

Struktur- und Funktionsanalyse der zytokinbindenden Domäne des humanen Interleukin-6 Rezeptors

Dissertation zur Erlangung des Grades
„Doktor der Naturwissenschaften“

am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität
Mainz

Suat Özbek
geb. in Marl/Westfalen
Mainz 1999

MEINEN ELTERN

Wesentliche Teile dieser Arbeit sind veröffentlicht in:

Özbek, S., Grötzinger, J., Krebs, B., Fischer, M., Wollmer, A., Jostock, T., Müllberg, J. and Rose-John, S. (1998) The Membrane Proximal Cytokine Receptor Domain of the Human Interleukin-6 Receptor Is Sufficient for Ligand Binding but Not for gp130 Association, *J. Biol. Chem.* **273**, 21374-21379.

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	1
1.1 Zytokine	1
1.2 Interleukin-6.....	1
1.3 Der Interleukin-6 Rezeptor.....	3
1.4 Die signaltransduzierende Untereinheit gp130	8
1.5 Der IL-6/IL-6R-Komplex	11
1.6 Der IL-6/IL-6R/gp130-Komplex	16
1.7 Strukturaufklärung von Molekülen mittels NMR-Spektroskopie	20
1.8 Ziele der Arbeit	21
2. MATERIAL UND METHODEN	22
2.1 Chemikalien	22
2.2 Enzyme.....	22
2.3 Geräte.....	22
2.4 Antikörper und rekombinante Proteine.....	22
2.5 Molekularbiologische Techniken.....	23
2.6 SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese) und Western Blot	23
2.7 ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)	23
2.8 Immunpräzipitation.....	24
2.9 Konstruktion der Expressionsvektoren	24
2.10 Expression der IL-6 Rezeptor-Domänen in E. coli BL21 (DE3) Zellen.....	25
2.11 Proteinreinigung und Renaturierung	26
2.12 CD-Spektroskopie.....	26
2.13 Kinetische Messungen.....	26
2.14 NMR-Spektroskopie.....	27
3. ERGEBNISSE	28
3.1 Klonierung und Expression der IL-6R-Domänen D2, D3 und D3-6.2.....	28
3.2 Markierung von D3 (D3-6.2) mit ^{15}N und $^{15}\text{N} / ^{13}\text{C}$	33
3.3 Reinigung und Renaturierung von D3 (D3-6.2).....	34

3.4	Strukturelle Charakterisierung von D3 (D3-6.2)	38
3.6	Kinetik der Bindung von D3 (D3-6.2) an immobilisiertes IL-6.....	43
3.7	Immunpräzipitation von D3 (D3-6.2) durch ein IL-6-Fc-Fusionsprotein.....	51
3.8	NMR-Spektroskopie.....	53
4.	DISKUSSION	56
4.1	Bakterielle Expression, Reinigung und Renaturierung von D3 (D3-6.2)	56
4.2	Bindung von D3 (D3-6.2) an Interleukin-6.....	62
4.3	Der IL-6/D3 (D3-6.2)-Komplex assoziiert nicht mit gp130.....	65
4.4	Die Aufklärung der Struktur von D3 (D3-6.2) durch die NMR-Spektroskopie....	68
5.	ZUSAMMENFASSUNG.....	70
6.	LITERATURVERZEICHNIS	71
7.	ANHANG	83
7.1	Abkürzungen.....	83
7.2	Abkürzungen der Aminosäuren	85
7.3	Aminosäuresequenz des humanen IL-6R.....	86

1. Einleitung

1.1 Zytokine

Zytokine sind Proteine, die als lösliche Mediatoren der Regulation des immunologischen, hämatopoetischen und neuronalen Systems dienen. Ähnlich wie Hormone vermitteln sie wichtige Signale zur Steuerung von Zellteilung, Differenzierung und Stoffwechsel. Zu den Zytokinen zählen die Interleukine, die von Lymphozyten sezernierten Lymphokine, die Monokine, Interferone und die koloniestimulierenden Faktoren. Zytokine wirken auf ihre Zielzellen über spezifische Rezeptoren, die in löslicher oder membranständiger Form existieren können. Die von verschiedenen Zytokinen in einem bestimmten Zelltyp ausgelösten Signale sind hierbei häufig überlappend. Andererseits sind ihre Funktionen durch Pleiotropie charakterisiert, d.h. ein bestimmtes Zytokin zeigt in verschiedenen Zelltypen unterschiedliche biologische Wirkungen.

1.2 Interleukin-6 (IL-6)

Die cDNS für das Zytokin IL-6 wurde von Hirano et al. [Hirano, 1986] kloniert und als ein von T-Zellen sezernierter Faktor beschrieben, der die Differenzierung von B-Zellen zu Plasmazellen induziert (b-cell stimulatory factor 2, BSF-2). Darüberhinaus konnte jedoch gezeigt werden, daß IL-6, in Kombination mit Glucocorticoiden, ein Hauptmediator der Akut-Phase-Reaktion ist [Gauldie, 1987; Heinrich, 1990]. Zudem spielt es eine zentrale Rolle für die Proliferation und Differenzierung von hämatopoetischen Vorläufer-, B- und T- und neuronalen Zellen, Thrombozyten und Osteoklasten (Abb. 1.1) [Kishimoto, 1995]. Es ist beteiligt an der Pathophysiologie verschiedener Krankheiten, wie z.B. Castleman'sche Krankheit [Brandt, 1990], Osteoporose [Jilka, 1992], Kachexie [Strassmann, 1992], rheumatoide Arthritis [Hermann, 1989], AIDS [Poli, 1990] und, als autokriner Wachstumsfaktor, am Plasmozytom und Myelom [Suematsu, 1993]. Hauptproduzenten von IL-6 sind Monozyten/Makrophagen, Fibroblasten und Endothelzellen; die Expression erfolgt nach Stimulation durch verschiedene Mediatoren, wie z.B. bakterielles LPS und, endogen, durch andere Zytokine wie IL-1 und TNF.

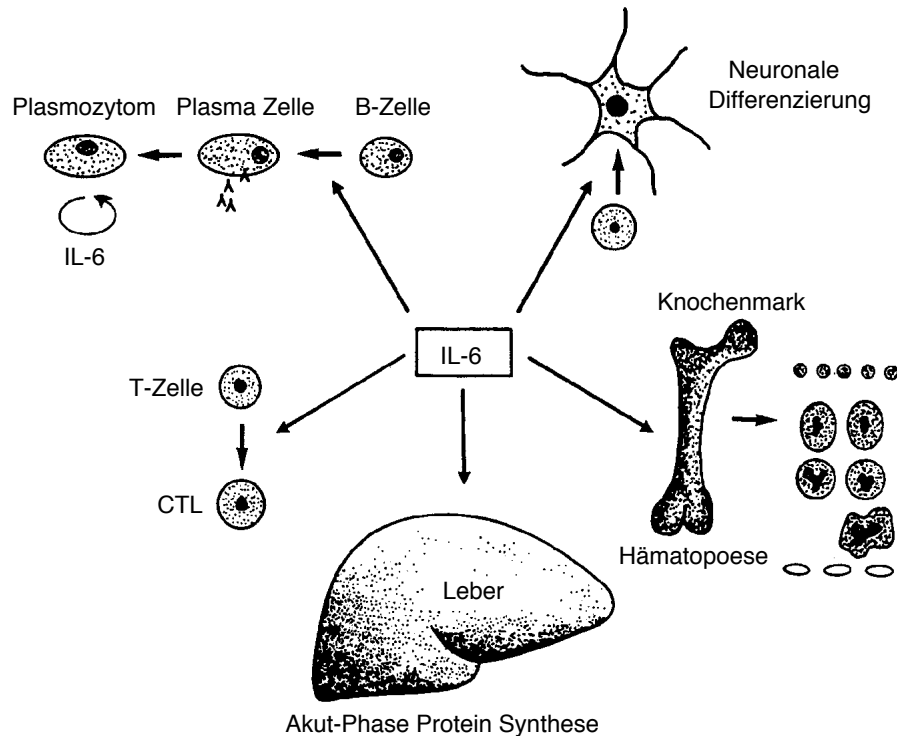


Abb.1.1. IL-6 als multifunktionelles Zytokin [Heinrich, 1990]. IL-6 ist ein Wachstums- und Differenzierungsfaktor für eine Vielzahl von Zelltypen und induziert bei entzündlichen Prozessen die Expression von Akut-Phase-Proteinen in der Leber.

Aus dem 1,3 kB großen mRNS-Transkript des IL-6-Gens wird zunächst ein Vorläuferprotein des IL-6 mit einem aus 28 Aminosäuren bestehenden, N-terminalen Signalpeptid translatiert. Das reife Protein besteht aus 184 Aminosäuren, enthält 2 sequentielle Cystinbrücken und ist N- und O-glykosyliert [Clogston, 1989; Gross, 1989]. Strukturell wird IL-6 in die Klasse der langkettigen “4-Helix-Bündel”-Proteine mit einer charakteristischen up-up-down-down-Topologie der 4 α -Helices eingeordnet [Bazan, 1990b] (Abb.1.2). Dieses Faltungsmuster wurde auch für das Wachstumshormon (growth hormone, GH), Prolactin, den Granulozytenkoloniestimulierenden Faktor (granulocyte colony stimulating factor, G-CSF), Erythropoietin (EPO), leukemia inhibitory factor (LIF), Onkostatin M (OSM) und ciliary neurotrophic factor (CNTF) vorgeschlagen [Bazan, 1990a, 1990b, 1991]. Die Tertiärstruktur des IL-6 wurde mit Hilfe der Röntgenstrukturanalyse und der NMR (Nuclear Magnetic Resonance)-Spektroskopie aufgeklärt und bestätigte das postulierte Strukturmodell [Somers, 1997; Xu, 1997].

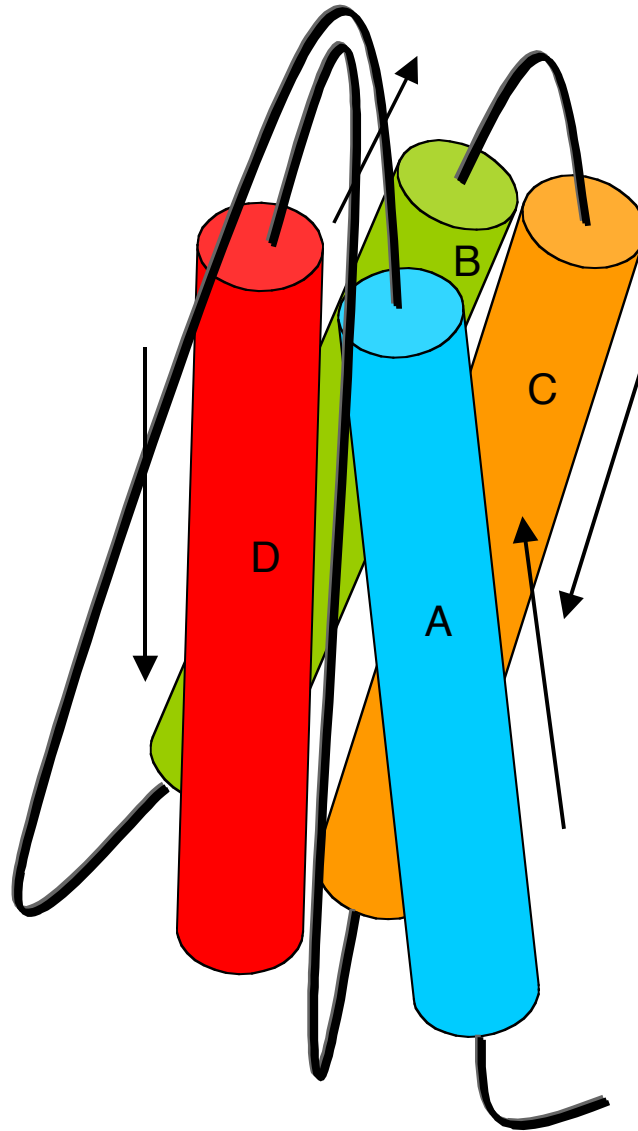


Abb.1.2. „4-Helix-Bündel“-Modell der Zytokine der hämatopoetischen Zytokin-Familie [Bazan, 1990c]. Die N-terminale A-Helix ist aufwärts gerichtet, dann folgt eine lange AB-Schleife, Helix B verläuft ebenfalls aufwärts, es folgt eine kurze BC-Schleife, Helix C verläuft abwärts, gefolgt von einer langen CD-Schleife, Helix D verläuft ebenfalls abwärts (up-up-down-down-Motiv).

1.3 Der Interleukin-6 Rezeptor (IL-6R)

Der IL-6R ist ein Typ-I-Transmembranprotein mit extrazellulärem N-Terminus und zytoplasmatischem C-Terminus. Er besteht aus 449 Aminosäuren, von denen sich 339 auf den extrazellulären Bereich, 28 auf die Transmembran- und 82 auf die zytoplasmatische Region verteilen. Er wurde erstmals von Yamasaki et al. (1988) beschrieben und als Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 80 kd (gp80) charakterisiert [Yamasaki, 1988].

Strukturell gehört der IL-6R der von Bazan (1990) beschriebenen Klasse-1-Zytokin-Rezeptor-Familie (hematopoietic growth factor receptor family) an, die durch Homologien im extrazellulären Bereich charakterisiert ist [Bazan, 1990b]. Diese basieren auf einem gemeinsamen Strukturelement, das als Zytokin-Rezeptor-Homologie-Modul oder zytokinbindendes Modul (cytokine binding module, CBM) bezeichnet wird. Das CBM besteht aus einer N-terminalen Domäne, die ein Muster von vier konservierten Cysteinen aufweist, und einer C-terminalen Domäne, die durch ein Tryptophan-Serin-X-Tryptophan-Serin-Motiv (WSXWS) (X bezeichnet eine beliebige Aminosäure) gekennzeichnet ist. Beide Domänen des CBM bestehen nach Sekundärstrukturvorhersagen aus sieben antiparallelen β -Faltblatt-Strängen (A-F) und gehören in die Strukturklasse der Fibronectin-Typ-III-Domänen [Bazan, 1990]. Beim IL-6R wird das CBM aus den Domänen 2 und 3 des extrazellulären Bereichs gebildet, Domäne 1 besitzt eine Immunglobulin (Ig)-ähnliche Faltung (Abb. 1.3) [Baumann, 1990]. Die zytoplasmatische Domäne des IL-6R weist keine Homologien zu bekannten Sequenzen anderer Proteine auf und ist irrelevant für die biologische Aktivität des Moleküls [Yawata, 1993].

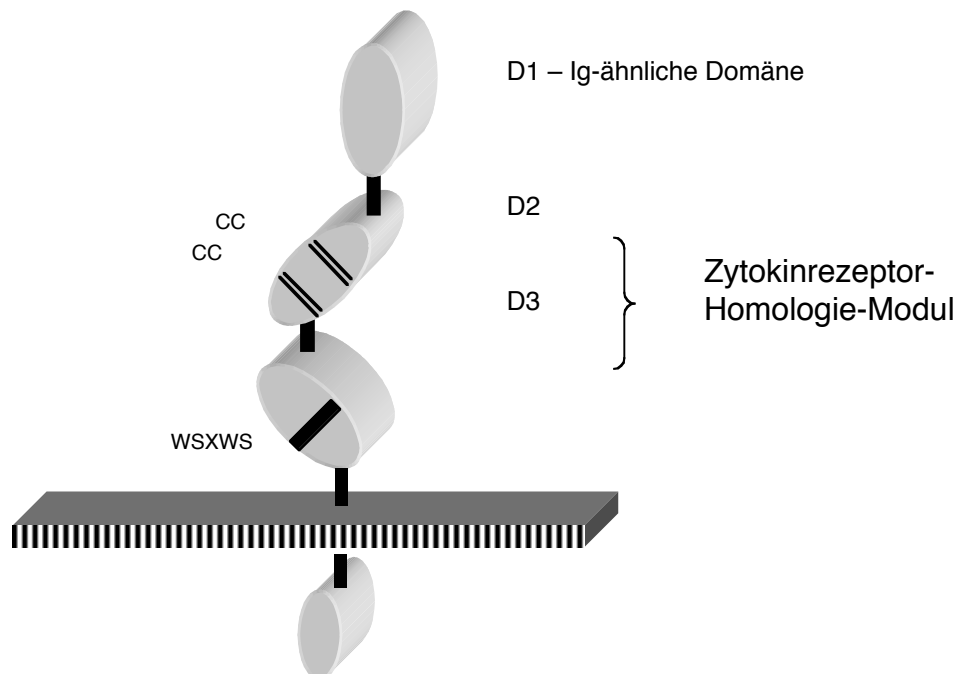


Abb. 1.3. Schematische Darstellung des Interleukin-6-Rezeptors. Der extrazelluläre Teil des IL-6R-Moleküls besteht aus einer N-terminalen Ig-ähnlichen Domäne (D1) und aus zwei Fibronectin-Typ-III-Domänen (D2 + D3), die das Zytokinbindende Modul (CBM) mit vier konservierten Cysteinresten und einem konservierten WSXWS-Motiv bilden.

Das Glykosylierungsmuster und die Disulfidverbrückung im extrazellulären Bereich des IL-6R wurden durch Cole et al. (1999) umfassend beschrieben [Cole, 1999]. Durch tryptischen Verdau des löslichen IL-6R unter reduzierenden und nichtreduzierenden Bedingungen und anschließender massenspektroskopischer Analyse der Bruchstücke konnten vier Disulfidbrücken (Cys⁴⁷-Cys⁹⁶, Cys¹²¹-Cys¹³², Cys¹⁶⁵-Cys¹⁷⁶, Cys²¹-Cys¹⁹³) und zwei freie Cysteinseitenketten (Cys²¹¹ und Cys²⁷⁷) identifiziert werden. Zudem ließen sich drei N-Glykosylierungsstellen (Asn⁵⁵, Asn⁹³ und Asn²²¹) nachweisen. Die zwei aufeinanderfolgenden Disulfidbrücken (Cys¹²¹-Cys¹³² und Cys¹⁶⁵-Cys¹⁷⁶) in der N-terminalen Domäne des CBM (D2) entsprechen denen in anderen Klasse-1-Zytokin-Rezeptoren [Hiraoka, 1994]. Die Cys⁴⁷-Cys⁹⁶-Verbrückung, die eine Verbindung zwischen den beiden β -Faltblättern der Ig-ähnlichen Domäne (D1) bildet, ist ihrerseits charakteristisch für die Immunglobulin-Superfamilie [Bork, 1994]. Die Cys²¹-Cys¹⁹³-Disulfidbrücke ist jedoch bisher für keinen anderen Zytokinrezeptor beschrieben worden. Sie stellt eine Verbindung dar zwischen dem N-terminalen Abschnitt (β -Strang A) von D1 und dem C-terminalen Bereich (β -Strang F) von D2 und erzwingt hierdurch ein Zurückfallen der Ig-ähnlichen Domäne in Richtung des CBM [Cole, 1999].

Der IL-6R kann sowohl in membranständiger als auch in löslicher Form vorliegen. Der lösliche IL-6R entsteht durch limitierte Proteolyse oder als alternatives splice-Produkt und wirkt im Gegensatz zu vielen anderen löslichen Zytokinrezeptoren agonistisch [Rose-John & Heinrich, 1994]. Müllberg et al. (1993) konnten zeigen, daß Zellen, die den IL-6R exprimieren, diesen nach Stimulation mit dem Phorbol-ester 4 β -Phorbol-12-Myristat-13-Acetat (PMA) durch limitierte Proteolyse dicht oberhalb der Membran (Q357-D358) freisetzen [Müllberg, 1993]. Die Mutation dieser Spaltstelle führte jedoch nicht zur Proteaseresistenz des IL-6R-Moleküls, so daß der proteolytische Prozeß nicht als sequenzspezifisch, sondern eher als strukturabhängig angenommen wird [Müllberg, 1994].

Die Klasse-1-Zytokin-Rezeptoren lassen sich anhand ihres Aktivierungsmechanismus in zwei Gruppen einteilen. In der ersten Gruppe, die die Rezeptoren für GH, Erythropoietin, Prolactin und G-CSF einschließt, wird die zytoplasmatische Signaltransduktionskaskade nach Bindung des spezifischen Liganden durch die Homodimerisierung der Rezeptoren ausgelöst. In der zweiten Gruppe erfolgt die Signalweiterleitung über eine gemeinsame Rezeptoruntereinheit, durch deren Homodimerisierung oder Heterodimerisierung mit einem spezifischen Zytokinrezeptor. Bisher sind drei gemeinsame Rezeptoruntereinheiten beschrieben worden: das Glykoprotein 130 (gp130), die gemeinsame β -Kette für die Rezeptoren von IL-3, IL-5 und GM-CSF [Bagley, 1997] und die gemeinsame γ -Kette für die Rezeptoren von IL-2, IL-4, IL-7, IL-9 und IL-15 [Wells, 1996].

Gp130 ist die gemeinsame signaltransduzierende Untereinheit der Familie der Zytokine vom IL-6-Typ [Kishimoto, 1995]. Hierzu gehören neben IL-6 Kardiotrophin-1 (cardiotrophin-1, CT-1), IL-11, OSM, CNTF, LIF und, als neues Mitglied, BSF-3 [Senaldi, 1999]. IL-6 und IL-11 verwenden gp130 als Signaltransduktor in Form eines Homodimers, während die übrigen Zytokine über ein Heterodimer mit dem strukturell verwandten LIFR signalisieren. Für OSM wurde zusätzlich ein spezifischer OSM-Rezeptor beschrieben, der nach Ligandenbindung mit gp130 dimerisiert [Taga & Kishimoto, 1997] (Abb. 1.4).

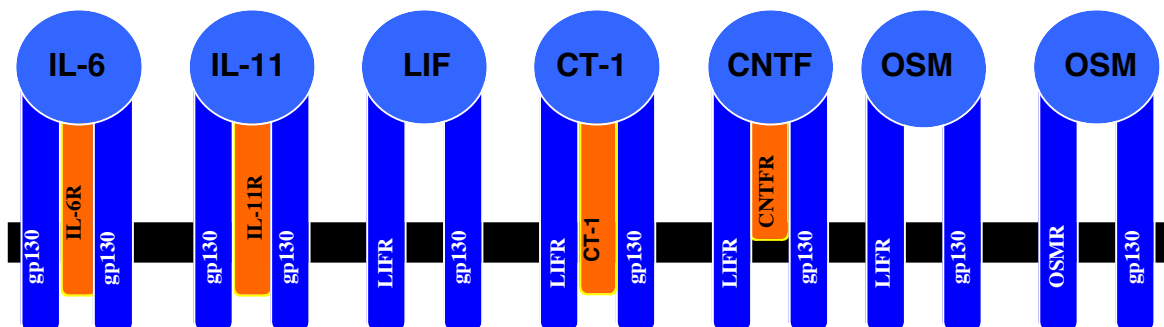


Abb. 1.4. gp130 als gemeinsames Signalmolekül der Zytokine der IL-6-Familie [Heinrich, 1998]

Die Bildung eines signaltransduzierenden Komplexes aus Zytokin, spezifischem Zytokinrezeptor und mindestens einem gp130-Molekül erfolgt, mit Ausnahme von OSM, bei allen Mitgliedern der IL-6-Familie sequentiell zunächst durch die Bindung eines Zytokins an seinen spezifischen Rezeptor. Der Zytokin/Rezeptor-Komplex assoziiert dann mit gp130 [Hibi, 1990]. Die direkte Bindung eines Zytokins an gp130 ist nur für OSM nachgewiesen [Gearing & Bruce, 1992]. Abb. 1.5 zeigt modellhaft die Bildung und Aktivierung des IL-6R-Komplexes: freies IL-6 bildet zunächst einen niedrigaffinen Komplex ($K_D = 10^{-9}$ M) mit dem spezifischen IL-6R in membrangebundener oder löslicher Form [Yamasaki, 1988]; dieser Komplex assoziiert mit hoher Affinität ($K_D = 10^{-10}$ M) mit mindestens einem gp130-Molekül [Hibi, 1990; Yamasaki, 1988]. Die kovalente Dimerisierung zweier gp130-Moleküle durch Disulfidverbrückung führt schließlich zur Auslösung eines intrazellulären Signals [Murakami, 1993].

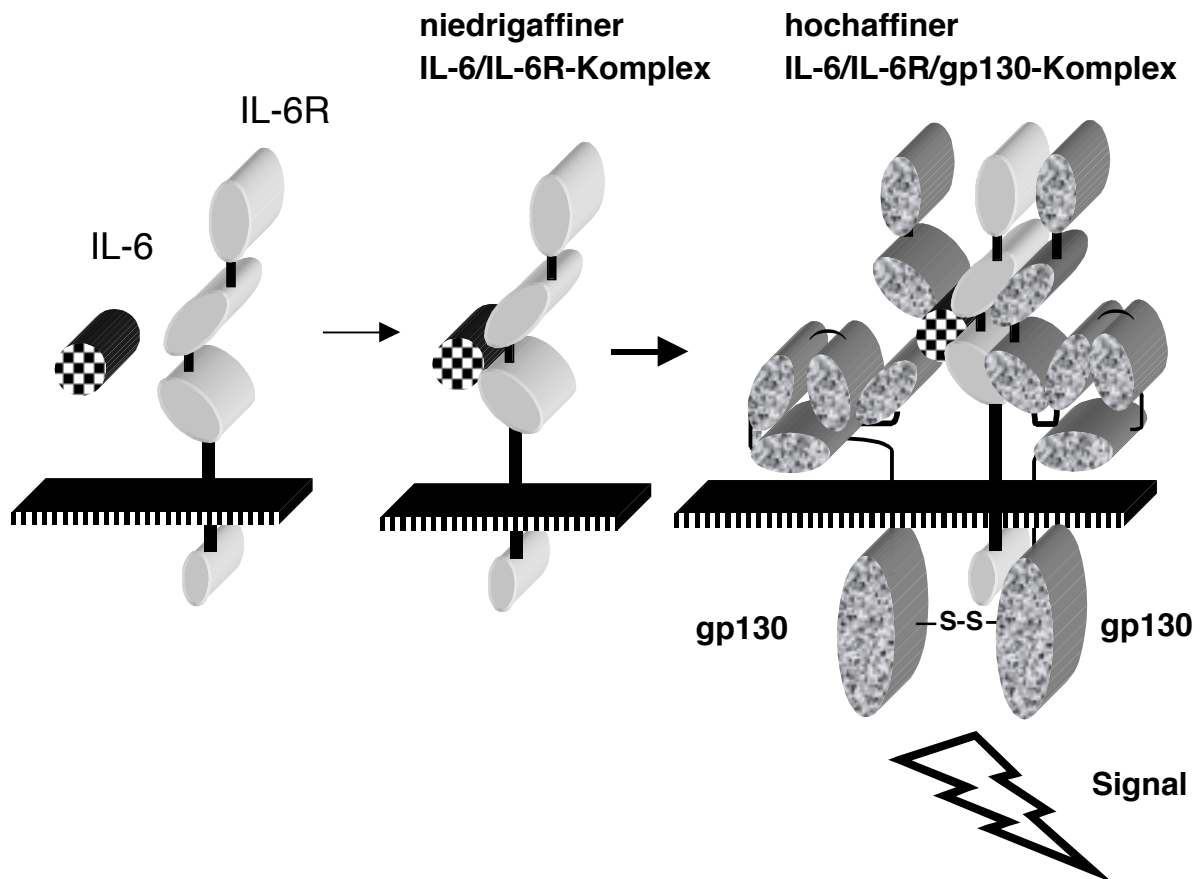


Abb. 1.5. Modell der sequentiellen Bildung und Aktivierung des IL-6R-Komplexes. Auf Zielzellen bindet IL-6 zunächst mit niedriger Affinität an den spezifischen IL-6R (IL-6R α), worauf dieser Komplex mit hoher Affinität mit einem gp130-Molekül (IL-6R β) assoziiert. Die anschließende Dimerisierung zweier gp130-Moleküle führt dann zur Auslösung eines intrazellulären Signals.

1.4 Die signaltransduzierende Untereinheit gp130

Gp130 ist ein Typ I-Transmembranprotein mit einem Molekulargewicht von 130 kD und besteht aus 896 Aminosäureresten. Seine cDNS wurde 1990 von Hibi et al. aus Plazenta und U266-Zellen kloniert und es gehört aufgrund seiner Struktur ebenfalls zu der hämatopoetischen Zytokinrezeptorfamilie [Hibi, 1990]. Der extrazelluläre Bereich des gp130-Moleküls wird aus sechs Fibronectin-Typ-III-ähnlichen Domänen (D1-D6) gebildet und umfaßt 597 Aminosäurereste, während die Transmembranregion und der zytoplasmatische Bereich aus 22 bzw. 277 Resten bestehen. Es konnte gezeigt werden, daß die drei N-terminalen Domänen des gp130-Moleküls für die Ligandenbindung ausreichend sind [Horsten, 1995] und in ihrer Architektur dem extrazellulären Bereich des IL-6R entsprechen [Bazan, 1990a, b]: D1 besitzt eine Ig-ähnliche Faltung, während D2 und D3 das Zytokin-Rezeptor-Homologie-Modul bilden, dessen Struktur durch Röntgenstrukturanalyse (D2+D3) [Bravo, 1998] und NMR-Spektroskopie (D3) [Kernebeck, 1999] gelöst werden konnte. Die Rezeptoren für LIF, OSM, G-CSF und Leptin zeigen eine hohe Homologie zu gp130. Sie werden daher in einer gp130-Subfamilie der Klasse-I-Zytokinrezeptoren zusammengefaßt, die in ihrem extrazellulären Teil durch komplette oder unvollständige Doppelungen des CBM gekennzeichnet sind (Abb. 1.6) [Taga & Kishimoto, 1997]. Homologien im zytoplasmatischen Bereich dieser Rezeptoren verteilen sich auf drei Abschnitte, die in membranproximal-distaler Reihenfolge als box1, box2 und box3 bezeichnet werden [Fukunaga, 1991; Murakami, 1991; Baumann, 1994].

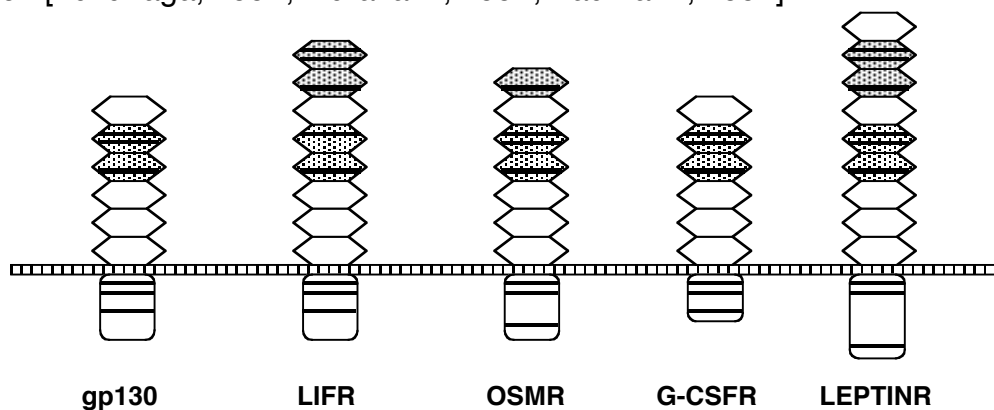


Abb. 1.6. gp130-Subfamilie der Zytokinrezeptoren. Die extrazellulären Ig-ähnlichen oder Fibronectin-Typ-III-Domänen sind in Form eines Hexagons dargestellt. Das CBM ist punktiert, konservierte Sequenzen sind durch horizontale Balken angedeutet. In der zytoplasmatischen Domäne sind die homologen Abschnitte (box1, box2 und box3) ebenfalls durch Querbalken in membranproximal-distaler Reihenfolge dargestellt [Taga & Kishimoto, 1997].

