendet, welches 40fach weniger aktiv ist, als das in der vorliegenden Arbeit verwendete vIL-6his aus Säugerzellen. Darüber hinaus wurde die Faltung des bakteriell exprimierten vIL-6 nicht überprüft (Burger et al. 1998). Es kann daher nicht ausgeschlossen werden, daß ungefaltetes oder falsch gefaltetes vIL-6 die Ergebnisse der Arbeit von Burger et al. beeinflußt hat und daß die Unterschiede in den experimentellen Systemen begründet sind.

2.4 Die vIL-6-induzierte Proliferation wird durch gp130-Aktivierung vermittelt

Die Tatsache, daß sowohl gp130Fc (Abb. 30) als auch ein neutralisierender gp130-Antikörper (Abb. 31) dosisabhängig die vIL-6 induzierte Proliferation von BAF/gp130-Zellen inhibiert, zeigt, daß vIL-6 seine Aktivität auf den Zellen über gp130 entfaltet. Auch hier verhält sich vIL-6 so wie der IL-6/sIL-6R-Komplex, der ebenfalls inhibiert wird. Humanes IL-6 hingegen wird durch gp130Fc nicht in seiner Aktivität beeinträchtigt (Abb. 18).

Da BAF/3-Zellen, die kein gp130 exprimieren, weder nach vIL-6-Stimulation, noch nach H-IL-6-Stimulation proliferieren (Hoischen et al. 2000), kann man davon ausgehen, daß gp130 alleine als Rezeptorprotein auf der Zelloberfläche ausreicht, um ein vIL-6-Signal zu vermitteln.

Somit aktiviert vIL-6 Zellen vermutlich genauso wie der IL-6/sIL-6R-Komplex durch direkte Bindung an gp130 und anschließende Homodimerisierung von gp130. Damit ist vIL-6 das erste und bisher einzige Zytokin, daß direkt gp130 binden und aktivieren kann. Alle weiteren

Zytokine der IL-6-Familie benötigen mindestens eine weitere Rezeptoruntereinheit zur Signaltransduktion (Abb. 7).

2.5 Die Aktivierung von humanen Hepatomzellen (HepG2) durch vIL-6 erfolgt durch direkte Stimulation von gp130

Die in den Proliferationsassays mit BAF/3-Zellen erhaltenen Ergebnisse bestätigten sich bei der Analyse der vIL-6-induzierten Akute-Phase-Protein-Synthese von humanen Hepatomzellen (HepG2). Eine Stimulation mit vIL-6 führt bei IL-6R-exprimierenden HepG2 und nicht-IL-6R-exprimierenden HepG2/IL-6-Zellen gleichermaßen zur Sekretion von Antichymotrypsin und war durch sgp130Fc teilweise inhibierbar (Abb. 32). Virales IL-6 und IL-6/sIL-6R zeigten auch auf diesen Zellen übereinstimmende Eigenschaften. Humanes IL-6 hingegen induzierte nur in IL-6R-exprimierenden HepG2 Zellen die Synthese von Akute-Phase-Proteinen.

Der Anwesenheit neutralisierender gp130-Antikörper führte bei HepG2/IL-6-Zellen zur Inhibition der vIL-6- und H-IL-6-induzierten STAT3-Phosphorylierung (Abb. 33). Analog zu den Ergebnissen mit BAF/3-Zellen ist damit gezeigt, daß die biologische Aktivität von vIL-6 auf HepG2-Zellen durch gp130 vermittelt wird.

2.6 Die Rolle von vIL-6 in der Pathogenese von KSHV-assoziierten Krankheiten

KSHV Infektionen sind oft mit hämatologischen Fehlfunktionen wie primäres Effusions Lymphom und Castlemann'sche Krankheit assoziiert (Cesarman et al. 1995; Soulier et al. 1995; Nador et al. 1996; Staskus et al. 1999). Darüber hinaus wird nach wie vor über eine Assoziation von KSHV mit multiplen Myelomen diskutiert (Rettig et al. 1997; Berenson and Vescio 1999; Tarte et al. 1999). Interessanterweise wurde bei allen diesen Krankheiten eine pathogene Rolle für humanes IL-6 demonstriert (Akira et al. 1993), so daß es naheliegt, daß vIL-6 ebenfalls an der Pathogenese dieser Krankheiten beteiligt ist.

Darüberhinaus wurde gezeigt, daß hämatopoetische Vorläuferzellen nur in Anwesenheit von sIL-6R responsiv für IL-6 sind (Sui et al. 1995; Peters et al. 1997b; Peters et al. 1998; Peters et al. 2001) und in transgenen Mäusen, die IL-6 und sIL-6R überexprimieren, beobachtete man eine erhöhte und beschleunigte Entwicklung von Plasmazytomen (Schirmacher et al. 1998). Da vIL-6, wie IL-6/sIL-6R direkt gp130 stimuliert, kann man davon ausgehen, daß

vIL-6 und IL-6/sIL-6R ähnliche oder identische Wirkungen zeigen. Eine Stimulation von hämatopoetischen Zellen durch vIL-6 könnte also durchaus zur Entwicklung einer proliferativen Disregulationen bei der Hämatopoese beitragen.

Diese Ansicht wird durch Daten von Aoki et al. (Aoki et al. 1999) unterstützt, die zeigen, daß die Injektion vIL-6 exprimierender Zellen in Mäusen eine starke extramedulläre Hämatopoese induziert, wie sie auch bei transgenen Mäusen, die IL-6 und sIL-6R überexprimieren auftritt (Peters et al. 1996). Darüberhinaus wird in den Mäusen, die vIL-6-exprimierende Fibroblasten beherbergen eine verstärkte Angiogenese beobachtet (Aoki et al. 1999).

Ein weiterer Zelltyp, der nur in Anwesenheit des sIL-6R responsiv für IL-6 ist, sind glatte Muskelzellen (Klouche et al. 1999). Auch bei diesen Zellen entfaltet vIL-6 die gleiche Aktivität wie der IL-6/sIL-6R-Komplex und aktiviert die glatten Muskelzellen Chemokine zu produzieren (Müllberg et al. 2000). Dieser Effekt von vIL-6 und Wirkungen viral kodierter Chemokine könnten an der für Karposi Sarkome thypischen Infiltration mit entzündlichen Zellen beteiligt sein.

Zusammengefaßt kann man sagen, daß eine Beteiligung des von KSHV-infizierten Zellen sezernierten vIL-6 an der Pathophysiologie von KSHV-assoziierten Krankheiten wahrscheinlich ist. Unter diesem Aspekt zeigt sich erneut ein therapeutisches Potential von sgp130Fc, da dieses zu einer kompletten Inhibition der vIL-6-Aktivität führte, ohne die biologische Aktivität von IL-6 über membrangebundenen IL-6R zu beeinflussen. Sgp130Fc ist somit vermutlich geeignet, pathogene Effekte von vIL-6 bei KSHV-assoziierten Krankheiten gezielt zu hemmen.

V. Zusammenfassung

Interleukin-6 (IL-6) ist ein pleiotropes Zytokin, das Zielzellen durch Bindung an den Interleukin-6-Rezeptor (IL-6R) und anschließende Homodimerisierung des Signaltransduktors gp130 aktiviert. Gp130 ist auch in den Rezeptor-Komplexen aller anderen IL-6-artigen Zytokine enthalten und wird ubiquitär exprimiert, während die IL-6R-Expression hauptsächlich auf Monozyten und Hepatozyten beschränkt ist. IL-6 alleine kann nur Zellen aktivieren, die IL-6R exprimieren, der Komplex aus IL-6 und einer löslichen Form des IL-6R (sIL-6R) kann jedoch gp130 auf Zellen dimerisieren und aktivieren, die keinen IL-6R auf der Zelloberfläche tragen („Transsignaling“). Auch von gp130 gibt es eine lösliche Form (sgp130), die in ternären Komplexen mit sIL-6R und IL-6 vorliegen kann.

