

Rezeptor *cross-talk* und die Rolle der Protein Kinase CK2 in der Signaltransduktion von Zytokinen der Interleukin (IL)-6/IL-12-Familie

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Samadhi Aparicio Siegmund

aus Alicante

Düsseldorf, August 2014

aus dem Institut für **Biochemie und Molekularbiologie II**
des Universitätsklinikums Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. rer. nat. Jürgen Scheller

Korreferent: Prof. Dr. rer. nat. Lutz Schmitt

Tag der mündlichen Prüfung: 16.01.2015

INHALTSVERZEICHNIS

Inhaltsverzeichnis.....	I
Veröffentlichungen.....	V
1 Einleitung	1
1.1 Zytokine	1
1.1.1 Die Interleukin-6-(IL-6)-Zytokinfamilie	1
1.1.2 Die IL-12-Zytokinfamilie.....	6
1.2 Der Rezeptor gp130.....	9
1.2.1 Zytokinbindung.....	9
1.2.2 Signaltransduktion.....	11
1.3 Jaks und STATs in der IL-6-Signaltransduktion	13
1.3.1 Janus Kinasen	13
1.3.2 STAT-Aktivierung	14
1.3.3 Gegenregulation durch SOCS3	16
1.3.4 Konstitutiv aktive STAT3-Signaltransduktion: Chronische Entzündung und Krebs.....	17
1.4 Protein-Kinase 2 (CK2)	18
1.5 Ziel der Arbeit	19

2	Material und Methoden.....	21
2.1	Material.....	21
2.1.1	Antibiotika	21
2.1.2	Antikörper	21
2.1.3	Chemikalien	22
2.1.4	Enzyme	23
2.1.5	Geräte.....	23
2.1.6	Kits.....	23
2.1.7	Oligonukleotide	24
2.1.8	Puffer und Lösungen	24
2.1.9	Rekombinante Zytokine und Inhibitoren	26
2.1.10	Verbrauchsmaterialien.....	27
2.1.11	Zellkulturmedien und –reagenzien	28
2.1.12	Zelllinien	28
2.2	Methoden	29
2.2.1	Molekularbiologische Methoden	29
2.2.2	Zellbiologische Methoden.....	34
2.2.3	Proteinbiochemische Methoden.....	37
3	Ergebnisse	41
3.1	<i>Trans</i>-Signaltransduktion der IL-27-Untereinheit p28 (IL-30) über den IL-6R und ein gp130-Homodimer.....	41
3.1.1	Klonierung und Expression eines IL-6R-p28 Fusionskonstruktes	41
3.1.2	sIL-6R-p28 induziert STAT3-Phosphorylierung und Proliferation in Ba/F3-gp130 Zellen	43
3.1.3	Der Rezeptor für sIL-6R-p28 ist ein gp130-Homodimer.....	45
3.2	Rekombinantes p35 bildet IL-12 mit p40, aber kein IL-35 mit EBI3.....	49
3.2.1	Klonierung eines Fusionskonstruktes aus EBI3 und p35	49
3.2.2	Alle Hyper-Zytokine außer Hyper-IL-35 werden in den Überstand sekretiert	51

3.2.3	Hyper-Zytokin-induzierte Proliferation von Ba/F3-gp130-IL-12R β 1-IL-12R β 2.....	52
3.2.4	Koexpression von α -Untereinheiten der Zytokine und löslicher α -Rezeptoren: Heterodimeres IL-35 wird nicht nachweisbar sekretiert.....	53
3.2.5	p35 interagiert mit EBI3	56
3.2.6	Die intermolekulare Disulfidbrücke in IL-12 ist für die Funktion nicht notwendig	57
3.2.7	Rekombinantes p35 aus <i>E. coli</i> bildet funktionales IL-12 mit p40 C197A aus konditioniertem Überstand.....	60
3.2.8	Rekombinantes p35 bildet kein funktionales IL-35 mit EBI3 aus konditioniertem Überstand	61
3.3	Die Rolle der Protein-Kinase 2 (CK2) in der Jak-STAT-Aktivierung durch Zytokine der IL-6-Familie.....	63
3.3.1	OSM-induzierte STAT3-Aktivierung ist CK2-abhängig	63
3.3.2	STAT3-Aktivierung durch IL-6-artige Zytokine in HepG2-Zellen und Expression der Rezeptoren der IL-6-Familie	64
3.3.3	Alle Zytokine der IL-6-Familie benötigen die Aktivität von CK2 für die STAT-Aktivierung	66
3.3.4	Generierung von Ba/F3-gp130-LIFR Zellen.....	68
3.3.5	Proliferation und STAT-Signaltransduktion in Ba/F3-gp130, Ba/F3-gp130-IL-6R und Ba/F3-gp130-LIFR Zellen sind CK2-abhängig	69
3.3.6	CK2-Inhibition führt zur Reduktion von Akt-Expression und -Signal-transduktion.....	72
3.3.7	CK2 ist involviert in die ERK-Aktivierung durch IL-6-artige Zytokine.....	74
3.3.8	Jak1 ist im Gegensatz zu Jak2 notwendig für die CK2-abhängige STAT-Aktivierung	75
3.4	CK2 in der Signaltransduktion von konstitutiv aktiven Mutanten von gp130 und STAT3	79
3.4.1	Signaltransduktion der konstitutiv-aktiven gp130-Mutante Δ Tyr186-Tyr190 (Δ YY) ist CK2-abhängig.....	79
3.4.2	Klonierung von konstitutiv-aktiven STAT3-Mutanten.....	81
3.4.3	Die Y640F und D661V Mutationen in STAT3 führen zu konstitutiver CK2-abhängiger Phosphorylierung bei Überexpression	81
3.4.4	Generierung und Charakterisierung von Ba/F3-gp130-STAT3 Y640F und -STAT3 D661V Zellen	84
3.4.5	Die Phosphorylierung von STAT3 Y640F ist abhängig von CK2 und Jak1	87

4	Diskussion	89
4.1	<i>Trans</i>-Signaltransduktion von p28 über den löslichen IL-6R.....	89
4.2	Rekombinantes p35 (rp35) bildet extrazellulär IL-12 mit p40, aber nicht IL-35 mit EBI3	92
4.2.1	Die Sekretion von IL-35	92
4.2.2	Die Rolle der intermolekularen Disulfidbrücke in IL-12	94
4.2.3	Extrazelluläre Bildung von IL-12 aber nicht von IL-35	94
4.3	CK2 als Komponente des Jak/STAT-Signalwegs.....	96
4.3.1	CK2 ist notwendig für die Signaltransduktion der IL-6-Familie	96
4.3.2	Die konstitutive Signaltransduktion von STAT3 benötigt CK2-Aktivität.....	99
5	Zusammenfassung	105
6	Summary	107
7	Literaturverzeichnis.....	109
8	Anhang	129
	Abkürzungsverzeichnis.....	129
	Danksagung	133
	Eidesstattliche Erklärung.....	135

VERÖFFENTLICHUNGEN

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

Aparicio-Siegmund, S, Sommer, J, Monhasery, N, Schwanbeck, R, Keil, E, Finkenstadt, D, Pfeffer, K, Rose-John, S, Scheller, J und Garbers, C (2014). "Inhibition of protein kinase II (CK2) prevents induced signal transducer and activator of transcription (STAT) 1/3 and constitutive STAT3 activation." Oncotarget 5(8): 2131-2148.

Garbers, C, Spudy, B, **Aparicio-Siegmund, S**, Waetzig, GH, Sommer, J, Hölscher, C, Rose-John, S, Grötzinger, J, Lorenzen, I und Scheller, J (2013). "An Interleukin-6 Receptor-dependent Molecular Switch Mediates Signal Transduction of the IL-27 Cytokine Subunit p28 (IL-30) via a gp130 Protein Receptor Homodimer." J Biol Chem 288(6): 4346-4354.

Aparicio-Siegmund, S, Moll, JM, Lokau, J, Grusdat, M, Schröder, J, Plöhn, S, Rose-John, S, Grötzinger, J, Lang, PA, Scheller, J und Garbers, C (2014). "Recombinant p35 from bacteria can form Interleukin (IL-)12, but not IL-35." Plos one, 9(9): e107990.