Im Gegensatz zu einer Vielzahl von Wachstumsfaktorrezeptoren besitzen Klasse-I-Zytokinrezeptoren keine intrinsische Kinaseaktivität. Die Feststellung, daß Zytokinrezeptoren dennoch in der Lage sind, über ihre zytoplasmatische Domäne Ligandenbindung mit der Tyrosinphosphorylierung von zytoplasmatischen Substraten zu koppeln, führte zu der Identifikation von Proteintyrosinkinase, die mit Zytokinrezeptoren assoziiert sind und nach Ligandenbindung aktiviert werden [Wilks, 1989; Partanen, 1990]. Diese gehören zu der Familie der JAK (Janus Kinase)-Kinasen [Ihle, 1994]. Es konnte gezeigt werden, daß JAK1, JAK2 und TYK2 konstitutiv mit den konservierten box1- und box2-Motiven in der zytoplasmatischen Region des gp130-Moleküls assoziiert sind und infolge der Zytokinbindung aktiviert werden [Lütticken, 1994]. Die ligandeninduzierte Dimerisierung führt zunächst zur Tyrosinphosphorylierung von gp130 im konservierten membrandistalen box3-Motiv, das hierdurch befähigt wird, Transkriptionsfaktoren der STAT (Signal Transducer and Activator of Transcription)-Familie zu binden [Stahl, 1995].

Die Rekrutierung von STAT3 und, in geringerem Maß, STAT1, führt zu deren Tyrosinphosphorylierung durch JAK-Kinasen und anschließender Dimerisierung über SH2-Domänen [Shuai, 1994]. Neben der Aktivierung von STAT-Faktoren führt die Stimulation von gp130 zu Veränderungen in der GTPase-Aktivität des RAS (rat sarcoma)-Proteins [Sato, 1992]. Der erhöhte Anteil von regulatorisch aktivem RAS-GTP führt zur Tyrosinphosphorylierung und Aktivierung von Raf-1, einer Serin/Threonin-Kinase, die ihrerseits zur Phosphorylierung einer weiteren Serin/Threonin-Kinase, MAP (Mitogen-aktivierte Proteinkinase), beiträgt [Boulton, 1994; Daeipour, 1993]. Die Signalkette des RAS/MAPK-Weges führt schließlich zur Threoninphosphorylierung und Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-IL-6, welcher an Typ1-Promotorregionen der Akut-Phase-Proteine bindet und deren Expression initiiert [Akira, 1992; Nakajima, 1993]. STAT-Dimere aktivieren ebenfalls die Expression von Akut-Phase-Proteinen nach Bindung an Typ2-Promotorregionen (Abb. 1.7) [Poli, 1990; Wegenka, 1993].

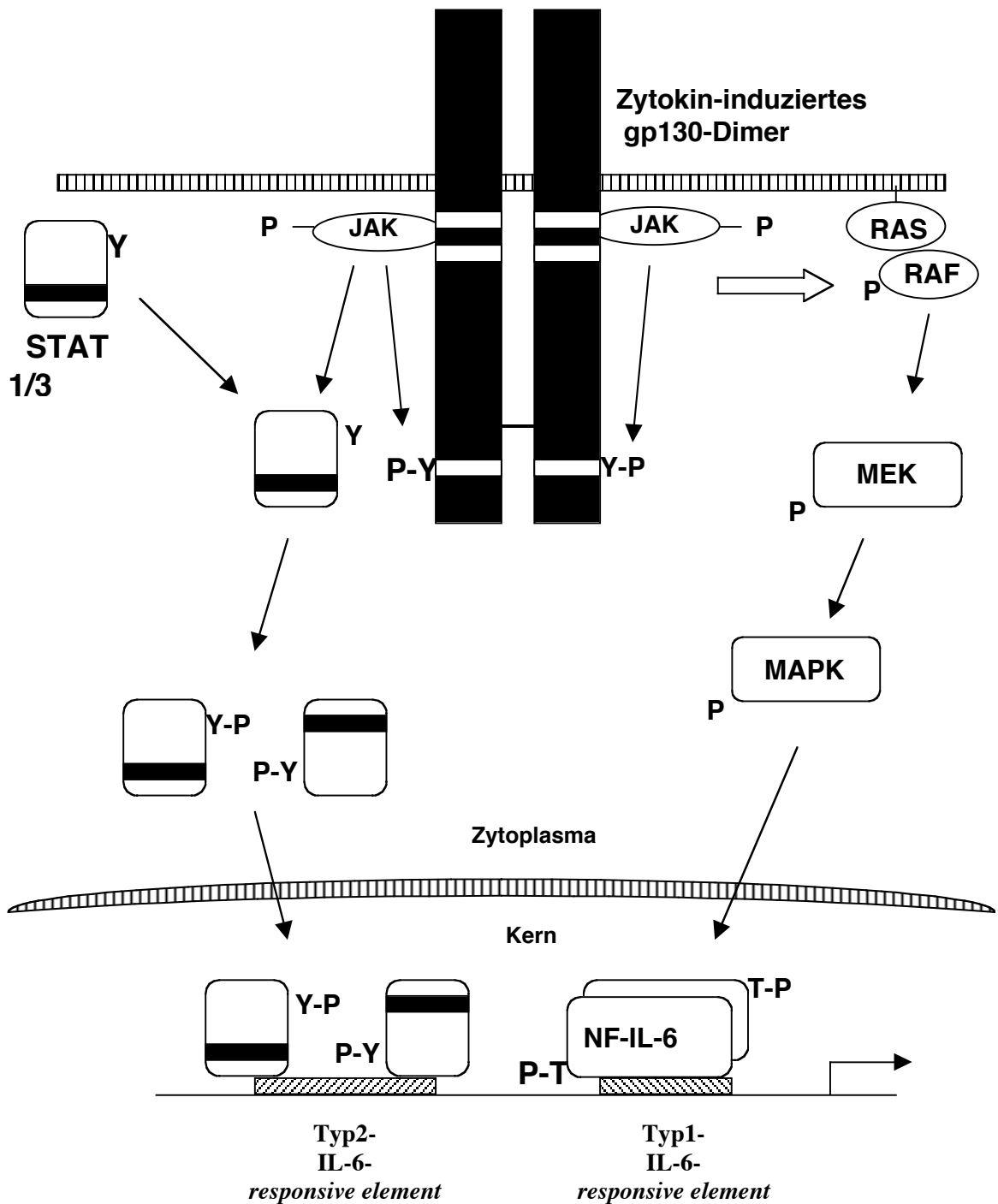


Abb. 1.7. gp130-Signalweg über JAK/STAT und RAF/MAPK (aus Taga & Kishimoto, 1997). Nach der Zytokin-induzierten Dimerisierung von gp130 werden Tyrosinkinasen der JAK-Familie aktiviert, die mit dem box1-Motiv im zytoplasmatischen Bereich des gp130-Moleküls assoziiert sind. Die anschließende Phosphorylierung von Tyrosinseitenketten im box3-Motiv des gp130 durch JAKs führt zur Rekrutierung von STAT-Faktoren, die nach Phosphorylierung durch die benachbarten JAKs dimerisieren und in den Kern wandern. Dort erfolgt die positive Regulation von Akut-Phase-Genen über IL-6-responsive elements vom Typ1. Ein zweiter Signalweg verläuft über eine Kaskade von Ser/Thr-Kinasen, die initial durch RAS aktiviert wird, und endet in der Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-IL-6.

1.5 Der IL-6/IL-6R-Komplex

Aussagen über die molekularen Wechselwirkungen zwischen IL-6 und dem IL-6R lassen sich bisher nur anhand von Mutationsanalysen und Strukturmodellen auf der Grundlage bekannter Zytokin- oder Zytokinrezeptor-Strukturen wie etwa des humanen G-CSF [Hill, 1993] und des humanen GH/GHR-Komplexes [De Vos, 1992] machen [Savino, 1994; Grötzinger, 1997]. Vor allem durch die Konstruktion von chimären Molekülen aus humanem und murinem IL-6 und unter Ausnutzung der asymmetrischen Spezifität des IL-6 (humanes IL-6 wirkt auf humanen und murinen Zellen, murines IL-6 nur auf murinen Zellen) konnten die wichtigsten Kontaktstellen zwischen IL-6 und dem IL-6R sowie IL-6 und gp130 kartiert werden [van Snick, 1990; van Dam, 1993; Ehlers, 1995, 1996]. Gezielte Mutations- und Deletionsanalysen innerhalb dieser Regionen ermöglichten die Identifikation von drei distinkten Bereichen im IL-6-Molekül, die für die Interaktionen im IL-6/IL-6R- und IL-6/gp130-Komplex notwendig sind (Abb. 1.8) [Ehlers, 1994, 1996; de Hon, 1995; Paonessa, 1995]: Region 1 bildet die Kontaktstelle zum IL-6R und umfaßt den Anfang von Helix A, das Ende von Helix D und den C-terminalen Abschnitt der AB-Schleife; Position 2 wird gebildet aus Teilen der A- und C-Helix und ist verantwortlich für die Interaktion mit gp130; Region 3 besteht aus dem Anfang der AB-Schleife, dem C-Terminus der A-Helix und der BC-Schleife nebst angrenzenden Aminosäureresten, dem C-terminalen CD-Schleife und der N-terminalen D-Helix; sie besitzt kein Äquivalent im GH/GHR-Komplex und ermöglicht die Bindung des zweiten gp130-Moleküls bzw. bei anderen Zytokinen der IL-6-Familie des LIF-Rezeptors und damit die Signaltransduktion.

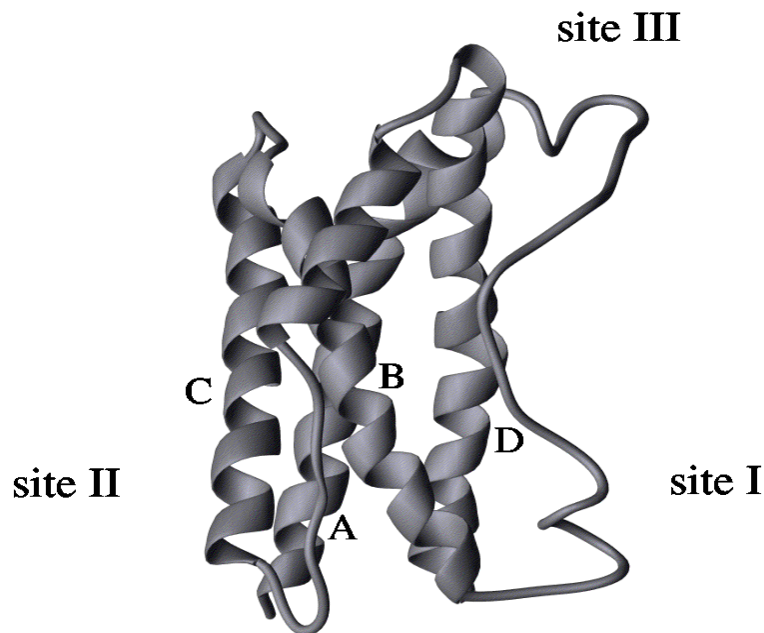


Abb. 1.8. „4-Helix-Bündel“-Struktur des IL-6-Moleküls mit Bindungszeptoren für den IL-6R und gp130. Region 1 ist verantwortlich für die Bindung des IL-6R, Region 2 und 3 bilden die Kontaktstellen zu dem ersten und zweiten gp130-Molekül.

Abb.1.9 zeigt das von Grötzinger et al. erstellte Modell des IL-6/IL-6R-Komplexes auf der Grundlage des strukturell homologen GH/GHR-Komplexes [Grötzinger, 1997]. Bereiche des IL-6-Moleküls, die innerhalb des Komplexes mit dem IL-6R in Wechselwirkung treten (Region 1) sind der Beginn der A-Helix, das Ende der D-Helix und C-terminale Abschnitt der AB-Schleife, die als 2c-Region bezeichnet wird. Die Kontaktstellen im IL-6R-Molekül liegen in der EF-Schleife der ersten CBM-Domäne und in den B'C'- und F'G'-Schleifen der zweiten CBM-Domäne. Durch gerichtete Mutagenese innerhalb dieser Bereiche konnten einzelne Seitenketten ermittelt werden, die in die Bindung zwischen Rezeptor und Ligand involviert sind. Hierzu gehören die Aminosäuren 27-30 in der A-Helix des IL-6-Moleküls [Brakenhoff, 1994] und Phenylalanin 74 und 78 in der 2c-Region am Ende der AB-Schleife [Ehlers, 1994; Kalai, 1997]. Die dritte Region am Ende der D-Helix beinhaltet drei Arginine, 168 [Fontaine, 1994], 179 [Fontaine, 1993] und 182 [Lütticken, 1991]. Mutationen, die eine von diesen Aminosäuren austauschen oder deletieren, führen zu einem Verlust oder einer starken Reduktion der Bindung.

Aminosäureseitenketten im IL-6R, die die Bindung zu IL-6 beeinflussen, sind Tyrosin 188 [Kalai, 1996] (EF-Schleife), Phenylalanin 248 [Yawata, 1993; Kalai, 1996], Tyrosin 249 [Kalai, 1996] Arginin 250 [Yawata, 1993], Glutamat 254 [Yawata, 1993] (B'C'-Schleife) und Glutamat 296, 297 [Kalai, 1997] und 302 [Yawata, 1993] (F'G'-Schleife).

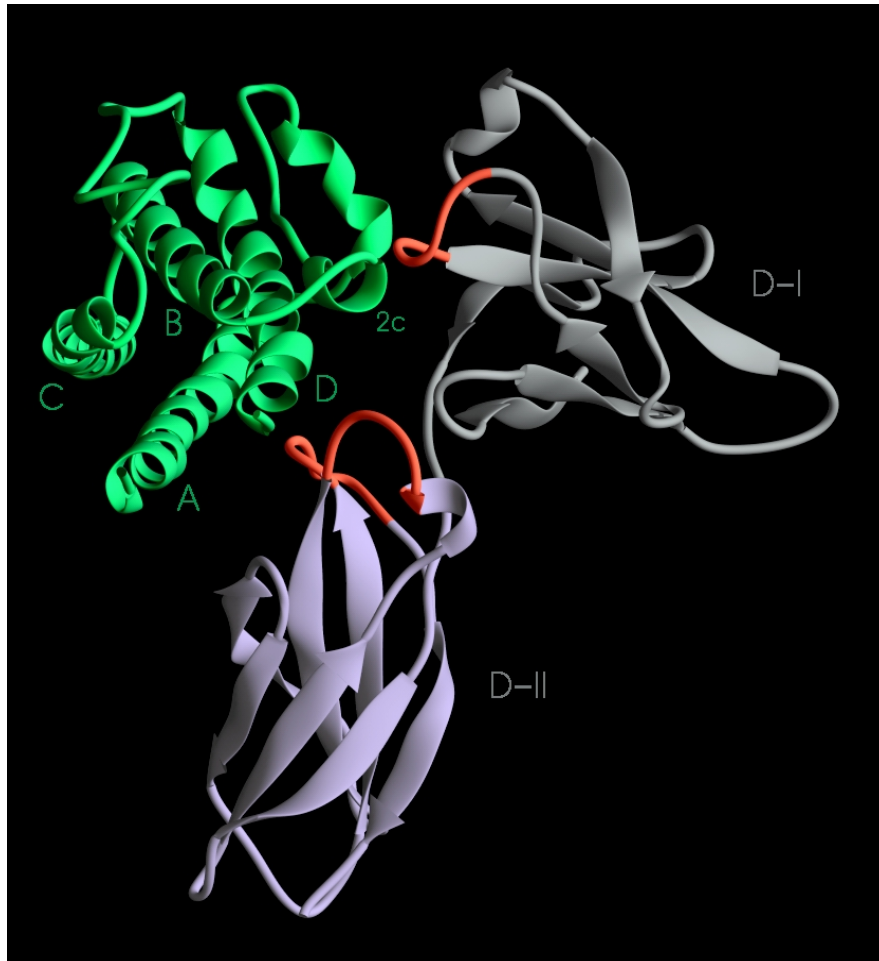


Abb. 1.9. Bändermodell des IL-6/IL-6R-Komplexes (A) [Grötzinger, 1997]. Die Helices im IL-6-Molekül (grün) sind mit A, B, C, D bezeichnet. D-I und D-II stellen die beiden Domänen des CBM im IL-6R-Molekül (grau) dar. Die in die Bindung mit IL-6 involvierten Schleifen (EF in D-I und B'C' und F'G' in D-II) sind rot hervorgehoben.

Die molekularen Interaktionen im IL-6/IL-6R-Komplex lassen sich wie im GH/GHR-Komplex in zwei Kategorien einteilen: in Wechselwirkungen zwischen hydrophoben Seitenketten, die zur Bindungsenergie beitragen, und in Wechselwirkungen zwischen hydrophilen Seitenketten, die für die Spezifität der Bindung verantwortlich sind. Hierbei bilden die hydrophoben Bindungsareale Kernzonen, die von hydrophilen Wechselwirkungen umgeben sind.

In Abb. 1.10 sind die Seitenketten gezeigt, die dem Modell von Grötzinger et al. [Grötzinger, 1997] entsprechend für die Ausbildung von ionischen Wechselwirkungen zwischen IL-6 und dem IL-6R hauptsächlich verantwortlich sind. Im IL-6 sind Glu23, Asp26, Lys27 und Arg30 in der A-Helix und Arg168, 179 und 182 in der D-Helix beteiligt. Hierbei erwiesen sich Arg30 [Kalai, 1997], Arg168 [Fontaine, 1994], Arg179 [Fontaine, 1993] und Arg182 [Lütticken, 1991] als essentiell für die Rezeptorbindung, während Deletionen, die die Seitenketten 1-28 betreffen [Brakenhoff, 1989], eine geringere Rolle zu spielen scheinen. Die korrespondierenden Seitenketten im IL-6R-Molekül sind Arg250 und 252, Asp272, Glu254, 296, 297 und 302. Der Austausch von Arg250, Glu254, 296, 297 und 302 führt jeweils zum Verlust der Bindung, während der Austausch von Asp272 gegen Tyrosin keinen Effekt zeigt [Yawata, 1993; Kalai, 1997]. Arg252 wurde bisher nicht in Mutagenesestudien analysiert.

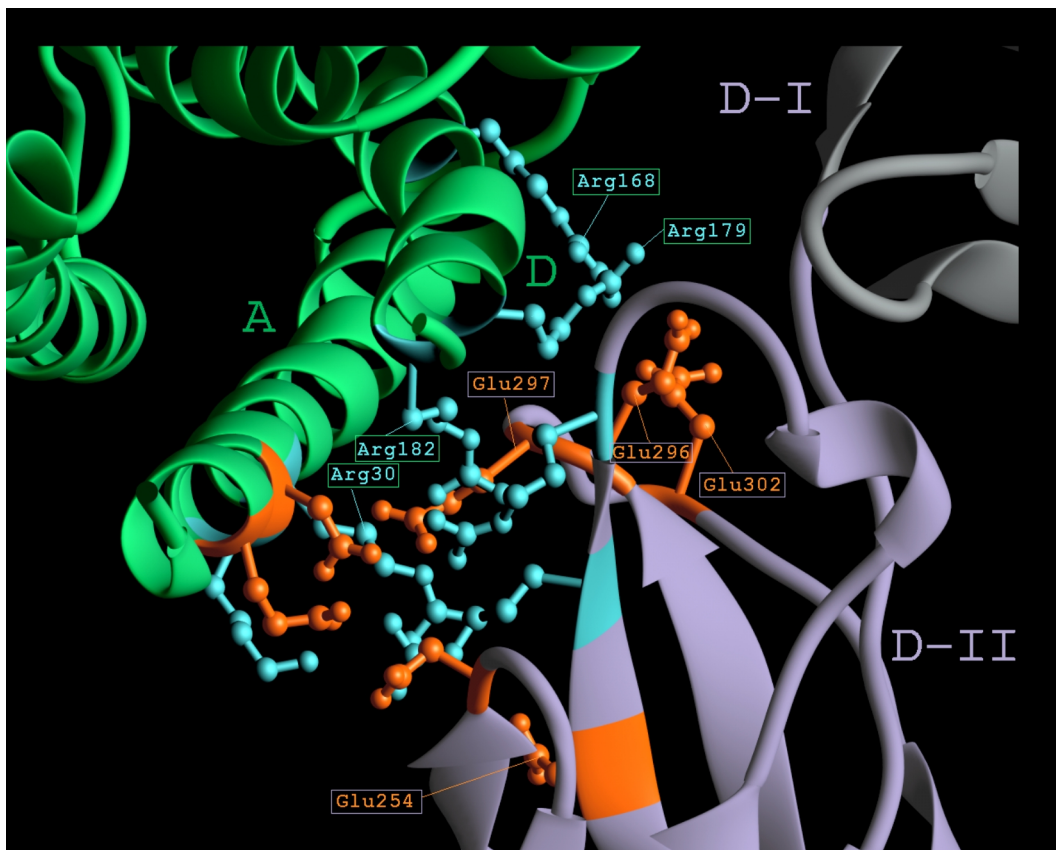


Abb. 1.10. Bändermodell des IL-6/IL-6R-Komplexes (B) [Grötzinger, 1997]. Gezeigt sind die Aminosäureseitenketten, die an ionischen Bindungen beteiligt sind. Positiv geladene Seitenketten sind blau dargestellt, negativ geladene Seitenketten orange. Die Kontaktzonen betreffen im IL-6-Molekül (grün) die A- und D-Helix, im IL-6R (grau) die zweite Domäne (D-II) des zytokinbindenden Moduls.

Die hydrophoben Wechselwirkungen im IL-6/IL-6R-Komplex konzentrieren sich auf zwei distinkte Zonen (Abb. 1.11):

1. Die Phe298-Seitenkette des IL-6R ragt in eine hydrophobe Tasche des IL-6-Moleküls, die aus den Seitenketten Ile29 und 32 und Leu33 in der A-Helix und Leu174 und 178 in der D-Helix gebildet wird. Ein Austausch von Phe298 gegen Ile führt zu einem vollständigen Verlust der Bindung zwischen IL-6 und dem IL-6R [Yawata, 1993]. Dieser hydrophobe Kontaktbereich im IL-6/IL-6R-Komplex wird umgeben von vier Salzbrücken, die ihn vor dem Kontakt mit Wasser schützen: Arg179/Glu296, Arg182/Glu297, Arg168/Glu302 und Arg30/Glu254.
2. Der zweite hydrophobe Kontaktbereich wird gebildet aus den Seitenketten Phe74 und 78 des IL-6 und Phe248 und 249 des IL-6R. Es konnte gezeigt werden, daß bereits der Austausch je einer dieser Seitenketten zu einem vollständigen Verlust der Bindung führt [Ehlers, 1996; Kalai, 1997].

Aus den bisher verfügbaren Daten, die hauptsächlich homologiegestützten Strukturmodellen und gerichteten Mutationsanalysen entstammen, läßt sich folgendes Bild des IL-6/IL-6R-Komplexes entwickeln: die Kontaktregionen zwischen den beiden Molekülen werden im wesentlichen aus zwei hydrophoben Arealen gebildet, die – in Analogie zum Aufbau eines globulären Proteins - durch eine Reihe von hydrophilen Seitenketten-Kontakten zwischen beiden Molekülen schützend umgeben sind. Die für die Bindung von IL-6 essentiellen Seitenketten im IL-6R-Molekül sind hierbei vorwiegend in der C-terminalen Domäne des CBM (D3) lokalisiert. Seitenketten in der N-terminalen Domäne des CBM, die in die Bildung des Komplexes involviert sind, wie z.B. Tyr188, haben lediglich unterstützende Funktionen [Kalai, 1997]. Dies entspricht nicht den Verhältnissen im GH/GHR-Komplex, in dem beide Domänen des CBM gleichwertig zur Bindung beitragen [De Vos, 1992], scheint jedoch im Falle des IL-11/IL-11R-Komplexes in vergleichbarer Weise ausgeprägt zu sein (Grötzinger et al., persönliche Mitteilung).

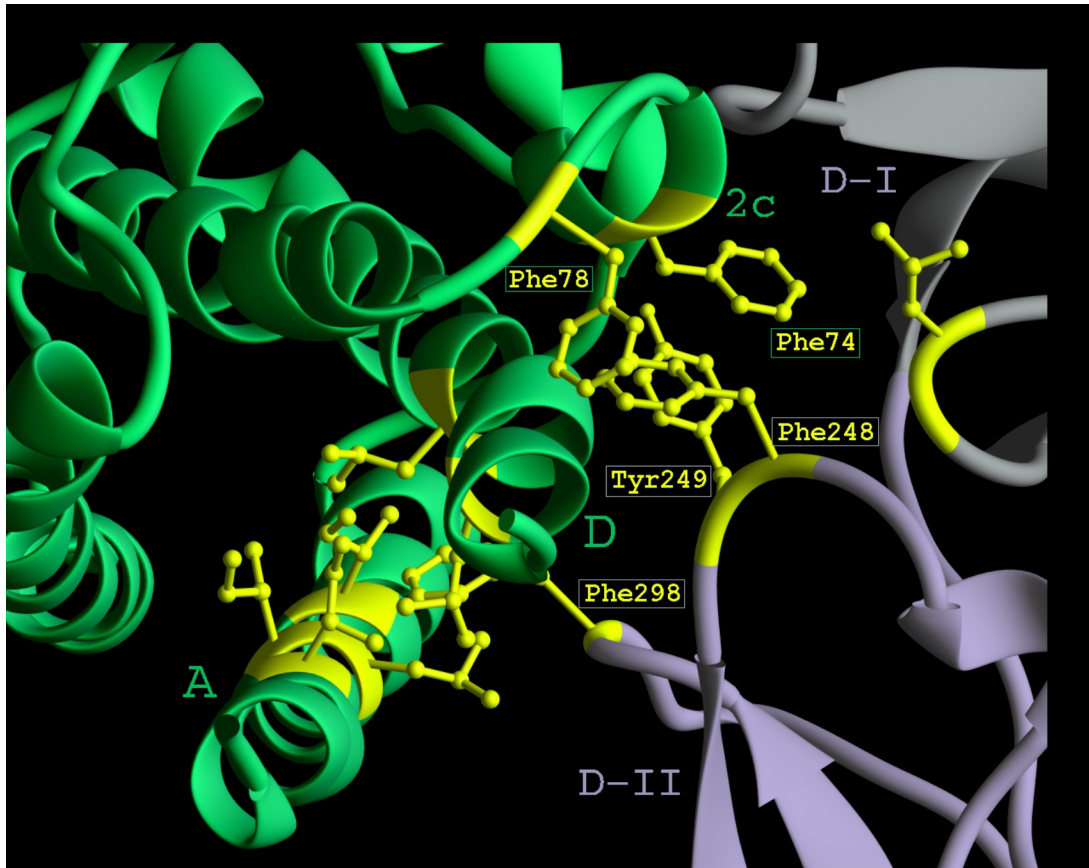


Abb. 1.11. Bändermodell des IL-6/IL-6R-Komplexes (C) [Grötzinger, 1997]. Aminosäureseitenketten, die an hydrophoben Wechselwirkungen beteiligt sind, wurden gelb dargestellt. Diese verteilen sich im IL-6-Molekül (grün) auf die A- und D-Helix und die Region 2c (Übergang zwischen AB-Schleife und B-Helix), im IL-6R (grau) auf Schleifen-Regionen der ersten (D-I) und zweiten (D-II) Domäne des zytokinbindenden Moduls.

1.6 Der IL-6/IL-6R/gp130-Komplex

Im GH/GHR-Komplex bindet ein Molekül GH über die Regionen 1 und 2 an jeweils ein Molekül GHR. Hierbei verwenden die beiden Rezeptoren identische Seitenketten, um an unterschiedliche Epitope des GH zu binden [De Vos, 1992; Wells, 1996]. Im IL-6/IL-6R/gp130-Komplex, der auf der Grundlage des GH/GHR-Komplexes erstellt wurde, entspricht, wie oben beschrieben, Region 1 der Bindungsstelle für den spezifischen IL-6R und Region 2 der Kontaktstelle für ein gp130-Molekül. Diese Analogie basiert auf den asymmetrischen Affinitätsverhältnissen im GH/GHR-Komplex: Region 1 im GH bindet an ein GHR mit höherer Affinität als Region 2 [Clackson & Wells, 1995]. Region 3 in den Zytokinen der IL-6-Familie besitzt kein Gegenstück im GH und ist verantwortlich für die Bindung des zweiten gp130 bzw. eines LIFR oder OSMR [Kallen, 1999].

Durch modellgestützte Mutationsanalysen konnte gezeigt werden, daß die Seitenketten Phe191 und Val252 in D2 und D3 von gp130 essentiell sind für die Bindung an den IL-6/IL-6R-Komplex über Region 2 [Horsten, 1997; Kurth, 1999]. Seitenketten im IL-6, die zu diesem Kontakt beitragen, sind Tyr31, Gly35, Ser118 und Val121, wobei Ser118 und Val121 im Zentrum der Bindungsstelle liegen [Savino, 1994a, 1994b]. Durch die Deletion von D1 des gp130-Moleküls konnten Kurth et al. [Kurth, 1999] zeigen, daß diese ebenfalls für die Bildung des IL-6/IL-6R/gp130-Komplexes notwendig ist. Durch den Austausch von Bindungsepitopen zwischen IL-6 und CNTF gelang es Kallen et al. [Kallen, 1999], Region 3 als gp130- bzw. LIFR-spezifisches Epitop zu charakterisieren, welches mit der Ig-ähnlichen Domäne des jeweiligen Rezeptors interagiert. Mutationen im IL-6-Molekül, die diese Interaktion aufheben, betreffen Gln159 [van Dam, 1993] und Thr162 [Paonessa, 1995]. Seitenketten im IL-6R, die eine Signaltransduktion über gp130 verhindern, ohne aber die Bindung zu IL-6 zu beeinträchtigen, sind Val190 in D2 (erste Domäne des CBM) [Yawata, 1993; Kalai, 1997] und Asn230, His280, Asp281 [Yawata, 1993; Salvati, 1995], Gly285 und His288 [Yawata, 1993] in D3 (zweite Domäne des CBM). Die Bedeutung von D3 des IL-6R für eine IL-6-unabhängige Assoziation mit gp130 wird zudem durch die Beobachtung unterstrichen, daß ein Peptid, welches einem kurzen Abschnitt von D3 entspricht (249-258), die biologische Aktivität von IL-6 inhibieren kann [Grube & Cochrane, 1994].

Das Vorhandensein von drei verschiedenen Bindungsepitopen im IL-6-Molekül deutet auf die Bildung eines tetrameren Signalkomplexes aus einem IL-6R- und zwei gp130-Molekülen hin. Experimente mit rekombinant exprimierten löslichen Komponenten des IL-6R-Komplexes demonstrierten jedoch die Existenz eines hexameren Komplexes aus je zwei Molekülen IL-6, löslichem IL-6R und löslichem gp130 [Ward, 1994; Paonessa, 1995]. Die symmetrische Anordnung der Ligandenbindungsstellen in einem solchen Komplex würde jedoch voraussetzen, daß bei Zytokinen, die ein Heterodimer zur Signalbildung verwenden, wie etwa im CNTF-Molekül, für das ebenfalls ein Hexamer postuliert worden ist, Regionen 2 und 3 gp130 und den LIFR mit gleicher Spezifität binden können [Grötzinger, 1999] (Abb. 1. 12 A).

Die Tatsache, daß eine IL-6/CNTF-Chimäre, bei der die Region 3 von CNTF auf IL-6 übertragen wurde, ein gp130/LIFR-Heterodimer zur Signalbildung benötigt, charakterisiert Region 3 im CNTF-Molekül jedoch als LIFR-spezifisches Bindungsepitop und favorisiert ein tetrameres Modell [Kallen, 1999] (Abb. 1. 12 B).