Um Funktionen von sgp130 zu untersuchen, wurden rekombinante Versionen von sgp130 konstruiert, exprimiert und aufgereinigt. Die rekombinanten sgp130 Proteine binden den Komplex aus IL-6 und sIL-6R. Dabei gibt es keine Speziesrestriktionen zwischen Maus und Mensch bei der Interaktion von sgp130 mit IL-6/sIL-6R.

Die sgp130 Proteine inhibieren die IL-6/sIL-6R-induzierte Proliferation von gp130-exprimierenden BAF/3-Zellen, während die IL-6-induzierte Proliferation von BAF/3-Zellen, die gp130 und membrangebundenen IL-6R exprimieren, nicht inhibiert wird. In sehr hohen Konzentrationen führt sgp130 zu einer teilweisen Inhibition der LIF- und OSM-induzierten Proliferation; die CNTF-induzierte Proliferation wird nicht inhibiert.

Auch auf die IL-6-induzierte Akute-Phase-Protein-Synthese in humanen Hepatomzellen (HepG2) hat sgp130 nur dann einen inhibitorischen Effekt, wenn das IL-6-Signal durch sIL-6R vermittelt wird. Lösliches gp130 inhibiert demnach selektiv sIL-6R-„Transsignaling“-Antworten und hat keinen Einfluß auf IL-6-Antworten, die über membrangebundenen IL-6R vermittelt werden.

Rekombinantes sgp130 konnte darüber hinaus verwendet werden, um den antiapoptotischen Effekt von IL-6 auf Lamina Propria Mononukleäre Zellen von Morbus Crohn Patienten zu inhibieren. Daraus läßt sich ableiten, daß der antiapoptotische Effekt von IL-6 bei Morbus Crohn über sIL-6R vermittelt wird.

Aus den vorliegenden Ergebnissen kann geschlossen werden, daß sgp130 der natürliche Inhibitor von sIL-6R-vermittelten IL-6-Antworten ist. Rekombinantes sgp130, insbesondere als Fc-Fusionsprotein, kann therapeutisch genutzt werden, um spezifisch Pathomechanismen zu hemmen, an denen sIL-6R-„Transsignaling“ beteiligt ist, z.B. bei Morbus Crohn.

Auch bei Erkrankungen, die mit Virusinfektionen assoziiert sind, kann IL-6 eine Rolle bei der Pathogenese spielen. Bei Krankheiten, die mit dem Karposi Sarkom assoziierten Herpesvirus (KSHV) in Verbindung gebracht werden, wie primäres Effusions Lymphom und der Castlemann'schen Krankheit wurde eine Beteiligung von humanem IL-6 nachgewiesen. Das Genom von KSHV kodiert interessanterweise für Proteine mit Ähnlichkeiten zu Zytokinen und Chemokinen, inklusive eines Homologons zu humanem IL-6.

Für dieses virale IL-6 (vIL-6) wurde gezeigt, daß es IL-6-abhängige Zellen stimuliert, was auf eine Verwendung des IL-6R-Systems hindeutet und für eine Beteiligung von vIL-6 an der Pathogenese KSHV-assoziiierter Krankheiten spricht.

Während über die Frage der Beteiligung von gp130 an der Signaltransduktion von vIL-6 Einigkeit herrscht, gibt es eine kontroverse Diskussion über Frage, ob der IL-6R an der Signaltransduktion beteiligt ist oder nicht.

Um diese Frage zu klären und um zu untersuchen, ob vIL-6 direkt an IL-6R oder gp130 bindet, wurden Immunpräzipitationen mit radioaktiv markiertem vIL-6 durchgeführt. Dabei zeigte vIL-6 eine direkte Interaktion mit rekombinantem gp130, nicht jedoch mit IL-6R.

Die biologische Aktivität von vIL-6 ist IL-6R-unabhängig. Es gibt keinen Unterschied in der Effektivität von vIL-6 bei der Stimulation der Proliferation von BAF/3-Zellen die nur gp130 (BAF/gp130) oder gp130 und IL-6R exprimieren (BAF/gp130/IL-6R). Sowohl rekombinantes sgp130, als auch neutralisierende Antikörper gegen gp130 haben einen inhibitorischen Effekt auf die vIL-6-induzierte Proliferation der BAF/3 Zellen, dies zeigt, daß die vIL-6 Stimulation über gp130 vermittelt wird.

Ähnliche Ergebnisse wurden in Versuchen mit humanen Hepatomzellen (HepG2) erzielt. Die Induktion der Akute-Phase-Protein-Synthese durch vIL-6 und die vIL-6-induzierte Phosphorylierung von STAT3 in HepG2-Zellen ist IL-6R-unabhängig und durch sgp130 bzw. gp130-Antikörper hemmbar.

Diese Ergebnisse demonstrieren, daß vIL-6 das erste bekannte Zytokin ist, welches direkt gp130 binden und aktivieren kann. Virales IL-6 verhält sich also wie der Komplex aus IL-6 und sIL-6R und kann spezifisch durch rekombinantes sgp130 inhibiert werden.

VI. Literaturverzeichnis

- Akira, S., Y. Nishio, M. Inoue, X. J. Wang, S. Wei, T. Matsusaka, K. Yoshida, T. Sudo, M. Naruto 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.
- Akira, S., T. Taga and T. Kishimoto (1993). "Interleukin-6 in biology and medicine." *Adv Immunol* **54**: 1-78.
- Alonzi, T., E. Fattori, D. Lazzaro, P. Costa, L. Probert, G. Kollias, F. De Benedetti, V. Poli, G. Ciliberto (1998). "Interleukin 6 is required for the development of collagen-induced arthritis" *J Exp Med* **187**(4): 461-68
- Andus, T., T. Geiger, T. Hirano, H. Northoff, U. Ganter, J. Bauer, T. Kishimoto 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.
- Aoki, Y., E. S. Jaffe, Y. Chang, K. Jones, J. Teruya-Feldstein, P. S. Moore and G. Tosato (1999). "Angiogenesis and hematopoiesis induced by Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-encoded interleukin-6." *Blood* **93**: 4034-4043.
- Arcone, R., P. Pucci, F. Zappacosta, V. Fontaine, A. Malorni, G. Marino and G. Ciliberto (1991). "Single-step purification and structural characterization of human interleukin-6 produced in Escherichia coli from a T7 RNA polymerase expression vector." *Eur. J. Biochem.* **198**(3): 541-7.
- Atreya, R., J. Mudter, S. Finotto, J. Müllberg, T. Jostock, S. Wirtz, M. Schütz, B. Bartsch, M. Holtmann, C. Becker, D. Strand, J. Czaja, J. F. Schlaak, H. A. Lehr, F. Autschbach, G. Schürmann, N. Nishimoto, K. Yoshizaki, H. Ito, T. Kishimoto, P. R. Galle, S. Rose-John and M. F. Neurath (2000). "Blockade of IL-6 transsignaling abrogates established experimental colitis in mice by suppression of the antiapoptotic resistance of lamina propria T cells." *Nature Med.* **6**: 583-588.
- Audet, J., C.L. Miller, S. Rose-John, J.M. Piret, C.J. Eaves (2001). "Distinct role of gp130 activation in promoting self-renewal divisions by mitogenically stimulated murine hematopoietic stem cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **98**(4): 1757-62
- Baumann, H., V. Onorato, J. Gauldie and G. P. Jahreis (1987). "Distinct sets of acute phase plasma proteins are stimulated by separate human hepatocyte-stimulating factors and monokines in rat hepatoma cells." *J. Biol. Chem.* **262**(20): 9756-68.