Weitere Publikationen:

Garbers, C, Kuck, F, **Aparicio-Siegmund, S**, Konzak, K, Kessenbrock, M, Sommerfeld, A, Häussinger, D, Lang, PA, Brenner, D, Mak, TW, Rose-John, S, Essmann, F, Schulze-Osthoff, K, Piekorz, RP und Scheller, J (2013). "Cellular senescence or EGFR signaling induces Interleukin 6 (IL-6) receptor expression controlled by mammalian target of rapamycin (mTOR)." Cell Cycle 12(21): 3421-3432.

Garbers, C, Monhasery, N, **Aparicio-Siegmund, S**, Lokau, J, Baran, P, Nowell, MA, Jones, SA, Rose-John, S und Scheller, J (2014). "The interleukin-6 receptor Asp358Ala single nucleotide polymorphism rs2228145 confers increased proteolytic conversion rates by ADAM proteases." Biochim Biophys Acta 1842(9): 1485-1494.

Wagener, EM, Aurich, M, **Aparicio-Siegmund, S**, Floss, DM, Garbers, C, Breusing, K, Rabe, B, Schwanbeck, R, Grotzinger, J, Rose-John, S und Scheller, J (2014). "The Amino Acid Exchange R28E in Ciliary Neurotrophic Factor (CNTF) Abrogates Interleukin-6 Receptor-dependent but Retains CNTF Receptor-dependent Signaling via Glycoprotein 130 (gp130)/Leukemia Inhibitory Factor Receptor (LIFR)." J Biol Chem 289(26): 18442-18450.

1 EINLEITUNG

1.1 Zytokine

Das Immunsystem ist ein komplexes Netzwerk aus Zellen, die die verschiedensten Funktionen erfüllen. Diese Zellen werden in ihrer Differenzierung, Aktivierung und Migration durch Zytokine gesteuert. Zytokine sind sezernierte Proteine, die im Gegensatz zu Hormonen nicht von Drüsen, sondern von verschiedenen Zelltypen in nahezu allen Geweben produziert werden können. Ihre Wirkung kann autokrin oder parakrin sein und hängt von der Oberflächenexpression ihrer spezifischen Zytokinrezeptoren auf den Zielzellen ab. Zu den Zytokinen gehören unter anderem die Interferone, die vor allem für die virale Immunabwehr eine Rolle spielen, die Chemokine, die die gerichtete Bewegung von Immunzellen steuern (Chemotaxis) und die Interleukine, die für die Proliferation und Differenzierung der Zellen des erworbenen, wie auch des angeborenen Immunsystems von zentraler Bedeutung sind. Die Zytokine werden aufgrund ihrer Struktur und ihrer Rezeptoren in Familien unterteilt.

1.1.1 Die Interleukin-6-(IL-6)-Zytokinfamilie

Die Zytokine der Interleukin-6 (IL-6)-Familie haben verschiedenste physiologische Funktionen in der Gewebehomöostase, der Embryonalentwicklung, im neuronalen Wachstum und in der Lymphozytendifferenzierung. Ihre Wirkung ist zeitlich und räumlich begrenzt und verschiedene Gegenregulationsmechanismen verhindern ein unkontrolliertes Zytokinsignal, das in entzündlichen Erkrankungen und Krebs resultieren würde.

Das namensgebende Zytokin der IL-6-Familie ist IL-6, das ein wichtiger Regulator von sowohl pro- als auch anti-inflammatorischen Prozessen ist und Funktionen in der Leberregeneration und Akut-Phase-Reaktion hat.

Die weiteren Mitglieder der IL-6-Zytokinfamilie sind IL-11, IL-27, p28 (IL-30), IL-31, *ciliary neurotrophic factor* (CNTF), *cardiotrophin-like cytokine* (CLC), Leukämie inhibierender Faktor (LIF), Cardiotrophin-1 (CT-1) und Oncostatin M (OSM) (Abbil-

dung 1.1). Alle Zytokine dieser Familie sind in ihrer Struktur vergleichbar und bestehen aus einem Bündel aus vier α -Helices, sie weisen aber nur eine geringe Sequenzhomologie auf (Bazan, 1990). Außerdem haben sie gemeinsam, dass sie Homo- oder Heterodimere des β -Rezeptors gp130 aktivieren. IL-6 und IL-11 aktivieren ein gp130 Homodimer, wobei beide zusätzlich einen entsprechenden α -Rezeptor benötigen. LIF und CT-1 verwenden ein Heterodimer aus gp130 und dem LIFR zur Signaltransduktion (Plun-Favreau *et al.*, 2003). Genau wie CLC und CNTF, mit dem Unterschied, dass ihr Rezeptorkomplex zusätzlich den α -Rezeptor CNTFR enthält (Plun-Favreau *et al.*, 2001). OSM kann im humanen System zwei verschiedene Rezeptorkomplexe aktivieren, nämlich gp130/LIFR oder gp130/OSMR (Abbildung 1.1, Drechsler *et al.*, 2012). IL-31 stellt die einzige Ausnahme dar, da der signaltransduzierende Rezeptorkomplex ein Heterodimer aus dem OSMR und GPL (*gp130-like receptor*) ist und somit kein gp130 enthält. Dieses Zytokin wurde erst vor kurzem beschrieben und spielt vor allem in der Immunabwehr an Grenzflächen wie der Haut und dem Lungen- und Darmepithel eine Rolle (Cornelissen *et al.*, 2012). IL-27, das aus p28 und EBI3 besteht, kann aufgrund seines Rezeptors aus gp130 und WSX-1 sowohl zur IL-6-Familie, als auch aufgrund seines löslichen α -Rezeptors EBI3 zur IL-12-Familie gezählt werden (Pflanz *et al.*, 2002; Pflanz *et al.*, 2004, Abbildung 1.3).

Alle Rezeptoren der IL-6-Familie sind Typ I Transmembranproteine mit Ausnahme des α -Rezeptors von CNTF, der keine Transmembrandomäne aufweist und mit einem GPI-Anker in der Plasmamembran verankert ist (Davis *et al.*, 1991). Eine weitere Ausnahme ist der lösliche α -Rezeptor EBI3.

Der signaltransduzierende Rezeptorkomplex von IL-6 besteht aus dem IL-6R (auch CD126 oder gp80) und gp130, an den IL-6 mit hoher Affinität bindet (Murakami *et al.*, 1993). Als Resultat daraus werden verschiedene Signalwege wie die ERK1/2- und die

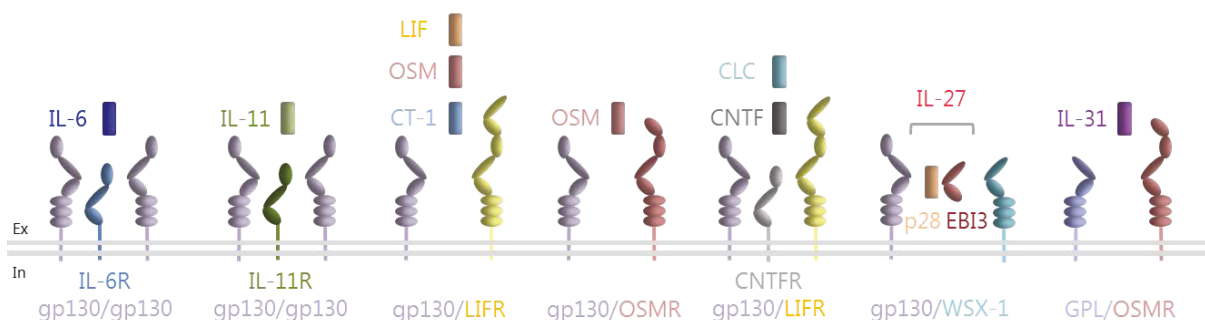


Abbildung 1.1: Rezeptorkomplexe in der IL-6-Zytokin-Familie. IL-6 und IL-11 nutzen zur Signaltransduktion ein gp130-Homodimer und einen spezifischen α -Rezeptor, während alle anderen ein Heterodimer nutzen. Für LIF und CT-1 besteht dieses aus gp130 und dem LIFR. OSM kann zusätzlich dazu auch über ein gp130/OSMR Heterodimer signalisieren. Auch CLC und CNTF binden an ein gp130/LIFR Heterodimer, verwenden aber zusätzlich den α -Rezeptor CNTFR. IL-31 ist nicht dargestellt und signalisiert nicht über gp130, sondern über ein Heterodimer aus OSMR und GPL. Ex: Extrazellulärraum, In: Intrazellulärraum. Abbildung modifiziert nach Garbers *et al.*, 2012.