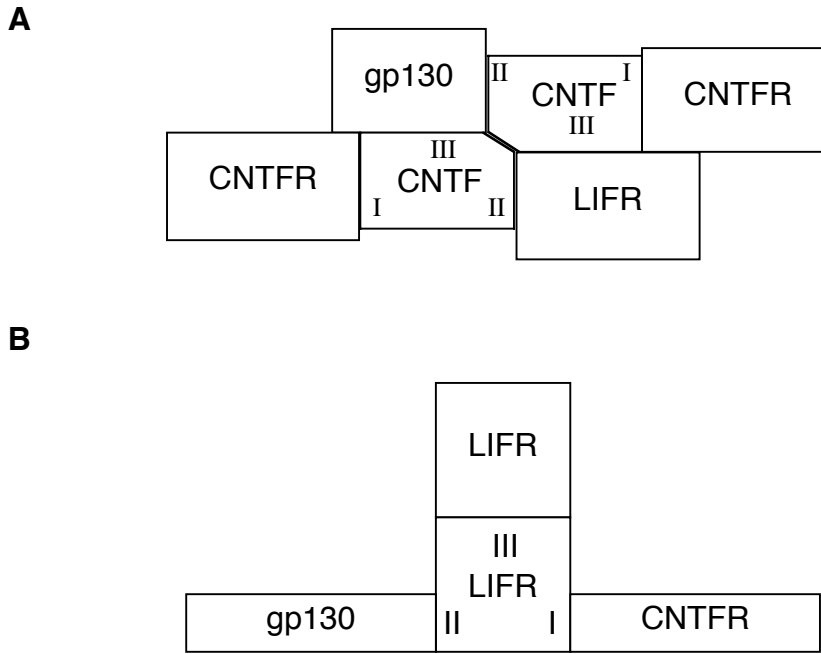


Abb. 1.12. Hexameres und tetrameres Modell des CNTFR-Komplexes [Grötzinger, 1999].

A. Hexameres Modell des CNTFR-Komplexes [De Serio, 1995]. Jedes CNTF-Molekül bindet einen CNTFR und einen LIFR bzw. ein gp130. Diese Trimere dimerisieren über eine Kontaktstelle, die beide CNTF-Moleküle verbindet. B. Tetrameres Modell des CNTFR-Komplexes [Kallen, 1999]. Der LIFR wird spezifisch über Region 3 gebunden. Im IL-6R-Komplex wird diese Position vom zweiten gp130 eingenommen.

Der Nachweis von hexameren Ligand-Rezeptor-Komplexen gelingt nur bei Einsatz der Bindungspartner in mikromolaren Konzentrationen [Ward, 1994; Paonessa, 1995]. Abgesehen von der möglichen Bildung unphysiologischer Artefakte in einem solchen Konzentrationsbereich wurde als Erklärungsmodell für einen hexameren Komplex ein protektiver Mechanismus vorgeschlagen: im geringen Konzentrationsbereich kommt es zu der Bildung eines aktiven Tetramers, bei höheren Konzentrationen erzwingt die Bindung eines weiteren IL-6/IL-6R-Komplexes den Übergang in eine inaktive hexamere Anordnung [Grötzinger, 1999].

Hierfür sprechen auch die glockenförmigen Dosis-Abhängigkeitskurven [van Dam, 1993; Curtis, 1997] der Zytokine, die über ein gp130-Homodimer signalisieren. Voraussetzung für dieses Modell ist die Existenz eines vorgeformten, symmetrischen gp130-Dimers auf der Zelloberfläche, wie von Auguste et al. (1997) [Auguste, 1997] für das gp130/OSMR-Heterodimer beschrieben. Ein solcher Komplex, in dem sich die beiden gp130-Moleküle über D1 und D2+D3 kontaktieren, würde die sequentielle Assoziation erst eines, dann eines zweiten IL-6/IL-6R-Komplexes erklären (Abb. 1.13).

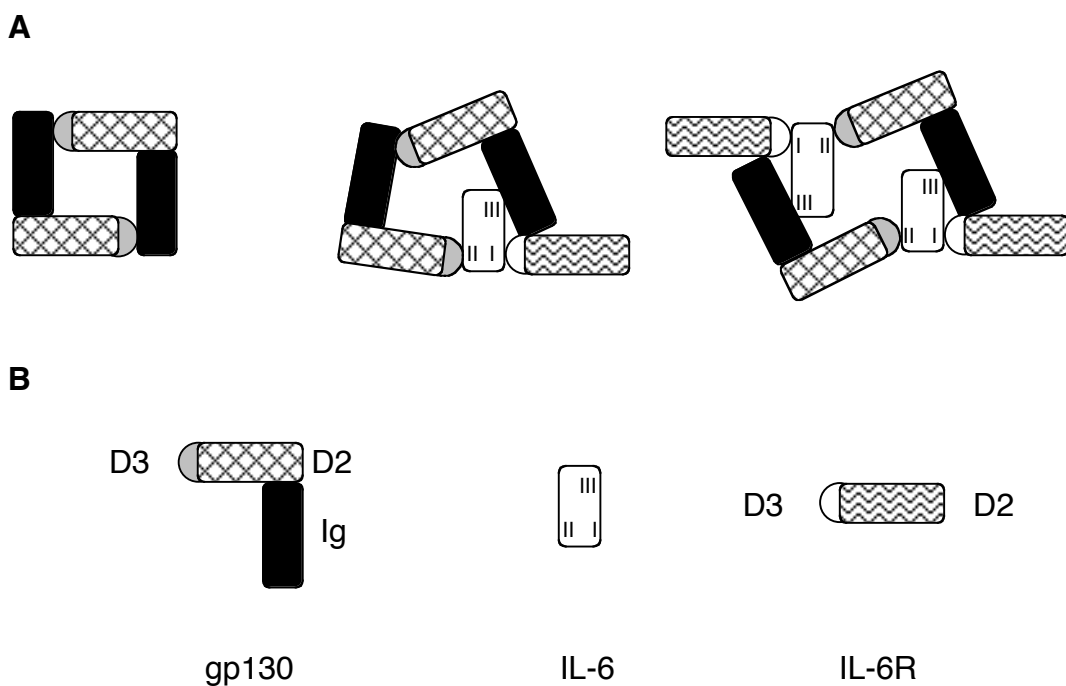


Abb. 1.13. Tetramer-Hexamer-Übergangs-Modell des IL-6R-Komplexes [Grötzinger, 1999]. A. Das von Grötzinger et al. vorgeschlagene Modell der Interaktion des IL-6/IL-6R-Komplexes mit gp130 geht von einem vorgeformten, symmetrischen gp130-Dimer (links) aus, das zunächst mit einem IL-6/IL-6R-Komplex ein aktives Tetramer (Mitte) bildet, welches wiederum in der Lage ist, durch Bindung eines zweiten IL-6/IL-6R-Komplexes in den inaktiven hexameren Zustand (rechts) überzugehen. B. Legende der verwandten Symbole für gp130, IL-6 und den IL-6R. Die Interaktionsbereiche im IL-6-Molekül sind mit I, II und III bezeichnet.

1.7 Strukturaufklärung von Molekülen mittels NMR-Spektroskopie

Die Funktion eines Proteins wird maßgeblich von seiner Struktur bestimmt. Die spezifische Erkennung von Liganden durch ihre Rezeptoren, DNS-Sequenzen durch Transkriptionsfaktoren oder von regulatorischen Proteinen untereinander wird erst durch deren dreidimensionale Struktur ermöglicht. Zum Verständnis der Funktion eines Proteins kann daher die Kenntnis seiner dreidimensionalen Struktur entscheidend beitragen. Zu deren Klärung stehen zwei experimentelle Methoden zur Verfügung. Die Röntgenstrukturanalyse benötigt Einkristalle von Proteinen, für die NMR-Spektroskopie muß eine Lösung des Proteins in ausreichender Konzentration vorliegen. Zur Strukturaufklärung von Proteinen und DNS-Fragmenten hat sich inzwischen die NMR-Spektroskopie etabliert [Wüthrich, 1986]. Die wichtigste Neuerung auf diesem Weg war das Konzept der zweidimensionalen (2D) NMR-Spektroskopie. Diese ermöglicht die Interpretation der komplexen NMR-Spektren von Proteinen oder DNS-Fragmenten und die Ermittlung der für die Strukturberechnung benötigten Parameter. Die NMR-spektroskopische Untersuchung von Proteinen blieb aber zunächst auf relativ kleine Moleküle mit einer Größe bis zu ca. 80 Aminosäureresten beschränkt, da sich für die Analyse größerer Proteine Signalüberlagerungen in den 2D-Spektren als limitierend erwiesen [Kaptein, 1988]. Erst die drei- (3D) und vierdimensionalen (4D) heteronuklearen (^{15}N , ^{13}C) NMR-Techniken ermöglichten die Überwindung dieser Barriere [Zuiderweg & Fesik, 1989]. Heute lassen sich Systeme mit einem Molekulargewicht bis zu 40 kDa untersuchen. Versuche, die Komponenten des IL-6/IL-6R-Systems im Komplex zu kristallisieren, waren bisher nicht erfolgreich. Daher wird alternativ versucht, mit Hilfe der Röntgenstrukturanalyse und der NMR-Spektroskopie Teilstrukturen des Rezeptorkomplexes aufzuklären, um so das Gesamtbild mosaikartig zusammensetzen zu können. Die Strukturen des CBM [Bravo, 1998] und der dritten extrazellulären Domäne (D3) [Kernebeck, 1999] des gp130-Moleküls sind hierzu bereits bestimmt worden. Die vorliegende Arbeit hatte zum Ziel, die in die Zytokinbindung involvierten Domänen (D2 und D3) des IL-6R für die NMR-spektroskopische Strukturanalyse isoliert zur Verfügung zu stellen, da die Expression und Renaturierung des gesamten löslichen Rezeptors (D2+D3) in *E. coli* nicht zu den hierzu benötigten Ausbeuten geführt hatte [Stoyan, 1993].

1.8 Ziele der Arbeit

Die vorliegende Arbeit hatte folgende Ziele:

1. Expression der zytokinbindenden Domänen des humanen IL-6R in *E. coli*
2. Charakterisierung der IL-6R-Domänen in bezug auf ihre Struktur (Faltung) und Funktion (Ligandenbindung)
3. Etablierung einer Methode zur Gewinnung von großen Mengen (mehrere mg) gereinigten Proteins, um die Strukturaufklärung durch NMR-Spektroskopie zu ermöglichen
4. Markierung der Domänenproteine mit ^{15}N und ^{13}C für die mehrdimensionale, heteronukleare NMR-Spektroskopie

2. Material und Methoden

2.1 Chemikalien

Es wurden, soweit erhältlich, ausschließlich Chemikalien des Reinheitsgrades pro analysi der Firmen Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe), Fluka (Buchs), Sigma (Deisenhofen) und GERBU (Gaisheim) verwendet.

2.2 Enzyme

Restriktionsenzyme wurden von Biolabs (Beverly, MA, USA) oder AGS (Heidelberg) bezogen. DNS-Sequenzierungen erfolgten mit Hilfe eines automatischen Sequenziergerätes („dyedeoxy chain termination kit, 373A DANN sequencer“, Applied Biosystems, Weiterstadt). PCR-Reaktionen wurden mit Vent-Polymerase (Biolabs, Schwalbach) gemäß den Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.3 Geräte

Der optische Biosensor IASYS™ stammte von FISONs (Loughborough, England), die Chromatographieanlage von Pharmacia Biotech (Uppsala, Schweden), das CD-Spektrometer von Aviv (Lakewood, NJ, USA), das NMR-Spektrometer von Bruker und der Fermenter von New Brunswick Scientific (Edison, NJ, USA).

2.4 Antikörper und rekombinante Proteine

Die spezifische Detektion von löslichem IL-6R oder D3 (D3-6.2) erfolgte durch einen polyklonalen Kaninchen-Antikörper (6.2) [Stoyan, 1993]. Anti-Kaninchen-IgG-POD stammte von Sigma (Deisenhofen). Rekombinanter humaner löslicher IL-6R (bestehend aus dem extrazellulären Teil ohne Ig-Domäne), rekombinantes humanes IL-6, IL-6/sIL-6R-Fusionsprotein (H-IL-6), Fc-Fusionsproteine von IL-6, gp130 und H-IL-6 wurden wie beschrieben exprimiert und aufgereinigt [Stoyan, 1993; Fischer, 1997; Jostock, 1999].

2.5 Molekularbiologische Techniken

Techniken zur Modifikation und Präparation von DNS, Polymerase-Ketten-Reaktionen, Analyse von DNS mittels Agarosegelelektrophorese und bakterielle Transformationen wurden, falls nicht anders vermerkt, nach Standardvorschriften durchgeführt [Sambrook, 1989].

2.6 SDS-PAGE (SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese) und Western Blot

Die Detektion von Proteinen erfolgte durch Auftrennung in einem 12,5%igen Gel nach Laemmli [Laemmli, 1970]. Für einen immunologischen Nachweis durch Western Blot wurden aufgetrennte Proteine elektrophoretisch auf Nylonmembranen (GeneScreen Plus, NEN Life Science Products, Boston, MA, USA) übertragen und mit spezifischen Erstantikörpern und einem peroxydasekonjugierten Zweitantikörper inkubiert. Die Peroxydaseaktivität wurde mit Hilfe des Peroxydasesubstrates BM Blue precipitating (Boehringer Mannheim) nachgewiesen.

2.7 ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay)

Bindungsstudien zwischen D3 (D3-6.2) bzw. dem löslichen IL-6R und IL-6 wurden mittels eines sandwich ELISA bei Raumtemperatur durchgeführt. Hierzu wurden ELISA-Platten (Microtest III, Falcon, Oxnard, CA, USA) mit rekombinatem humanen IL-6 (10µg/ml) beschichtet, danach mit 5%iger Trockenmilchlösung (ICN, Mannheim) blockiert und mit D3 (D3-6.2) oder löslichem IL-6R (je 10µg/ml) 1 Stunde inkubiert. Nach Waschen mit PBS wurde gebundenes Protein mit einem IL-6R-spezifischen Erstantikörper (1:2000) und einem peroxydasekonjugierten anti-Kaninchen IgG (1:2000) nachgewiesen. Die Detektion der Peroxydaseaktivität erfolgte durch das POD Substrat BM Blue soluble (Boehringer Mannheim). Als Kontrolle wurden ELISA-Platten mit 5%iger Milchlösung beschichtet und wie beschrieben inkubiert.

2.8 Immunpräzipitation

100 ng gereinigtes D3 (D3-6.2)-Protein oder löslicher IL-6R wurden für 4 Stunden bei 4°C mit einem 20fachen Überschuß von humanem IL-6-Fc oder einem 10fachen Überschuß von humanem gp130-Fc (allein oder in Kombination mit 300ng humanem IL-6) oder H-IL-6-Fc inkubiert. Immunkomplexe wurden mit Protein A-Sepharose (Amersham Pharmacia, Uppsala, Schweden) gefällt, und kopräzipitiertes D3 (D3-6.2) oder IL-6R Protein wurde durch Western Blot mit einem IL-6R-spezifischen Antikörper nachgewiesen.

2.9 Konstruktion der Expressionsvektoren

Die kodierenden Regionen für die Domänen D2, D3 und D3-6.2 wurden unter Verwendung der IL-6Rezeptor-cDNS als Matrize mittels PCR amplifiziert. Zur Einklonierung der amplifizierten Fragmente in die Expressionsvektoren pRSET 5b und pRSET 5d wurden hierbei folgende Restriktionsstellen eingeführt:

D2 (pRSET 5d)	D3 + D3-6.2 (pRSET 5b)
Forward-Primer	Forward-Primer
5'-gcg gcc atg gct ccc gag gag ccc cag c-3' ▲ NcoI	5'-ccg gcg cat atg gga atc ttg cag cct g-3' ▲ NdeI
Reverse-Primer	Reverse-Primer (unterer Primer für D3-6.2)
5'-ggc cca ggc tta cgg atc agg ctg caa g-3' ▲ HindIII	5'-ggc cca agc tta ctc agc tgg agg act cc-3' ▲ HindIII 5'-ggc cca ▼ agc tta agt agt aag tgc ctg-3'

Die PCR wurde in einem Gesamtvolumen von 50µl PCR-Puffer (10mM KCl, 20mM Tris-HCl, pH 8,8, 10 mM $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2mM MgSO_4 , 0,1% Triton X-100, 0,2mM jeden dNTPs) zusammen mit 0,25ng Matrizen-DNS, 0,5 U Vent-Polymerase und 1µM der jeweiligen Primerpaare durchgeführt. Die Amplifizierung der DNS-Fragmente erfolgte durch 35 Zyklen von Denaturierung (45s, 94°C), primer annealing (45s, 60°C) und Elongation (45s, 72°C). Die erhaltenen PCR-Produkte wurden aufgereinigt, verdaut und in die entsprechenden Vektoren ligiert. Die Sequenz der cDNS-Konstrukte wurde durch automatische Sequenzierung verifiziert.

2.10 Expression der IL-6Rezeptor-Domänen in E. coli BL21 (DE3) Zellen

Die amplifizierten Fragmente aus der IL-6Rezeptor cDNS wurden nach Klonierung in die pRSET-Vektoren, soweit möglich, in E. coli BL21 exprimiert [Studier, 1990]. Das Genom von E. coli BL21 ist so organisiert, daß auf ein Lac-Operon die cDNS für die T7-Polymerase des Bakteriophagen DE3 folgt. Ein Repressor, der an das Lac-Operon bindet, verhindert im nichtinduzierten Zustand die Expression der T7-Polymerase. Die Induktion erfolgt durch die Zugabe des Substratanalogons Isopropyl-β-D-thiogalaktopyranosid (IPTG), das nach Interaktion mit dem Repressor dessen Ablösung vom Operator bewirkt. Die T7-Polymerase kann hierauf exprimiert werden und initiiert ihrerseits die Expression des Fremdproteins, das in der Regel im bakteriellen Zytoplasma in Form von inclusion bodies aggregiert. Zur Expression wurden zunächst 200ml Minimalmedium [Neubauer, 1995] mit Ampicillin (50µg/ml), Glucose (2g/l) und Spurenelementen versetzt, mit 2ml Vorkultur eines einzelnen Klons angeimpft und über Nacht bei 37°C auf einem Schüttler inkubiert. Die Hauptkultur von 3l Minimalmedium wurde mit der gesamten Vorkultur angeimpft und in einem Fermenter bei 37°C und einer minimalen Sauerstoffsättigung von 30% inkubiert. Die Induktion erfolgte durch Zugabe von IPTG (Endkonzentration 0,4 mM) bei einer OD_{600} von etwa 3,0 und einer spezifischen Wachstumsrate von $\mu = 0,7$, worauf die Fermentation für weitere 2 Stunden weitergeführt wurde.

2.11 Proteinreinigung und Zurückfaltung

Die Bakterienzellen wurden durch Zentrifugation geerntet und in Lysispuffer (50mM Tris-HCl, pH 7,5, 1mM EDTA, 1% Tween 20, 1mM Dithiothreitol, 1mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)) resuspendiert. Vollständige Lyse der Zellen und eine Anreicherung der inclusion bodies erfolgten durch wiederholtes Frieren und Tauen der Bakteriensuspension, gefolgt von einer 3minütigen Behandlung mit Ultraschall und mehreren Waschschrinen. Überstände und Lysate wurden durch SDS-PAGE und Western Blot analysiert und die angereicherten inclusion bodies in 6M Guanidin-hydrochlorid, 50mM Tris-HCl, pH 8,0, 10mM Dithiothreitol aufgenommen. Eine Superdex²⁰⁰ (16/60) Säule (Pharmacia) wurde mit einem geeigneten Renaturierungspuffer (50mM Na₃PO₄, pH 5,0, 250mM NaCl, 0,5mM EDTA) equilibriert, mit 1,5ml der solubilisierten inclusion bodies beladen und einer konstanten Flußrate von 1,5ml/min betrieben. Die Fraktionen wurden gesammelt, durch SDS-PAGE analysiert und vereinigt.

2.12 CD-Spektroskopie

CD-spektroskopische Messungen wurden an einem Aviv 62DS CD-Spekrometer (Institut für Biochemie, Klinikum der RWTH Aachen), ausgestattet mit einer Temperaturkontrolleinheit und einem Jasco J-600 Spektralpolarimeter (beides kalibriert nach Chen & Yang [Chen & Yang, 1977]), durchgeführt. Die spektrale Bandbreite betrug 1,5nm. Die Zeitkonstante lag in einem Bereich zwischen 1 und 4 Sekunden und die Schichtdicke der Küvetten zwischen 0,1 und 10mm.

2.13 Kinetische Messungen

Assoziations- und Dissoziationskonstanten für die Bindung von Liganden an IL-6 konnten mit Hilfe eines optischen Biosensors IASYSTM (FISONS) ermittelt werden, der in der Lage ist, molekulare Interaktionen in Echtzeit darzustellen. Hierzu wurde IL-6, nach Aktivierung der Carboxymethyl-dextran (CMD)-Matrix einer IASYSTM Küvette mit EDC (1-Etyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid)/NHS (N-Hydroxysuccinimid), über freie Aminogruppen kovalent immobilisiert. Nicht besetzte Succinimidestergruppen der aktivierten Matrix wurden mit Ethanolamin abgesättigt. Nach Equilibrierung der mit IL-6 beschichteten Küvette mit PBS/0,02% Tween 20

(PBST) wurde eine Serie von Experimenten mit verschiedenen Konzentrationen von D3 (D3-6.2) durchgeführt. Die Assoziation wurde für mindestens 2 Minuten aufgenommen, die Probe durch PBST ersetzt und die Dissoziationsphase wieder entsprechend verfolgt. Nach jedem Experiment wurde die Küvette mit 5 mM HCl regeneriert und mit PBST equilibriert. Die erhaltenen Assoziations- und Dissoziationskurven wurden mittels nichtlinearer Regression mit der FASTfit software (FISONS, UK) analysiert, die den Marquardt-Levenburg Algorithmus für iteratives Anpassen verwendet.

2.14 NMR-Spektroskopie

Die eindimensionalen ^1H -Spektren wurden mit einem Bruker-Spektrometer (600 MHz) (Institut für Biol. Information II, Forschungszentrum Jülich) bei 25°C durchgeführt. Die Konzentration des Proteins lag bei ca. 150 mM. Die Proteinproben wurden für die Messungen in PBS aufgenommen.

3. Ergebnisse

3.1 Klonierung und Expression der IL-6R-Domänen D2, D3 und D3-6.2

Die cDNS-Fragmente für die Domänen D2, D3 und D3-6.2 wurden, wie in 2.9 beschrieben, amplifiziert und in die Vektoren pRSET5b (D3 und D3-6.2) und pRSET5d (D2) einkloniert. Die so erhaltenen Konstrukte wurden durch Restriktionsanalyse und automatische Sequenzierung verifiziert. In Abb. 3.1 sind die den cDNS-Fragmenten entsprechenden extrazellulären Sequenzabschnitte des humanen IL-6Rezeptors schematisch dargestellt. Das Konstrukt für Domäne 2 (D2) umfaßt die Aminosäuren 114-218, das für Domäne 3 (D3) die Aminosäuren 212-321. Ein zweites Konstrukt für Domäne 3, das für die Aminosäuren 212-336 codiert, beinhaltet in dem zusätzlichen C-terminalen Bereich eine Erkennungsstelle für einen IL-6R-spezifischen polyklonalen Antikörper (6.2) [Stoyan, 1993].

1	<u>MLAVGCALLAALLAAPGAALAPRRCPAQEVARGVLTSLPGDSVTLT</u> CPGV	50
51	EPEDNATVHWVLRKPAAGSHPSRWAGMGRLLLLRSVQLHDSGNYSYRAG	100
101	RPAGTVHLLVDVP PEEPQLS C FRKSPLSNVV C EWGPPRTPSLTTKAVLLV	150
151	RKFQNSPAEDFQEP C QVSQESQKFS C QLAVPEGDSSFFYIVSMCVASSVGS	200
201	KFSKTQTFQGC GILQPDP PANITVTAVARNPRWLSVTWQDPHSWNSSFYR	250
251	LRFELRVRAERSKTFTTWMVKDLQHHCVIHDAWSGLRHVVQLRAQEFGQ	300
301	GE WSEWS SPEAMGTPWTESRSP PAENEVSTPMQALTT NKDDDNILFRDSAN	350
351	ATSLPVQ <u>DSSSVPLPTFLVAGGSLAFGTL</u> LCIAIVLRFKKTWKLRALKEG	400
401	 KTSMHQLVPERPRPTPVLVPLISPPVSPSSLGSDNTSSHNRPDA	450
451	RDPRSPYDISNTDVFFPR	

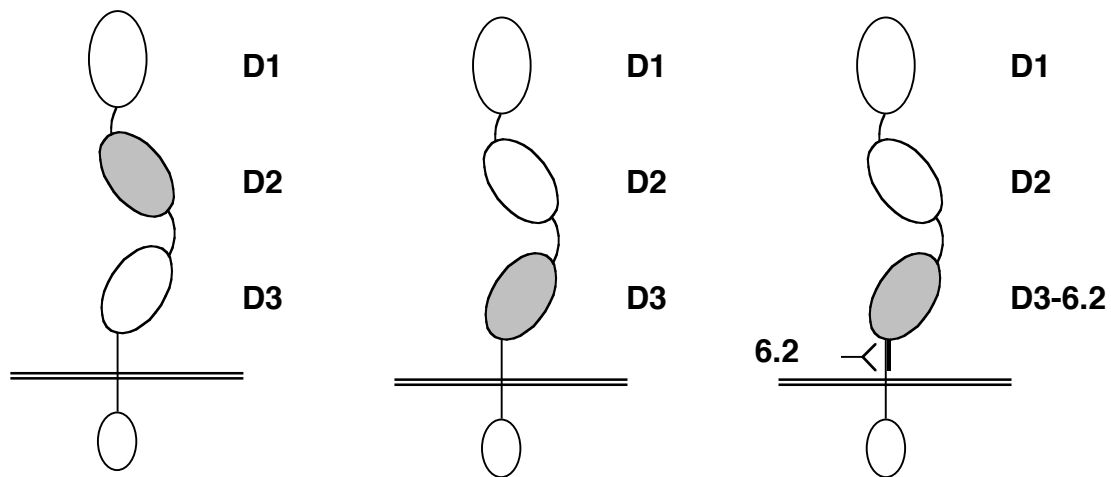


Abb. 3.1. Schematische Darstellung der IL-6-Rezeptor-Domänen. Der humane IL-6R ist schematisch in seiner Domänenstruktur dargestellt, wobei D1 die N-terminale Ig-Domäne und D2 und D3 die beiden Domänen des zytokinbindenden Moduls darstellen. Das Konstrukt D3-6.2 (rechte Zeichnung) codiert zusätzlich zu der Domäne 3 für einen kurzen C-terminalen Bereich des löslichen IL-6R, der eine Erkennungsstelle für den polyklonalen IL-6R-spezifischen Antikörper 6.2 enthält. Oben ist die Aminosäuresequenz des humanen IL-6R in Form des Einbuchstabencodes angegeben. Die 5'- und 3'-Grenzen der PCR-Produkte sind durch Pfeile markiert. Das Signalpeptid ist einfach, die Transmembrandomäne doppelt unterstrichen. Die 4 konservierten Cysteine in Domäne 2 und das konservierte WSXWS-Motiv in Domäne 3 sind hervorgehoben. \times bezeichnet die natürliche Schnittstelle des Rezeptors dicht oberhalb der Membran.

Die Vektoren mit den eingefügten cDNS-Fragmenten für die IL-6R-Domänen wurden zur Expression in *E. coli* BL21 (DE3)-Zellen transformiert. Die Expression erfolgte zunächst versuchsweise in kleinem Maßstab (Schüttelkultur). Abb.3.2 zeigt ein SDS-Gel mit den Bakterienlysaten vor und nach Induktion der Expression durch die Zugabe von IPTG. Eine signifikante Expression des Fremdproteins konnte nach mehrmaligem Versuch nur für das Konstrukt D3-6.2 nachgewiesen werden. Das entsprechende Protein ließ sich in der SDS-PAGE in Form einer Bande auf der Höhe von 17 kDa detektieren. Das rechnerische Molekulargewicht für dieses Protein liegt bei 14,5 kDa. Die ausbleibende oder nur sehr geringe Expression der Konstrukte D2 und D3 kann mehrere Ursachen haben. Denkbar ist z.B. eine Toxizität der Fremdproteine für die Bakterienzellen oder eine erhöhte Empfindlichkeit dieser Proteine gegenüber bakteriellen Proteasen.

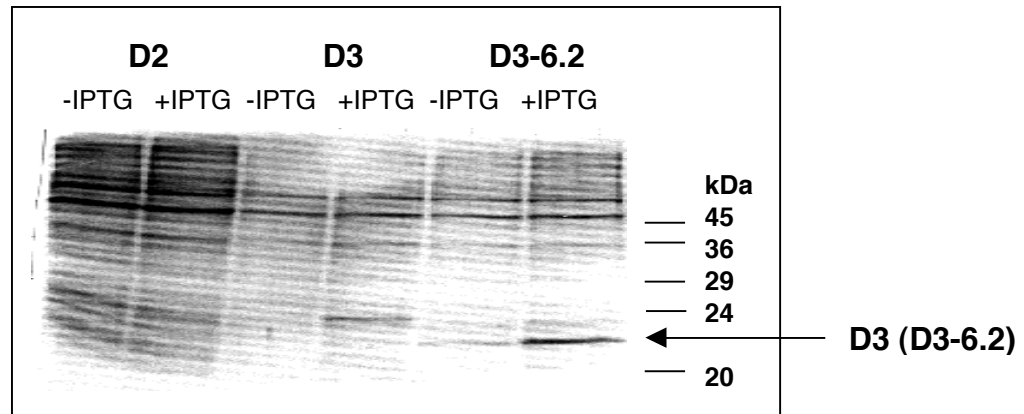


Abb. 3.2. Expressionsversuch für die IL-6R-Konstrukte D2, D3 und D3-6.2. E. coli BL21 (DE3)-Zellen wurden mit den oben beschriebenen IL-6R-Konstrukten transformiert und bis zu einer OD_{600} von 0,5 bei 37°C in einer Schüttelkultur inkubiert. Nach Induktion der Expression durch die Zugabe von IPTG (0,4 mM) wurde die Kultur für eine weitere Stunde inkubiert. Aliquots der Bakterienkulturen wurden vor und nach Induktion entnommen, in Lysispuffer aufgenommen und in einem 12,5%igen SDS-Gel aufgetrennt. Eine signifikant erhöhte Expression eines nichtbakteriellen Proteins nach Induktion zeigte sich nur für das Konstrukt D3-6.2. Die entsprechende Bande erscheint im SDS-Gel auf einer Höhe von ca. 17 kDa. Eine basale Expression des rekombinanten Proteins ohne Induktion durch IPTG konnte nicht nachgewiesen werden.

Die Expression von Domäne 3 (D3-6.2) in Form von zytoplasmatischen inclusion bodies [Schein, 1993] konnte durch mehrmaliges Waschen des Bakterienlysats mit Lysispuffer (s. Material und Methoden) bestätigt werden. Hierbei reicherte sich das Protein in der unlöslichen Fraktion des Bakterienlysats stark an, während es im Überstand in löslicher Form nicht nachzuweisen war (vgl. Abb 3.4). Zur Expression von D3-6.2 in großem Maßstab wurde eine Kultur von 3l mit einer 250ml-Vorkultur angeimpft und in einem 10l-Fermenter bei 37°C und einer minimalen Sauerstoffsättigung von 30% bis zu einer OD_{600} von ca. 3 inkubiert. Dieser Punkt in der Zelldichte war in Versuchskulturen ohne Induktionsvorgang als der Beginn der exponentiellen Wachstumsphase identifiziert worden (vgl. Abb 3.3). Die Expression des D3 (D3-6.2)-Proteins wurde dann durch die Zugabe von IPTG (0,4 mM) induziert und die Inkubation für weitere 2 Stunden fortgesetzt (vgl. Abb. 3.5). Nach Abbruch der Fermentation wurden die Bakterien durch Zentrifugation geerntet und in Lysispuffer resuspendiert. Die inclusion bodies wurden, wie in 2.11 beschrieben, angereichert und in 6M Guanidin-Hydrochlorid aufgenommen.