- Baumann, H. and J. Gauldie (1990). "Regulation of hepatic acute phase plasma protein genes by hepatocyte stimulating factors and other mediators of inflammation." *Mol Biol Med* **7**(2): 147-59.
- Baumann, H. and P. Schendel (1991). "Interleukin-11 regulates the hepatic expression of the same plasma protein genes as interleukin-6." *J. Biol. Chem.* **266**(30): 20424-7.
- Baumann, H., Y. Wang, K. K. Morella, C. F. Lai, H. Dams, D. J. Hilton, R. G. Hawley and A. Mackiewicz (1996). "Complex of the soluble IL-11 receptor and IL-11 acts as IL-6-type cytokine in hepatic and nonhepatic cells." *J. Immunol.* **157**(1): 284-90.
- Bazan, J. F. (1990a). "Haemopoietic receptors and helical cytokines." *Immunol Today* **11**(10): 350-4.
- Bazan, J. F. (1990b). "Shared architecture of hormone binding domains in type I and II interferon receptors [letter]." *Cell* **61**(5): 753-4.
- Bazan, J. F. (1990c). "Structural design and molecular evolution of a cytokine receptor superfamily." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**(18): 6934-8.
- Bazan, J. F. (1991). "Neuropoietic cytokines in the hematopoietic fold." *Neuron* **7**(2): 197-208.
- Berenson, J. R. and R. A. Vescio (1999). "HHV-8 is present in multiple myeloma patients." *Blood* **93**: 3157-3159.
- Betz, U. A. K., W. Bloch, M. van den Broek, K. Yoshida, T. Taga, T. Kishimoto, K. Addicks, K. Rajewsky and W. Muller (1998). "Postnatally induced inactivation of gp130 in mice results in neurological, cardiac, hematopoietic, immunological, hepatic, and pulmonary defects." *J. Exp. Med.* **188**: 1955-1965.
- Boirivant, M., M. Marini, G. Di Felice, A. M. Pronio, C. Montesani, R. Tersigni and W. Strober (1999). "Lamina propria T cells in Crohn's disease and other gastrointestinal inflammation show defective CD2 pathway-induced apoptosis." *Gastroenterology* **116**: 557-565.
- Bonni, A., Y. Sun, M. Nadal Vicens, A. Bhatt, D. A. Frank, I. Rozovsky, N. Stahl, G. D. Yancopoulos and M. E. Greenberg (1997). "Regulation of gliogenesis in the central nervous system by the JAK-STAT signaling pathway." *Science* **278**(5337): 477-83.
- Boulton, T. G., N. Stahl and G. D. Yancopoulos (1994). "Ciliary neurotrophic factor/leukemia inhibitory factor/interleukin 6/oncostatin M family of cytokines induces tyrosine phosphorylation of a common set of proteins overlapping those induced by other cytokines and growth factors." *J. Biol. Chem.* **269**(15): 11648-55.

- Brakenhoff, J. P., M. Hart, E. R. De Groot, F. Di Padova and L. A. Aarden (1990). "Structure-function analysis of human IL-6. Epitope mapping of neutralizing monoclonal antibodies with amino- and carboxyl-terminal deletion mutants." *J. Immunol.* **145**(2): 561-8.
- Brandt, S. J., D. M. Bodine, C. E. Dunbar and A. W. Nienhuis (1990). "Dysregulated interleukin 6 expression produces a syndrome resembling Castleman's disease in mice." *J Clin Invest* **86**(2): 592-9.
- Burger, R., F. Neipel, B. Fleckenstein, R. Savino, G. Ciliberto, J. R. Kalden and M. Gramatzki (1998). "Human herpesvirus type 8 interleukin-6 homologue is functionally active on human myeloma cells." *Blood* **91**(6): 1858-63.
- Cesarman, E., Y. Chang, P. S. Moore, J. W. Said and D. M. Knowles (1995). "Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-related body-cavity-based lymphomas." *N Engl J Med* **332**(18): 1186-91.
- Chang, Y., E. Cesarman, M. S. Pessin, F. Lee, J. Culpepper, D. M. Knowles and P. S. Moore (1994). "Identification of herpesvirus-like DNA sequences in AIDS-associated Kaposi's sarcoma." *Science* **266**: 1865-1869.
- Chang, Y. and P. S. Moore (1996). "Kaposi's Sarcoma (KS)-associated herpesvirus and its role in KS." *Infect Agents Dis* **5**(4): 215-22.
- Chebath, J., D. Fischer, A. Kumar, J. W. Oh, O. Kolett, T. Lapidot, M. Fischer, S. Rose-John, A. Nagler, S. Slavin and M. Revel (1997). "Interleukin-6 receptor-interleukin-6 fusion proteins with enhanced interleukin-6 type pleiotropic activities." *Eur. Cytokine Netw.* **8**: 359-365.
- Chow, D. C., X. L. He, A.L. Snow, S. Rose-John, K. C. Garcia (2001). "Structure of an extracellular gp130-cytokine receptor signalling complex." *Science*, in press
- De Vos, A. M., M. Ultsch and A. A. Kossiakoff (1992). "Human growth hormone and extracellular domain of its receptor: crystall structure and of the complex." *Science* **255**: 306-312.
- Diamant, M., K. Rieneck, N. Mechti, X. G. Zhang, M. Svenson, K. Bendtzen and B. Klein (1997). "Cloning and expression of an alternatively spliced mRNA encoding a soluble form of the human interleukin-6 signal transducer gp130." *FEBS Lett* **412**(2): 379-84.
- Ehlers, M., J. Grötzinger, F. D. de Hon, J. Müllberg, J. P. Brakenhoff, A. Wollmer and S. Rose-John (1995). "Residues 77-95 of the human interleukin-6 protein are responsible for receptor binding and residues 41-56 for signal transduction." *Ann N Y Acad Sci* **762**: 400-2.

- Elson, G. C., E. Lelievre, C. Guillet, S. Chevalier, H. Plun-Favreau, J. Froger, I. Suard, A. B. de Coignac, Y. Delneste, J. Y. Bonnefoy, J. F. Gauchat and H. Gascan (2000). "CLF associates with CLC to form a functional heteromeric ligand for the CNTF receptor complex." *Nat. Neurosci.* **3**: 867-872.
- Fanslow, W. C., D. M. Anderson, K. H. Grabstein, E. A. Clark, D. Cosman and R. J. Armitage (1992). "Soluble forms of CD40 inhibit biologic responses of human B cells." *J. Immunol.* **149**(2): 655-60.
- Ferrara, N., J. Winer 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.
- Fischer, M., J. Goldschmitt, C. Peschel, K. J. Kallen, J. P. J. Brakenhoff, A. Wollmer, J. Grötzinger and S. Rose-John (1997). "A Designer Cytokine with High Activity on Human Hematopoietic Progenitor Cells." *Nature Biotech.* **15**: 142-145.
- Fourcin, M., S. Chevalier, J. J. Lebrun, P. Kelly, A. Pouplard, J. Wijdenes and H. Gascan (1994). "Involvement of gp130/interleukin-6 receptor transducing component in interleukin-11 receptor." *Eur J. Immunol.* **24**(1): 277-80.
- Garman, R. D., K. A. Jacobs, S. C. Clark 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.
- Gauldie, J., C. Richards, D. Harnish, P. Lansdorp 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.
- Gearing, D. P., C. J. Thut, T. VandeBos, S. D. Gimpel, P. B. Delaney, J. King, V. Price, D. Cosman and M. P. Beckmann (1991). "Leukemia inhibitory factor receptor is structurally related to the IL-6 signal transducer, gp130." *EMBO J.* **10**(10): 2839-48.
- Gearing, D. P. and A. G. Bruce (1992a). "Oncostatin M binds the high-affinity leukemia inhibitory factor receptor." *New Biol* **4**(1): 61-5.
- Gearing, D. P., M. R. Comeau, D. J. Friend, S. D. Gimpel, C. J. Thut, J. McGourty, K. K. Brasher, J. A. King, S. Gillis, B. Mosley and et al. (1992b). "The IL-6 signal transducer, gp130: an oncostatin M receptor and affinity converter for the LIF receptor." *Science* **255**(5050): 1434-7.