PI3K-Signalkaskade, aber vor allem die Janus Kinasen (Jak) und die *signal transducer and activator of transcription* (STAT) aktiviert (Heinrich *et al.*, 1998; Eulendorf *et al.*, 2012).

Wenn IL-6 an seinen membranständigen α -Rezeptor bindet und damit die Bildung des Rezeptorkomplexes auslöst, wird dies als klassische Signaltransduktion bezeichnet. Im Gegensatz dazu definiert man den Vorgang, bei dem IL-6 an eine lösliche Form des IL-6R bindet und dieser Komplex dann den membranständigen Rezeptor gp130 aktiviert, als *trans*-Signaltransduktion (Rose-John *et al.*, 1995; Chalaris *et al.*, 2011, Abbildung 1.2). Die lösliche Form des α -Rezeptors kann zum einen durch alternatives Spleißen der mRNA entstehen, wodurch das für die Transmembranregion kodierende Exon herausgeschnitten wird. Als dominanter Mechanismus wird allerdings das sogenannte *shedding* angesehen (Lust *et al.*, 1992; Müllberg *et al.*, 1993; Müller-Newen *et al.*, 1996). Hierbei schneiden membranständige Proteasen Membranproteine an einer Stelle dicht oberhalb der Plasmamembran, sodass die Ektodomäne des Proteins als löslicher Faktor freigesetzt wird, während das restliche Protein in der Membran zurückbleibt. Dieses wird anschließend abgebaut oder kann ebenfalls Signaltransduktion vermitteln. Im Fall von IL-6 vermittelt die klassische Signaltransduktion vor allem regenerative und anti-inflammatorische Prozesse (Dann *et al.*, 2008; Grivennikov *et al.*, 2009; Scheller *et al.*, 2011), während die *trans*-Signaltransduktion eine Rolle in der Entzündungsreaktion und Tumorprogression spielt (Becker *et al.*, 2004; Chalaris *et al.*, 2007; Rabe *et al.*, 2008).

IL-6 wurde zunächst als Differenzierungsfaktor für B-Zellen identifiziert (Hirano *et al.*, 1986). Sezerniert wird das Zytokin von verschiedensten Zelltypen, wie T- und B-Zellen, Makrophagen und Monozyten, Fibroblasten und Endothelzellen (Kishimoto *et al.*, 1995). Neben seiner Wirkung auf B-Zellen führt es auch zur Differenzierung von Makrophagen,

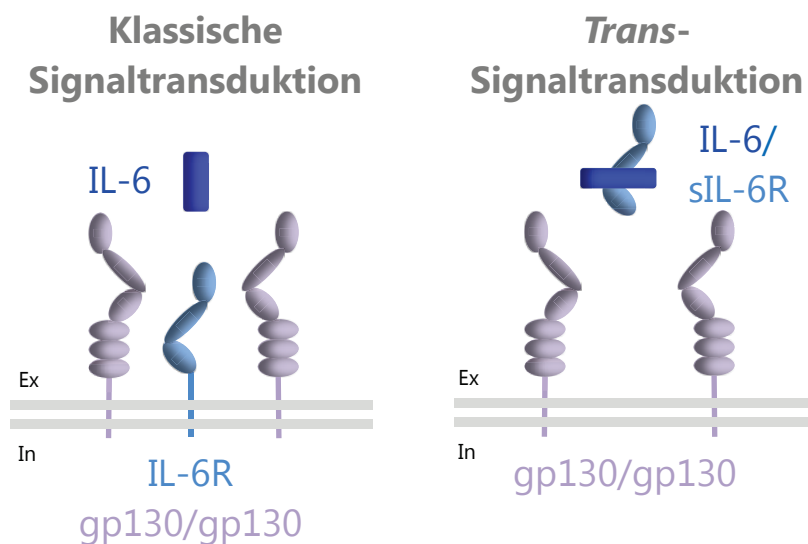


Abbildung 1.2: Schematische Darstellung der klassischen und *trans*-Signaltransduktion von IL-6. Bei der klassischen Signaltransduktion bindet IL-6 an einen membranständigen IL-6R. Bindet IL-6 an einen löslichen IL-6R kann dieser Komplex auch Zellen aktivieren, die nur gp130 auf der Oberfläche tragen. Ex: Extrazellulärraum, In: Intrazellulärraum. Abbildung modifiziert nach Chalaris *et al.*, 2011.

T-Zellen, Neutrophilen und Megakaryozyten (Okada *et al.*, 1988; Ishibashi *et al.*, 1989; Dominitzki *et al.*, 2007; Walker *et al.*, 2008).

Aus Studien mit IL-6-defizienten Mäusen weiß man heute, dass IL-6 notwendig für die Akut-Phase-Reaktion in der Leber ist und dass diese hauptsächlich STAT3-abhängig induziert wird. Außerdem spielt IL-6 eine wichtige Rolle bei der Pathogenese autoimmuner Erkrankungen, wie der rheumatoiden Arthritis (Alonzi *et al.*, 1998; Alonzi *et al.*, 1998 (2)) oder der experimentellen Autoimmunenzephalomyelitis (EAE) als Modell für die multiple Sklerose im Menschen (Samoilova *et al.*, 1998). Keine der beiden Krankheiten kann in IL-6-defizienten Mäusen ausgelöst werden.

Auch die anderen Mitglieder der Zytokin-Familie spielen eine Rolle in Entzündung und Embryonalentwicklung. IL-11 kann im Serum vor allem bei viralen Infektionen und bei verschiedenen Krebsformen nachgewiesen werden. Der IL-11R ist zusätzlich zur Expression auf verschiedenen Leukozyten auch auf Endothelzellen, Osteoklasten und Darmepithelzellen und im Muskel-, Herz- und Nierengewebe zu finden (Putoczki und Ernst, 2010), wobei die Expressionsregulation sowohl des IL-11R, als auch des IL-6R bis heute nicht vollständig untersucht worden ist (vgl. Garbers und Scheller, 2013). Analog zur trans-Signaltransduktion von IL-6, konnte auch für den löslichen IL-11/IL-11R-Komplex *in vitro* eine agonistische Wirkung über gp130 nachgewiesen werden (Pflanz *et al.*, 1999). Bisher ist allerdings *in vivo* kein löslicher IL-11R beschrieben worden.

LIF wurde zunächst als Faktor identifiziert, der die Differenzierung von myeloiden leukämischen Zellen in Makrophagen induziert und damit deren Proliferation inhibiert (Gearing *et al.*, 1987). Im Gegensatz dazu fördert es bei Brustkrebs die Tumorprogression und Metastasierung (Li *et al.*, 2014). LIF wird vor allem in Fibroblasten, Hepatozyten, Osteoblasten, Monozyten und T-Zellen exprimiert und hat pleiotrope Funktionen. Im Endometrium gilt es als ein wichtiger Faktor bei der Einnistung der Blastozyste in den Uterus und spielt eine wichtige Rolle in der Embryonalentwicklung (Cheng *et al.*, 2001). Ein knock out von LIF in Mäusen ist nicht letal, führt aber zu Infertilität der weiblichen Tiere (Stewart *et al.*, 1992). Auch OSM ist wichtig für die Hämatopoese und T-Zell-Entwicklung (Boileau *et al.*, 2000; Tanaka *et al.*, 2003). Außerdem ist es involviert in die embryonale Leberentwicklung und die Leberregeneration, in die Angiogenese und wie andere IL-6-artige Zytokine in Entzündungsprozesse, wie Arteriosklerose, Psoriasis und akute Lungenschädigung (Kamiya *et al.*, 1999; Vasse *et al.*, 1999; Grenier *et al.*, 2001; Albasanz-Puig *et al.*, 2011).