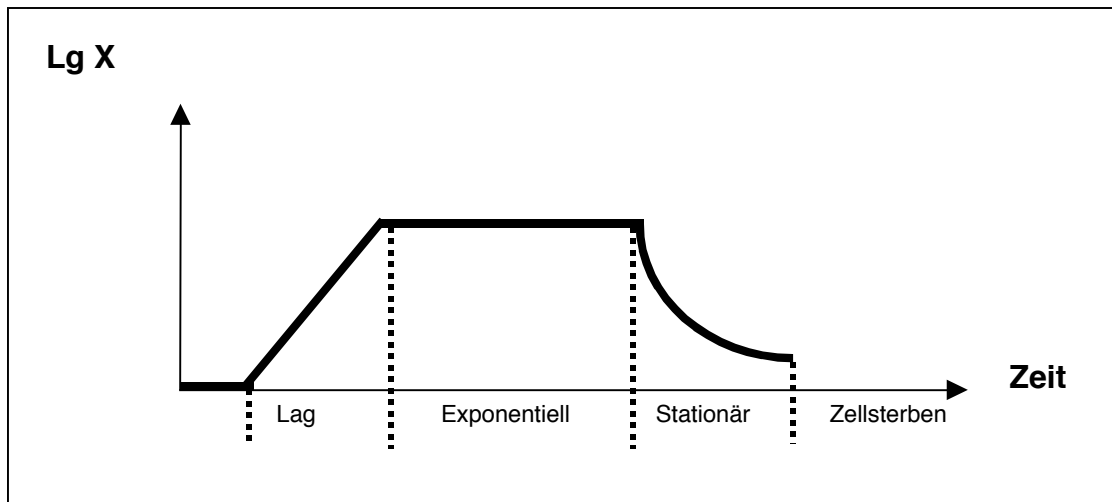


Abb. 3.3. Wachstumskurve einer statischen Bakterienkultur [Enfors & Häggström, 1994]. Anlauf- oder Lag-Phase: Zeit zwischen Animpfen und Erreichen der maximalen Teilungsrate. Exponentielle oder logarithmische Phase: Phase der konstanten maximalen Teilungsrate. Stationäre Phase: Phase ohne Zellteilung. Sterbephase: Rückgang der Zelldichte (X). Die Expression eines Fremdproteins wird auf den Beginn der exponentiellen Wachstumsphase gelegt, da hier zugleich die Phase der höchsten Stoffwechsel- und Proteinbiosyntheseaktivität liegt.

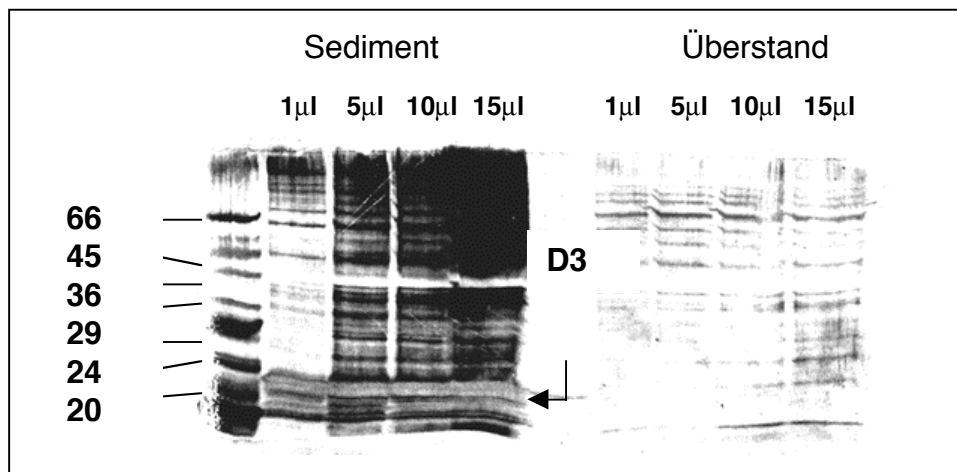


Abb. 3.4. Auftrennung der löslichen und unlöslichen Proteinfractionen nach bakterieller Expression von D3 (D3-6.2). E. coli BL21-Zellen wurden nach Expression der Domäne D3 (D3-6.2) aufgeschlossen und das Lysat wurde mehrmals gewaschen. Sedimente und Überstände wurden in steigenden Mengen (von links nach rechts) auf ein 12,5%iges SDS-Gel aufgetragen. Das D3 (D3-6.2)-Protein ließ sich ausschließlich im Sediment des Bakterienlysats nachweisen.

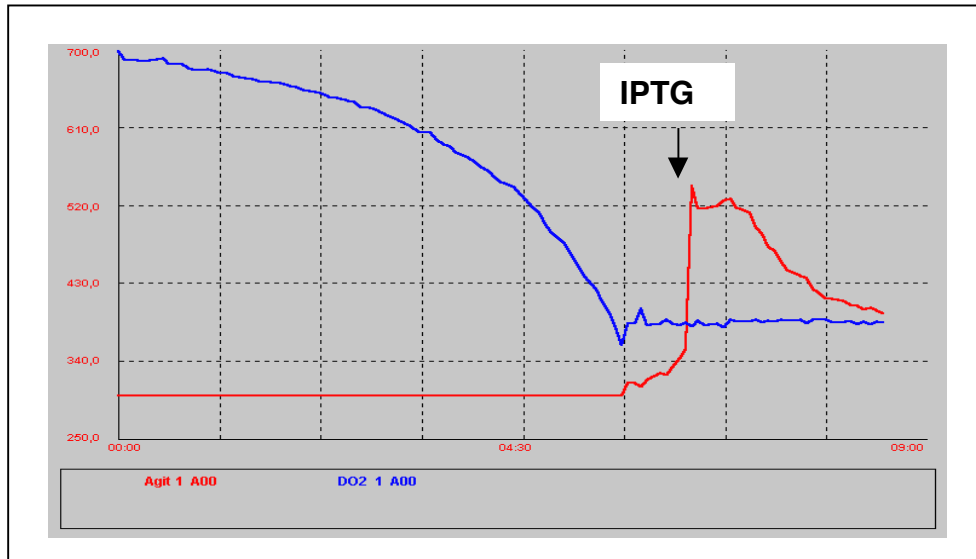


Abb. 3.5. Fermentationsprotokoll für Domäne 3 (D3-6.2). Die Fermenterkultur (3L) wurde zum Zeitpunkt $t = 0$ mit einer Vorkultur (250ml) von transformierten *E. coli* BL21 (DE3)-Zellen angeimpft. Die Protokollierung des Fermentationsverlaufes erfolgte über den Sauerstoffpartialdruck der Kultur (blaue Linie = DOT = dissolved oxygen tension; dies entspricht dem Elektrodensignal in % Luftsättigung, d.h. dem pO_2 des Kulturmediums im Verhältnis zu dem (bei der Kalibrierung unter Prozeßbedingungen) als maximal gesetzten Partialdruck des Mediums) und die Aktivität des Rührers (rote Linie). Die minimale Sauerstoffsättigung wurde auf 30% eingestellt. Bei Unterschreiten dieser Marke wird während eines Fermentationsprozesses automatisch die Geschwindigkeit des Rührers erhöht, um den Sauerstoffbedarf zu kompensieren. Nach Induktion der Expression zu Beginn der exponentiellen Wachstumsphase fiel der Sauerstoffbedarf, angezeigt durch die Aktivität des Rührers, infolge der reduzierten Proliferation der Bakterien merklich herab. Dieses Umschalten des bakteriellen Stoffwechsels von Proliferation auf Expression markiert daher deutlich eine erfolgreiche Induktion.

3.2 Markierung von D3 (D3-6.2) mit ^{15}N und $^{15}\text{N} / ^{13}\text{C}$ für die mehrdimensionale, heteronukleare NMR-Spektroskopie

Für die NMR-spektroskopische Strukturaufklärung eines Proteins ist es notwendig, dieses mit Isotopen (^{15}N ; ^{13}C) zu markieren, die Atomkerne mit ungerader Ordnungszahl besitzen (vgl. 3.8). Zur Expression von markiertem D3 (D3-6.2)-Protein wurde daher ein in seiner Zusammensetzung verändertes Minimalmedium eingesetzt, das andere N- oder C-Quellen als die markierten ausschließt. Zur Expression von ^{15}N -markiertem D3 (D3-6.2)-Protein wurde folgendes Fermentationsmedium verwendet:

2 g/l Na_2SO_4 , 2,47 g/l ($^{15}\text{NH}_4$) SO_4 , 0,46 g/l NaCl, 16 g/l K_2HPO_4 , 3,6 g/l NaH_2PO_4 , 0,86 g/l $\text{Na}_2\text{H-Citrat}$, 10 g/l Glucose.

Für die Doppelmarkierung mit $^{15}\text{N} / ^{13}\text{C}$ wurde ^{13}C -Glukose als einzige Kohlenstoff-Quelle in einer Konzentration von 3 g/l eingesetzt.

Bei der Fermentation mit einfach ^{15}N -markiertem Medium erfolgte der Zeitpunkt der Induktion wie oben beschrieben bei einer OD_{600} von ca. 3. Aufgrund der geringeren Glukose-Konzentration im Verlauf einer Fermentation mit doppelt markiertem Medium (^{13}C ist ein seltenes und daher teures Isotop, das nur eingeschränkt eingesetzt werden kann) wurde hier ein früherer Induktionszeitpunkt bei einer OD_{600} von ca. 1,7 gewählt. Die relative Expression von D3 (D3-6.2) in nicht markiertem, einfach ^{15}N -markiertem und doppelt $^{15}\text{N} / ^{13}\text{C}$ -markiertem Medium war vergleichbar.

3.3 Reinigung und Renaturierung von D3 (D3-6.2)

Für die Faltung von rekombinanten Proteinen, die im bakteriellen Zytoplasma überexprimiert werden, sind mehrere Systeme beschrieben worden [Rudolph & Lilie, 1996]. Neben etablierten in vitro – Prozeduren gibt es auch Ansätze, die korrekte Faltung eines zytoplasmatisch exprimierten Fremdproteins bereits in vivo durch die Koexpression von Chaperonen [Goloubinoff, 1989] oder natürlichen Liganden [Samuelsson, 1996] zu fördern. Die konventionelle Methode zur Rückfaltung von unlöslichen, nicht nativen Proteinaggregaten (inclusion bodies) aus Bakterien besteht darin, die in einem chaotropen Agens (z.B. Harnstoff oder Guanidin-Hydrochlorid) gelösten Proteine durch schrittweises Verdünnen des denaturierenden Agens in die native Form zu überführen [Saxena & Wetlaufer, 1970]. Eine korrekte Ausbildung von intramolekularen Disulfidbrücken wird hierbei zusätzlich durch die Zugabe eines Redoxsystems aus reduziertem und oxidiertem Glutathion (GSH:GSSG im Verhältnis 10:1) unterstützt [Ahmed, 1975]. Im Falle des D3 (D3-6.2)-Proteins erwies sich dieses Verfahren jedoch als unbrauchbar, da es bereits im Verlauf des ersten Dialyseschrittes zu einer nahezu quantitativen Präzipitation des Proteins kam. Grund hierfür könnte das Fehlen von intramolekularen Disulfidbrücken in dieser IL-6R-Domäne sein, die die Ausbildung der nativen Struktur fördern könnten [Matsumura, 1989; Cole, 1999]. Zudem ist davon auszugehen, daß die infolge der bakteriellen Expression fehlende Glykosylierung des Proteins dessen Löslichkeit erheblich herabsetzt und die unspezifische Aggregation fördert. Generell gilt aber, daß die Faltungseigenschaften eines Proteins nur bedingt voraussagbar sind und geeignete Methoden am ehesten von strukturell homologen Peptiden übertragen werden können.

Es wurde daher versucht, das in 6M Guanidin-Hydrochlorid solubilisierte D3 (D3-6.2)-Protein in einem alternativen Verfahren durch schnelle Verdünnung auf einer Gelfiltrationssäule zurückzufalten (Abb. 3.6A) [Werner, 1994]. Als Vorbild hierfür diente die erfolgreiche Zurückfaltung der dritten extrazellulären Domäne des gp130-Moleküls [Müller-Newen, 1997]. Diese Methode bot zudem den Vorteil der gleichzeitigen Trennung des rekombinanten Proteins von Verunreinigungen durch bakterielle Proteine oder von Nebenprodukten des Faltungsprozesses aus ungefalteten oder intermediären Zuständen.

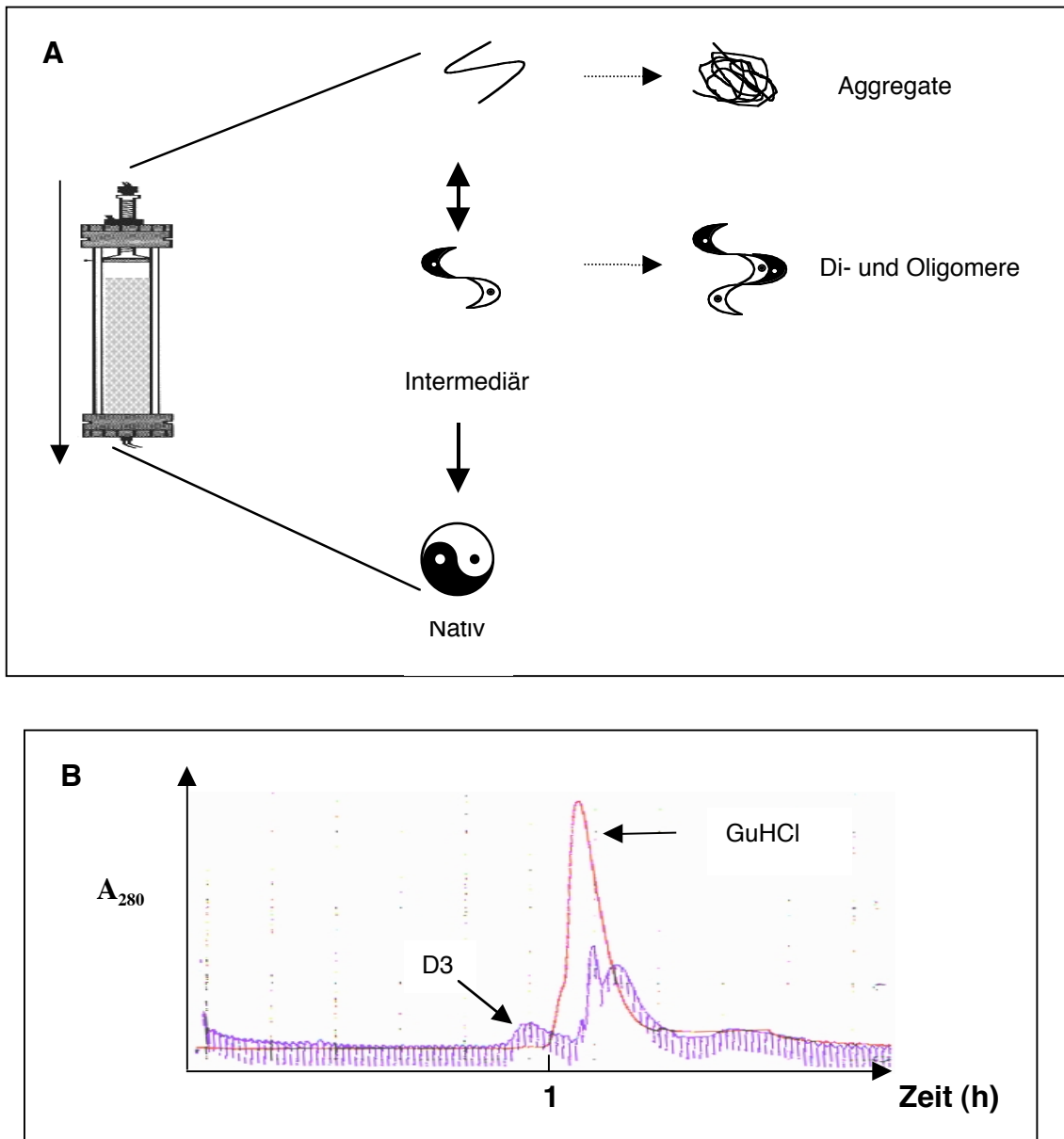


Abb. 3.6. Reinigung und Zurückfaltung von D3 (D3-6.2) durch Gelchromatographie.

A. Theoretischer Prozeß der Faltung von D3 (D3-6.2) im Verlauf der Gelfiltration (verändert nach Rudolph & Lilie, 1996 [Rudolph & Lilie, 1996]). Der spontane Übergang eines Proteins in seine native Form wird als sehr schneller Prozeß angenommen, dessen erste Intermediate mit ausgeprägten Sekundärstrukturelementen (molten globule) bereits nach wenigen Millisekunden nachzuweisen sind [Fink, 1995]. Infolge der raschen Verdünnung des in GuHCl gelösten Proteins im Laufpuffer der Gelfiltrationssäule wird das Reaktionsgleichgewicht auf die Seite des nativen Endprodukts verlagert und die Bildung von unspezifischen (hydrophoben) Aggregaten vermieden. B. Elutionsprofil eines Säulenlaufes mit einer Flußrate von 1,5 ml /Min. und einem Probenvolumen von 1ml D3 (D3-6.2) in 6M GuHCl. Das D3 (D3-6.2)-Protein eluierte nach einer Retentionszeit von ca. 50 Min. (s. blaue Linie), kurz vor der GuHCl-Front, die durch den Anstieg der Leitfähigkeit (rote Linie) gekennzeichnet ist. Im GuHCl-Peak enthalten sind neben Resten ungefalteten Proteins DNS-Fragmente, deren Absorptionsmaximum bei 260nm liegt.

Das Elutionsprofil der Gelfiltration von D3 (D3-6.2) in Abb. 3.6 B zeigt einen einzelnen Proteinpeak, der über ca. 10 Fraktionen verteilt ist. Unmittelbar nach Auslaufen dieses Proteinpeaks ist eine jähe Zunahme der Leitfähigkeit zu verzeichnen, die den Beginn der Guanidin-Hydrochlorid-Fraktion kennzeichnet. Diese enthält neben einem geringen Anteil von ungefaltetem D3 (D3-6.2)-Protein hohe Mengen von DNS, was sich durch UV-Messungen im Absorptionsbereich von 260 nm zeigte. Verunreinigungen durch bakterielle Proteine ließen sich in den D3 (D3-6.2)-Fraktionen nur nach Auftragung höherer Konzentrationen der inclusion bodies (über 1 mg/ml) nachweisen. Abb. 3.7 zeigt ein SDS-Gel und parallel hierzu einen Western Blot der Reinigungsschritte von D3 (D3-6.2) vom Zellaufschluß bis zur Gelfiltration. Die Ausbeute von gereinigtem D3 (D3-6.2)-Protein betrug pro Säulenlauf ca. 30-40%, was 200–300 µg entspricht.

Ein großer Teil des nicht gewonnenen Proteins formte offensichtlich Aggregate nach Interaktion mit dem Säulenmaterial und konnte nach Behandlung mit 1M NaOH von diesem heruntergewaschen werden. Die Homogenität des gereinigten D3 (D3-6.2)-Proteins wurde durch Rechromatographie unter identischen Bedingungen überprüft. Hierbei zeigte sich im Elutionsdiagramm ein einzelner, scharfer Peak, was eine Di- oder Oligomerisierung ausschließt (Abb. 3.8).

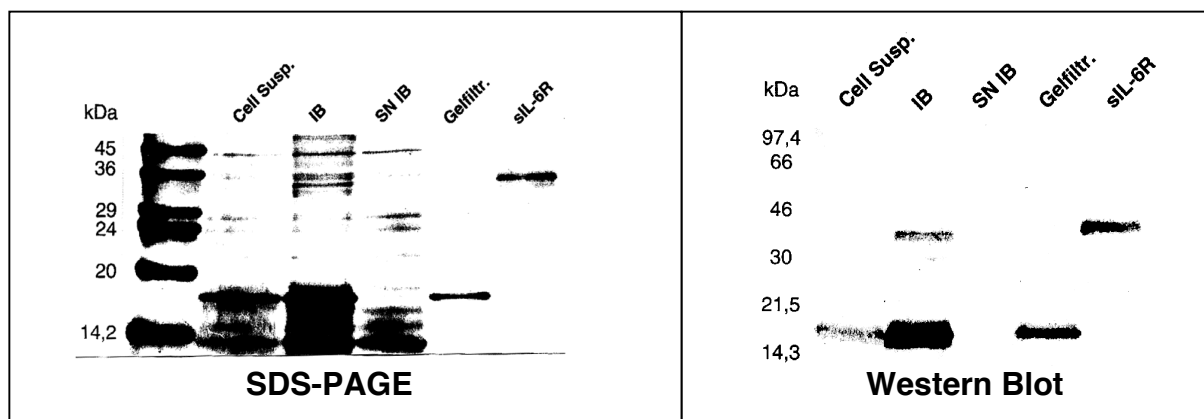


Abb. 3.7. SDS-PAGE und Western Blot der Reinigungsschritte von D3 (D3-6.2). D3 (D3-6.2) konnte durch SDS-PAGE und Western Blot nachgewiesen werden im Bakterienaufschluß, in den angereicherten inclusion bodies (IB) und, in gereinigter Form, nach der Gelfiltration. Im Überstand der gewaschenen inclusion bodies ließ sich kein D3 (D3-6.2)-Protein nachweisen. Jeweils auf der rechten Spur sind 100ng des gereinigten löslichen IL-6R (bestehend aus D2 und D3) aufgetragen. Der immunologische Nachweis im Western Blot demonstriert, daß der lösliche IL-6R und D3 (D3-6.2) vom IL-6R-spezifischen Antikörper 6.2 mit vergleichbarer Effizienz erkannt werden.

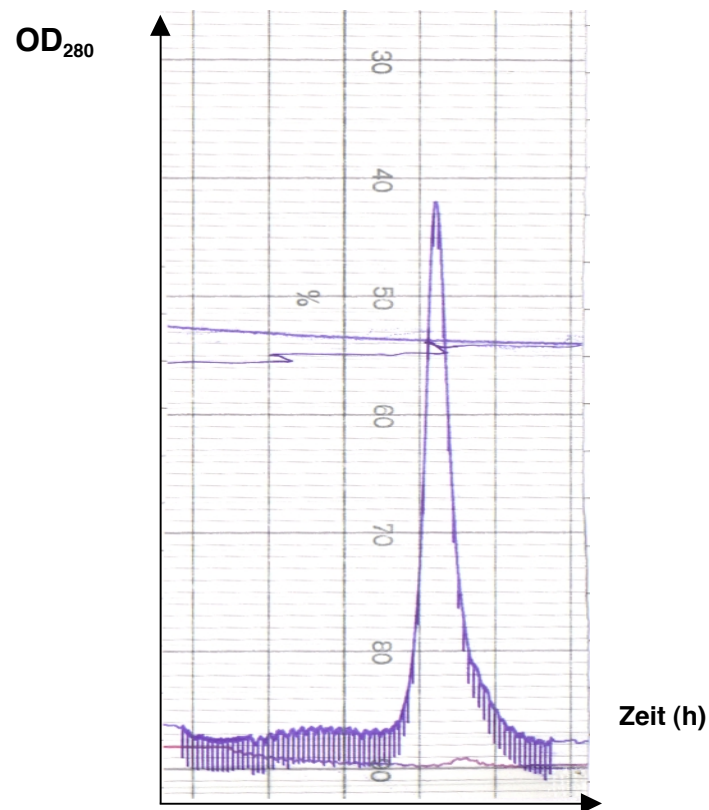


Abb. 3.8. Elutionsprofil des rechromatographierten D3 (D3-6.2)-Proteins. D3 (D3-6.2)-Fraktionen aus der Gelfiltration von Abb. 3.6 wurden vereinigt und erneut chromatographiert. Das Elutionsprofil zeigt einen einzelnen, scharfen Peak, der innerhalb der Retentionszeit von D3 (D3-6.2) im originalen Chromatogramm liegt, was eine Di- oder Oligomerisierung des gereinigten D3 (D3-6.2)-Proteins ausschließt.

3.4 Strukturelle Charakterisierung von D3 (D3-6.2)

Faltungszustand und Sekundärstrukturmerkmale von D3 (D3-6.2) wurden mit Hilfe des Circular dichroismus (CD) charakterisiert. Die Meßwerte einer CD-spektroskopischen Untersuchung entsprechen der differentiellen Absorption von links und rechts zirkular polarisiertem Licht durch asymmetrische Molekülstrukturen. Der Circular dichroismus der Amidgruppen, welche unterhalb von 250nm absorbieren, ermöglicht die Bestimmung des Sekundärstrukturanteils eines Proteins, während der CD der aromatischen Seitenketten (Tyrosin, Tryptophan, Phenylalanin), die im Bereich von 250-300 nm absorbieren, abhängig ist von einer definierten Orientierung der Seitenketten in der nativen Tertiärstruktur des Polypeptids. Die mittels eines CD-Spektrometers aufgezeichneten Daten werden entweder als Absorptionsdifferenz $\Delta A = A_L - A_R$ oder als Elliptizität Θ_{obs} in Grad oder Milligrad angegeben. Aus der Absorptionsdifferenz $\Delta A = A_L - A_R$ folgert nach dem Lambert-Beerschen Gesetz der differentielle molare circular dichroistische Extinktionskoeffizient:

$$\Delta \varepsilon = \varepsilon_L - \varepsilon_R = \frac{A_L - A_R}{c \times d}$$

Hierbei ist $A_L - A_R$ die gemessene differentielle CD-Absorption, c die Konzentration in mol/l und d die Schichtdicke der Küvette in cm. Die molare Elliptizität $[\Theta]$ oder die häufig angegebene mean residue weight Elliptizität $[\Theta]_{\text{MRW}}$ wird aus der gemessenen Elliptizität wie folgt berechnet:

$$[\Theta] = \frac{\Theta \times 100 \times M_r}{c \times d}$$

$$[\Theta]_{\text{MRW}} = \frac{\Theta \times 100 \times M_r}{c \times d \times N_A}$$

Hierbei ist $[\Theta]$ die gemessene Elliptizität in Grad, c die Proteinkonzentration in mg/ml, d die Schichtdicke, M_r das Molekulargewicht und N_A die Anzahl der Aminosäuren pro Molekül. $[\Theta]$ und $[\Theta]_{\text{MRW}}$ haben die Einheit Grad \times cm² \times dmol⁻¹. Der Faktor 100 resultiert aus der Umrechnung der molaren Konzentration in die Konzentrationseinheit dmol/cm³. Die gemessene Elliptizität Θ und ΔA sind über das Verhältnis $\Theta = 33 (A_L - A_R)$ korreliert. Eine gemessene Elliptizität von 10 mGrad entspricht demnach einem ΔA von 0.0003 Absorptionseinheiten.

CD-Spektren im fernen UV-Bereich können zur Bestimmung der relativen Anteile verschiedener Sekundärstrukturelemente eines Proteins verwendet werden. Diese basiert auf der Annahme, daß das CD-Spektrum (fernes UV) eines Proteins durch eine Linearkombination der CD-Spektren von unterschiedlichen Sekundärstrukturelementen dargestellt werden kann:

$$[\Theta(\lambda)] = f_{\alpha} \times [\Theta_{\alpha}(\lambda)] + f_{\beta} \times [\Theta_{\beta}(\lambda)] + f_t \times [\Theta_t(\lambda)] + f_n \times [\Theta_n(\lambda)]$$

Hierbei sind $[\Theta_{\alpha}(\lambda)]$, $[\Theta_{\beta}(\lambda)]$, $[\Theta_t(\lambda)]$ und $[\Theta_n(\lambda)]$ die Basispektren für α -helikale, β -Faltblatt-, β -turn- und nichtreguläre Strukturelemente. Der Faktor f_i gibt die Anteile der verschiedenen Sekundärstrukturelemente an und wird experimentell ermittelt.

In Abb. 3.9 sind typische CD-Spektren der unterschiedlichen Sekundärstrukturelemente gezeigt. Charakteristisch für eine α -Helix ist eine negative Bande bei ca. 222 nm und eine negative bzw. positive Bande bei ca. 208 bzw. 190 nm. Das CD-Spektrum für ein β -Faltblatt zeigt eine negative Bande bei ca. 215 nm und eine positive Bande bei ca. 198 nm. Die Positionen und Intensitäten dieser Banden sind jedoch für jedes Protein anders und stellen damit einen „Fingerabdruck“ (fingerprint) für ein bestimmtes Polypeptid dar.

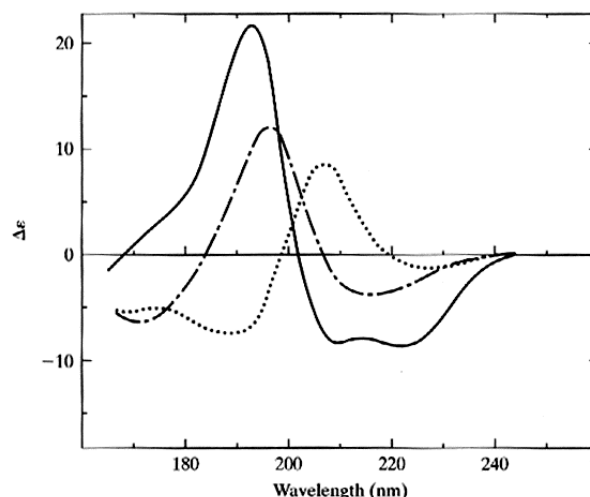


Abb.3.9. CD-Spektren für verschiedene Sekundärstrukturen in wässriger Lösung. Poly (L-Glutamat) bei pH 4.5 als α -Helix (—) [Johnson & Tinoco, 1972]. Poly (L-Lysin-L-Leucin) in wässriger Lösung bei pH 7 als antiparalleles β -Faltblatt (- - -) [Brahms, 1977]. Poly (L-Alanin₂-Glycin₂) in wässriger Lösung bei pH7 (·····) als β -turn [Brahms, 1977].

Abb. 3.10A zeigt das CD-Spektrum von D3 (D3-6.2) im fernen UV-Bereich. Das Spektrum ist charakteristisch für ein Protein im gefalteten Zustand. Die ausgeprägte Bande bei 232 nm ist die positive Bande eines Übergangs, der der Interaktion von Tryptophan-Seitenketten zugesprochen werden kann [Grishina & Woody, 1994]. Diese Bande ist ebenfalls in den CD-Spektren der entsprechenden Domäne des Rezeptors für den Granulozyten-Kolonie-stimulierenden Faktor (G-CSFR) [Anaguchi, 1995] und der dritten extrazellulären Domäne des gp130-Moleküls [Müller-Newen, 1997] zu beobachten. Sie scheint daher charakteristisch für das WSXWS-Motiv in den C-terminalen Domänen des zytokinbindenden Moduls aller Klasse-I-Zytokin-Rezeptoren zu sein. Die Sekundärstrukturanalyse des CD-Spektrums im fernen UV-Bereich erfolgte mit Hilfe der Methode von Sreerama & Woody (1994) [Sreerama & Woody, 1994] und zeigte für das D3 (D3-6.2)-Protein einen überwiegenden Anteil an β -Faltblatt-Struktur (β -Faltblatt = 56%; α -Helix = 0%, β -turn = 23% und nichtregulär: 21%), was die Voraussagen der Sekundärstrukturanalyse basierend auf der Primärstruktur bestätigte [Bazan, 1990b]. Das CD-Spektrum im nahen UV-Bereich (Abb.3.10B) zeigte mehrere distinkte Banden, die Tyrosin- ($\lambda_{\text{max}} = 280 \text{ nm}$) und Tryptophanseitenketten ($\lambda_{\text{max}} = 292 \text{ nm}$) zugeordnet werden können [Grishina & Woody, 1994].