- Giri, J. G., M. Ahdieh, J. Eisenman, K. Shanebeck, K. Grabstein, S. Kumaki, A. Namen, L. S. Park, D. Cosman and D. Anderson (1994). "Utilization of the beta and gamma chains of the IL-2 receptor by the novel cytokine IL-15." *EMBO J.* **13**(12): 2822-30.
- Gross, V., T. Andus, J. Castell, D. Vom Berg, P. C. Heinrich and W. Gerok (1989). "O- and N-glycosylation lead to different molecular mass forms of human monocyte interleukin-6." *FEBS Lett.* **247**(2): 323-6.
- Grötzinger, J., G. Kurupkat, A. Wollmer, M. Kalai and S. Rose-John (1997). "The family of the IL-6-type cytokines: Specificity and Promiscuity of the Receptor Complexes." *Proteins: Structure, Function, and Genetics* **27**: 96-109.
- Hack, C. E., E. R. De Groot and R. J. F. Felt-Bersma (1989). "Increased plasma levels of interleukin-6 in sepsis." *Blood* **74**: 1704-1710.
- Haegeman, G., J. Content, G. Volckaert, R. Derynck, J. Tavernier and W. Fiers (1986). "Structural analysis of the sequence coding for an inducible 26-kDa protein in human fibroblasts." *Eur J Biochem* **159**(3): 625-32.
- Hasegawa, M., S. Sato, M. Fujimoto, H. Ihn, K. Kikuchi and K. Takehara (1998). "Serum levels of interleukin 6 (IL-6), oncostatin M, soluble IL-6 receptor, and soluble gp130 in patients with systemic sclerosis." *J Rheumatol* **25**(2): 308-13.
- Hasegawa, M., S. Sato, H. Ihn and K. Takehara (1999). "Enhanced production of interleukin-6 (IL-6), oncostatin M and soluble IL-6 receptor by cultured peripheral blood mononuclear cells from patients with systemic sclerosis." *Rheumatology* **38**: 612-617.
- Heinrich, P. C., J. V. Castell and T. Andus (1990). "Interleukin-6 and the acute phase response." *Biochem. J.* **265**(3): 621-36.
- Heinrich, P. C., G. Dufhues, S. Flohe, F. Horn, E. Krause, A. Krüttgen, L. Legres, D. Lenz, C. Lütticken, H. Schooltink, T. Stoyan, H. S. Conradt and S. Rose-John (1991). Interleukin-6, its hepatic receptor and the acute phase response of the liver. *Molecular Aspects of Inflammation*. L. F. H. Sies, G. Zimmer. Berlin, Heidelberg, New York, Springer-Verlag: 129-145.
- Hermann, E., B. Fleischer, W.-J. Mayet, T. Poralla and K.-H. Meyer zum Büschenfelde (1989). "Correlation of synovial fluid interleukin 6 (IL-6) activities with IgG concentrations in patients with inflammatory joint disease and osteoarthritis." *Clin. Exp. Rheumatol.* **7**: 411-414.
- Hibi, M., M. Murakami, M. Saito, T. Hirano, T. Taga and T. Kishimoto (1990). "Molecular cloning and expression of an IL-6 signal transducer, gp130." *Cell* **63**(6): 1149-57.

- Hibi, M., K. Nakajima and T. Hirano (1996). "IL-6 cytokine family and signal transduction: a model of the cytokine system." *J Mol Med* **74**: 1-12.
- Hirano, T., K. Yasukawa, H. Harada, T. Taga, Y. Watanabe, T. Matsuda, S. Kashiwamura, K. Nakajima, K. Koyama, A. Iwamatsu, S. Tsunasawa, F. Sakiyama, H. Matsui, Y. Takahara, T. Taniguchi and T. Kishimoto (1986). "Complementary DNA for a novel human interleukin (BSF-2) that induces B lymphocytes to produce immunoglobulin." *Nature* **324**(6092): 73-6.
- Hoischen, S. H., P. Vollmer, P. März, S. Özbek, K. Götze, T. Jostock, T. Geib, J. Müllberg, S. Mechttersheimer, M. Fischer, J. Grötzinger, P. R. Galle and S. Rose-John (2000). "Human Herpesvirus 8 Interleukin-6 Homologue triggers gp130 on neuronal and hematopoietic cells." *Eur. J. Biochem.* **267**: 3604-3612.
- Honda, M., S. Yamamoto, M. Cheng, K. Yasukawa, H. Suzuki, T. Saito, Y. Osugi, T. Tokunaga and T. Kishimoto (1992). "Human soluble IL-6 receptor: its detection and enhanced release by HIV infection." *J. Immunol.* **148**: 2175-2180.
- Horii, Y., A. Muraguchi, M. Iwano, T. Matsuda, T. Harayama, H. Yamada, Y. Fujii, K. Dohi, H. Ishikawa, Y. Ohmoto, K. Yoshizaki, T. Hirano and T. Kishimoto (1989). "Involvement of interleukin-6 in mesangial proliferative glomerulonephritis." *J. Immunol.* **143**: 3949-3955.
- Horiuchi, S., Y. Koyanagi, Y. Zhou, H. Miyamoto, Y. Tanaka, M. Waki, A. Matsumoto, M. Yamamoto and N. Yamamoto (1994). "Soluble interleukin-6 receptors released from T cell or granulocyte/macrophage cell lines and human peripheral blood mononuclear cells are generated through an alternative splicing mechanism." *Eur. J. Immunol.* **24**(8): 1945-8.
- Horsten, U., H. Schmitz-Van de Leur, J. Müllberg, P. C. Heinrich and S. Rose-John (1995). "The membrane distal half of gp130 is responsible for the formation of a ternary complex with IL-6 and the IL-6 receptor." *FEBS Lett.* **360**(1): 43-46.
- Hosokawa, T., K. Kusugami, K. Ina, T. Ando, M. Shinoda, A. Imada, M. Ohsuga, T. Sakai, T. Matsuura, K. Ito and K. Kaneshiro (1999). "Interleukin-6 and soluble interleukin-6 receptor in the colonic mucosa of inflammatory bowel disease." *J Gastroenterol Hepatol* **14**: 987-996.
- Ihara, S., K. Nakajima, T. Fukada, M. Hibi, S. Nagata, T. Hirano and Y. Fukui (1997). "Dual control of neurite outgrowth by STAT3 and MAP kinase in PC12 cells stimulated with interleukin-6." *EMBO J.* **16**(17): 5345-52.