CT-1 ist für die Entwicklung von Herz und Motoneuronen wichtig und ist ebenfalls in die Akut-Phase Reaktion involviert (Pennica *et al.*, 1995; Pennica *et al.*, 1996; Richards *et al.*, 1996).

Sowohl CNTF, als auch CLC sind wichtig für die Viabilität von sensorischen und Motoneuronen (Oppenheim *et al.*, 1991). Außerdem ist CNTF ein trophischer Faktor für Skelettmuskeln (Helgren *et al.*, 1994; Guillet *et al.*, 1999).

Die Zytokine der IL-6-Familie binden ihre spezifischen Rezeptoren mit hoher Affinität. Allerdings binden sie häufig auch mit niedrigerer Affinität an andere Rezeptoren der Familie. So bindet CNTF z.B. außer an seinen α -Rezeptor CNTFR auch an den IL-6R. In beiden Fällen wird mit gp130/LIFR der gleiche β -Rezeptorkomplex aktiviert (Schuster *et al.*, 2003). Außerdem kann CNTF gp130/LIFR auch ohne einen α -Rezeptor der Zytokinfamilie, sondern nur mithilfe von Sortilin auf der Zelloberfläche aktivieren (Larsen *et al.*, 2010). Der gentechnische *knock out* von CNTFR in Mäusen ist embryonal letal, aufgrund von nicht ausgebildeten Motoneuronen (DeChiara *et al.*, 1995). Interessanterweise führt das Fehlen von CNTF zu einem wesentlich milderem Phänotyp. Motoneuronen können sich trotzdem größtenteils ausbilden und es kommt lediglich zu einer leichten Muskelschwäche (Takahashi *et al.*, 1994). Dies kann dadurch erklärt werden, dass der CNTFR mit CLC einen weiteren Liganden hat, der das Fehlen von CNTF größtenteils kompensieren kann.

Die IL-27-Untereinheit p28 signalisiert vor allem über seinen löslichen α -Rezeptor EBI3. Zusätzlich konnte aber auch gezeigt werden, dass es mit dem membranständigen IL-6R eine Bindung mit geringerer Affinität eingeht. Die ausgelöste Signaltransduktion wurde allerdings kontrovers diskutiert. In Stumhofer *et al.*, 2010 wurde gezeigt, dass p28 die Signaltransduktion über den IL-6R und gp130 und damit die IL-6-Signaltransduktion antagonisiert. Eine andere Arbeit zeigte eine STAT3- und STAT1-Aktivierung, analog zur IL-6-vermittelten Signaltransduktion, durch p28 in Komplex mit CLF-1 (*cytokine-like factor 1*) über den IL-6R (Crabé *et al.*, 2009).

Die Interaktion verschiedener Zytokinuntereinheiten mit verschiedenen α - und β -Rezeptoren wird als *Crosstalk* bezeichnet. Dieser macht das Netzwerk der Zytokine wesentlich komplexer. Der gentechnische *knock out* eines Zytokins oder Rezeptors in Mäusen, führt häufig zum Fehlen verschiedener Zytokin-Signalwege im Organismus und erschwert Rückschlüsse auf die Wirkung eines bestimmten Zytokins.

Die Responsivität der Zellen für IL-6-artige Zytokine wird vor allem durch die Expression der α -Rezeptoren auf ihrer Oberfläche bestimmt, da die β -Rezeptoren wie gp130 oder LIFR ubiquitär exprimiert werden. Durch die Interaktion mit verschiedenen α -Rezeptoren vergrößert sich die Zahl der Zelltypen, die auf ein bestimmtes Zytokin reagieren und durch unterschiedliche Rezeptoraffinitäten spielt auch die Zytokinkonzentration eine wichtige Rolle in der Zytokinsignaltransduktion.

Durch die Verwendung der gleichen β -Rezeptoren liegt eine gewisse Redundanz der Zytokine der IL-6-Familie nahe. Tatsächlich üben sie aber sehr verschiedene Funktionen aus. Wie die unterschiedliche Signaltransduktion trotz gleicher Rezeptoren reguliert wird, ist noch wenig bekannt. Für OSM konnte eine verstärkte ERK1/2-Aktivierung im Vergleich zu den anderen Zytokinen (die vor allem den Jak/STAT-Signalweg aktivieren) nachgewiesen werden, die durch die Bindung von Shc an den OSMR vermittelt wird (Hermanns *et al.*, 2000). Wie aber die Signaltransduktion der IL-6-artigen Zytokine

räumlich und zeitlich reguliert und unterschieden wird, ist noch nicht im Detail untersucht worden.

1.1.2 Die IL-12-Zytokinfamilie

Die Zytokine der IL-12-Familie sind aufgrund ihrer Struktur eng verwandt mit denen der IL-6-Familie. Die α -Untereinheiten bestehen ebenfalls aus einem Vier-Helix-Bündel. Allerdings sind ihre α -Rezeptoren nicht, wie z.B. der IL-6R, membranständig, sondern liegen ausschließlich in löslicher Form vor. Auch die β -Rezeptoren der IL-12-Familie haben keine intrinsische Tyrosinkinaseaktivität, sondern sind konstitutiv mit Janus Kinasen assoziiert, wie gp130 (Jones und Vignali, 2011).

In der IL-12-Familie wird der Komplex aus der α -Untereinheit und dem löslichen α -Rezeptor als Interleukin bezeichnet, d.h. IL-12 besteht aus der α -Untereinheit p35 und dem α -Rezeptor p40. Die weiteren Mitglieder sind IL-27 (p28 und EBI3, Pflanz *et al.*, 2002), IL-23 (p19 und p40, Oppmann *et al.*, 2000) und IL-35 (p35 und EBI3, Devergne *et al.*, 1997; Collison *et al.*, 2007) (Abbildung 1.3). Es ist ein besonderes Charakteristikum der IL-12-Zytokinfamilie, dass die Untereinheiten von den Zytokinen geteilt werden. Die Untereinheit p35 ist demnach sowohl Teil von IL-12, als auch von IL-35, während p40 sowohl in IL-12, als auch in IL-23 vorkommt. Welche Funktion diese unterschiedliche Paarung von Untereinheiten hat, ist noch nicht verstanden, sie erschwert aber eine Analyse von Daten aus Studien mit *knock out* Mäusen, da beim Fehlen von z.B. p40 oder p35 gleich zwei (oder auch noch unbekannte) Zytokine im Organismus fehlen (vgl. Garbers *et al.*, 2012). Die Untereinheit p40 kann zusätzlich zu den unterschiedlichen Paarungen auch noch als Homodimer sekretiert werden und so als Antagonist der IL-12-

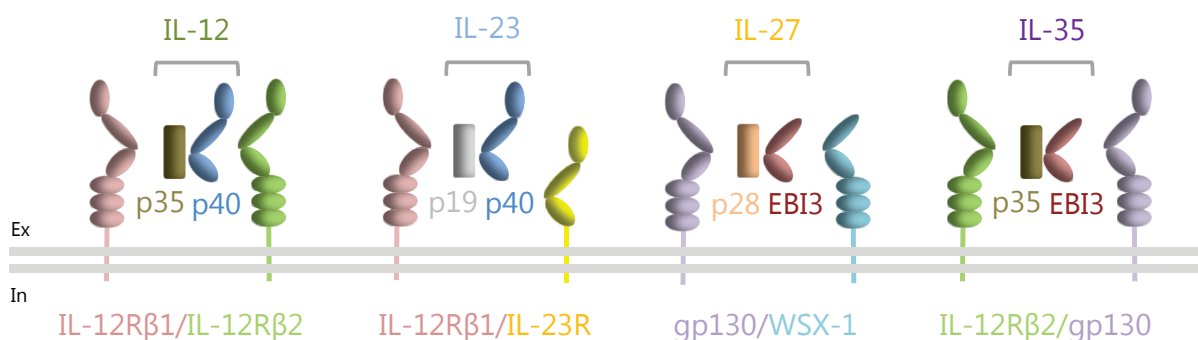


Abbildung 1.3: Schematische Darstellung der Zytokine der IL-12-Familie und ihrer Rezeptorkomplexe. IL-12-artige Zytokine bestehen aus zwei Untereinheiten die an ein Rezeptor-Heterodimer binden. p40 bildet eine Untereinheit von sowohl IL-12, als auch IL-23. EBI3 ist Bestandteil von IL-27 und IL-35. IL-12 bindet an ein Heterodimer aus dem IL-12Rβ1 und dem IL-12Rβ2, IL-23 an den IL-23R und IL-12Rβ1. Der Rezeptor für IL-27 besteht aus gp130 und WSX-1 und für IL-35 u.a. aus dem IL-12Rβ2 und gp130. Ex: Extrazellulärraum, In: Intrazellulärraum. Abbildung modifiziert nach Jones und Vignali, 2011.