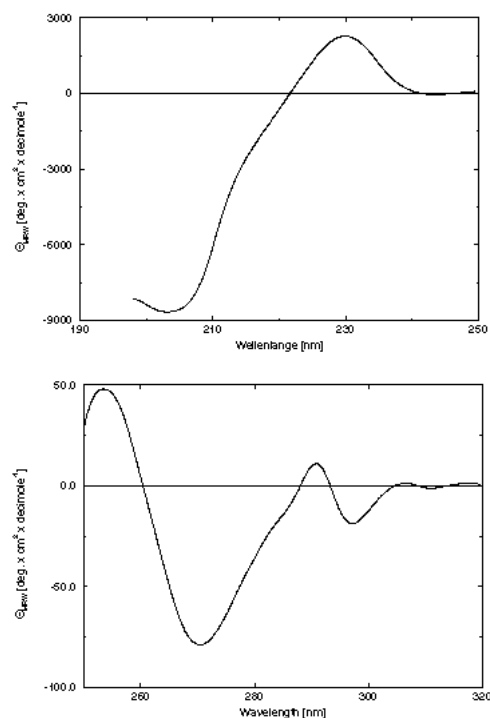


Abb. 3.10. CD-Spektren von D3 (D3-6.2) im fernen (A) und nahen (B) UV-Bereich

Die thermische Stabilität von D3 (D3-6.2) wurde ebenfalls mit Hilfe der CD-Spektroskopie analysiert. In Abb. 3.11A ist eine Serie von CD-Spektren im fernen UV-Bereich gezeigt, die bei 7 verschiedenen Temperaturen aufgezeichnet wurden. Hierbei zeigte sich, daß die ausgeprägte positive Bande bei 232 nm mit steigender Temperatur abnimmt. Die Elliptizität bei dieser Wellenlänge wurde als Maß des Faltungszustands verwendet und ist in Abb. 3.11B als Funktion der Temperatur dargestellt. Die resultierende Kurve offenbart eine außergewöhnlich geringe thermische Stabilität des D3 (D3-6.2) Proteins: die Denaturierung beginnt bereits oberhalb von 25°C, der Schmelzpunkt liegt bei pH 6.8 bei 35°C, bei 37°C liegt der Großteil des Proteins bereits in denaturierter Form vor. Die hohe Temperatursensitivität von D3 (D3-6.2) schloß Zellkulturexperimente, die auf eine mögliche biologische Aktivität des Proteins als Agonisten oder Antagonisten zielen, von vornherein aus, da diese durchweg bei 37°C durchgeführt werden müssen. Alle Interaktionsstudien des D3 (D3-6.2)-Proteins mit IL-6 oder der signaltransduzierenden Rezeptoruntereinheit gp130 wurden mit rekombinanten Proteinen bei Temperaturen $\leq 25^\circ\text{C}$ durchgeführt.

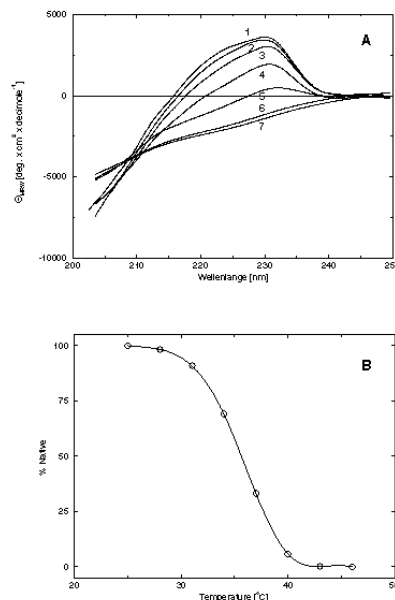


Abb. 3. 11. Thermische Denaturierung von D3 (D3-6.2). A. Die temperaturabhängige Denaturierung von D3 (D3-6.2) wurde anhand einer Serie von CD-Spektren im fernen UV-Bereich bei verschiedenen Temperaturen aufgezeichnet (1: 25°C; 2: 28°C; 3: 31°C; 4: 34°C; 5: 37°C; 6: 40°C; 7: 43°C). B. Die normalisierte Elliptizität bei 232 nm wurde als Funktion der Temperatur dargestellt.

3.5. Nachweis der Bindung von D3 (D3-6.2) an IL-6 durch ELISA

Zum Nachweis der Bindung von D3 (D3-6.2) an IL-6 wurde rekombinantes humanes IL-6 auf einer 96-Loch-ELISA-Platte immobilisiert und die Bindung wie unter 2.7 beschrieben mittels eines sandwich ELISA analysiert. Wie in Abb. 3.7 gezeigt, erkannte der IL-6R-spezifische Antikörper (6.2) D3 (D3-6.2) im Western Blot mit der gleichen Effizienz wie den löslichen IL-6R. In Abb. 3.12 sind Messungen der Bindung von D3 (D3-6.2) oder löslichem IL-6R an IL-6 gezeigt. Die Bindung von IL-6 durch D3 (D3-6.2) oder durch den löslichen IL-6R (bestehend aus D2 und D3) war in diesem Experiment vergleichbar.

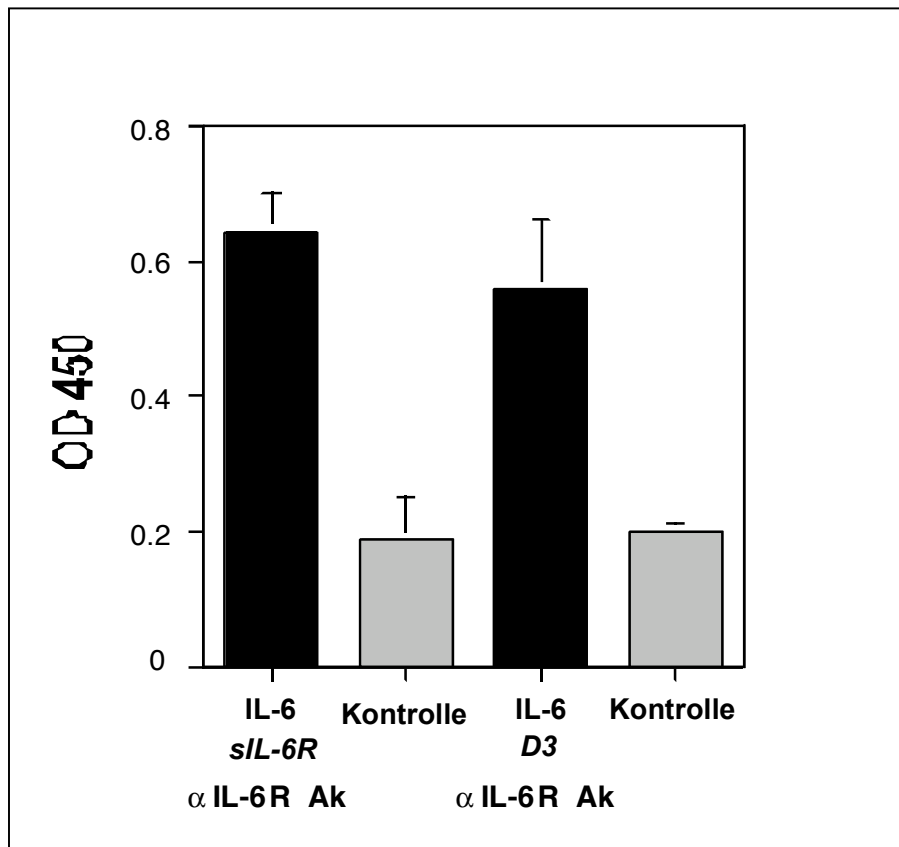


Abb. 3.12. Nachweis der Bindung von D3 (D3-6.2) an IL-6 durch ELISA. IL-6 (10 ng/μl) wurde auf einer ELISA-Platte immobilisiert und mit D3 (D3-6.2) oder löslichem IL-6R (linke Säule) (beides 10ng/μl) inkubiert. Gebundenes Protein wurde durch einen IL-6R-spezifischen Antikörper (6.2) nachgewiesen. Es sind Mittelwerte aus Doppelbestimmungen gezeigt. Als Negativkontrolle wurde das entsprechende Experiment durchgeführt, indem Zellen der ELISA-Platte statt mit IL-6 mit 5%iger Trockenmilchlösung beschichtet wurden.

3.6 Kinetik der Bindung von D3 (D3-6.2) an immobilisiertes IL-6

Wird rekombinantes humanes IL-6 an die feste Phase einer IASYS™ Küvette kovalent gebunden, kann die Interaktion von D3 mit IL-6 in Echtzeit verfolgt werden. Die Matrix der Küvette besteht in dem vorliegenden Fall aus einer 200 nm dicken Schicht aus Carboxymethyldextran, einem Polymer aus Glukoseresten mit geringem Verzweigungsgrad und einem mittleren Molekulargewicht von 500 kDa. Die Dextran-Matrix wurde so carboxymethyliert, daß im Durchschnitt auf zwei Glucosereste eine Carboxylgruppe ($pK_a=3,5$) kommt. Die CMD-Oberfläche ist daher bei Puffern mit einem pH-Wert > 5 negativ geladen. Liegt der pH-Wert des verwendeten Puffers zudem unterhalb des pI des zu immobilisierenden Proteins, wird das Protein eine positive Gesamtladung tragen und so von der Matrix durch elektrostatische Wechselwirkungen aufgenommen werden.

Unter Berücksichtigung dieser Bedingungen wurde eine CMD-Matrix mit EDC (1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimid) / NHS (N-Hydroxysuccinimid) aktiviert und rekombinantes IL-6 über seine freien primären Aminogruppen an diese kovalent gekoppelt (vgl. Abb. 3.13). Die Kopplung eines Proteins führt zu einer Erhöhung der Proteinkonzentration auf der Matrix und damit zu einer Erhöhung des Brechungsindex, der bei der Abtastung der Chipoberfläche durch einen Laser in Form einer Erhöhung des Resonanzwinkels α (hier ca. 1200 Winkelsekunden (arc s^{-1})) aufgezeichnet wird. Die Menge des immobilisierten IL-6 konnte anhand einer BSA-Eichkurve (nach Angaben des Herstellers FISONs) zu 1 ng/mm^2 pro 163 arc s^{-1} und damit zu 7 ng/mm^2 ermittelt werden. Nicht besetzte aktivierte COOH-Gruppen wurden mit Ethanolamin abgesättigt und die so kovalent mit IL-6 beschichtete Küvette wurde mit PBST equilibriert (Abb. 3.13).

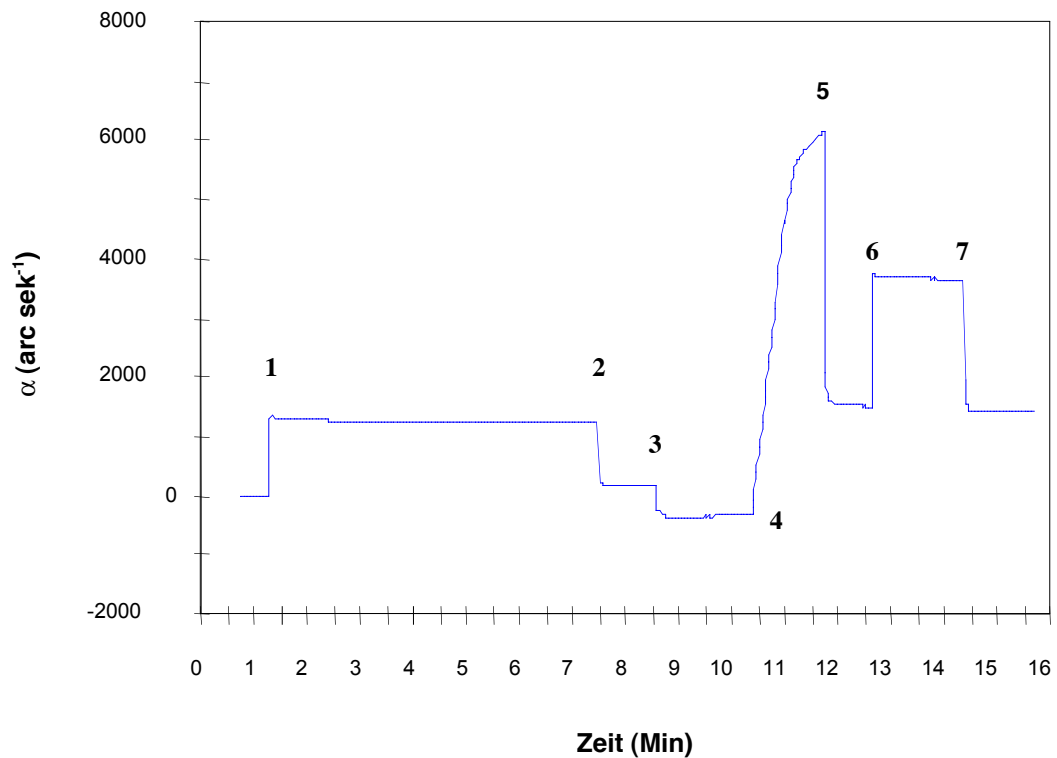


Abb. 3.13. Immobilisierung von IL-6 auf der CMD-Matrix. Nach Equilibrierung der CMD-Matrix mit PBST wurde zunächst eine stabile Basislinie aufgezeichnet. Dann wurde die Matrix für 7 Minuten mit EDC/NHS aktiviert (1), mit PBST gewaschen (2) und für weitere 2 Minuten in 10 mM NaAc, pH 5 equilibriert (3). Die Zugabe von 90 ng IL-6 (4) führte zum Anstieg des Resonanzwinkels auf ca. 6000 arc s^{-1} . Die Kopplungsreaktion wurde durch Waschen mit PBST unterbrochen (5) und nicht besetzte Gruppen der Matrix wurden durch Inkubation mit Ethanolamin (2 min) inaktiviert (6). Nach Waschen mit PBST (7) wurde die Resonanzwinkeländerung zu 1200 arc s^{-1} bestimmt.

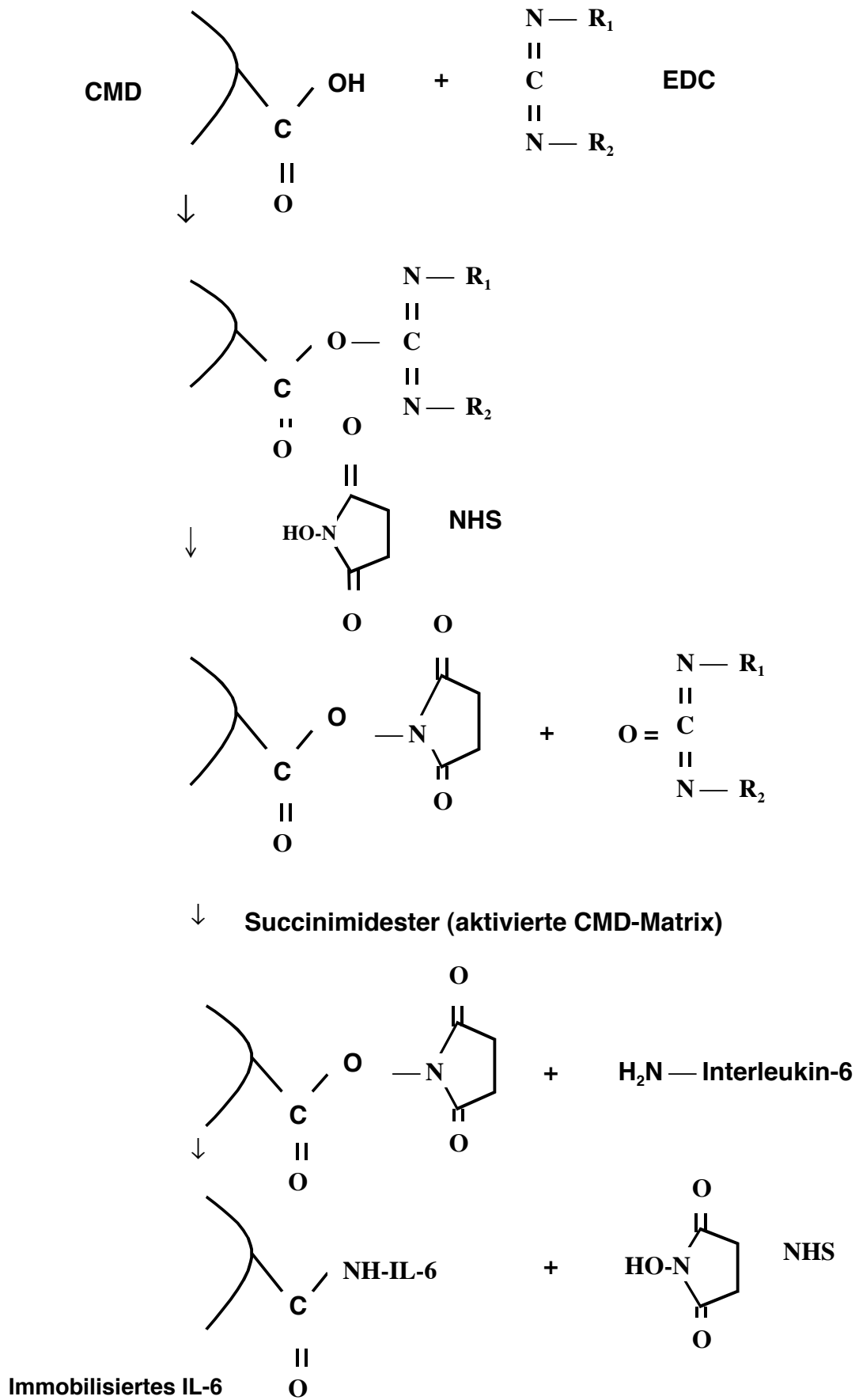


Abb. 3.14. Kovalente Immobilisierung von Proteinen auf der Carboxymethyldextran-Matrix.

Die Bindungseigenschaften des immobilisierten IL-6 wurden durch die Zugabe von löslichem IL-6R (bestehend aus D2 und D3) in PBS überprüft (Abb. 3.15A). Die Bindung an immobilisiertes IL-6 ließ sich durch die entsprechende Veränderung des Resonanzwinkels α in Form einer Assoziationskurve in Echtzeit nachvollziehen. Nach Absaugen der sIL-6R-Lösung und Waschen des Chips mit PBST wurde die Dissoziation eingeleitet und entsprechend aufgezeichnet. Ein Molekül, das nachweislich keine Affinität zu IL-6 besitzt, zeigte dagegen keine vergleichbare Assoziations- oder Dissoziationskurve, sondern lediglich einen Sprung im Brechungsindex, der durch die Pufferveränderung bei Proteinzugabe ausgelöst wird (Abb. 3.15B).

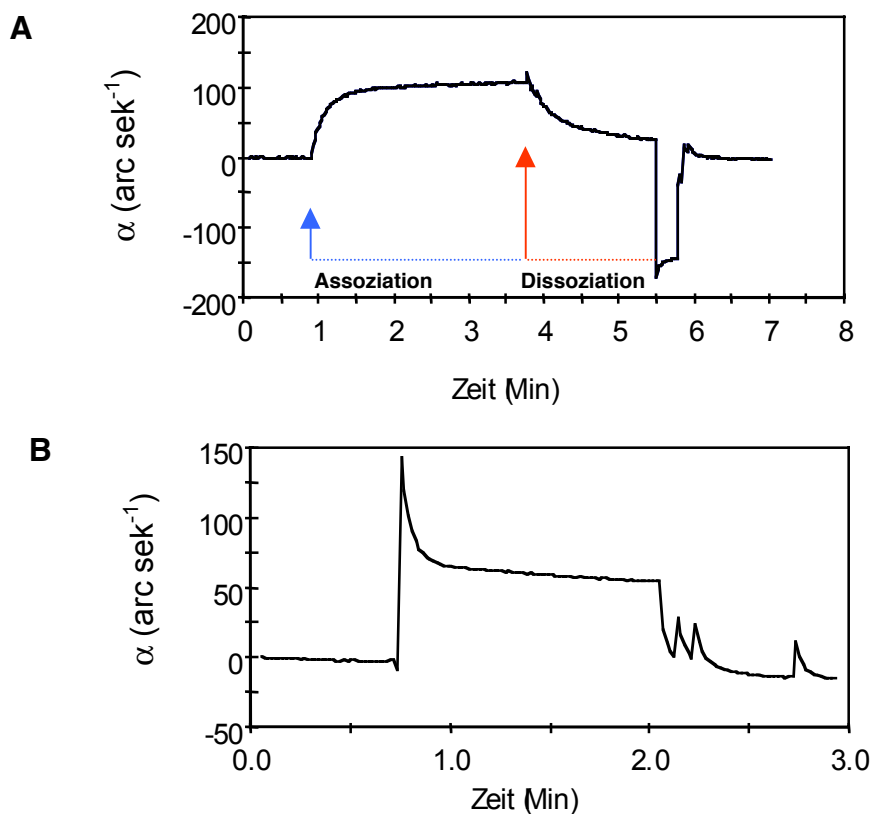


Abb. 3.15. Bindung von Proteinen an immobilisiertes IL-6. A. Bei Zugabe von 1 μ g sIL-6R wurde eine Bindung an den mit IL-6 beschichteten Chip aufgezeichnet. Waschen mit PBST löste die Dissoziation des sIL-6R vom immobilisierten IL-6 aus. B. Die Zugabe von 1 μ g des Fusionsproteins H-IL-6 löste zwar auch eine Differenz im Resonanzwinkel aus, aber das Ausbleiben einer Assoziationskurve und, nach Waschen mit PBST, einer entsprechenden Dissoziationskurve deutet auf eine unspezifische Wechselwirkung mit der Chip-Oberfläche hin.

Der mit IL-6 beschichtete Chip wurde anschließend verwendet, um die Affinität von D3 (D3-6.2) zu IL-6 zu bestimmen. Nach Zugabe einer D3 (D3-6.2)-haltigen Lösung konnte die Bindung an immobilisiertes IL-6 wiederum in Form einer Erhöhung des Resonanzwinkels α gemessen werden. Die Aufzeichnung dieser Winkeländerung in Echtzeit resultierte in einer Assoziationskurve, die anschließende Dissoziation wurde durch Waschen mit PBST ausgelöst. In Abb. 3.16 sind Assoziations- und Dissoziationskurven dargestellt, die für 10 verschiedene Konzentrationen von D3 aufgezeichnet wurden.

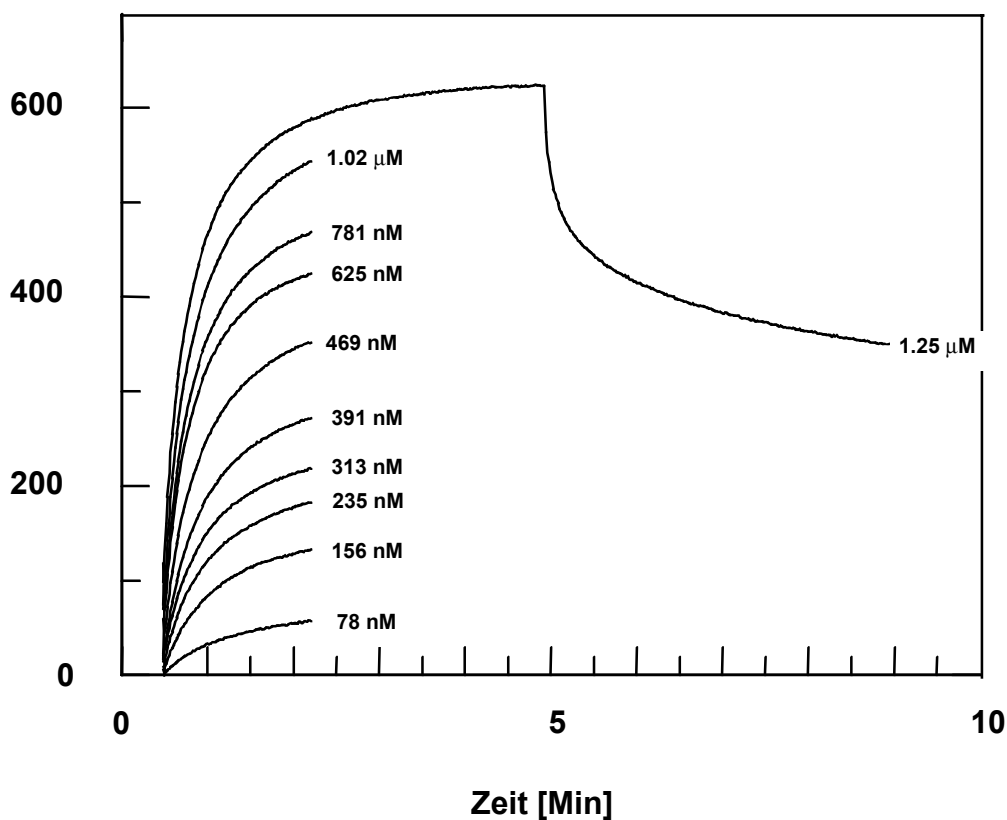


Abb. 3.18. Kinetik der Bindung von D3 an immobilisiertes IL-6. Die Interaktion von D3 (D3-6.2) mit immobilisiertem IL-6 wurde für 10 verschiedene Konzentrationen von gereinigtem D3 (D3-6.2)-Protein in Form von Assoziations- und Dissoziationskurven in Echtzeit aufgezeichnet. Zur Übersichtlichkeit wurde in der obigen Darstellung die Dissoziationsphase von lediglich einer Kurve abgebildet. Die molaren Konzentrationen sind wie in der Darstellung angegeben.

Die Daten aus den Assoziations- und Dissoziationskurven wurden nach folgendem Modell ausgewertet:

Die Anzahl an gebildeten Komplexen in der Zeit t , bezeichnet als $(\text{IL-6 D3})_t$, ist gegeben durch:

$$(\text{IL-6 D3})_t = (\text{IL-6 D3})_{\text{eq}} (1 - \exp(-k_{\text{on}}t))$$

In dieser Gleichung ist $(\text{IL-6 D3})_{\text{eq}}$ die Konzentration der Komplexe im Gleichgewicht. k_{on} ist wie folgt definiert:

$$k_{\text{on}} = k_{\text{ass}} (\text{D3}) + k_{\text{diss}}$$

Somit ist k_{on} abhängig von der Konzentration des Liganden D3. Das in arc Sekunden gemessene Signal R ist proportional zu der Masse an gebundenem Liganden, so daß gilt:

$$R_t = (R_{\text{eq}} - R_0) (1 - \exp(-k_{\text{on}}t)) + R_0$$

In dieser Gleichung ist R_t die Detektion zu der Zeit t , R_0 die initiale Detektion und R_{eq} die maximale Detektion. Diese Werte sind experimentell zugänglich, so daß die einzige Unbekannte, k_{on} , sich aus der jeweiligen Konzentration des Liganden ergibt. Da die Gleichung für k_{on} einer Geradengleichung entspricht, lassen sich nach Auftragung verschiedener k_{on} -Werte gegen die entsprechende Ligandenkonzentration aus der resultierenden Gerade k_{ass} (Steigung) und k_{diss} (Achsenabschnitt) ermitteln (vgl. Abb. 3.17).

Für die Bindung von D3 (D3 6.2) an IL-6 ließ sich auf diese Weise ein k_{diss} -Wert von $1,04 \times 10^{-2} \pm 0,0009 \text{ s}^{-1}$ und ein k_{ass} -Wert von $2,72 \times 10^4 \pm 1467,61 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ermitteln.

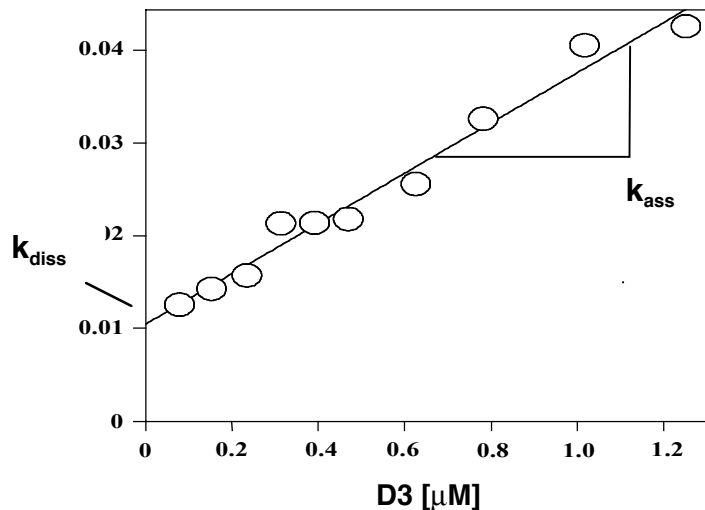


Abb. 3.17. Affinitätsanalyse der Interaktion zwischen D3 (D3-6.2) und immobilisiertem IL-6. Die Auswertung der Kurven aus Abb. 3.16 ermöglichte die Bestimmung von k_{diss} aus dem Y-Achsenabschnitt und k_{ass} aus der Steigung des Graphen. Der Korrelationskoeffizient für die Anpassung betrug 0,988501.

Vergleicht man die aus diesen Werten bestimmte Dissoziationskonstante $K_D = k_{\text{diss}} / k_{\text{ass}} = 385 \text{ nM}$ mit Affinitäten für die Interaktion von löslichem IL-6R und immobilisiertem IL-6 und IL-6 und immobilisiertem löslichen IL-6R, zeigt sich, daß die Affinität für die Wechselwirkung zwischen D3 (D3-6.2) und IL-6 um eine Größenordnung geringer ist (Tabelle 3.1).

Affinitäten, die auf Festphase bestimmt werden, liegen für IL-6 generell um einen Faktor 50-100 unter denen, die für lösliche Bindungspartner ermittelt werden (Scatchard-Analyse). Nach Messungen in Lösung wurde für die Wechselwirkung zwischen IL-6 und dem löslichen IL-6R eine Affinität von 0,5 nM berichtet [Weiergräber, 1995].

Tabelle 3.1. Vergleich der Bindungsaffinitäten von IL-6, löslichem IL-6R und D3 (D3-6.2)

Bindungsanalysen an fester Phase

Immobilisiertes Protein	Ligand	$K_{\text{ass}}/10^5$ ($\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$)	$K_{\text{diss}}/10^{-2}$ (s^{-1})	K_D (nM)	Referenz
IL-6	D3	$0,27 \pm 0,15$	$1,04 \pm 0,09$	385	diese Arbeit
IL-6	sIL-6R	$1,9 \pm 0,19$	$0,64 \pm 0,21$	34	[Weiergräber, 1995]
sIL-6R	IL-6	$2,6 \pm 0,18$	$1,2 \pm 0,04$	46	[Weiergräber, 1995]

Bindungsanalysen in Lösung (Scatchard-Analyse)

IL-6	sIL-6R			0,5	[Weiergräber, 1995]
------	--------	--	--	-----	---------------------

3.7 Immunpräzipitation von D3 (D3-6.2) durch ein IL-6-Fc-Fusionsprotein

Nach dem Nachweis der Bindung von D3 (D3-6.2) an humanes IL-6 auf fester Phase stellte sich die Frage, ob D3 (D3-6.2) in der Lage ist, humanes IL-6 in Lösung zu binden und ob ein möglicher D3 (D3-6.2) / IL-6-Komplex mit der signaltransduzierenden Rezeptoruntereinheit gp130 assoziieren kann. Hierzu wurde gereinigtes D3 (D3 6.2) mit Fc-Fusionsproteinen von humanem IL-6 und humanem gp130 in Anwesenheit oder Abwesenheit von IL-6 inkubiert. Um eine unspezifische Assoziation auszuschließen, wurde D3 (D3-6.2) mit dem Fc-Fusionsprotein von H-IL-6 inkubiert, da gezeigt worden war, daß die IL-6-Bindungsstellen des IL-6R in diesem IL-6/IL-6R-Fusionsprotein für freie Rezeptormoleküle nicht zugänglich sind [Fischer, 1997]. Bei den eingesetzten Immunadhäsinen von IL-6, gp130 und H-IL-6 handelt es sich um Konstrukte, die C-terminal die konstante Region der schweren Kette eines humanen IgG1-Moleküls tragen. Diese wurden nach Expression in COS7-Zellen über eine Protein A Sepharose-Säule gereinigt [Jostock, 1999]. Das aus der Zellwand von *Staphylococcus aureus* isolierte Protein A bindet mit hoher Affinität an alle IgG, wobei die Bindung im Bereich der CH2- und CH3-Domänen des Fc-Teils erfolgt.