- Ikebuchi, K., G. G. Wong, S. C. Clark, J. M. Ihle, Y. Hirai and M. Ogawa (1987). "Interleukin 6 enhancement of interleukin 3-dependent proliferation of multipotential hematopoietic progenitors." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**: 9035-9039.
- Ina, K., J. Itoh, K. Fukushima, K. Kusugami, T. Yamaguchi, K. Kyokane, A. Imada, D. G. Binion, A. Musso, G. A. West, G. M. Dobrea, T. S. McCormick, E. G. Lapetina, A. D. Levine, C. A. Ottaway and C. Fiocchi (1999). "Resistance of Crohn's disease T cells to multiple apoptotic signals is associated with a Bcl-2/Bax mucosal imbalance." *J Immunol.* **163**: 1081-1090.
- Ip, N. Y., S. H. Nye, T. G. Boulton, S. Davis, T. Taga, Y. Li, S. J. Birren, K. Yasukawa, T. Kishimoto, D. J. Anderson and 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.
- Jilka, R. L., G. Hangoc, G. Girasole, G. Passeri, D. C. Williams, J. S. Abrams, B. Boyce, H. Broxmeyer and S. C. Nalagas (1992). "Increased osteoclast development after estrogen loss: Mediation by interleukin-6." *Science* **257**: 88-91.
- Jones, S.A., D. Novick, S. Horiuchi, N. Yamamoto, A.J. Szalai, G.M. Fuller (1999). "C-reactive protein: a physiological activator of interleukin 6 receptor shedding." *J. Exp. Med.* **189**: 599-604
- Jostock, T., G. Blinn, C. Renné, K.-J. Kallen, S. Rose-John and J. Müllberg (1999). "Immunoadhesins of IL-6 and Hyper-IL-6." *J. Immunol. Meth.* **223**: 171-183.
- Jostock, T., J. Müllberg, S. Özbek, R. Atreya, G. Blinn, N. Voltz, M. Fischer, M. F. Neurath, S. Rose-John (2001). "Soluble gp130 is the natural inhibitor of soluble interleukin-6 receptor transsignaling responses." *Eur. J. Biochem.* **268**(1): 160-167.
- Kallen, K.-J., K. H. Meyer zum Büschenfelde and S. Rose-John (1997). "The therapeutic potential of interleukin-6 hyperagonists and antagonists." *Exp. Opin. Invest. Drugs* **6**(3): 237-266.
- Kallen, K.-J., J. Grötzinger, E. Lelièvre, P. Vollmer, D. Aasland, C. Renné, J. Müllberg, K.-H. Meyer zum Büschenfelde, H. Gascan and S. Rose-John (1999). "Receptor recognition sites of cytokines are organized as exchangeable moduls: transfer of the LIFR binding site from CNTF to IL-6." *J. Biol. Chem.* **274**: 11859-11867.
- Kawano, M., T. Hirano, T. Matsuda, T. Taga, Y. Horii, K. Iwato, H. Asaoku, B. Tang, O. Tanabe, H. Tanaka and et al. (1988). "Autocrine generation and requirement of BSF-2/IL-6 for human multiple myelomas." *Nature* **332**(6159): 83-5.

- Keul, R., P. C. Heinrich, G. Muller-Newen, K. Muller and P. Woo (1998). "A possible role for soluble IL-6 receptor in the pathogenesis of systemic onset juvenile chronic arthritis." *Cytokine* **10**: 729-734.
- Kishimoto, T., T. Taga and S. Akira (1994). "Cytokine signal transduction." *Cell* **76**(2): 253-62.
- Klouche, M., S. Bhakdi, M. Hemmes and S. Rose-John (1999). "Novel Path of activation of primary human smooth muscle cells: upregulation of gp130 creates an autocrine activation loop by IL-6 and its soluble receptor." *J. Immunol.* **163**: 4583-4589.
- Koj, A. and A. Dubin (1974). "On the hormonal modulation of acute-phase plasma protein synthesis in perfused rat liver." *Acta Biochim Pol* **21**(2): 159-67.
- Kotake, S., K. Sato, K. J. Kim, N. Takahashi, N. Udagawa, I. Nakamura, A. Yamaguchi, T. Kishimoto, T. Suda, S. Kashiwazaki (1996) "Interleukin-6 and soluble interleukin-6 receptors in the synovial fluids from rheumatoid arthritis patients are responsible for osteoclast-like cell formation" *J Bone Miner Res* **11**(1): 88-95
- Krüttgen, A., S. Rose-John, C. Moller, B. Wroblowski, A. Wollmer, J. Müllberg, T. Hirano, T. Kishimoto and P. C. Heinrich (1990). "Structure-function analysis of human interleukin-6. Evidence for the involvement of the carboxy-terminus in function." *FEBS Lett.* **262**(2): 323-6.
- Kushner, I. (1982). "The phenomenon of the acute phase response." *Ann N Y Acad Sci* **389**: 39-48.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." *Nature* **227**(259): 680-5.
- Lotz, M., F. Jirik, P. Kabouridis, C. Tsoukas, T. Hirano, T. Kishimoto 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.
- Lust, J. A., K. A. Donovan, M. P. Kline, P. R. Greipp, R. A. Kyle and N. J. Mairle (1992). "Isolation of an mRNA encoding a soluble form of the human interleukin-6 receptor." *Cytokine* **4**: 96-100.
- Lust, J. A., D. F. Jelinek, K. A. Donovan, L. A. Frederick, B. K. Huntley, J. K. Braaten and N. J. Mairle (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.
- Lütticken, C., U. M. Wegenka, J. Yuan, J. Buschmann, C. Schindler, A. Ziemiecki, A. G. Harpur, A. F. Wilks, K. Yasukawa, T. Taga, P. C. Heinrich and F. Horn (1994).

- “Association of transcription factor APRF and protein kinase Jak1 with the interleukin-6 signal transducer gp130.” *Science* **263**(5143): 89-92.
- Mackiewicz, A., H. Schooltink, P. C. Heinrich 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.
- Maes, M., I. Libbrecht, F. Van Hunsel, A. H. Lin, L. De Clerck, W. Stevens, G. Kenis, R. De Jongh, E. Bosmans and H. Neels (1999). “The immune-inflammatory pathophysiology of fibromyalgia: increased serum soluble gp130, the common signal transducer protein of various neurotrophic cytokines.” *Psychoneuroendocrinology* **24**(4): 371-83.
- Maladorno, D. and e. al (1996). “A phase II study with Lenecept Ro 45-2081 (TNFR55-IgG1) in treatment of severe sepsis and septic shock [abstract].” *Ninth European Conference on Intensive Care Medicine* **sept 24-28**(Glasgow, UK).
- März, P., J.-C. Cheng, R. A. Gadiant, P. Patterson, T. Stoyan, U. Otten and S. Rose-John (1998). “Sympathetic Neurons can produce and respond to Interleukin-6.” *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**: 3251-3256.
- März, P., K. Heese, B. Dimitriades-Schmutz, S. Rose-John 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.
- May, L. T., J. Ghrayeb, U. Santhanan, S. B. Tratter, Z. Stoeger, D. C. Helfgott and P. D. Sehgal (1988a). “Synthesis and secretion of multiple forms of b-2-Interferon/B-cell differentiation factor 2/hepatocyte stimulation factor by human fibroblastes and monocytes.” *J. Biol. Chem* **263**: 7760.
- May, L. T., U. Santhanan, J. Ghrayeb and S. B. S. Tatter (1988b). “Phosphorylation of secretet forms of human b-2-interferon/hepatocyte stimulating factor/interleukin-6.” *Biochem. Biophys. Res.* **152**: 1144.
- McDonald, N. Q., N. Panayotatos and W. A. Hendrickson (1995). “Crystal structure of dimeric human ciliary neurotrophic factor determined by MAD phasing.” *EMBO J.* **14**: 2689-2699.
- McMahan, C. J., J. L. Slack, B. Mosley, D. Cosman, S. D. Lupton, L. L. Brunton, C. E. Grubin, J. M. Wignall, N. A. Jenkins, C. I. Brannan, N. G. Copeland, K. Huebner, C. M. Croce, L. A. Cannizzarro, D. Benjamin, S. K. Dower, M. K. Spriggs and J. E. Sims (1991). “A novel IL-1 receptor, cloned from B cells by mammalian expression, is expressed in many cell types.” *EMBO J.* **10**(10): 2821-32.