Signaltransduktion fungieren (Gillesen *et al.*, 1995). Zusätzlich hat das p40-Homodimer aber auch agonistische Funktionen, wie die Induktion der NO-Synthase und von IL-16 in Mikroglia (Jana *et al.*, 2009; Jana und Pahan, 2009 (2)) und die Regulation der Migration von dendritischen Zellen (Khader *et al.*, 2006).

Alle Zytokine dieser Familie signalisieren über Heterodimere der β -Rezeptoren der Familie.

IL-27 bindet an das WSX-1/gp130 Heterodimer (Pflanz *et al.*, 2004), der Rezeptor für IL-12 besteht aus dem IL-12R β 1 und dem IL-12R β 2 (Presky *et al.*, 1996), der Rezeptor für IL-23 aus dem IL-12R β 1 und dem IL-23R (Parham *et al.*, 2002, Abbildung 1.3). Da IL-27 und IL-35 über den Rezeptor gp130 signalisieren können, werden sie einerseits als Mitglieder der IL-6-Familie angesehen, andererseits bestehen sie aus einem α -Zytokin und einem löslichen α -Rezeptor und sind daher auch Teil der IL-12-Familie. Im Gegensatz zu den anderen Familienmitgliedern IL-12 und IL-23 enthalten sie keine Disulfidbrücke zwischen den Untereinheiten und werden daher wesentlich weniger effizient sekretiert (vgl. Vignali und Kuchroo, 2012).

IL-12, IL-27 und IL-23 werden von aktivierten Antigen-präsentierenden Zellen, also dendritischen Zellen, Monozyten und Makrophagen, sekretiert. Sie haben sowohl redundante, als auch spezifische Funktionen. IL-12 induziert die Th1-Antwort und IFN- γ -Produktion in T-Zellen. IL-27 ist ebenfalls für die Th1 Antwort verantwortlich, hat aber auch anti-inflammatorische Eigenschaften und kann zusammen mit IL-12 die IL-2 Produktion in CD4⁺ T-Zellen hemmen (Villarino *et al.*, 2006). IL-23 hat ebenfalls IL-12-verwandte Funktionen, ist aber auch für die T-Zell-Differenzierung zu Th17 Zellen notwendig (Oppmann *et al.*, 2000; Aggarwal *et al.*, 2003), was wiederum von IL-27 gegenreguliert wird (Fitzgerald *et al.*, 2007). Daher spielen sie antagonisierende Rollen bei der Entwicklung von Autoimmunerkrankungen.

IL-35 ist das neueste Mitglied der IL-12-Familie. Es wird aus EBI3 und p35 gebildet, die gemeinsam von Zellen sezerniert werden (Devergne *et al.*, 1997). In Mäusen konnte die Expression von IL-35 in regulatorischen T-Lymphozyten nachgewiesen werden (Collison *et al.*, 2007). Die Bildung von IL-35 in humanen regulatorischen T-Zellen konnte allerdings nicht bestätigt werden (Bardel *et al.*, 2008). In Mäusen wurde vor kurzem auch die Expression von IL-35 in B-Zellen beschrieben (Shen *et al.*, 2014). Es gilt als anti-inflammatorisches Zytokin, da es die Bildung einer regulatorischen T-Zellpopulation induziert, die zwar nicht den Marker Foxp3 exprimiert, aber die Proliferation von Effektor-T-Zellen hemmt (Collison *et al.*, 2010). In verschiedenen Modellen konnte gezeigt werden, dass IL-35 Infektionstoleranz vermittelt.

IL-35 unterscheidet sich in vielerlei Hinsicht von den anderen IL-12-artigen Zytokinen. So wurden z. B. drei verschiedene Rezeptorkomplexe für dieses Zytokin in T-Zellen beschrieben. Ein gp130-Homodimer, ein IL-12R β 2-Homodimer oder ein Heterodimer aus den beiden Rezeptoren wurden für die Signaltransduktion postuliert, wobei das

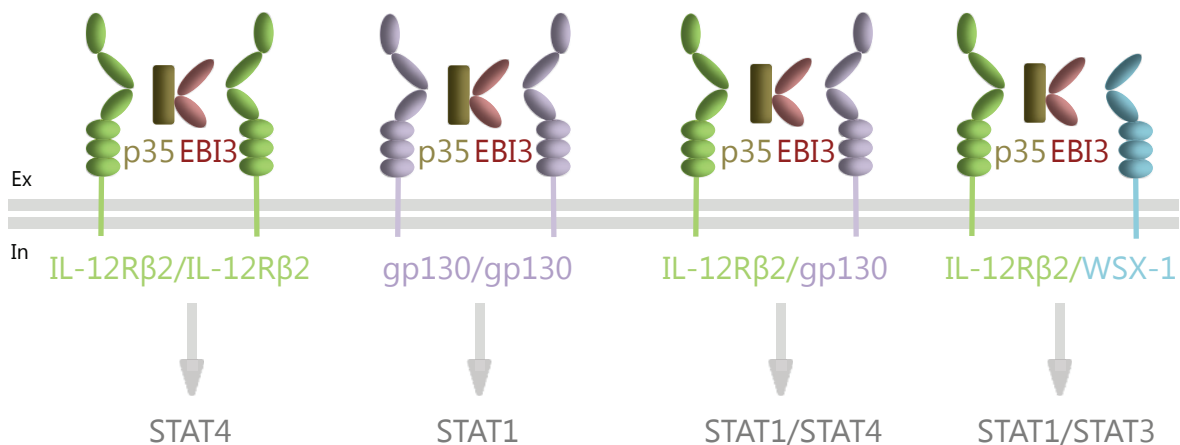


Abbildung 1.4: Rezeptorkomplexe in der IL-35-Signaltransduktion. Für IL-35, das aus EBI3 und p35 besteht, sind verschiedene Rezeptorkomplexe nachgewiesen worden. Es konnte gezeigt werden, dass IL-35 sowohl ein gp130- oder IL-12Rβ2-Homodimer aktiviert, als auch ein Heterodimer aus beiden β-Rezeptoren. Zusätzlich dient auch ein Heterodimer aus dem IL-12R β2 und WSX-1 als signaltransduzierender Rezeptor. Ex: Extrazellulärraum, In: Intrazellulärraum. Abbildung modifiziert nach Garbers *et al.*, 2012.

gp130-Homodimer ausschließlich zu einer STAT1-Aktivierung führt und nicht, wie bei IL-6 und IL-11, vor allem zu einer STAT3-Aktivierung (Collison *et al.*, 2012, Abbildung 1.4). Im Gegensatz dazu induziert das IL-12Rβ2-Homodimer eine Aktivierung von STAT4. Dieser Effekt könnte allerdings zelltypabhängig sein, da neue Untersuchungen eine STAT3-Aktivierung durch IL-35 in B-Zellen über ein Heterodimer aus dem IL-12Rβ2 und WSX-1 beschreiben (Wang *et al.*, 2014). Dies ist insofern überraschend, als das WSX-1 in der IL-27-Signaltransduktion im Gegensatz zu gp130 für die STAT1-Aktivierung notwendig ist, während STAT3 vor allem durch Bindung an gp130 aktiviert wird (Owaki *et al.*, 2008).