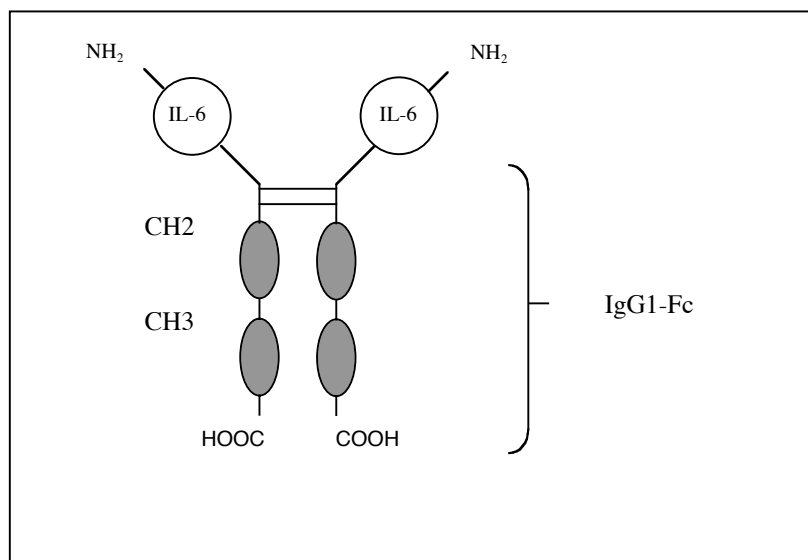


Abb. 3.18. Schematische Darstellung des IL-6-Fc Fusionsproteins [Jostock, 1999]). Der konstante Teil der schweren Kette eines humanen IgG1-Moleküls wurde C-terminal an humanes IL-6 fusioniert. Die Fusionsmoleküle sind über Disulfidbrücken in den schweren Ketten miteinander verknüpft. Bei dem entsprechenden gp130-Fc Fusionsprotein ist der extrazelluläre Teil des gp130-Moleküls mit der schweren Kette eines IgG1 fusioniert.

Nach Inkubation des D3 (D3-6.2)-Proteins mit einem Überschuß der Fc-Proteine von IL-6, gp130 (mit und ohne IL-6) und H-IL-6 wurden die gebildeten Immunkomplexe mit Protein A Sepharose gefällt und kopräzipitiertes D3 (D3-6.2)-Protein wurde durch einen Western Blot mit einem IL-6R-spezifischen Antikörper (6.2) nachgewiesen. Abb. 3.19A zeigt, daß D3 (D3-6.2) mit IL-6-Fc (linke Spur) präzipitiert werden konnte, aber nicht mit der Kombination von IL-6 und gp130-Fc. Es konnte keine Bindung zu gp130-Fc allein oder zu H-IL-6-Fc nachgewiesen werden. In Abb. 3.19B ist das identische Experiment für den löslichen IL-6R (D2+D3) gezeigt, der sowohl durch IL-6-Fc als auch durch die Kombination von IL-6 und gp130-Fc gefällt werden konnte. Der Vergleich der kopräzipitierten Proteinmengen mit den in den Experimenten eingesetzten Mengen von D3 (D3-6.2) oder löslichem IL-6R (äußere rechte Spur) veranschaulicht zudem, daß der lösliche Rezeptor nahezu quantitativ gefällt wurde, während nur 5-10% des D3-Proteins durch das IL-6-Fc gebunden wurden, was vermutlich auf die geringere Affinität von D3 (D3-6.2) zu IL-6 zurückzuführen ist.

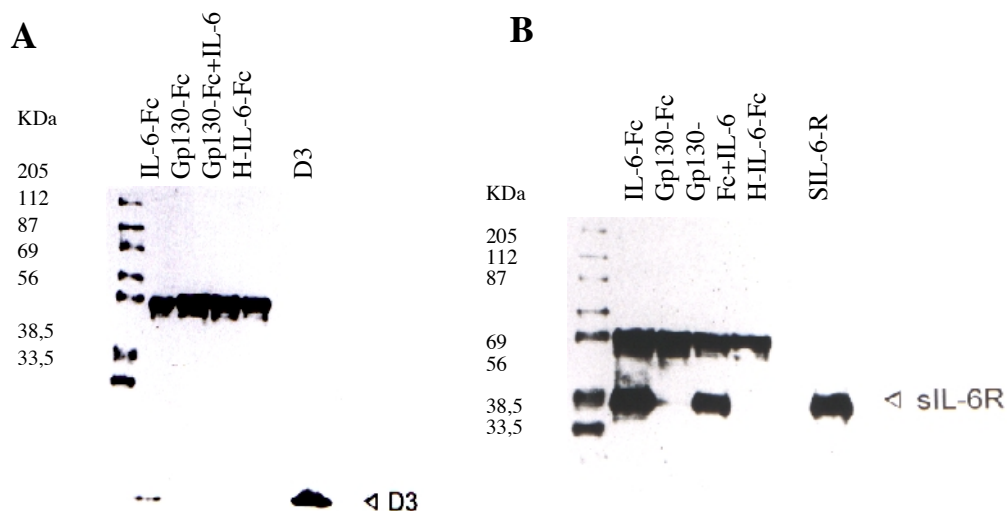


Abb. 3.19. Assoziation von D3 (D3-6.2) mit IL-6, dem IL-6R und gp130. A. 100 ng gereinigtes D3 (D3-6.2)-Protein wurden mit 2 µg IL-6-Fc (linke Spur), 1 µg gp130-Fc, 1 µg gp130-Fc in Kombination mit 300 ng IL-6 und 1 µg H-IL-6-Fc inkubiert. Alle Fc-Proteine wurden mit Protein A Sepharose präzipitiert und nach einem Western Blot wurde kopräzipitiertes D3 (D3-6.2) mit einem IL-6R-spezifischen Antikörper (6.2) nachgewiesen. Die rechte Spur wurde mit 100 ng gereinigtem D3 (D3-6.2)-Protein geladen. B. Das identische Experiment wurde mit 100 ng löslichem IL-6R durchgeführt. Die Bande auf der Höhe von ca. 55 kDa, die ebenfalls vom IL-6R-spezifischen Antikörper erkannt wird, konnte als Protein A identifiziert werden, das im Verlauf des Reinigungsprozesses der Fc-Proteine aus der Protein A Sepharose frei wird.

3.8 NMR-Spektroskopie

Die physikalische Grundlage der NMR-Spektroskopie ist der Kernmagnetismus. Dieser wird bestimmt durch das magnetische Moment eines Atomkerns, der die Folge eines Kern-Drehimpulses oder Kernspins ist. Alle Kerne mit einem Kernspin $I \neq 0$ (s. Tabelle 3.2) besitzen ein magnetisches Moment, das in einem äußeren Magnetfeld H nur definierte Orientierungen einnehmen kann. Die Anzahl der möglichen Orientierungen ist durch $2I+1$ gegeben, so daß der Wasserstoffkern ($I=1/2$) in einem äußeren Magnetfeld zwei diskrete Orientierungen annehmen kann. Diese mit $m_1=1/2$ und $m_2=-1/2$ bezeichneten Zustände befinden sich infolge ihrer unterschiedlichen Ausrichtung gegenüber dem Magnetfeld auf unterschiedlichen Energieniveaus. Abb. 3.20 zeigt dies am Beispiel des Protons.

Tabelle 3.2 Atome mit Kernspin, die in der NMR-Spektroskopie verwandt werden

Isotop	Spin	Natürliches Vorkommen (%)
^1H	1/2	99.98
^2H	1	1.5×10^{-2}
^{13}C	1/2	1.108
^{15}N	1/2	0.37
^{19}F	1/2	100
^{31}P	1/2	100
^{113}Cd	1/2	12.26

Die Resonanzfrequenz eines Kerns ist gegeben, wenn zwischen dem magnetischen Moment eines Atomkerns in einem konstanten Magnetfeld und einem elektromagnetischen Hochfrequenzfeld einer bestimmten Frequenz und Polarisation eine Wechselwirkung erfolgt. Unter dem Einfluß des Hochfrequenzfeldes werden zwischen den verschiedenen Energiezuständen der Kerne Übergänge angeregt. Diese Energiedifferenz wird als Signal registriert und als Resonanzfrequenz in einem Spektrum abgebildet.

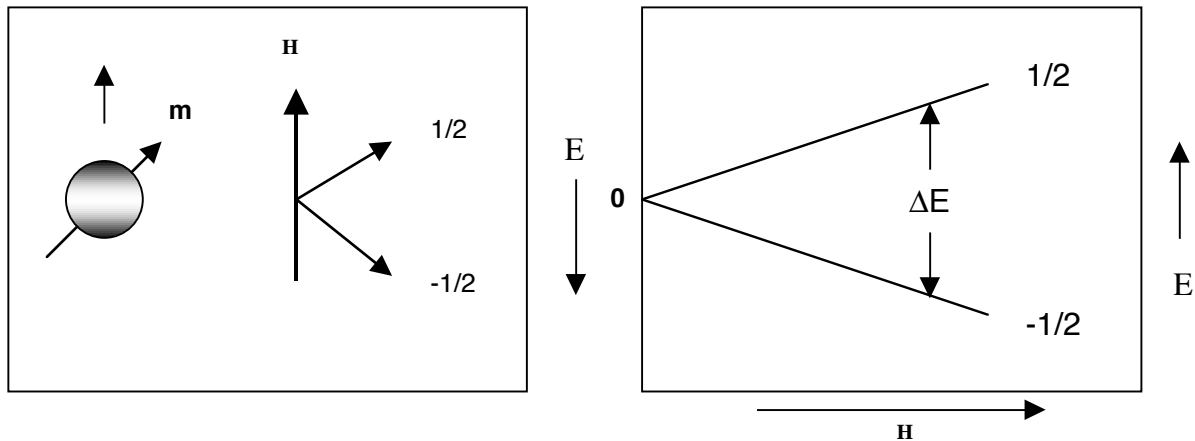


Abb. 3.9. Orientierung des kernmagnetischen Dipols in einem äußeren Magnetfeld. Eine rotierende Ladung wie das Proton generiert ein magnetisches Dipol m . Dieses Dipolmoment nimmt in einem äußeren Magnetfeld H bestimmte erlaubte Orientierungen ein ($m_1=1/2$ und $m_2=-1/2$), die sich auf unterschiedlichen Energieniveaus befinden. Die zum äußeren Magnetfeld antiparallele Ausrichtung ($m_2=-1/2$) besitzt eine höhere Energie als die parallele Anordnung ($m_1=1/2$). Die Energiedifferenz zwischen beiden Niveaus ΔE ist abhängig von der Stärke des Magnetfelds.

Die verschiedenen Protonen eines Moleküls sind in einem konstanten Magnetfeld - gemäß ihrer unterschiedlichen chemischen Umgebung - unterschiedlichen effektiven Magnetfeldern ausgesetzt. Da die Resonanzfrequenz eines Kerns abhängig ist von der Stärke des äußeren Magnetfelds, resultiert hieraus eine chemische Verschiebung der Signale. Die Resonanzfrequenz eines Protons ist gegeben durch

$$\nu_s = \nu_0(1-\sigma)$$

wobei ν_0 die Resonanzfrequenz ist, die dem konstanten Magnetfeld entspricht, und $\sigma\nu_0$ eine Korrektur darstellt, die die lokalen Variationen berücksichtigt. Die Abschirmungskonstante σ ist abhängig von der chemischen Bindung und der Elektronennegativität benachbarter Kerne. In einem Spektrum werden die unterschiedlichen Resonanzfrequenzen in Form der chemischen Verschiebung δ angegeben. Diese hat eine dimensionslose Größe (parts per million, ppm), die aus der Frequenzdifferenz der Resonanzsignale der Probe und einer Referenzsubstanz mit hoher elektronischer Abschirmung (z.B. Tetramethylsilan (TMS)), die der Lösung zugegeben wird, resultiert ($\delta = (\nu_{\text{Probe}} - \nu_{\text{Referenz}}) \nu_{\text{Referenz}}^{-1} \times 10^6$). Das Produkt aus Sendefrequenz und ppm-Wert gibt die chemische Verschiebung in Hertz (Hz) an.

In Abb. 3.21 sind die ^1H -NMR-Spektren von D3 (D3-6.2) dargestellt. Sie wurden bei einer Proteinkonzentration von ca. $150\ \mu\text{M}$ aufgenommen (s. Materialien und Methoden). Das Vorhandensein von Resonanzen im Bereich zwischen 1,0 und 1,5 ppm (Resonanzbereich der aliphatischen Seitenkettenprotonen) ist charakteristisch für Proteine im gefalteten Zustand und bestätigt das Ergebnis der CD-Spektroskopie (vgl. 3.4) [Wüthrich, 1986]. Die Dispersion zwischen 6,0 und 10,0 ppm (Resonanzbereich der Amidprotonen und Protonen der aromatischen Aminosäuren) ist typisch für ein Protein mit überwiegender β -Faltblatt-Struktur [Wüthrich, 1986]. Die Linienbreite der Resonanzen ist unmittelbar mit der Rotationskorrelationszeit und damit der Größe eines Moleküls verknüpft, und entspricht im vorliegenden Fall der eines monomeren Proteins dieser Größe [Grötzinger, persönliche Mitteilung]. Der mittlere Bereich des Spektrums (3,0-6,0 ppm) ist durch die intensive Absorption der Wassermoleküle (peak bei 4,7 ppm) verzerrt und wurde in der Abbildung aus dem Spektrum herausgenommen.

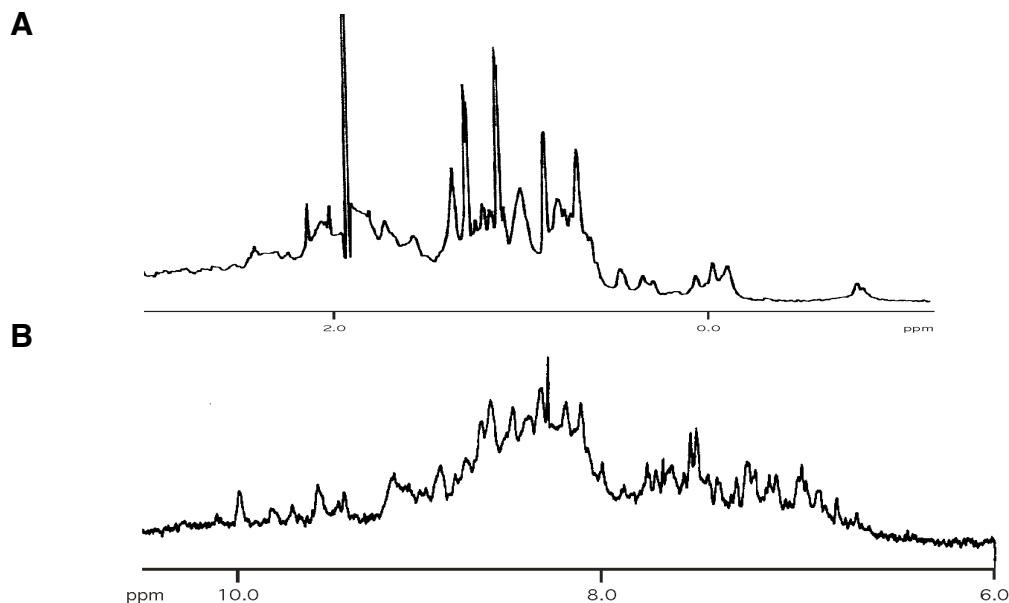


Abb. 3.21. ^1H -NMR-Spektren der dritten extrazellulären Domäne des IL-6R. A. ^1H -NMR-Spektrum im Bereich von $-2,0$ bis $3,0$ ppm. Das Vorhandensein der Resonanzen zwischen $1,0$ und $1,5$ ppm ist typisch für Proteine in gefaltetem Zustand [Wüthrich, 1986]. Sie entsprechen Methylgruppen, die sich in räumlicher Nähe zu aromatischen Aminosäureseitenketten befinden [Wüthrich, 1986]. B. ^1H -NMR-Spektrum im Bereich von $6,0$ bis $10,0$ ppm. In diesem Frequenzbereich liegen die Resonanzen der Amidprotonen und der Protonen von aromatischen Seitenketten. Die große Dispersion der Amidprotonen ist typisch für Proteine mit hohem β -Faltblatt-Anteil. Die Linienbreiten der Resonanzen entsprechen denjenigen eines monomeren Proteins dieser Größe.

4. Diskussion

Aus den in der vorliegenden Arbeit gezeigten Untersuchungen lassen sich folgende Schlüsse ziehen:

1. Die dritte extrazelluläre Domäne des humanen IL-6R kann rekombinant exprimiert und in vitro zurückgefaltet werden.
2. Das Protein besitzt eine außergewöhnlich geringe Temperaturstabilität.
3. D3 (D3-6.2) ist in der Lage, an IL-6 zu binden, jedoch mit einer geringeren Affinität als der gesamte humane IL-6R.
4. Obwohl D3 (D3-6.2) ausreichend für eine Bindung an IL-6 ist, assoziiert der D3/IL-6-Komplex nicht mehr mit dem Signaltransduktor gp130. Dies bedeutet, daß für die biologische Aktivität des IL-6R auch D2 notwendig ist.
5. Die vorläufigen NMR-spektroskopischen Untersuchungen lassen darauf schließen, daß D3 (D3-6.2) in Lösung als monomeres Protein vorliegt und geeignet ist für eine detailliertere NMR-spektroskopische Untersuchung zur Auflösung der dreidimensionalen Struktur des Proteins.

4.1 Bakterielle Expression, Renaturierung und strukturelle Charakterisierung von D3 (D3-6.2)

Die bakterielle Expression des gesamten löslichen humanen IL-6R unter Fermentationsbedingungen wurde erstmals von Stoyan et al. versucht [Stoyan, 1993a]. Die Expressionsrate blieb jedoch bei dem gezeigten Ansatz vergleichsweise gering (1-2 mg/L), die Ausbeute an zurückgefaltetem, aktivem Protein lag lediglich bei ca. 1%. In der vorliegenden Arbeit wurde versucht, im Hinblick auf eine Strukturanalyse durch die NMR-Spektroskopie, die Domänen des zytokinbindenden Moduls im extrazellulären Bereich des IL-6R isoliert als rekombinante Proteine darzustellen. Hierzu wurden cDNS-Konstrukte für D2, D3 und eine um 15 C-terminale Aminosäuren längere Version von D3 (D3-6.2), die hierdurch eine Erkennungsstelle für einen Antikörper enthält, hergestellt und in Vektoren inkloniert, die eine zytoplasmatische Expression in *E. coli* ermöglichen. Die Domänengrenzen für D2 und D3 wurden auf der Grundlage von Homologien zum GHR definiert. Der C-Terminus von D2 und der N-Terminus von D3 wurden hierbei so gewählt, daß sie teilweise überlappen, um so einen möglichen stabilisierenden Einfluß der Scharnierregion zwischen beiden Domänen für beide Konstrukte zu gewährleisten.

Eine signifikante Expression in *E. coli* BL21 (DE3)-Zellen konnte lediglich für das Konstrukt D3 (D3-6.2) nachgewiesen werden. Obwohl in späteren Versuchen eine Expression von D2 in *E. coli* BL21 (D3) pLysS-Zellen [Studier, 1990] gelang, konnte kein geeignetes Aufreinigungsverfahren entwickelt werden, um das Protein zu charakterisieren. Grund hierfür ist vermutlich eine erhöhte Sensitivität dieser Domäne gegenüber proteolytischem Abbau, was zu einem vollständigen Verlust des Ausgangsmaterials im Verlauf der konventionellen Isolationsprozedur führte (Daten sind nicht gezeigt). Das Konstrukt D3 ließ sich weder in *E. coli* BL21 (DE3)- noch in *E. coli* BL21 LysS-Zellen exprimieren. Dies deutet darauf hin, daß die C-terminale Extension im Konstrukt D3 (D3-6.2) für die korrekte Faltung und strukturelle Integrität von D3 notwendig ist. Eine ähnliche Beobachtung konnte für die dritte extrazelluläre Domäne des IL-11-Rezeptors gemacht werden (Grötzinger et al., mündliche Mitteilung).

Das Konstrukt D3 (D3-6.2) konnte erfolgreich unter Fermentationsbedingungen in Minimalmedium exprimiert werden. Die Induktion der Expression erfolgte in der frühen exponentiellen Wachstumsphase der Bakterienkultur und wurde bis zu einer OD_{600} von ca. 5 weitergeführt. T. Stoyan konnte in ihrer Arbeit zur Expression des löslichen IL-6R in *E. coli* zeigen, daß dieser unter Fermentationsbedingungen bereits 15 min nach Induktion nachzuweisen ist [Stoyan, 1993a]. Dies konnte für D3 (D3-6.2) anhand des Prozeßverlaufs der Fermentation bestätigt werden: ca. 15 min nach Induktion durch IPTG stagnierte das Wachstum der Bakterienkultur erkennbar. Ebenfalls in Analogie zur Expression des löslichen IL-6R erreichte das Expressionsniveau von D3 (D3-6.2) nach ca. 1 h ein Plateau (Abb. 4.1), so daß die Induktionsphase auf 2 h beschränkt wurde, um den Hintergrund von bakteriellen Proteinen gering zu halten.

Min nach Induktion 15 30 45 60 90 120



Abb. 4.1. Kinetik der Expression von D3 (D3-6.2). Es wurden zu verschiedenen Zeiten nach Induktion einer Fermenterkultur Proben entnommen, inclusion bodies präpariert und in einem Western Blot mit Hilfe eines IL-6R-spezifischen Antikörpers (6.2) analysiert. Hierbei zeigte sich, daß die Expression des D3 (D3-6.2)-Proteins nach 1 h stagniert.

Das in Form von inclusion bodies aggregierte D3 (D3-6.2)-Protein konnte nach Zellaufschluß durch wiederholtes Waschen mit Lysispuffer größtenteils (zu ca. 90%) von Verunreinigungen mit bakteriellen Proteinen gereinigt werden (Abb. 4.2).

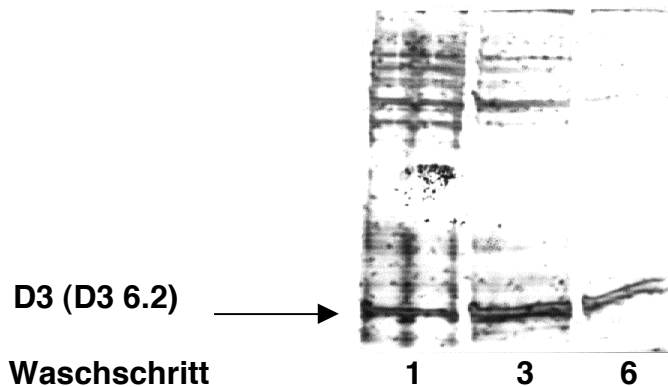


Abb. 4.2. Isolation von D3 (D3-6.2) durch die Anreicherung von inclusion bodies. Das sedimentierte Zellsatz einer induzierten Bakterienkultur wurde nach verschiedenen Waschschritten mit Lysispuffer in einem SDS-Gel aufgetrennt. Hierbei zeigte sich, daß ein Großteil der bakteriellen Proteine im Verlauf dieser Prozedur vom D3 (D3-6.2)-Protein getrennt werden konnte.

Nach Solubilisierung der inclusion bodies in 6M GuHCl erfolgte die Renaturierung des D3 (D3-6.2)-Proteins - in Analogie zur Rückfaltung der dritten extrazellulären Domäne des gp130-Moleküls [Müller-Newen, 1997] - durch Chromatographie auf einer Gelfiltrationssäule. Versuche, D3 (D3-6.2) durch Dialyse zurückzufalten, führten, vermutlich aufgrund der langsameren Renaturierungsreaktion, zur Präzipitation. Als geeigneter Laufpuffer für die Gelchromatographie wurde 50 mM Na_2PO_4 , pH 5,0 (der isoelektrische Punkt von D3 (D3-6.2) liegt bei 6,68) gewählt, da es sich gezeigt hatte, daß D3 (D3-6.2) in Phosphatpuffer in einem erheblich höheren Konzentrationsbereich löslich ist als beispielsweise in Acetatpuffer. Pro Säulenlauf wurden ca. 700 μg Protein aufgetragen, die Ausbeute an renaturiertem, gereinigtem D3 (D3-6.2)-Protein schwankte zwischen 30-40%. Insgesamt konnten mit Hilfe dieser einstufigen Reinigungs- und Renaturierungsmethode ca. 6 mg rekombinantes Protein aus einem Liter Bakterienkultur erhalten werden, was eine gute Basis für die Strukturaufklärung durch die NMR-Spektroskopie darstellt. Durch Rechromatographie des gereinigten Proteins konnte zudem gezeigt werden, daß D3 (D3-6.2) nicht dazu neigt, in Lösung Dimere oder höhere Aggregate zu bilden (Abb.3.8).

Da es während der Renaturierung von D3 (D36.2) zu größeren Verlusten durch die Interaktion von ungefaltetem Protein mit dem Säulenmaterial kam, wurden versuchsweise alternative Strategien angewandt, um eine höhere Ausbeute zu erzielen. Positiv wirkte sich eine vorgeschaltete weitere Aufreinigung der solubilisierten inclusion bodies durch Chromatographie auf einer mit 6M GuHCl equilibrierten Gelfiltrationssäule aus. Als weitere effiziente Renaturierungstechnik erwies sich die schnelle Verdünnung der solubilisierten inclusion bodies durch Einschließen in Renaturierungspuffer in einem Verhältnis von 1:100 [Rudolph & Lilie, 1996]. Diese Methode bedingte jedoch einen nachgeschalteten Reinigungsschritt. Grötzingler et al. konnten zeigen (mündliche Mitteilung), daß es gelingt, große Mengen von gelösten inclusion bodies der dritten extrazellulären Domäne von gp130 durch schnelle Dialyse auf einer Entsalzungssäule (Pharmacia) effizient zurückzufalten. Falls diese Methode auf das D3 (D3-6.2)-Protein übertragbar wäre, könnte eine für eine Strukturanalyse signifikante Menge des Proteins in vergleichsweise kurzer Zeit zur Verfügung gestellt werden.

Die Expression ^{15}N - und $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ -markierten Proteins erfolgte unter identischen Bedingungen, wobei die Salzzusammensetzung des Mediums so gewählt wurde, daß $(^{15}\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ und ^{13}C -Glucose die einzigen N- bzw. C-Quellen waren. Aufgrund der eingeschränkten Verfügbarkeit von ^{13}C -Glucose wurde bei der Fermentation mit $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ -markierten Substraten ein früherer Induktionszeitpunkt gewählt, um eine maximale Expression bis zum Abbruch der Fermentation infolge Glukosemangels zu gewährleisten. Ausgehend von den Ausbeuten renaturierten, nicht markierten Proteins, sind aus diesen Fermentationen ca. 15 mg ^{15}N -markierten und ca. 10 mg $^{15}\text{N}/^{13}\text{C}$ -markierten D3 (D3-6.2)-Materials zu erwarten.

Der Faltungszustand von D3 (D3-6.2) wurde mit Hilfe der CD-Spektroskopie charakterisiert und bestätigte die auf der Grundlage von Homologie-Daten vorausgesagte Eigenschaft dieser IL-6R-Domäne, eine eigenständige Sekundärstruktur einzunehmen. Die im CD-Spektrum ausgeprägte Bande bei 232 nm, welche allen C-terminalen CBM-Domänen der Klasse-I-Zytokinrezeptoren gemeinsam ist, deutet zudem auf die korrekte Positionierung der Tryptophanseitenketten in dem konservierten WSXWS-Motiv hin. Die Analyse des CD-Spektrums im fernen UV-Bereich zeigte ein der homologen Domäne des gp130-Moleküls vergleichbares Muster von Sekundärstrukturanteilen (Tabelle 4.1). Bei beiden Domänen handelt es sich um Proteine mit einem überwiegenden β -Faltblatt-Anteil, was die Voraussagen für die Sekundärstruktur auf der Grundlage von Sequenzhomologien bestätigt [Bazan, 1990b].

Tabelle 4.1. Sekundärstrukturanteile der D3-Proteine vom IL-6R und von gp130 [Müller-Newen, 1997]

Sekundärstrukturmerkmal	β-Faltblatt	α-Helix	β-turn	nichtregulär
D3 (D3-6.2)	56%	0%	23%	21%
D3 - gp130	49%	0%	17%	34%

Die thermische Stabilität von D3 (D3-6.2) wurde durch die Aufnahme von CD-Spektren bei verschiedenen Temperaturen analysiert (Abb. 3.11A). Hierbei zeigte das Protein eine ungewöhnliche Temperatursensitivität: die Elliptizität bei 232 nm beginnt bereits über 25° C abzunehmen, während das homologe D3-Protein des gp130-Moleküls bis 34° C stabil bleibt [Müller-Newen, 1997]. Auch scheint der Verlauf der Denaturierung für das D3 (D3-6.2)-Protein graduell zu sein, während das D3-Protein von gp130 innerhalb eines sehr schmalen Temperaturrahmens (34°C-40°C) denaturiert. Der breitere Verlauf der Schmelzkurve für D3 (D3-6.2) ist vermutlich auf Verunreinigungen der Probe durch Anteile ungefalteten Proteins zurückzuführen, deren Verhalten den raschen, kooperativen Denaturierungsprozeß [Schindler, 1995; Plaxco, 1996] überlagert.

Die vergleichsweise höhere Stabilität der dritten extrazellulären Domäne des gp130 wird mit dem Einfluß eines Valin-Restes in der Scharnier-Region zwischen D2 und D3 erklärt, das dem Modell entsprechend in eine hydrophobe Tasche des D3-Proteins eingepaßt werden kann und so zu der Größe und Kompaktheit des Proteinkerns beiträgt. Eine N-terminal verkürzte Version des D3-Proteins von gp130 zeigt ein Schmelzverhalten, welches dem von D3 (D3-6.2) nahezu entspricht (der Schmelzpunkt liegt bei 34°C), so daß ein entsprechend stabilisierender Einfluß der Scharnier-Region im D3 (6.2)-Protein nicht angenommen werden kann. Die geringe Stabilität von D3 (D3-6.2) unter physiologischen Bedingungen (37°C) läßt vielmehr darauf schließen, daß im löslichen IL-6R die Domänen D2 und D3 sich gegenseitig stabilisieren, da der rekombinant hergestellte lösliche IL-6R (bestehend aus D2 und D3) biologisch aktiv ist [Yawata, 1993; Vollmer, 1996].