- Miles, S. A., A. R. Rezai, J. F. Salazar Gonzalez, M. Vander Meyden, R. H. Stevens, D. M. Logan, R. T. Mitsuyasu, T. Taga, T. Hirano, T. Kishimoto and et al. (1990). "AIDS Kaposi sarcoma-derived cells produce and respond to interleukin 6." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**(11): 4068-72.
- Mitsuyama, K., A. Toyonaga, E. Sasaki, O. Ishida, H. Ikeda, O. Tsuruta, K. Harada, H. Tateishi, T. Nishiyama and K. Tanikawa (1995). "Soluble interleukin-6 receptors in inflammatory bowel disease: relation to circulating interleukin-6." *Gut* **36**: 45-49.
- Miyaura, C., K. Onozaki, Y. Akiyama, T. Taniyama, T. Hirano, T. Kishimoto and T. Suda (1988). "Recombinant human interleukin 6 (B-cell stimulatory factor 2) is a potent inducer of differentiation of mouse myeloid leukemia cells (M1)." *FEBS Lett.* **234**(1): 17-21.
- Modrell, B., J. Liu, H. Miller and M. Shoyab (1994). "LIF and OM directly interact with a soluble form of gp130, the IL-6 receptor signal transducing subunit." *Growth Factors* **11**: 81-91.
- Molden, J., Y. Chang, Y. You, P. S. Moore and M. A. Goldsmith (1997). "A Kaposi's Sarcoma-associated Herpesvirus-encoded Cytokine Homolog (vIL-6) Activates Signaling through the Shared gp130 Receptor Subunit." *J. Biol. Chem.* **272**: 19625-19631.
- Montero-Julian, F. A., H. Brailly, C. Sautes, I. Joyeux, T. Dorval, V. Mosseri, K. Yasukawa, J. Wijdenes, A. Adler, I. Gorin, W. H. Fridman and E. Tartour (1997). "Characterization of soluble gp130 released by melanoma cell lines: A polyvalent antagonist of cytokines from the interleukin 6 family." *Clin Cancer Res* **3**: 1443-1451.
- Moore, P. S., C. Boshoff, R. A. Weiss and Y. Chang (1996). "Molecular mimicry of human cytokine and cytokine response pathway genes by KSHV." *Science* **274**: 1739-1744.
- Mori, L., S. Iselin, G. De Libero and W. Lesslauer (1996). "Attenuation of collagen-induced arthritis in 55-kDa TNF receptor type 1 (TNFR1)-IgG1-treated and TNFR1-deficient mice." *J Immunol.* **157**(7): 3178-82.
- Mosley, B., C. De Imus, D. Friend, N. Boiani, B. Thoma, L. S. Park and D. Cosman (1996). "Dual oncostatin M (OSM) receptors. Cloning and characterization of an alternative signaling subunit conferring OSM-specific receptor activation." *J. Biol. Chem.* **271**(51): 32635-43.
- Müllberg, J., H. Schooltink, T. Stoyan, P. C. Heinrich 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.

- Müllberg, J., E. Dittrich, L. Graeve, C. Gerhartz, K. Yasukawa, T. Taga, T. Kishimoto, P. C. Heinrich and S. Rose-John (1993a). "Differential shedding of the two subunits of the interleukin-6 receptor." *FEBS Lett.* **332**(1-2): 174-8.
- Müllberg, J., H. Schooltink, T. Stoyan, M. Gunther, L. Graeve, G. Buse, A. Mackiewicz, P. C. Heinrich and S. Rose-John (1993b). "The soluble interleukin-6 receptor is generated by shedding." *Eur. J. Immunol.* **23**(2): 473-80.
- Müllberg, J., W. Oberthur, F. Lottspeich, E. Mehl, E. Dittrich, L. Graeve, P. C. Heinrich and S. Rose-John (1994). "The soluble human IL-6 receptor. Mutational characterization of the proteolytic cleavage site." *J. Immunol.* **152**(10): 4958-68.
- Müllberg, J., F. H. Durie, C. Otten Evans, M. R. Alderson, S. Rose-John, D. Cosman, R. A. Black and K. M. Mohler (1995). "A metalloprotease inhibitor blocks shedding of the IL-6 receptor and the p60 TNF receptor." *J. Immunol.* **155**(11): 5198-205.
- Müllberg, J., M. L. Hsu, C. T. Rauch, M. J. Gerhart, A. Kaykas and D. Cosman (1999). "The R27080 glycoprotein is abundantly secreted from human cytomegalovirus-infected fibroblasts." *J Gen Virol* **80**: 437-440.
- Müllberg, J., T. Geib, T. Jostock, S. H. Hoischen, P. Vollmer, N. Voltz, D. Heinz, P. R. Galle, M. Klouche and S. Rose-John (2000). "IL-6-Receptor Independent Stimulation of Human gp130 by Viral IL-6." *J. Immunol.* **164**: 4672-4677.
- Müller-Newen, G., C. Kohne, R. Keul, U. Hemmann, W. Muller-Esterl, J. Wijdenes, J. P. Brakenhoff, M. H. Hart and P. C. Heinrich (1996). "Purification and characterization of the soluble interleukin-6 receptor from human plasma and identification of an isoform generated through alternative splicing." *Eur. J. Biochem.* **236**(3): 837-842.
- Müller-Newen, G., A. Küster, U. Hemmann, R. Keul, U. Horsten, A. Martens, L. Graeve, J. Wijdenes and P. C. Heinrich (1998). "Soluble IL-6 receptor potentiates the antagonistic activity of soluble gp130 on IL-6 responses." *J Immunol* **161**: 6347-6355.
- Murakami, M., M. Hibi, N. Nakagawa, T. Nakagawa, K. Yasukawa, K. Yamanishi, T. Taga and T. Kishimoto (1993). "IL-6-induced homodimerization of gp130 and associated activation of a tyrosine kinase." *Science* **260**(5115): 1808-10.
- Nador, R. G., E. Cesarman, A. Chadburn, D. B. Dawson, M. Q. Ansari, J. Sald and D. M. Knowles (1996). "Primary effusion lymphoma: a distinct clinicopathologic entity associated with the Kaposi's sarcoma-associated herpes virus." *Blood* **88**: 645-656.
- Narazaki, M., K. Yasukawa, T. Saito, Y. Ohsugi, H. Fukui, Y. Koishihara, G. D. Yancopoulos, T. Taga and T. Kishimoto (1993). "Soluble forms of the interleukin-6

- signal-transducing receptor component gp130 in human serum possessing a potential to inhibit signals through membrane-anchored gp130." *Blood* **82**(4): 1120-6.
- Neipel, F., J. C. Albrecht, A. Ensser, Y. Q. Huang, J. J. Li, A. E. Friedman Kien and B. Fleckenstein (1997a). "Human herpesvirus 8 encodes a homolog of interleukin-6." *J Virol* **71**(1): 839-42.
- Neipel, F., J. C. Albrecht and B. Fleckenstein (1997b). "Cell-homologous genes in the Kaposi's sarcoma-associated rhadinovirus human herpesvirus 8: determinants of its pathogenicity?" *J Virol* **71**(6): 4187-92.
- Norihiro, N., I. Aie, O. Mika, T. Hiromi, M. Tomoshige, T. Tetsuya, O. Takahiro and Y. Kazuyuki (2000). "IL-6 inhibits the proliferation of fibroblastic synovial cells from rheumatoid arthritis patients in the presence of soluble IL-6 receptor." *International Immunology* **12**(2): 187-193.
- Okada, M., M. Kitahara, S. Kishimoto, T. Matsuda, T. Hirano and T. Kishimoto (1988). "IL-6/BSF-2 functions as a killer helper factor in the in vitro induction of cytotoxic T cells." *J. Immunol.* **141**(5): 1543-9.
- Padberg, F., W. Feneberg, S. Schmidt, M. J. Schwarz, D. Korschenhausen, B. D. Greenberg, T. Nolde, N. Muller, H. Trapmann, N. Konig, H. J. Moller and H. Hampel (1999). "CSF and serum levels of soluble interleukin-6 receptors (sIL-6R and sgp130), but not of interleukin-6 are altered in multiple sclerosis." *J Neuroimmunol* **99**: 218-223.
- Pennica, D., K. L. King, K. J. Shaw, E. Luis, J. Rullamas, S. M. Luoh, W. C. Darbonne, D. S. Knutzon, R. Yen, K. R. Chien and et al. (1995a). "Expression cloning of cardiotrophin 1, a cytokine that induces cardiac myocyte hypertrophy." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**(4): 1142-1146.
- Pennica, D., K. J. Shaw, T. A. Swanson, M. W. Moore, D. L. Shelton, K. A. Zioncheck, A. Rosenthal, T. Taga, N. F. Paoni and W. I. Wood (1995b). "Cardiotrophin-1. Biological activities and binding to the leukemia inhibitory factor receptor/gp130 signaling complex." *J. Biol. Chem.* **270**(18): 10915-10922.
- Peters, M., S. Jacobs, M. Ehlers, P. Vollmer, J. Müllberg, E. Wolf, G. Brem, K. H. Meyer zum Büschenfelde 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.
- Peters, M., M. Odenthal, P. Schirmacher, M. Blessing, G. Ciliberto, K. H. Meyer zum Büschenfelde and S. Rose-John (1997a). "Soluble IL-6 Receptor leads to a paracrine