Über die Signaltransduktion des neuesten IL-12-Familienmitglieds IL-35 ist noch vieles unbekannt. Es sind bisher vier Rezeptorkomplexe beschrieben und ebenso verschiedene STAT-Aktivierungsmuster. Wie die unterschiedlichen Aktivierungsmuster in Zellen durch ähnliche Untereinheiten und Rezeptoren genau reguliert werden, ist auch für die IL-12-Familie noch nicht genau verstanden. Eventuell könnte es durch unterschiedliche Untereinheiten-Paarungen auch noch andere, bislang nicht beschriebene IL-12-artige Zytokine geben, die Gegenstand zukünftiger Studien sein werden. Außerdem gibt es Bestrebungen, Antikörper zur therapeutischen Gegenregulation zu entwickeln, die spezifisch die Bildung einer Paarung und damit eines Zytokins inhibieren.

1.2 Der Rezeptor gp130

Zur IL-6-Zytokinfamilie gehören die nicht-signaltransduzierenden α -Rezeptoren IL-6R, IL-11R und CNTFR und die signaltransduzierenden β -Rezeptoren gp130, LIFR, OSMR und GPL, die keine intrinsische Tyrosin-Kinase-Aktivität zeigen, sondern mit Jaks assoziieren. Der β -Rezeptor, über den alle IL-6-artigen Zytokine, mit Ausnahme von IL-31, signalisieren, ist gp130 (auch CD130), der ubiquitär exprimiert wird. Der Rezeptor tritt außer in seiner membrangebundenen Form auch in löslicher Form im Serum auf und fungiert dort als Antagonist der IL-6-*trans*-Signaltransduktion (Müller-Newen *et al.*, 1998; Jostock *et al.*, 2001). Von der löslichen Form des gp130 gibt es verschiedene Varianten, die durch alternatives Spleißen oder alternative Polyadenylierung entstehen (Diamant *et al.*, 1997; Sommer *et al.*, 2014). Die kleinste Isoform, sgp130-RAPS (*rheumatoid arthritis antigenic peptide-bearing soluble form*) kommt auch bei Gesunden im Serum vor und inhibiert IL-6-Signaltransduktion. In der rheumatoiden Arthritis werden Autoantikörper gegen diese Rezeptorvariante gebildet (Tanaka *et al.*, 2000).

1.2.1 Zytokinbindung

Die Signaltransduktion über den Rezeptor gp130 wird durch Zytokinbindung und anschließende Dimerisierung des Rezeptors ausgelöst. Der Rezeptor gp130 ist ein Typ-I-Transmembranprotein und besteht aus einem zytoplasmatischen Teil, einer Transmembran-Domäne und extrazellulär aus fünf Fibronectin-Typ-III-ähnlichen (FNIII) Domänen und einer Immunglobulin-ähnlichen (*Ig-like*) Domäne. Zwei der FNIII-Domänen (D2 und D3) bilden das Zytokinbindemodul (ZBM) und N-terminal dazu liegt die *Ig-like* Domäne, die ebenfalls in die Zytokinbindung involviert ist (Abbildung 1.5). Das ZBM weist im C-terminalen Bereich das charakteristische WSXWS-Motiv auf, das auch in den anderen β -Rezeptoren zu finden ist (Pflanz *et al.*, 2000).

IL-6 kann ausschließlich an gp130 binden, wenn es bereits an den IL-6R gebunden hat. Dabei ist es nicht ausschlaggebend, ob dieser in membrangebundener oder löslicher Form vorliegt.

In IL-6 sind je drei Regionen identifiziert worden, die für die Bindung an den Rezeptorkomplex notwendig sind. Diese werden *Site I* – *III* genannt, wobei *Site I* an den α -Rezeptor bindet, *Site II* an das ZBM des β -Rezeptors und *Site III* wird von der *Ig-like* Domäne in gp130 gebunden (Kurth *et al.*, 1999; Pflanz *et al.*, 2000). Hierfür wären mindestens ein IL-6R- und zwei gp130-Moleküle notwendig. Die tatsächliche Stöchiometrie des IL-6-Rezeptorkomplexes wurde kontrovers diskutiert. Grötzinger *et al.*, 1999 schlagen einen tetrameren Komplex aus einem IL-6 und einem IL-6R-Molekül zusammen mit zwei Molekülen gp130 als signaltransduzierenden Komplex vor. Ihrer

Meinung nach entsteht ein hexamerer Komplex bei Zytokinüberschuss zur Gegenregulation des Zytokinsignals. Vor allem Strukturdaten zeigen eine hexamere Komplexbildung aus zwei Molekülen IL-6, zwei IL-6R und zwei gp130 (Chow *et al.*, 2001; Varghese *et al.*, 2002; Boulanger *et al.*, 2003), die teilweise *in vitro* bestätigt werden konnte (Barton *et al.*, 2000; Chow *et al.*, 2001(2)). In Pflanz *et al.*, 2000 führte allerdings die Koexpression von zwei gp130-Mutanten, von denen einer die Ig-like Domäne fehlte ($\Delta D1$) und die andere eine Mutation im ZBM (F191E) aufwies, zu einer ungestörten Hyper-IL-6-Signaltransduktion in COS7 Zellen, die Expression einer einzelnen dieser Varianten dagegen nicht. Dieses Ergebnis spricht für einen tetrameren Rezeptorkomplex, da die Bindungsepitope für ein weiteres Hyper-IL-6-Molekül durch die Mutationen nicht vorhanden sind.

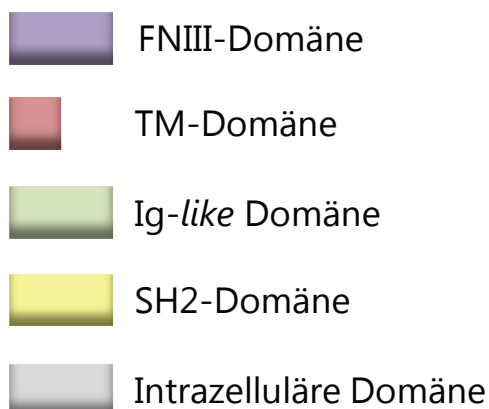
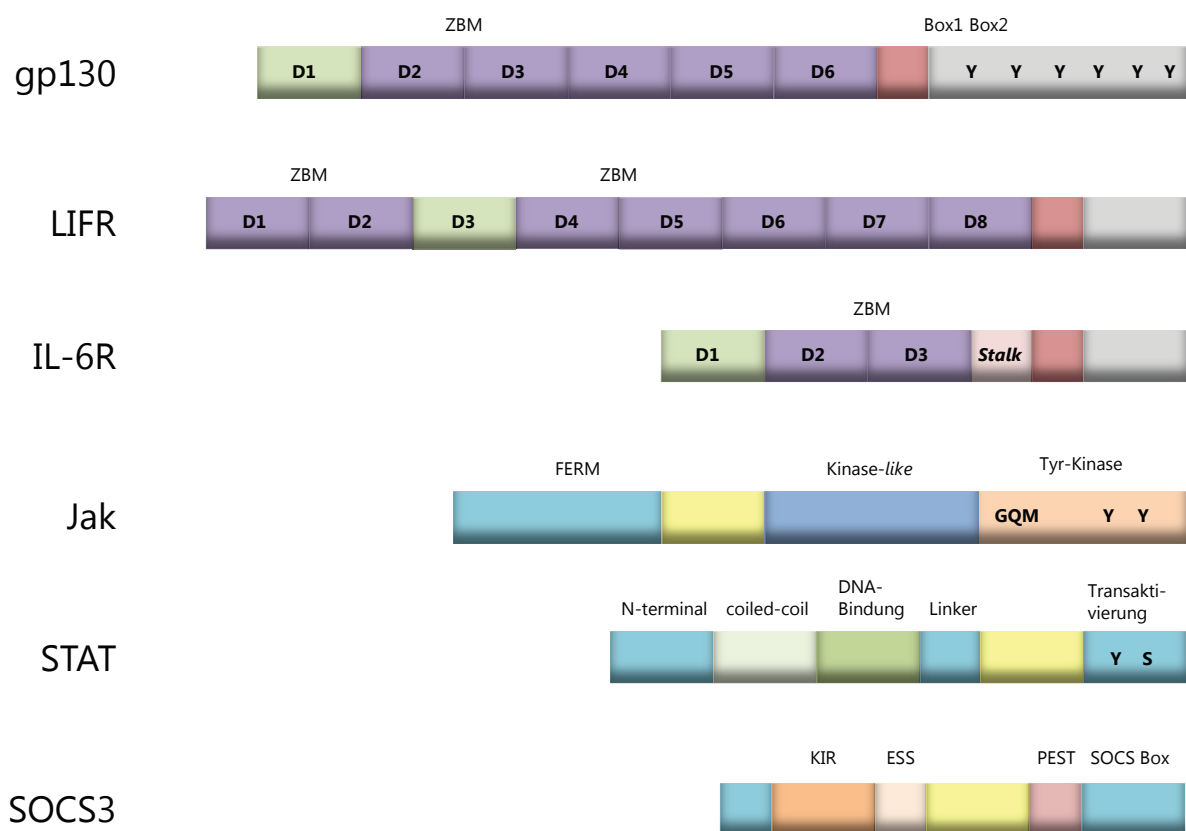