4.2 Bindung von D3 (D3-6.2) an Interleukin-6

Die Rezeptoren, die zur Familie der 4-helikalen Zytokine gehören, sind in ihrem extrazellulären Bereich modulartig aus Ig-ähnlichen und Fibronectin-Typ-III-artigen Domänen aufgebaut [Sprang & Bazan, 1993]. Eine spezifische ligandenbindende Funktion wurde dem zytokinbindenden Modul (CBM) zugeschrieben, das aus zwei Fibronectin-Typ-III-artigen Domänen besteht, die durch vier konservierte Cysteine und ein konserviertes WSXWS-Motiv gekennzeichnet sind. Nach der strukturellen Vorhersage von Bazan [Bazan, 1990b] bestehen diese Domänen aus sieben antiparallelen β -Faltblättern, die über ein "Scharnier" (hinge-Region) verbunden sind, das im Falle des IL-6R fünf Aminosäurereste umfaßt (Abb. 4.3). Die konservierte WSXWS-Schleife (Reste 303-307) in der C-terminalen CBM-Domäne ist, wie Mutationen im IL-2R [Miyazaki, 1991] und IL-6R [Yawata, 1993] gezeigt haben, entscheidend für die Bindung des jeweiligen Liganden. Der extrazelluläre Teil des humanen IL-6R ist aus drei Domänen zusammengesetzt. Für die N-terminale Ig-Domäne konnte gezeigt werden, daß sie für die Ligandenbindung und Signaltransduktion entbehrlich ist [Yawata, 1993; Vollmer, 1996], vermutlich aber eine wichtige Rolle beim intrazellulären Transport und der Sekretion des IL-6R spielt [Vollmer, 1999].

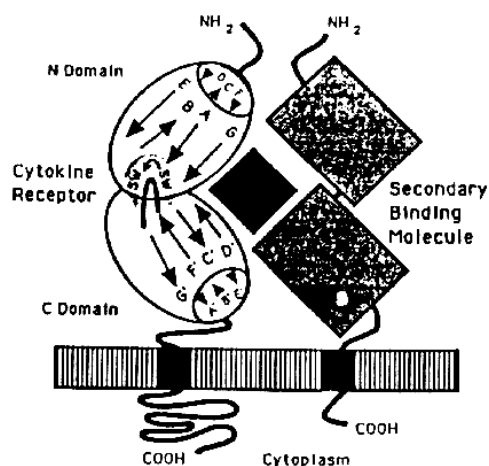


Abb. 4.3. Vorrausgesagte Konfiguration des CBM in hämatopoetischen Rezeptoren [Bazan, 1990b]. Die beiden Domänen des CBM falten in einem Winkel zueinander, so daß eine Bindungstasche für das Zytokin entsteht. Die konservierte WSXWS-Sequenz bildet den proximalen Bereich der hydrophoben Scharnier-Region, die beide Domänen verbindet. Ein hypothetischer sekundärer Rezeptor bindet an die freie Oberfläche des Zytokins und an distale Bereiche des Zytokinrezeptors, die außerhalb der Bindungstasche liegen.

Die Domänen 2 und 3 bilden das CBM, das für die Bindung von IL-6 verantwortlich ist, wobei gezeigt wurde, daß die spezifische Erkennung des Liganden - in Analogie zum GH - über die Schleifen zwischen den β -Faltblättern der beiden CBM-Domänen erfolgt [Kalai, 1996]. In der vorliegenden Arbeit konnte mit Hilfe eines ELISA gezeigt werden, daß die isoliert exprimierte C-terminale Domäne des CBM, D3 (D3-6.2), in der Lage ist, an IL-6 zu binden. Die Bindung in diesem System war vergleichbar mit der des löslichen IL-6R (bestehend aus D2 und D3). Eine Analyse der Interaktion durch Plasmon-Resonanz zeigte, daß D3 (D3-6.2) mit einer Affinität von $K_D = 385$ nM an immobilisiertes IL-6 bindet, um etwa eine Größenordnung schwächer als der gesamte lösliche IL-6R [Weiergräber, 1995]. Diese Diskrepanz in den Bindungsaffinitäten zeigte sich auch in einem Fällungsexperiment mit löslichen Komponenten, bei dem D3 (D3-6.2) durch einen Überschuß eines IL-6-Fc-Fusionsproteins spezifisch präzipitiert werden konnte, jedoch in einem geringeren Maß als der lösliche IL-6R.

Alle bisherigen Erkenntnisse über den IL-6/IL-6R-Komplex stammen aus homologiegestützten Modellbaustudien und aus umfangreichen Mutationsanalysen. Das von Grötzinger et al. [Grötzinger, 1997] vorgeschlagene Modell der Interaktionsregion beschreibt einen hydrophoben Kern, der, ähnlich wie bei einem globulären Protein, von einer hydrophilen Hülle vor dem Kontakt mit Wasser geschützt wird. Die zentrale Interaktionszone wird gebildet durch das Phe298 des IL-6R, das in eine hydrophobe Tasche des IL-6, bestehend aus Resten der A- und D-Helix, hineinreicht. Diesen Bereich umgebende Salzbrücken, die zusätzlich für die Spezifität der Bindung verantwortlich sind, bestehen aus den Argininen 30, 168, 179 und 182 (IL-6) und den Glutaminsäuren 254, 296, 297 und 302 (IL-6R). Ein zweiter Interaktionsbereich wird definiert durch die Wechselwirkung von aromatischen Seitenketten, an der die Phenylalanine 74 und 78 (IL-6) und das Phe248 und Tyr249 des IL-6R beteiligt sind. Auch diese Region wird schützend von ionischen Seitenketten umgeben. Mutationen in der N-terminalen CBM-Domäne (D2) des IL-6R, die die Bindung zu IL-6 vollständig aufheben, betreffen ausschließlich strukturgebende Cysteine (C121, C132, C165, C176, C193) oder nahe gelegene Reste (R123, W134) [Yawata, 1993].

Der Austausch von Aminosäuren innerhalb von D2, die dem Modell nach in die Interaktion mit IL-6 direkt involviert sind, wie etwa des Tyr188, führt lediglich zu einer reduzierten Bindungsaktivität. Dies legt den Schluß nahe, daß der Beitrag von D2 zur Bindungsenergie dem von D3 untergeordnet ist, daß aber von dieser Domäne ein entscheidender Einfluß auf die strukturelle Integrität des Gesamtproteins ausgeht. Diese Annahme wird unterstützt durch die niedrigen Expressionsniveaus der entsprechenden IL-6R-Mutanten in COS7-Zellen [Yawata, 1993] und die hier gezeigte strukturelle Instabilität von D3 (D3-6.2). Die im Vergleich zum gesamten löslichen IL-6R reduzierte Affinität von D3 (D3-6.2) zu IL-6 belegt zudem, daß die Anwesenheit von D2 zur vollen Bindungsaktivität des IL-6R notwendig ist.

Auch im Falle des GH/GHR-Komplexes konnte gezeigt werden, daß beide Domänen des CBM in die Ligandenbindung involviert sind [De Vos, 1992]. Der C-terminalen Domäne des GHR wurde zusätzlich eine Rolle in der Stabilisierung des Homodimers durch Interaktion mit der analogen Domäne des zweiten Rezeptors zugeschrieben. Hiraoka et al. [Hiraoka, 1994] exprimierten die N-terminale CBM-Domäne des murinen G-CSFR in *E. coli*. Sie konnten zeigen, daß diese, ähnlich wie D3 (D3-6.2), in der Lage ist, an G-CSF zu binden, allerdings auch hier mit einer Affinität, die im Vergleich zum ganzen CBM um einen Faktor von 10 niedriger liegt. Die Deletion dieser Domäne führte zu einem totalen Verlust der Bindungsaktivität, während die Deletion der C-terminalen CBM-Domäne in diesem Rezeptormolekül zu einer Erniedrigung der Bindungsaffinität um einen Faktor von 50 führte [Fukunaga, 1991]. Dies bedeutet, daß im Falle des G-CSFR, dessen extrazelluläre Domänenarchitektur der des gp130 entspricht, hauptsächlich die N-terminale Domäne des CBM für die Bindung des Liganden verantwortlich ist, eine hochaffine Bindung jedoch auch nur durch die Anwesenheit beider Domänen zustandekommt. Die Spezifität des strukturell homologen Bindungsmoduls innerhalb der Zytokinrezeptor-Familie drückt sich daher nicht nur in Sequenzänderungen außerhalb der nicht konservierten Bereiche aus, sondern auch in der unterschiedlichen Lagerung des „Affinitätsschwerpunktes“ zwischen der N- und C-terminalen Domäne der Zytokinbindungstasche. Eine totale Reduktion der Bindungseigenschaften auf eine der CBM-Domänen (eine Art „Mini-Rezeptor“) scheint jedoch ohne Verlust von Bindungsenergien und/oder –spezifitäten im Verhältnis zur Gesamtstruktur nicht möglich zu sein.

4.3 Der IL-6/D3 (D3-6.2)-Komplex assoziiert nicht mit gp130

Das Strukturmodell des IL-6/IL-6R/gp130-Komplexes wurde in funktioneller Analogie zum GH-System erstellt, in dem der biologisch aktive GH/(GHR)₂-Komplex durch die Assoziation eines initialen GH/GHR-Komplexes mit einem zweiten GHR-Molekül entsteht [Fuh, 1992; Wells, 1996]. Im GH/(GHR)₂-Komplex kontaktiert der Ligand die beiden Rezeptoren über zwei verschiedene Bindungsstellen (Region 1 und 2) auf gegenüberliegenden Seiten des Moleküls. Die Dimerisierung der Rezeptoren wird zusätzlich durch einen Kontakt zwischen den C-terminalen CBM-Domänen der Rezeptoren stabilisiert [De Vos, 1992]. Im IL-6/IL-6R/gp130-Komplex besetzt ein gp130-Molekül die hochaffine Kontaktstelle (Region 2) des Liganden, wobei eine Assoziation zwischen gp130 und dem IL-6R dem Modell entsprechend durch die E'F'-Schleifen und den Anfang der E'-Stänge der C-terminalen Domänen beider Moleküle vermittelt wird [Salvati, 1995]. IL-6R-Moleküle, die in diesem Kontaktbereich Punktmutationen tragen, wie etwa His280, Asp281, Gly285 und His288/Val289 [Yawata, 1993], sind nicht mehr in der Lage, obwohl mit IL-6 komplexiert, über gp130 zu signalisieren. Eine zweite, für die Signalbildung notwendige Region wurde durch die Analyse der inhibitorischen Funktion von synthetischen IL-6R-Peptiden beschrieben [Grube & Cochrane, 1994]. Es konnte hierbei gezeigt werden, daß ein Peptid, welches der Sequenz Tyr249-Arg258 des IL-6R entspricht, die Proliferation von IL-6-abhängigen Zellen inhibieren kann, ohne gleichzeitig die Interaktion zwischen IL-6 und dem IL-6R zu beeinträchtigen. Im dem von Grötzinger et al. [Grötzinger, 1997] vorgeschlagenen tetrameren IL-6/IL-6R/(gp130)₂-Komplex würde diese Region zusammen mit der Region 3 von IL-6 die Bindung zum zweiten gp130-Molekül vermitteln (Abb.4.4). In der umfangreichen, von Yawata et al. [Yawata, 1993] veröffentlichten Mutationsanalyse des IL-6R wurde innerhalb der N-terminalen CBM-Domäne nur Val190 als ein Rest definiert, der für die Signaltransduktion, nicht aber für die IL-6-Bindung notwendig ist. Die räumliche Nähe von D2 zum zweiten gp130-Molekül im Modell des IL-6/IL-6R/(gp130)₂-Komplexes würde eine solche Interaktion erklären.

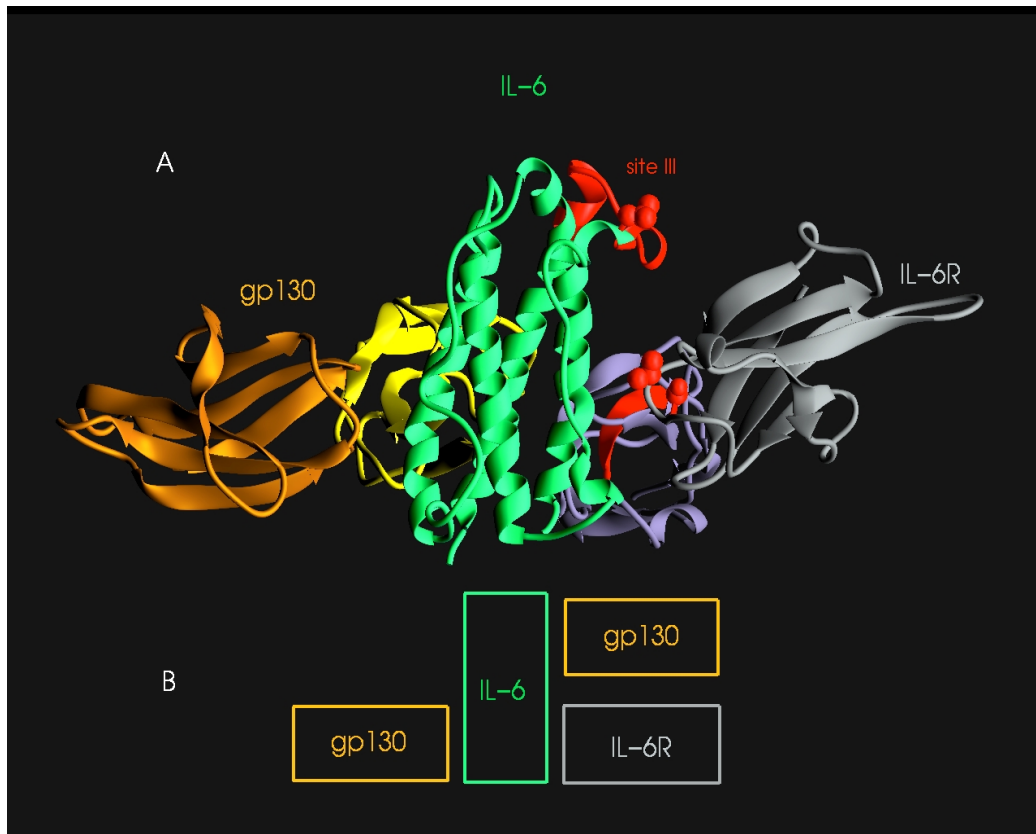


Abb. 4.4. Der IL-6/IL-6R/gp130-Komplex. A. Bändermodell des IL-6/IL-6R-Komplexes [Grötzinger, 1997]. Die rot dargestellten Bereiche des IL-6 (Region 3) und IL-6R entsprechen den Kontaktzonen, die mit dem zweiten gp130-Molekül interagieren. B. Schematische Darstellung des tetrameren IL-6/IL-6R/gp130-Komplexes.

Die in der vorliegenden Arbeit vorgestellten Immunpräzipitationsversuche (2.8) zeigen, daß der IL-6R (bestehend aus D2 und D3) in Lösung sowohl mit IL-6 als auch mit IL-6 in Kombination mit einem gp130-Dimer assoziieren und in Form von Immunkomplexen gefällt werden kann. Die im zehnfachen molaren Überschuß eingesetzten Fc-Fusionsproteine von IL-6 und gp130 waren in der Lage, den löslichen IL-6R nahezu quantitativ zu präzipitieren. In einem identischen Experiment konnte das D3 (D3-6.2)-Protein nur durch IL-6-Fc spezifisch gefällt werden. Eine Assoziation des D3 (D3-6.2)/IL-6-Komplexes mit gp130-Fc war nicht nachweisbar. Die vergleichsweise geringe Affinität von D3 (D3-6.2) zu IL-6 zeigte sich hierbei in dem geringeren Anteil des gefällten Proteins (ca. 5-10%) im Verhältnis zur eingesetzten Menge. Aus diesen Daten läßt sich folgern, daß die C-terminale CBM-Domäne des IL-6R für die Interaktion mit gp130 - und somit für die Induktion eines Signals - nicht ausreichend ist.

Der Beitrag von D2 zur Bildung des signaltransduzierenden IL-6/IL-6R/(gp130)₂-Komplexes kann daher als größer angenommen werden als der für die Bildung des initialen IL-6/IL-6R-Komplexes, welcher bereits mit der C-terminalen CBM-Domäne zustandekommt. Die aus Mutations- und Modellstudien erhobenen Daten weisen der N-terminalen CBM-Domäne (D2) in erster Linie eine Rolle bei der Assoziation mit dem zweiten gp130-Molekül zu. Denkbar ist aber auch ein stabilisierender Einfluß von D2 auf die korrekte Orientierung der C-terminalen CBM-Domäne (D3) bei der Assoziation mit dem ersten gp130.

Die Tatsache, daß D3 (D3-6.2) an IL-6 binden kann, ohne in der Lage zu sein, ein Signal über gp130 zu induzieren, legt die Verwendung dieses Proteins als IL-6-Antagonisten nahe. Allerdings müßte hierzu die Stabilität des D3 (D3-6.2)-Proteins unter physiologischen Bedingungen (37°C) gewährleistet sein. Eine Möglichkeit, die Stabilität eines Polypeptids zu erhöhen, besteht in der Einführung von intramolekularen Disulfidbrücken durch die Insertion von Cysteinseitenketten an geeigneten Positionen der Primärsequenz des Proteins. So konnten z.B. Janssen et al. zeigen, daß es gelingt, durch die Einführung einer Disulfidbrücke in eine Phospholipase A2, anlehnend an das Disulfidbrückenmuster eines homologen Enzyms, deren strukturelle Stabilität bei gleichbleibender enzymatischer Aktivität zu erhöhen [Janssen, 1999]. Es wäre daher vorstellbar, durch ein ähnliches Verfahren eine D3 (D3-6.2)-Variante zu generieren, die, im Überschuß eingesetzt, beispielsweise die Proliferation von IL-6-abhängigen Zelllinien inhibieren könnte. Denkbar ist auch die Verwendung des D3 (D3-6.2)-Proteins als Antigen bei der gezielten Suche nach einem humanen Antikörper-Fragment aus einer Phagen-Präsentationsbibliothek. Ein solcher Antikörper konnte für IL-6 bereits gefunden werden, zeigte jedoch keine neutralisierende Aktivität [Krebs, 1998]. Da die Interaktion zwischen D3 (D3-6.2) und IL-6 den Hauptanteil der Bindung im IL-6/IL-6R-Komplex ausmacht, könnte die Wahrscheinlichkeit einen neutralisierenden Antikörper zu finden, mit Hilfe von D3 (D3-6.2) als Zielantigen entscheidend erhöht werden. Ein solcher Antikörper würde in einer Reihe von IL-6-abhängigen Erkrankungen (vgl. 1.2) durchaus therapeutische Perspektiven eröffnen.

4.4 Die Aufklärung der Struktur von D3 (D3-6.2) durch die NMR-Spektroskopie

Die in der vorliegenden Arbeit gezeigte Expressions-, Reinigungs-, und Renaturierungsstrategie für das D3 (D3-6.2)-Protein stellt die Basis für weitergehende strukturelle Untersuchungen durch die NMR-Spektroskopie dar. Das eindimensionale ^1H -Spektrum von D3 (D3-6.2) bestätigte die Ergebnisse der CD-Spektroskopie und Rechromatographie des gereinigten Proteins: D3 (D3-6.2) ist korrekt gefaltet und liegt auch in hoher Konzentration als Monomer vor. Die Markierung des Proteins mit ^{15}N und ^{13}C konnte mit ausreichender Ausbeute durchgeführt werden. Somit sind die wichtigsten Voraussetzungen für eine heteronukleare, mehrdimensionale NMR-Spektroskopie erfüllt.

Die Aufklärung der Struktur von D3 (D3-6.2) verspricht eine genaue Beschreibung des Fibronectin-Typ-III-Faltungsmusters für dieses Protein. Obwohl die Mitglieder der Klasse-I-Zytokin-Rezeptoren eine ähnliche Topologie besitzen (Abb.4.5), weisen ihre β -Faltblätter und Schleifen unterschiedliche Längen und Orientierungen auf. Bei einem Vergleich bekannter D3-homologer Strukturen innerhalb dieser Rezeptor-Familie zeigt sich dies am deutlichsten in der relativen Orientierung der Stränge C und D [Kernebeck, 1999]. Beim EPOR liegen diese nahezu parallel, während sie sich beim gp130 oder GHR überkreuzen. Dies führt bei D3 von gp130 dazu, daß das Ende der CD-Schleife der exponierten Fläche der Stränge C und F genähert wird. Es kommt zu einer Wechselwirkung von Trp269 mit hydrophoben Seitenketten des F- und C-Strangs. Zusätzlich bildet Trp269 den distalen Abschnitt eines ungewöhnlichen Trp/Arg-Zippers, zu dem die Tryptophan-Seitenketten von Trp310 und 313 im konservierten WSXWS-Motiv (FG-Schleife) und die Arginin-Seitenketten Arg300, Arg298 (Strang F) und Arg 262 (Strang C) beitragen (Abb.4.6). In D3 des IL-6R könnte eine vergleichbare Wechselwirkung zwischen den Arginin-Seitenketten Arg256, 258 und 293, sowie den Tryptophan-Seitenketten der konservierten WSXWS-Sequenz, Trp303 und 306, und Phe265 als dritter interkalierender Seitenkette verwirklicht sein. Dieses Strukturmotiv bildet eine Oberfläche mit besonderen elektrostatischen Eigenschaften, die vermutlich entscheidend in die Ligandenbindung involviert ist [Yawata, 1993]. Genau definierte Informationen über die Interaktionsstellen zwischen D3 (D3-6.2) und IL-6 wird jedoch erst der Vergleich der NMR-Spektren der Domäne mit und ohne IL-6 liefern [Yamasaki, 1997].

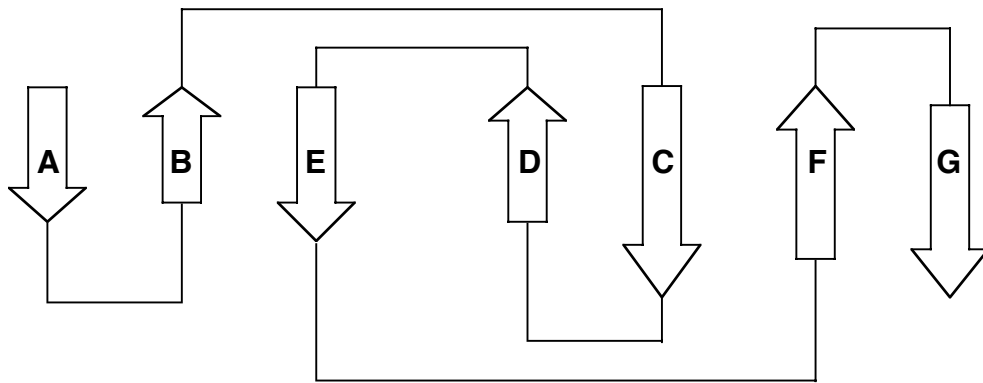


Abb. 4.5. Schema des Fibronectin-Typ-III-Strukturmotivs. Die sieben Stränge einer Fibronectin-Typ-III-Domäne bilden in einer mäanderartigen Anordnung (Greek key) zwei β -Faltblätter aus jeweils drei (A, B, E) und vier (D, C, F, G) Strängen.

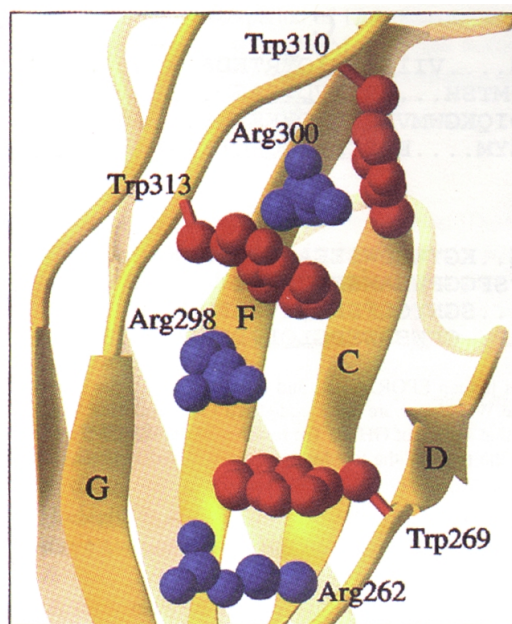


Abb. 4.6. WR-Zipper in D3 von gp130. Strukturmotiv aus alternierenden Tryptophan (rot)- und Arginin (blau)-Seitenketten [Kernebeck, 1999].

5. Zusammenfassung

Die Familie der IL-6-Typ-Zytokine (IL-6, IL-11, CT-1, CNTF, LIF, OSM, BSF-3) ist durch eine vierhelikale Faltung gekennzeichnet. Alle Zytokine dieser Familie agieren über einen Rezeptorkomplex, der als gemeinsame Komponente mindestens ein Molekül gp130 enthält. IL-6 und IL-11 signalisieren über ein gp130-Homodimer, während CT-1, CNTF, LIF und OSM ein Heterodimer aus gp130 und dem strukturell verwandten LIFR oder, im Falle des OSM, auch OSMR verwenden.

Die Rezeptoren der vierhelikalen Zytokine sind in ihrem extrazellulären Bereich modulartig aus Ig- und Fibronectin-Typ-III-ähnlichen Domänen aufgebaut. Sie besitzen als gemeinsame Struktureinheit ein zytokinbindendes Modul (CBM) aus zwei Fibronectin-Typ-III-ähnlichen Domänen, die durch vier konservierte Cysteine in der N-terminalen und ein konserviertes WSXWS-Motiv in der C-terminalen Domäne charakterisiert sind. Auf Zielzellen bindet IL-6 an den spezifischen IL-6 Rezeptor, worauf der Komplex aus IL-6/IL-6R mit dem Signaltransduktor gp130 assoziiert. Der IL-6R besteht in seinem extrazellulären Bereich aus drei Domänen. Die N-terminale Ig-ähnliche Domäne ist für die biologische Aktivität nicht notwendig. Die Domänen 2 und 3 bilden das CBM, welches auch in löslicher Form agonistisch wirkt.

In der vorliegenden Arbeit wurden die strukturellen und funktionellen Eigenschaften der dritten extrazellulären Domäne des IL-6R untersucht. Das Protein läßt sich effizient in Bakterien exprimieren und in vitro renaturieren. Es konnte gezeigt werden, daß Domäne 3 für die Bindung an IL-6 ausreichend ist, der Komplex aus D3 und IL-6 jedoch nicht mehr mit dem gp130-Molekül assoziieren kann. Da der lösliche IL-6R (bestehend aus D2 und D3) in der Lage ist, an gp130 zu binden und ein biologisches Signal auszulösen, weisen diese Daten der C-terminalen CBM-Domäne (D3) eine ligandenbindende Funktion und der N-terminalen CBM-Domäne eine wichtige Rolle bei der Komplexbildung mit gp130 und Signalinduktion zu. Die gezeigte Expressions- und Renaturierungsstrategie für D3 wurde zur Markierung des Proteins mit ^{15}N und ^{13}C für die mehrdimensionale, heteronukleare NMR-Spektroskopie angewandt. Die hierdurch ermöglichte Strukturaufklärung von D3 als einer eindeutig in die Ligandenbindung involvierten Teilstruktur wird umfassendere strukturelle Informationen über den IL-6R-Komplex liefern, als es die bisherigen Mutations- bzw. Modellbaustudien konnten.

6. Literaturverzeichnis

Ahmed, A.K., Schaffer, S.W. and Wetlaufer, D.B. (1975) Nonenzymic Reactivation of Reduced Bovine Pancreatic Ribonuclease by Air Oxidation and by Glutathione Oxidoreduction Buffers. *J. Biol. Chem.*, **250**, 8477-8482.

Akira, S., Isshiki, H., Nakajima, T., Kinoshita, S., Nishio, Y., Hashimoto, S., Natsuka, S. and Kishimoto, T. (1992) A nuclear factor for the IL-6 gene (NF-IL6). *Chem. Immunol.*, **51**, 299-322.

Anaguchi, H., Hiraoka, O., Yamasaki, K., Naito, S. and Ota, Y. (1995) Ligand Binding Characteristics of the Carboxyl-terminal Domain of the Cytokine Receptor Homologous Region of the Granulocyte Colony-stimulating Factor Receptor. *J. Biol. Chem.*, **270**, 27845-27851.

Auguste, P., Guillet, C., Fourcin, M., Olivier, C., Veziere, J., Pouplard Barthelaix, A. and Gascan, H. (1997) Signaling of Type II Oncostatin M Receptor. *J. Biol. Chem.*, **272**, 15760-15764.

Bagley, C.J., Woodcock, J.M., Stomski, F.C. and Lopez, A.F. (1997) The structural and functional basis of cytokine receptor activation: lessons from the common beta subunit of the granulocyte-macrophage colony stimulating factor, interleukin-3 (IL-3), and IL-5 receptors. *Blood*, **89**, 1471-1482.

Baumann, M., Baumann, H. and Fey, G.H. (1990) Molecular Cloning, Characterization and Functional Expression of the Rat Liver Interleukin 6 Receptor. *J. Biol. Chem.*, **265**, 19853-19862.

Baumann, H., Symes, A.J., Comeau, M.R., Morella, K.K., Wang, Y., Friend, D., Ziegler, S.F., Fink, J.S. and Gearing, D.P. (1994) Multiple regions within the cytoplasmic domains of the leukemia inhibitory factor receptor and gp130 cooperate in signal transduction in hepatic and neuronal cells. *Mol. Cell. Biol.*, **14**, 138-146.

Bazan, J.F. (1990a) Shared architecture of hormone binding domains in type I and II interferon receptors. *Cell*, **61**, 753-754.

Bazan, J.F. (1990b) Structural design and molecular evolution of a cytokine receptor superfamily. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 6934-6938.

Bazan, J.F. (1990c) Haemopoietic receptors and helical cytokines. *Immunol. Today*, **11**, 350-354.

Bazan, J.F. (1991) Genetic and Structural Homology of Stem Cell Factor and Macrophage Colony-Stimulating Factor [letter]. *Cell*, **65**, 9-10.

Bork, P., Holm, L. and Sander, C. (1994) The immunoglobulin fold. Structural classification, sequence patterns and common core. *J. Mol. Biol.*, **242**, 309-320.

Boulton, T.G., Stahl, N. and Yancopoulos, G.D. (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**, 11648-11655.

Brahms, S., Brahms, J., Spach, G. and Brack, A. (1977) Identification of beta,beta-turns and unordered conformations in polypeptide chains by vacuum ultraviolet circular dichroism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 3208-3212.

Brakenhoff, J.P.J., Hart, M. and Aarden, L.A. (1989) Analysis of human IL-6 mutants expressed in *Escherichia coli*. Biologic activities are not affected by deletion of amino acids 1-28. *J. Immunol.*, **143**, 1175-1182.

Brakenhoff, J.P.J., de Hon, F.D., Fontaine, V., ten Boekel, E., Schooltink, H., Rose-John, S., Heinrich, P.C., Content, J. and Aarden, L.A. (1994) Development of a Human Interleukin-6 Receptor Antagonist. *J. Biol. Chem.*, **269**, 86-93.

Brandt, S.J., Bodine, D.M., Dunbar, C.E. and Nienhuis, A.W. (1990) Dysregulated expression produces a syndrome resembling Castleman's disease in mice. *J. Clin. Invest.*, **86**, 592-599.

Bravo, J., Staunton, D., Heath, J.K. and Jones, E.Y. (1998) Crystal structure of a cytokine-binding region of gp130. *EMBO J.*, **17**, 1665-1674.

Castell, J.V., Andus, T., Kunz, D. and Heinrich, P.C. (1989) . The major regulator of acute phase protein synthesis in man and rat. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **557**, 87-99.

Chen, G.C. and Yang, J.T. (1977) Two-point calibration of circular dichrometer with d-10-camphorsulfonic acid. *Anal. Lett.*, **10**, 1195-1207.

Clackson, T. and Wells, J.A. (1995) A hot spot of binding energy in a hormone-receptor interface. *Science*, **267**, 383-386.

Clogston, C.L., Boone, T.C., Crandall, B.C., Mendiaz, E.A. and Lu, H.S. (1989) Disulfide structures of human are similar to those of human granulocyte-colony stimulating factor. *Arch. Biochem. Biophys.*, **272**, 144-151.