- modulation of the hepatic acute phase response in double transgenic mice." *J. Immunol.* **159**: 1474-1481.
- Peters, M., P. Schirmacher, J. Goldschmitt, M. Odenthal, C. Peschel, H. P. Dienes, E. Fattori, G. Ciliberto, K. H. Meyer zum Büschenfelde and S. Rose-John (1997b). "Extramedullary expansion of hematopoietic progenitor cells in IL-6/sIL-6R double transgenic mice." *J. Exp. Med.* **185**: 755-766.
- Peters, M., A. Müller and S. Rose-John (1998). "Interleukin-6 and soluble Interleukin-6 Receptor: Direct Stimulation of gp130 and Hematopoiesis." *Blood* **92**: 3495-3504.
- Peters, M., F. Solem, P. Schirmacher and S. Rose-John (2001). "IL-6 and soluble IL-6R induce stem cell factor (SCF) and Flt-3 ligand expression in vivo and in vitro." *Exp. Hematol.*: in press.
- Poli, G., P. Bressler, A. Kinter, E. Duh, W. C. Timmer, A. Rabson, J. S. Justement, S. Stanley and A. S. Fauci (1990). "Interleukin 6 induces human immunodeficiency virus expression in infected monocytic cells alone and in synergy with tumor necrosis factor alpha by transcriptional and post-transcriptional mechanisms." *J. Exp. Med.* **172**(1): 151-8.
- Rettig, M. B., H. J. Ma, R. A. Vescio, M. Pold, G. Schiller, D. Belson, A. Savage, C. Nishikubo, C. Wu, J. Fraser, J. W. Said 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.
- Richards, C. D., T. J. Brown, M. Shoyab, H. Baumann and J. Gauldie (1992). "Recombinant oncostatin M stimulates the production of acute phase proteins in HepG2 cells and rat primary hepatocytes in vitro." *J. Immunol.* **148**(6): 1731-6.
- Roeb, E. und Rose-John, S. (1996). "Zytokine: Biologie und therapeutische Relevanz.", *Deutsche Medizinische Wochenschrift*.
- Robinson, R. C., L. M. Grey, D. Staunton, H. Vankelecom, A. B. Vernallis, J. F. Moreau, D. I. Stuart, J. K. Heath and E. Y. Jones (1994). "The crystal structure and biological function of leukemia inhibitory factor: implications for receptor binding." *Cell* **77**(7): 1101-16.
- Romano, M., M. Sironi, C. Toniatti, N. Polentarutti, P. Fruscella, P. Ghezzi, R. Faggioni, W. Luini, V. van Hinsbergh, S. Sozzani, F. Bussolino, V. Poli, G. Ciliberto and A. Mantovani (1997). "Role of IL-6 and its soluble receptor in induction of chemokines and leukocyte recruitment." *Immunity* **6**: 315-325.

- Rose-John, S. and P. C. Heinrich (1994). "Soluble receptors for cytokines and growth factors: generation and biological function." *Biochem. J.* **300**: 281-90.
- Sambrook, J., E. F. Fritsch and T. Maniatis (1989). *Molecular Cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Satoh, T., S. Nakamura, T. Taga, T. Matsuda, T. Hirano, T. Kishimoto 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.
- Schirmacher, P., M. Peters, G. Ciliberto, E. Fattori, J. Lotz, K. H. Meyer zum Büschenfelde 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.
- Senaldi, G., B. C. Varnum, U. Sarmiento, C. Starnes, J. Lile, S. Scully, J. Guo, G. Elliott, J. McNinch, C. L. Shaklee, D. Freeman, F. Manu, W. S. Simonet, T. Boone and M. S. Chang (1999). "Novel neurotrophin-1/B cell-stimulating factor-3: a cytokine of the IL-6 family." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 11458-11463.
- Smith, A. G., J. K. Heath, D. D. Donaldson, G. G. Wong, J. Moreau, M. Stahl and D. Rogers (1988). "Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides." *Nature* **336**(6200): 688-90.
- Somers, W. Stahl, M. Sehra, J. S. (1997). "1.9 A crystal structure of interleukin 6: implications for a novel mode of receptor dimerization and signaling." *EMBO J* **16**(5): 989-97
- Soulier, J., L. Grollet, E. Oksenhendler, P. Cacoub, D. Cazals Hatem, P. Babinet, M. F. d'Agay, J. P. Clauvel, M. Raphael, L. Degos and et al. (1995). "Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-like DNA sequences in multicentric Castleman's disease." *Blood* **86**(4): 1276-80.
- Stahl, N., T. G. Boulton, T. Farruggella, N. Y. Ip, S. Davis, B. A. Witthuhn, F. W. Quelle, O. Silvennoinen, G. Barbieri, S. Pellegrini, I. 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.
- Staskus, K. A., W. Zhong, K. Gebhard, B. Herndier, H. Wang, R. Renne, J. Beneke, J. Pudney, D. J. Anderson, D. Ganem and A. T. Haase (1997). "Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus gene expression in endothelial (spindle) tumor cells." *J. Virol.* **71**: 715-719.

- Staskus, K. A., R. Sun, G. Miller, P. Racz, A. Jaslowski, C. Metroka, H. Brett-Smith and A. T. Haase (1999). "Cellular tropism and viral interleukin-6 expression distinguish human herpesvirus 8 involvement in Kaposi's sarcoma, primary effusion lymphoma, and multicentric Castleman's disease." *J. Virol.* **73**: 4181-4187.
- Stoyan, T., U. Michaelis, H. Schooltink, M. Van Dam, R. Rudolph, P. C. Heinrich and S. Rose-John (1993). "Recombinant soluble human interleukin-6 receptor. Expression in *Escherichia coli*, renaturation and purification." *Eur. J. Biochem.* **216**(1): 239-45.
- Strassmann, G., M. Fong, J. S. Kenney and O. J. Chaim (1992). "Mechanisms of experimental cancer cachexia. Interaction between mononuclear phagocytes and colon-26 carcinoma and its relevance to IL-6-mediated cancer cachexia." *J. Clin. Invest.* **89**: 1681-1684.
- Sui, X., K. Tsuji, R. Tanaka, S. Tajima, K. Muraoka, Y. Ebihara, K. Ikebuchi, K. Yasukawa, T. Taga, T. Kishimoto and T. Nakahata (1995). "gp130 and c-Kit signalings synergize for ex vivo expansion of human primitive hemopoietic progenitor cells." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**(7): 2859-63.
- Taga, T., M. Hibi, Y. Hirata, K. Yamasaki, K. Yasukawa, T. Matsuda, T. Hirano and T. Kishimoto (1989). "Interleukin-6 triggers the association of its receptor with a possible signal transducer, gp130." *Cell* **58**(3): 573-81.
- Taga, T. and T. Kishimoto (1997). "gp130 and the Interleukin-6 Family of Cytokines." *Annu. Rev. Immunol.* **15**: 797-819.
- Tamura, T., N. Udagawa, N. Takahashi, C. Miyaura, S. Tanaka, Y. Yamada, Y. Koishihara, Y. Ohsugi, K. Kumaki, T. Taga, T. Kishimoto and T. Suda (1993). "Soluble interleukin-6 receptor triggers osteoclast formation by interleukin 6." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**(24): 11924-8.
- Tanabe, O., S. Akira, T. Kamiya, G. G. Wong, T. Hirano and T. Kishimoto (1988). "Genomic structure of the murine IL-6 gene. High degree conservation of potential regulatory sequences between mouse and human." *J. Immunol.* **141**(11): 3875-81.
- Tanaka, M., M. Kishimura, S. Ozaki, F. Osakada, H. Hashimoto, O. M., M. M. and N. K. (2000). "Cloning of a novel soluble gp130 and detection of its neutralizing autoantibodies in rheumatoid arthritis." *J. Clin. Invest.* **106**(1): 137-144.
- Tarte, K., Y. Chang and B. Klein (1999). "Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus and multiple myeloma: lack of criteria for causality." *Blood* **93**: 3159-3163.