Abbildung 1.5: Schematische Domänenstruktur der and der Signaltransduktion der IL-6-Familie beteiligten Proteine. Dargestellt sind die Rezeptoren gp130, LIFR und der IL-6R. Für Janus Kinasen und STAT-Proteine ist der allgemeine Aufbau gezeigt, für die SOCS-Proteine exemplarisch SOCS3. FNIIDomäne: Fibronektin-TypIII, TM: Transmembran, Ig-like: Immunglobulin-ähnliche, ZBM: Zytokinbindemodul, FERM: 4.1/Ezrin/Radixin/Moesin, KIR: kinase inhibitory region, ESS: extended SH2 subdomain. Abbildung modifiziert nach Heinrich *et al.*, 2003.

In einem Rezeptor-Heterodimer, wie z. B. bei Bindung von LIF an gp130/LIFR, bindet LIF mit der *Site III* an die *Ig-like* Domäne (D3) im LIFR (Abbildung 1.5) und dies gilt auch für die Bindung von CT-1 und OSM (Timmermann *et al.*, 2000). Wenn LIF, CT-1 und OSM lediglich mit ihrer *Site II* an gp130 binden können, dann handelt es sich bei diesem Rezeptorkomplex vermutlich um ein Tetramer. Welche Funktionen allerdings die zusätzlichen ZBM im LIFR haben ist bislang unbekannt.

Die *Ig-like* Domäne in gp130 ist also für die Homodimerisierung des Rezeptors notwendig. Aber auch IL-27, dessen zweiter β -Rezeptor WSX-1 keine *Ig-like* Domäne aufweist, bindet mit seiner *Site III* an gp130 (Jones und Vignali, 2011).

Der Rezeptor gp130 bindet also viele verschiedene Zytokine und die gebildeten Rezeptorkomplexe lösen damit auch unterschiedliche Signaltransduktionswege aus.

1.2.2 Signaltransduktion

Der Rezeptor gp130 kann durch Bindung von Zytokinen der IL-6- und der IL-12-Familie spezifisch aktiviert werden. In Abhängigkeit der Art des Zytokins bildet der Rezeptor Homodimere oder Heterodimere mit den anderen β -Rezeptoren der Zytokinfamilien aus. Daraufhin werden verschiedene Signalkaskaden aktiviert, von denen der Jak-STAT-

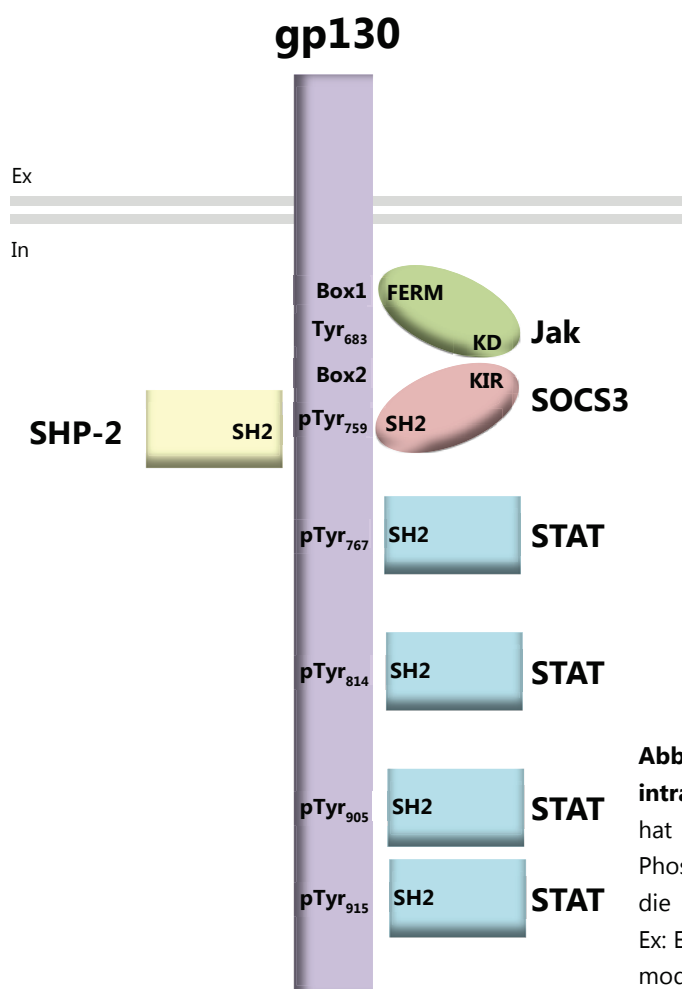


Abbildung 1.6: Bindungsstellen in der intrazellulären Domäne von gp130. Der Rezeptor hat sechs intrazelluläre Tyrosine, an die nach Phosphorylierung sowohl SHP2 und SOCS3, als auch die STATs binden. Jaks binden an das Box1-Motiv. Ex: Extrazellulärraum, In: Intrazellulärraum. Abbildung modifiziert nach Heinrich et al., 2003.

Signalweg wohl der am meisten beachtete ist, aber auch der PI3K- und der MAPK-Signalweg spielen eine Rolle in der gp130-Signaltransduktion.

Durch die Bildung des Rezeptorkomplexes werden zwei β -Rezeptoren in unmittelbare Nähe gebracht. Da gp130 und auch die anderen β -Rezeptoren keine intrinsische Tyrosinkinase-Aktivität haben, übernehmen die Janus Kinasen die Aufgabe der Tyrosin-Phosphorylierung. Sie interagieren konstitutiv mit gp130 und phosphorylieren sich in *trans* bei Bildung des Rezeptorkomplexes (Lütticken *et al.*, 1994; Stahl *et al.*, 1994). Außerdem phosphorylieren sie die intrazellulären Tyrosine des Rezeptors. Gp130 trägt intrazellulär sechs Tyrosine, von denen die distalen vier (Y⁷⁶⁷, Y⁸¹⁴, Y⁹⁰⁵ und Y⁹¹⁵) als Bindungsfläche für STATs dienen (Stahl *et al.*, 1995; Gerhartz *et al.*, 1996; Abbildung 1.6). Nach der Bindung werden die STATs von Janus Kinasen phosphoryliert und translozieren in den Zellkern, wo sie die Expression ihrer Zielgene regulieren (dieser Prozess wird in Abschnitt 1.3 genauer beschrieben).