Cole, A.R., Hall, N.E., Treutlein, H.R., Eddes, J.S., Reid, G.E., Moritz, R.L. and Simpson, R.J. (1999) Disulfide Bond Structure and N-Glycosylation Sites of the Extracellular Domain of the Human Interleukin-6 Receptor. *J. Biol. Chem.*, **274**, 7207-7215.

Curtis, D.J., Hilton, D.J., Roberts, B., Murray, L., Nicola, N. and Begley, C.G. (1997) Recombinant soluble interleukin-11 (IL-11) receptor alpha-chain can act as an IL-11 antagonist. *Blood*, **90**, 4403-4412.

Daeipour, M., Kumar, G., Amaral, M.C. and Nel, A.E. (1993) Recombinant IL-6 activates p42 and p44 mitogen-activated protein kinases in the IL-6 responsive B cell line, AF-10. *J. Immunol.*, **150**, 4743-4753.

de Hon, F.D., ten Boekel, E., Herrman, J., Clement, C., Ehlers, M., Taga, T., Yasukawa, K., Ohsugi, Y., Kishimoto, T., Rose-John, S., Wijdenes, J., Kastelein, R., Aarden, L.A. and Brakenhoff, J.P.J. (1995) Functional distinction of two regions of human interleukin-6 important for signal transduction via gp130. *Cytokine*, **7**, 398-407.

De Vos, A.M., Ultsch, M. and Kossiakoff, A.A. (1992) Human Growth Hormone and Extracellular Domain of Its Receptor: Crystall Structure of the Complex. *Science*, **255**, 306-312.

De Serio, A., Graziani, R., Laufer, R., Ciliberto, G. and Paonessa, G. (1995) In vitro binding of ciliary neurotrophic factor to its receptors: evidence for the formation of an IL-6-type hexameric complex. *J. Mol. Biol.*, **254**, 795-800.

Ehlers, M., de Hon, F.D., Bos, H.K., Horsten, U., Kurapkat, G., van De Leur, H.S., Grötzinger, J., Wollmer, A., Brakenhoff, J.P.J. and Rose-John, S. (1995) Combining Two Mutations of Human Interleukin-6 That Affect gp130 Activation Results in a Potent Interleukin-6 Receptor Antagonist on Human Myeloma Cells. *J. Biol. Chem.*, **270**, 8158-8163.

Ehlers, M., Grötzinger, J., deHon, F.D., Müllberg, J., Brakenhoff, J.P.J., Liu, J., Wollmer, A. and Rose-John, S. (1994) Identification of two novel regions of human IL-6 responsible for receptor binding and signal transduction. *J. Immunol.*, **153**, 1744-1753.

Ehlers, M., Grötzinger, J., Fischer, M., Bos, H.K., Brakenhoff, J.P.J. and Rose-John, S. (1996) Identification of Single Amino Acid Residues of Human Interleukin-6 Involved in Receptor Binding and Signal Initiation. *J. Interferon Cytokine Res.*, **16**, 569-576.

Enfors, S.O. and Häggström, L. (1994) *Bioprocess Technology. Fundamentals and Applications*. Royal Institute of Technology, Stockholm, Stockholm.

Fink, A.L. (1995) Compact Intermediates States In Protein Folding. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, **24**, 495-522.

Fischer, M., Goldschmitt, J., Peschel, C., Kallen, K.J., Brakenhoff, J.P.J., Wollmer, A., Grötzinger, J. and Rose-John, S. (1997) A Designer Cytokine with High Activity on Human Hematopoietic Progenitor Cells. *Nature Biotech.*, **15**, 142-145.

Fontaine, V., Ooms, J. and Content, J. (1994) Mutagenesis of the human interleukin-6 fourth predicted alpha-helix: involvement of the Arg168 in the binding site. *Eur. J. Immunol.*, **24**, 1041-1045.

Fontaine, V., Savino, R., Arcone, R., de Wit, L., Brakenhoff, J.P., Content, J. and Ciliberto, G. (1993) Involvement of the Arg179 in the active site of human IL-6. *Eur. J. Biochem.*, **211**, 749-755.

Fuh, G., Cunningham, B.C., Fukunaga, R., Nagata, S., Goeddel, D.V. and Wells, J.A. (1992) Rational design of potent antagonists to the human growth hormone receptor. *Science*, **256**, 1677-1680.

Fukunaga, R., Ishizaka-Ikeda, E., Pan, C.X., Seto, Y. and Nagata, S. (1991) Functional domains of the granulocyte colony-stimulating factor receptor. *EMBO J.*, **10**, 2855-2865.

Gauldie, J., Richards, C., Harnish, D., Lansdorp, P. and Baumann, H. (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**, 7251-7255.

Gearing, D.P. and Bruce, A.G. (1992) Oncostatin M binds the high affinity leukemia inhibitory factor receptor. *New. Biol.*, **4**, 61-65.

Goloubinoff, P., Gatenby, A.A. and Lorimer, G.H. (1989) GroE heat-shock proteins promote assembly of foreign prokaryotic ribulose biphosphate carboxylase oligomers in *Escherichia coli*. *Nature*, **337**, 44-47.

Grishina, I.B. and Woody, R.W. (1994) Contributions of tryptophan side chains to the circular dichroism of globular proteins: exciton couplets and coupled oscillators. *Faraday Discuss.*, **99**, 245-262.

Gross, V., Andus, T., Castell, J., Vom Berg, D., Heinrich, P.C. and Gerok, W. (1989) O- and N-glycosylation lead to different molecular mass forms of human monocyte. *FEBS Lett.*, **247**, 323-326.

Grötzinger, J., Kurapkat, G., Wollmer, A., Kalai, M. and Rose-John, S. (1997) The Family of the IL-6-type Cytokines: Specificity and Promiscuity of the Receptor Complexes. *Proteins: Structure, Function, and Genetics*, **27**, 96-109.

Grötzinger, J., Kernebeck, T., Kallen, K.-J. and Rose-John, S. (1999) IL-6 type Cytokine Receptor Complexes: Hexamer, Tetramer or Both? *Biol. Chem.*, **380**, 803-813.

Grube, B.J. and Cochrane, C.G. (1994) Identification of a Regulatory Domain of the Interleukin-6 Receptor. *J. Biol. Chem.*, **269**, 20791-20797.

Heinrich, P.C., Behrmann, I., Müller-Newen, G., Schaper, F. and Graeve, L. (1998) Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. *Biochem. J.*, **334**, 297-314.

Heinrich, P.C., Castell, J.V. and Andus, T. (1990) Interleukin-6 and the acute phase response. *Biochem. J.*, **265**, 621-636.

Hermann, E., Fleischer, B., Mayet, W.J., Poralla, T. and Meyer zum Büschenfelde, K.H. (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., Murakami, M., Saito, M., Hirano, T., Taga, T. and Kishimoto, T. (1990) Molecular Cloning and Expression of an IL-6 signal transducer, gp130. *Cell*, **63**, 1149-1157.

Hill, C.P., Osslund, T.D. and Eisenberg, D. (1993) The structure of granulocyte-colony-stimulating factor and its relationship to other growth factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 5167-5171.

Hirano, T., Yasukawa, K., Harada, H., Taga, T., Watanabe, Y., Matsuda, T., Kashiwamura, S., Nakajima, K., Koyama, K., Iwamatsu, A., Tsunasawa, S., Sakiyama, F., Matsui, H., Takahara, Y., Taniguchi, T. and Kishimoto, T. (1986) Complementary DNA for a novel human interleukin (BSF-2) that induces B-lymphocytes to produce immunoglobulin. *Nature*, **324**, 73-76.

Hiraoka, O., Anaguchi, H., Yamasaki, K., Fukunaga, R., Nagata, S. and Ota, Y. (1994) Ligand Binding Domain of Granulocyte Colony-stimulating Factor Receptor. *J. Biol. Chem.*, **269**, 22412-22419.

Horsten, U., Schmitz-Van de Leur, H., Müllberg, J., Heinrich, P.C. and Rose-John, S. (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**, 43-46.

Horsten, U., Müller-Newen, G., Gerhartz, C., Wollmer, A., Wijdenes, J., Heinrich, P.C. and Grötzinger, J. (1997) Molecular Modeling-guided Mutagenesis of the Extracellular Part of gp130 Leads to the Identification of Contact Sites in the Interleukin-6 (IL-6).IL-6 Receptor.gp130 Complex. *J. Biol. Chem.*, **272**, 23748-23757.

Ihle, J.N., Witthuhn, B.A., Quelle, F.W., Yamamoto, K., Thierfelder, W.E., Kreider, B. and Silvennoinen, O. (1994) Signaling by the cytokine receptor superfamily: JAKs and STATs. *Trends Biochem. Sci.*, **19**, 222-227.

Janssen, M.J., Verheij, H.M., Slotboom, A.J. and Egmond, M.R. (1999) Engineering the disulphide bond patterns of secretory phospholipases A2 into porcine pancreatic isozyme. The effects on folding, stability and enzymatic properties. *Eur. J. Biochem.*, **261**, 197-207.

Jilka, R.L., Hangoc, G., Girasole, G., Passeri, G., Williams, D.C., Abrams, J.S., Boyce, B., Broxmeyer, H. and Manolagas, S.C. (1992) Increased Osteoclast Development After Estrogen Loss: Mediation by Interleukin-6. *Science*, **257**, 88-91.

Johnson, W.C.J. and Tinoco, I.J. (1972) Circular dichroism of polypeptide solutions in the vacuum ultraviolet. *J. Am. Chem. Soc.*, **94**, 4389-4392.

Jostock, T., Blinn, G., Renné, C., Kallen, K.-J., Rose-John, S. and Müllberg, J. (1999) Immuno adhesins of interleukin-6 and the IL-6 / soluble IL-6R fusion protein hyper-IL-6. *J. Immunol. Meth.*, **223**, 171-183.

Kalai, M., Montero Julian, F.A., Grötzinger, J., Fontaine, V., Vandebussche, P., Deschuyteneer, R., Wollmer, A., Brailly, H. and Content, J. (1997) Analysis of the Human Interleukin-6/Human Interleukin-6 Receptor Binding Interface at the Amino Acid Level: Proposed Mechanism of Interaction. *Blood*, **89**, 1319-1333.

Kalai, M., Montero-Julian, F.A., Grötzinger, J., Wollmer, A., Morelle, D., Brochier, J., Rose-John, S., Heinrich, P.C., Brailly, H. and Content, J. (1996) Participation of two Ser-Ser-Phe-Tyr repeats in interleukin-6 (IL-6)-binding sites of the human IL-6 receptor. *Eur. J. Biochem.*, **238**, 714-723.

Kallen, K.-J., Grötzinger, J., Lelièvre, E., Vollmer, P., Aasland, D., Renné, C., Müllberg, J., Meyer zum Büschenfelde, K.-H., Gascan, H. and Rose-John, S. (1999) Receptor Recognition Sites of Cytokines Are Organized as Exchangeable Moduls: Transfer Of The Leukemia Inhibitory Factor Receptor-Binding Site From Ciliary Neurotrophic Factor To Interleukin-6. *J. Biol. Chem.*, **274**, 11859-11867.

Kaptein, R., Boelens, R., Scheek, R.M. and van Gunsteren, W.F. (1988) Protein structures from NMR. *Biochemistry*, **27**, 5389-5395.

- Kernebeck, T., Pflanz, S., Müller-Newen, G., Kurapkat, G., Scheek, R.M., Dijkstra, K., Heinrich, P.C., Wollmer, A., Grzesiek, S. and Grötzinger, J. (1999) The signal transducer gp130: Solution structure of the carboxy-terminal domain of the cytokine receptor homology region. *Protein Sci.*, **8**, 5-12.
- Kishimoto, T., Akira, S., Narazaki, M. and Taga, T. (1995) Interleukin-6 family of cytokines and gp130. *Blood*, **86**, 1243-1254.
- Krebs, B., Griifin, H., Winter, G. and Rose-John, S. (1998) Recombinant Human Single Chain Fv Antibodies Recognizing Human Interleukin-6: Specific Targeting of Cytokine-Secreting Cells. *J. Biol. Chem.*, **273**, 2858-2865.
- Kurth, I., Horsten, U., Pflanz, S., Dahmen, H., Küster, A., Grötzinger, J., Heinrich, P.C. and Müller-Newen, G. (1999) Activation of the Signal Transducer Glycoprotein 130 by both IL-6 and IL-11 Requires Two Distinct Binding Epitopes. *J. Immunol.*, **162**, 1480-1487.
- Laemmli, U.K., Molbert, E., Showe, M. and Kellenberger, E. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Lütticken, C., Krüttgen, A., Moller, C., Heinrich, P.C. and Rose-John, S. (1991) Evidence for the importance of a positive charge and an alpha-helical structure of the C-terminus for biological activity of human IL-6. *FEBS Lett.*, **282**, 265-267.
- Lütticken, C., Wegenka, U.M., Yuan, J., Buschmann, J., Schindler, C., Ziemiecki, A., Harpur, A.G., Wilks, A.F., Yasukawa, K., Taga, T., Kishimoto, T., Barbieri, G., Pellegrini, S., Sendtner, M., Heinrich, P.C. and Horn, F. (1994) Association of Transcription Factor APRF and Protein Kinase Jak1 with the Interleukin-6 Signal Transducer gp130. *Science*, **263**, 89-92.
- Matsumura, M., Signor, G. and Matthews, B.W. (1989) Substantial increase of protein stability by multiple disulphide bonds. *Nature*, **342**, 291-293.
- Müllberg, J., Oberthur, W., Lottspeich, F., Mehl, E., Dittrich, E., Graeve, L., Heinrich, P.C. and Rose John, S. (1994) The soluble human IL-6 receptor. Mutational characterization of the proteolytic cleavage site. *J. Immunol.*, **152**, 4958-4968.
- Müllberg, J., Schooltink, H., Stoyan, T., Günther, M., Graeve, L., Buse, G., Mackiewicz, A., Heinrich, P.C. and Rose John, S. (1993) The soluble Interleukin-6 receptor is generated by shedding. *Eur. J. Immunol.*, **23**, 473-480.

Müller-Newen, G., Pflanz, S., Hassiepen, U., Stahl, J., Wollmer, A., Heinrich, P.C. and Grötzinger, J. (1997) The signal transducer gp130: Bacterial expression, refolding and properties of the carboxy-terminal domain of the cytokine-binding module. *Eur. J. Biochem.*, **247**, 425-431.

Murakami, M., Hibi, M., Nakagawa, N., Nakagawa, T., Yasukawa, K., Yamanishi, K., Taga, T. and Kishimoto, T. (1993) IL-6-Induced Homodimerization of gp130 and Associated Activation of a Tyrosine Kinase. *Science*, **260**, 1808-1810.

Murakami, M., Narazaki, M., Hibi, M., Yawata, H., Yasukawa, K., Hamaguchi, M., Taga, T. and Kishimoto, T. (1991) Critical cytoplasmic region of the interleukin 6 signal transducer gp130 is conserved in the cytokine receptor family. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 11349-11353.

Nakajima, T., Kinoshita, S., Sasagawa, T., Sasaki, K., Naruto, M., Kishimoto, T. and Akira, S. (1993) Phosphorylation at threonine-235 by a ras-dependent mitogen-activated protein kinase cascade is essential for transcription factor NF-IL6. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 2207-2211.

Neubauer, P., Häggström, L. and Enfors, S.-O. (1995) Influence of Substrate Oscillations on Acetate Formation and Growth Yield in Escherichia coli Glucose Limited Fed-Batch Cultivations. *Biotechnol. Bioeng.*, **47**, 139-146.

Paonessa, G., Graziani, R., De Serio, A., Savino, R., Ciapponi, L., Lahm, A., Salvati, A.L., Toniatti, C. and Ciliberto, G. (1995) Two distinct and independent sites on IL-6 trigger gp 130 dimer formation and signalling. *EMBO J.*, **14**, 1942-1951.

Partanen, J., Makela, T.P., Alitalo, R., Lehvaslaiho, H. and Alitalo, K. (1990) Putative tyrosine kinases expressed in K-562 human leukemia cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 8913-8917.

Plaxco, K.W., Spitzfaden, C., Campbell, I.D. and Dobson, C.M. (1996) Rapid refolding of a proline-rich all- β -sheet fibronectin type III module. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 10703-10706.

Poli, G., Bressler, P., Kinter, A., Duh, E., Timmer, W.C., Rabson, A., Justement, J.S., Stanley, S. and Fauci, A.S. (1990) Interleukin-6 Induces Human Immunodeficiency Virus Expression in Infected Monocytic Cells Alone and in Synergy with Tumor Necrosis Factor α by Transcriptional and Post-transcriptional Mechanisms. *J. Exp. Med.*, **172**, 151-158.

Poli, V., Mancini, F.P. and Cortese, R. (1990) IL-6DBP, a nuclear protein involved in interleukin-6 signal transduction, defines a new family of leucine zipper proteins related to C/EBP. *Cell*, **63**, 643-653.

Rose-John, S. and Heinrich, P.C. (1994) Soluble receptors for cytokines and growth factors: generation and biological function. *Biochem. J.*, **300**, 281-290.

Rudolph, R. and Lilie, H. (1996) In vitro folding of inclusion body proteins. *FASEB J.*, **10**, 49-56.

Salvati, A.L., Lahm, A., Paonessa, G., Ciliberto, G. and Toniatti, C. (1995) Interleukin-6 (IL-6) Antagonism by Soluble IL-6 Receptor α Mutated in the Predicted gp130-binding Interface. *J. Biol. Chem.*, **270**, 12242-12249.

Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

Samuelsson, E., Jonasson, P., Viklund, F., Nilsson, B. and Uhlén, M. (1996) Affinity-assisted in vivo folding of a secreted human peptide hormone in *Escherichia coli*. *Nat. Biotechnol.*, **14**, 751-755.

Satoh, T., Nakafuku, M. and Kaziro, Y. (1992) Function of Ras as a Molecular Switch in Signal Transduction. *J. Biol. Chem.*, **267**, 24149-24152.

Savino, R., Ciapponi, L., Lahm, A., Demartis, A., Cabibbo, A., Toniatti, C., Delmastro, P., Altamura, S. and Ciliberto, G. (1994a) Rational design of a receptor super-antagonist of human interleukin-6. *EMBO J.*, **13**, 5863-5870.

Savino, R., Lahm, A., Salvati, A.L., Ciapponi, L., Sporeno, E., Altamura, S., Paonessa, G., Toniatti, C. and Ciliberto, G. (1994b) Generation of interleukin-6 receptor antagonists by molecular-modeling guided mutagenesis of residues important for gp130 activation. *EMBO J.*, **13**, 1357-1367.

Saxena, V.P. and Wetlaufer, D.B. (1970) Formation of three-dimensional structure in proteins. I. Rapid nonenzymic reactivation of reduced lysozyme. *Biochemistry*, **9**, 5015-5023.

Schein, C.H. (1993) Solubility and secretability. *Curr. Opin. Biotechnol.*, **4**, 456-461.

Schindler, T., Herrler, M., Marahiel, M.A. and Schmid, F.X. (1995) Extremely rapid protein folding in the absence of intermediates. *Nat. Struct. Biol.*, **2**, 663-673.

Shuai, K., Horvath, C.M., Huang, L.H., Qureshi, S.A., Cowburn, D. and Darnell, J.E.Jr. (1994) Interferon Activation of the Transcription Factor Stat91 Involves Dimerization Through SH2-Phosphotyrosyl Peptide Interactions. *Cell*, **76**, 821-828.

- Somers, W., Stahl, M. and Seehra, J.S. (1997) 1.9 Å crystal structure of interleukin-6: implications for a novel mode of receptor dimerization and signaling. *EMBO J.*, **16**, 989-997.
- Sprang, S.R. and Bazan, J.F. (1993) Cytokine structural taxonomy and mechanism of receptor engagement. *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **3**, 815-827.
- Sreerama, N. and Woody, R.W. (1994) Protein secondary structure from circular dichroism spectroscopy. Combining variable selection principle and cluster analysis with neural network, ridge regression and self-consistent methods. *J. Mol. Biol.*, **242**, 497-507.
- Stahl, N., Farruggella, T.J., Boulton, T.G., Zhong, Z., Darnell, J.E., Jr. and Yancopoulos, G.D. (1995) Choice of STATs and Other Substrates Specified by Modular Tyrosine-Based Motifs in Cytokine Receptors. *Science*, **267**, 1349-1353.
- Stoyan, T. (1993a) Expression des löslichen Interleukin-6-Rezeptors in Bakterien: Rückfaltung, Reinigung und funktionelle Charakterisierung. Dissertation, Aachen.
- Stoyan, T., Michaelis, U., Schooltink, H., Van Dam, M., Rudolph, R., Heinrich, P.C. and Rose-John, S. (1993b) Recombinant soluble human interleukin-6 receptor. Expression in *Escherichia coli*, renaturation and purification. *Eur. J. Biochem.*, **216**, 239-245.
- Strassmann, G., Fong, M., Kenney, J.S. and Chaim, O.J. (1992) Evidence for the involvement of Interleukin 6 in Experimental Cancer Cachexia. *J. Clin. Invest.*, **89**, 1681-1684.
- Studier, F.W., Rosenberg, A.H., Dunn, J.J. and Dubendorff, J.W. (1990) Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol.*, **185**, 60-89.
- Suematsu, S., Matsusaka, T., Matsuda, T., Hirano, T. and Kishimoto, T. (1993) Interleukin-6 in myeloma/plasmacytoma. *Int. Rev. Exp. Pathol.*, **34 Pt A**, 91-98.
- Taga, T. and Kishimoto, T. (1997) Gp130 And The Interleukin-6 Family Of Cytokines. *Annu. Rev. Immunol.*, **15**, 797-819.
- van Dam, M., Müllberg, J., Schooltink, H., Stoyan, T., Brakenhoff, J.P., Graeve, L., Heinrich, P.C. and Rose-John, S. (1993) Structure-function analysis of interleukin-6 utilizing human/murine chimeric molecules. Involvement of two separate domains in receptor binding. *J. Biol. Chem.*, **268**, 15285-15290.
- Van Snick, J. (1990) Interleukin-6: an overview. *Annu. Rev. Immunol.*, **8**, 253-278.

Vollmer, P., Oppmann, B., Voltz, N., Fischer, M. and Rose-John, S. (1999) A role for the immunoglobulin-like domain of the human IL-6 receptor: Intracellular protein transport and shedding. *Eur. J. Biochem.*, **263**, 438-446.

Vollmer, P., Peters, M., Ehlers, M., Yagame, H., Matsuba, T., Kondo, M., Yasukawa, K., Büschenfelde, K.H. and Rose-John, S. (1996) Yeast expression of the cytokine receptor domain of the soluble interleukin-6 receptor. *J. Immunol. Methods*, **199**, 47-54.

Ward, L.D., Howlett, G.J., Discolo, G., Yasukawa, K., Hammacher, A., Moritz, R.L. and Simpson, R.J. (1994) High Affinity Interleukin-6 Receptor Is a Hexameric Complex Consisting of Two Molecules Each of Interleukin-6, Interleukin-6 Receptor, and gp-130. *J. Biol. Chem.*, **269**, 23286-23289.

Wegenka, U.M., Buschmann, J., Lütticken, C., Heinrich, P.C. and Horn, F. (1993) Acute-phase response factor, a nuclear factor binding to acute-phase response elements, is rapidly activated by interleukin-6 at the posttranslational level. *Mol. Cell. Biol.*, **13**, 276-288.

Weiergräber, O., Hemmann, U., Kuster, A., Müller-Newen, G., Schneider, J., Rose-John, S., Kurschat, P., Brakenhoff, J.P., Hart, M.H., Stabel, S. and Heinrich, P. (1995) Soluble human interleukin-6 receptor. Expression in insect cells, purification and characterization. *Eur. J. Biochem.*, **234**, 661-669.

Wells, J.A. and de Vos A.M. (1996) Hematopoietic Receptor Complexes. *Annu. Rev. Biochem.*, **65**, 609-634.

Wells, J.A. (1996) Binding in the growth hormone receptor complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **93**, 1-6.

Werner, M.H., Clore, G.M., Gronenborn, A.M., Kondoh, A. and Fisher, R.J. (1994) Refolding proteins by gel filtration chromatography. *FEBS Lett.*, **345**, 125-130.

Wilks, A.F. (1989) Two putative protein-tyrosine kinases identified by application of the polymerase chain reaction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **86**, 1603-1607.

Wüthrich, K. (1986) NMR of proteins and nucleic acids. John Wiley & Sons, New York, NY.

Xu, G.Y., Yu, H.A., Hong, J., Stahl, M., McDonagh, T., Kay, L.E. and Cumming, D.A. (1997) Solution structure of recombinant human interleukin-6. *J. Mol. Biol.*, **268**, 468-481.

Yamasaki, K., Naito, S., Anaguchi, H., Ohkubo, T. and Ota, Y. (1997) Solution structure of an extracellular domain containing the WSxWS motif of the granulocyte colony-stimulating factor receptor and its interaction with ligand. *Nat. Struct. Biol.*, **4**, 498-504.

Yamasaki, K., Taga, T., Hirata, Y., Yawata, H., Kawanishi, Y., Seed, B., Taniguchi, T., Hirano, T. and Kishimoto, T. (1988) Cloning and Expression of the Human Interleukin-6 (BSF-2/IFN β 2) Receptor. *Science*, **241**, 825-828.

Yawata, H., Yasukawa, K., Natsuka, S., Murakami, M., Yamasaki, K., Hibi, M., Taga, T. and Kishimoto, T. (1993) Structure-function analysis of human IL-6 receptor: dissociation of amino acid residues required for IL-6-binding and for IL-6 signal transduction through gp130. *EMBO J.*, **12**, 1705-1712.

Zuiderweg, E.R. and Fesik, S.W. (1989) Heteronuclear three-dimensional NMR spectroscopy of the inflammatory protein C5a. *Biochemistry*, **28**, 2387-2391.

7. Anhang

7.1 Abkürzungen

arc	Winkel
bp	Basenpaare
BSA	bovine serum albumin, Rinderserumalbumin
CNTF	Ciliary Neurotrophic Factor
CNTFR	Ciliary Neurotrophic Factor Rezeptor
CT-1	Cardiotrophin-1
CT-1R	Cardiotrophin-1 Rezeptor
D1	Ig-Domäne des IL-6R
D2	N-terminale CBM-Domäne des IL-6R
D3	C-terminale CBM-Domäne des IL-6R
D3-6.2	cDNA-Konstrukt für D3 mit C-terminaler Extension
DI	N-terminale Hämatoepetin-Domäne
DII	C-terminale Hämatoepetin-Domäne
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
GH	growth hormon, Wachstumshormon
GHR	growth hormon Rezeptor
gp130	Glykoprotein 130
h	hour, Stunde
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IL-6	Interleukin-6
IL-6R	Interleukin-6 Rezeptor

IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalaktopyranosid
Jak	Janus-Kinase
k _{ass}	Geschwindigkeitskonstante der Hin-Reaktion
kb	Kilobasen
K _D	Dissoziationskonstante
kDa	Kilodalton
k _{diss}	Geschwindigkeitskonstante der Rück-Reaktion
LIF	Leukemia Inhibitory Factor
LIFR	Leukemia Inhibitory Factor Rezeptor
M	mol/l
m	milli
μ	mikro
mAB	monoclonal antibody, monoklonaler Antikörper
min	Minute
NaAc	Natriumacetat
OD	Optische Dichte
OSM	Onkostatine M
OSMR	Onkostatine M Rezeptor
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	phosphate buffered saline, Phosphatpuffer
PBST	PBS mit 0,05 % Tween 20
PCR	Polymerasekettenreaktion
pH	pH-Wert
pI	isoelektrischer Punkt
POD	Peroxidase
R	Bindungskapazität
RAS	resonance angle shift, Resonanzwinkeldrift
R _{max}	maximale Bindungskapazität
R _t	Bindungskapazität zur Zeit t
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
STAT	signal transducer and activator of transcription

7.2 Abkürzungen der Aminosäuren

Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Asparaginsäure	Asp	D
Cystein	Cys	C
Glutamin	Gln	Q
Glutaminsäure	Glu	E
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V

7.3 Aminosäuresequenz des humanen IL-6R

1	MLAVGCALLAALLAAPGAALAPRRCPAQEVARGVLTSLPGDSV	43
44	TLTCPGVEPEDNATVHWVLRKPAAGSHPSRWAGMGRRLLLRS	85
86	VQLHDSGNYSYRAGRPAAGTVHLLVDVPPEEPQLSCFRKSPLS	125
128	NVCEWGPRSTPSLTTKAVLLVRKFQNSPAEDFQEPCCQYSQES	175
170	QKFSCQLAVPEGDSSFYIVSMCVASSVGSKFSKTQTFQGCIL	211
212	QPDPPANITVTAVARNPRWLSVTWQDPHSWNSSFYRLRFELR	254
255	YRAERSKTFTTWMVKDLQHHCVIHDAWSGLRHVVQLRAQEEF	296
297	GQGEWSEWSPEAMGTPWTESRSPAENEVSTPMQLTTNKDD	338
339	DNILFRDSANATSLPVQDSSSVPLPTFLVAGGSLAFGTLLCIAIVL	382
383	RFKKTWKLRLALKEGKTSMHPPYSLGQLVPERPRPTPVLVPLISP	426
427	PVSPSSLGSDNTSSHNRPDARDPRSPYDISNTDYFFPR	468

Die vorliegende Arbeit wurde unter der Leitung von Prof. Dr. Stefan Rose-John und Prof. Dr. Jürgen Markl von April 1996 bis Dezember 1999 am Institut für Pathophysiologie der I. Medizinischen Klinik der Johannes Gutenberg-Universität Mainz angefertigt.

Ich danke Herrn Prof. Dr. Rose-John für die Überlassung des interessanten Themas und die hervorragende wissenschaftliche Betreuung und Förderung.

Herrn Prof. Dr. Markl danke ich für die freundliche Unterstützung und das Interesse an meiner Arbeit.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Priv.-Doz. Dr. Joachim Grötzinger für die gute und erfolgreiche Zusammenarbeit, die unermüdliche Diskussionsbereitschaft, die Durchführung der NMR- und CD-spektroskopischen Messungen und das Korrekturlesen der Arbeit.

Ein Lob möchte ich auch Herrn Prof. Dr. Rolf Streeck aussprechen für die engagierte und kreative Gestaltung des Graduiertenkollegs, dessen Programm den Mitgliedern viele Einblicke in aktuelle Forschungsgebiete bot und durch dessen Unterstützung mir die Teilnahme an wissenschaftlichen Kongressen im nationalen und internationalen Rahmen ermöglicht wurde.

Ganz herzlich möchte ich mich bei allen Mitgliedern der Mainzer Arbeitsgruppe bedanken für das freundschaftliche Arbeitsklima im Labor, Dr. Barbara Krebs und Martina Fischer für die wertvolle technische Unterstützung sowie Thomas Jostock und Dr. Jürgen Müllberg für die Bereitstellung der Fc-Fusionsproteine.

Lebenslauf

Anschrift:

Suat Özbek
Essenheimer Str. 121B
55128 Mainz
e-mail: soezbek@mail.uni-mainz.de



Persönliche Daten:

Geb. am 1. 12.1968 in Marl/Westfalen
ledig
Staatsangehörigkeit: türkisch

Schulbildung:

Aug. 1975 - Juni 1979: Grundschule in Marl
Aug. 1979 - Juni 1988: Albert-Schweitzer-Gymnasium in Marl
Abschluß mit Abitur

Hochschulausbildung:

Aug. 1988 - Sept. 1995: TH Darmstadt
Fachrichtung: Biologie
Abschluß als Diplom-Biologe (Hauptfach Mikrobiologie)

März 1995-Sept. 1995:

Diplomarbeit am Institut für Mikrobiologie der TH Darmstadt

Promotion:

Seit April 1996 in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Rose-John,
I. Medizinische Klinik / Abteilung Pathophysiologie des Klinikums der
Johannes Gutenberg-Universität Mainz