- Tomida, M., Y. Yamamoto Yamaguchi 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.
- Van Snick, J., A. Vink, S. Cayphas 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.
- Van Snick, J. (1990). "Interleukin-6: an overview." *Annu. Rev. Immunol.* **8**: 253-279.
- Vollmer, P., I. Walev, S. Rose-John 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.
- Vollmer, P., B. Oppmann, N. Voltz, M. Fischer and S. Rose-John (1999). "A role for the immunoglobulin-like domain of the human IL-6 receptor: intracellular protein transport and shedding." *Eur J Biochem* **263**(2): 438-46.
- Walev, I., P. Vollmer, M. Palmer, S. Bhakdi and S. Rose-John (1996). "Pore-forming toxins trigger shedding of receptors for interleukin 6 and lipopolysaccharide." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 7882-7887.
- Wells, J. A., B. C. Cunningham, G. Fuh, H. B. Lowman, S. H. Bass, M. G. Mulkerrin, M. Ultsch and A. M. deVos (1993). "The molecular basis for growth hormone-receptor interactions." *Recent Prog Horm Res* **48**: 253-75.
- Williams, R. L., D. J. Hilton, S. Pease, T. A. Willson, C. L. Stewart, D. P. Gearing, E. F. Wagner, D. Metcalf, N. A. Nicola and N. M. Gough (1988). "Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells." *Nature* **336**(6200): 684-7.
- Xu, G. Y., H. A. Yu, J. Hong, M. Stahl, T. McDonagh, L. E. Kay, D. A. Cumming (1997). "Solution structure of recombinant human interleukin-6." *J Mol Biol* **268**(2): 468-81
- Yamasaki, K., T. Taga, Y. Hirata, H. Yawata, Y. Kawanishi, B. Seed, T. Taniguchi, T. Hirano and T. Kishimoto (1988). "Cloning and expression of the human interleukin-6 (BSF-2/IFN beta 2) receptor." *Science* **241**(4867): 825-8.
- Zandstra, P. W., E. Conneally, A. L. Petzer, J. M. Piret and C. J. Eaves (1997). "Cytokine manipulation of primitive human hematopoietic cell self-renewal." *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**(9): 4698-703.
- Zhang, J. G., Y. Zhang, C. M. Owczarek, L. D. Ward, R. L. Moritz, R. J. Simpson, K. Yasukawa and N. A. Nicola (1998). "Identification and characterization of two distinct

- truncated forms of gp130 and a soluble form of leukemia inhibitory factor receptor alpha-chain in normal human urine and plasma." *J. Biol. Chem.* **273**: 10798-10805.
- Zheng, X. X., A. W. Steele, W. W. Hancock, A. C. Stevens, P. W. Nickerson, P. Roy Chaudhury, Y. Tian and T. B. Strom (1997). "A noncytolytic IL-10/Fc fusion protein prevents diabetes, blocks autoimmunity, and promotes suppressor phenomena in NOD mice." *J. Immunol.* **158**(9): 4507-13.
- Zilberstein, A., R. Ruggieri, J. H. Korn and M. Revel (1986). "Structure and expression of cDNA and genes for human interferon-beta-2, a distinct species inducible by growth-stimulatory cytokines." *EMBO J.* **5**(10): 2529-37.
- Zohlh fer, D., L. Graeve, S. Rose-John, H. Schooltink, E. Dittrich and P. C. Heinrich (1992). "The hepatic interleukin-6 receptor. Down-regulation of the interleukin-6 binding subunit (gp80) by its ligand." *FEBS Lett.* **306**(2-3): 219-222.

VII. Anhang

1. Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
μ	mikro
Abb	Abbildung
ACK	Ammoniumchlorid/Kaliumhydroxid/Karbonat/EDTA
ACT	Antichymotrypsin
AIDS	„Acquired Immuno Deficiency Syndrome“
AK	Antikörper
Arg	Arginin
Asp	Aspartat
Bq	Bequerel
cDNA	komplementäre DNA
Ci	Curie
CNTF	„Ciliary Neurotrophic Factor“
CO ₂	Kohlendioxid
cpm	„counts per minute“
CRF	„Corticotropin Releasing Factor“
CRP	C-reaktives Protein
CT-1	„Cardiotrophin-1“
DEAE	Diethylaminoethyl
DMEM	„Dulbecco's Modified Eagle's Medium“
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E. Coli	Echerichia Coli
FACS	„Fluorescent Activated Cell Sorter“
Fc	„Fragment Crystallizable“ kristallines Fragment (von Antikörpern)
FCS	Fötale Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FNIII	Fibronectin Typ III
g	Gramm

Gly	Glycin
GM-CSF	„Granulocyte/Macrophage-Colony Stimulating Factor“
gp130	Glykoprotein 130
h	Stunde
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-ethylsulfonsäure
HHV8	Humanes Herpesvirus 8
H-IL-6	„Hyper-IL-6“, Fusionsprotein aus IL-6 und sIL-6R
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
JAK	Janus-Tyrosinkinase
KD	Dissoziationskonstante
kDa	Kilodalton
KS	Karposi Sarkom
KSHV	Karposi Sarkom assoziiertes Herpesvirus
l	Liter
LIF	„Leukemia Inhibitory Factor“
LPMC	Lamina Propria Mononukleäre Zellen
LPS	Lipopolysaccharid
M	mol/l
m	milli
MAPK	„Mitogen Activatet Protein Kinase“
MEK	MAPK-Kinase
MIP-II	„Macrophage Inflammatory Protein-II“
mRNA	„messenger RNA“
n	nano
NF	„Nuclear Factor“
Ni	Nickel
NNT-1	„Novel Neurotrophin-1“
ORF	Offener Leserahmen
OSM	Onkostatine M
p	pico
P	Phosphat
PAGE	Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese

PBS	„Phosphate Buffered Saline“
PGE	Prostaglandin E
pH	negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration
Phe	Phenylalanin
PMA	„4 β -phorbol-12-myristat-13-acetat“
R	Rezeptor
RNA	Ribonucleinsäure
s	„soluble“, löslich
SDS	„natriumdodecylsulfate“
S-Phase	Synthese-Phase
STAT	„Signal Transducer and Activator of Transcription“
T	Terra
Taq	Thermophilus Aquaticus
TGF	„Tumor Growth Factor“
TM	Transmembrandomäne
TNBS	Trinitrobenzensäure
TNF	Tumor Nekrose Faktor
U	„Unit“
v	viral
Y	Tyrosin