Das Tyrosin⁷⁵⁹ in gp130 interagiert dagegen mit negativen Gegenregulatoren der Signaltransduktion, wie SOCS3 (*suppressor of cytokine signaling*) und SHP2 (*SH2 containing phosphatase*; Schmitz *et al.*, 2000). SOCS3 ist eines der Zielgene der STATs und wird daher nur in Abhängigkeit einer STAT-Aktivierung exprimiert. Seine

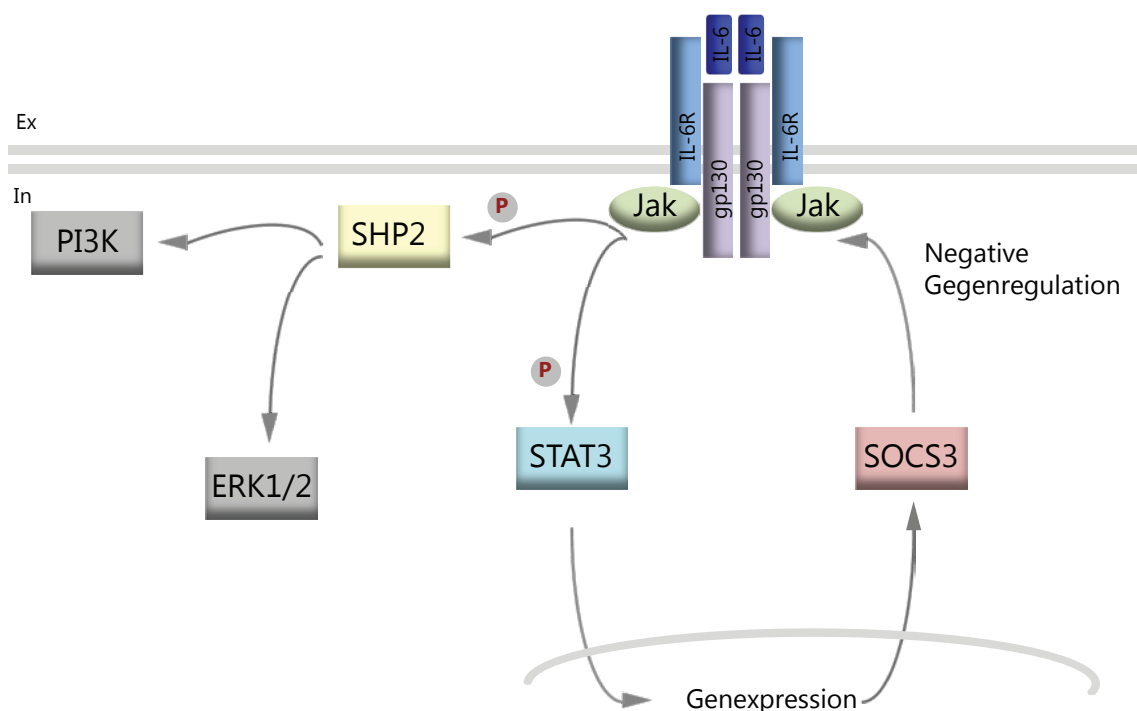


Abbildung 1.7: Schematische Darstellung der durch IL-6 aktivierten Signaltransduktionswege. Nach Bildung des Rezeptorkomplexes phosphorylieren Jaks sowohl STAT3, als auch SHP2. SHP2 dient als Adapterprotein für die Auslösung des PI3K- und des ERK1/2-Signalweges. STAT3 reguliert die Genexpression und führt u.a. zur Expression von SOCS3, das als negative Regulator der Signaltransduktion fungiert. Ex: Extrazellulärraum, In: Intrazellulärraum. Abbildung modifiziert nach Eulenfeld *et al.*, 2012.

Funktionen sind in Abschnitt 1.3.3 näher erläutert. SHP2 dagegen wird konstitutiv exprimiert und interagiert daher schon direkt nach einer Rezeptorphosphorylierung mit gp130. Die Phosphatase ist ein negativer Regulator der STAT3-Aktivierung, da eine Aktivierung von SHP2 durch das Chemotherapeutikum Sorafenib zu verminderter STAT3-Phosphorylierung führt (Blechacz *et al.*, 2009). SHP2 unterdrückt eine basale STAT-Phosphorylierung, spielt aber keine Rolle bei der IL-6-induzierten STAT-Aktivierung, da die Phosphatase durch das Zytokinsignal phosphoryliert wird und dann vom Rezeptor dissoziiert (Dittrich *et al.*, 2012). In diesem Fall spielt SHP2 eine aktivierende Rolle für den MAPK/ERK und den PI3K Signalweg. Es dient dabei als Adapterprotein für Grb2 und SOS, wodurch SOS membrangebundenes Ras aktivieren kann und damit die MAP-Kinase-Kaskade in Gang setzt. Außerdem bindet SHP2 das Adapterprotein Gab1, das die PI3-Kinase aktiviert (vgl. Eulendorf *et al.*, 2012).

Am Rezeptor gp130 werden also drei verschiedene Signalwege, der Jak/STAT-Signalweg, die MAPK-Kaskade, sowie der PI3K-Akt-Signalweg in Gang gesetzt, die sich allerdings alle auch gegenseitig beeinflussen. Die Regulation der beiden letzteren in der IL-6-Signaltransduktion ist noch unvollständig verstanden, während es wesentlich mehr Daten zur Jak/STAT-Aktivierung gibt.

1.3 Jaks und STATs in der IL-6-Signaltransduktion

Wie zuvor erwähnt, werden an der intrazellulären Domäne von gp130 verschiedene Signalkaskaden in Gang gesetzt. Die weitaus prominenteste Rolle in der Signaltransduktion der IL-6-Zytokinfamilie spielt aber die Aktivierung der an gp130 assoziierten Janus Kinasen und die durch sie vermittelte STAT-Aktivierung.

1.3.1 Janus Kinasen

Aufgrund der Zytokinbindung dimerisieren die β -Rezeptoren der IL-6-Familie. Die Funktion der membranproximalen FNIII-Domänen im gp130 und den anderen β -Rezeptoren liegt nicht in der Zytokinbindung. Sie fungieren als Bindeglied zwischen den N-terminalen Domänen, die den Komplex mit dem Zytokin bilden und den intrazellulären Domänen, die mit den Janus Kinasen interagieren. Durch ihre Konformationsänderung geraten die intrazellulären Domänen, und damit die Jaks, in eine veränderte räumliche Anordnung (Kurth *et al.*, 2000). Dies ist die Voraussetzung für die Aktivierung der Kinasen. Wie dieser Mechanismus genau abläuft, ist bislang ungeklärt. Für den Wachstumshormonrezeptor (GHR) konnte vor kurzem gezeigt werden, dass er bereits im unstimulierten Zustand dimerisiert vorliegt und die Pseudokinase-Domäne einer assoziierten Janus Kinase die Kinase-Domäne der anderen inhibiert. Bei Zytokinbindung vergrößert sich ihr Abstand und die Kinase-Domänen

werden aktiv (Brooks *et al.*, 2014). Dieser Mechanismus könnte eventuell auch auf gp130 zutreffen, da die Existenz präformierter Rezeptordimere in Abwesenheit von Liganden bereits nachgewiesen wurde (Tenhumberg *et al.*, 2006).

Die Janus Kinasen Jak1, Jak2 und Tyk2 interagieren mit dem Rezeptor gp130 und sind verantwortlich für die Signaltransduktion in der IL-6-Familie, da die β -Rezeptoren selbst keine Tyrosinkinaseaktivität aufweisen (Stahl *et al.*, 1994). Das vierte Mitglied der Familie, Jak3, spielt in der Signaltransduktion der IL-6-Familie keine Rolle. Jak1, Jak2 und Tyk2 binden an ein konserviertes Motiv in gp130, LIFR und OSMR, das Box 1 genannt wird und damit notwendig für die Signaltransduktion von gp130 ist (Tanner *et al.*, 1995, Abbildung 1.6).

Janus Kinasen bestehen aus einer C-terminalen Kinase Domäne mit zwei Tyrosinen, die zur Aktivierung phosphoryliert werden. Daran schließt sich eine Pseudokinase-Domäne an, die vermutlich der Autoinhibition der Kinase-Aktivität dient (Lupardus *et al.*, 2014; Shan *et al.*, 2014). Sie enthalten außerdem eine SH2-Domäne, deren Funktion noch ungeklärt ist. N-terminal befindet sich die FERM (*four-point-one, ezrin, radixin and moesin*)-Domäne mit der sie an das Box1-Motiv binden (Abbildung 1.5). Die verschiedenen Domänen sind flexibel verbunden, weswegen die Jaks in vielen unterschiedlichen Konformationen vorliegen können. Der genaue Mechanismus ihrer Aktivierung ist aber noch nicht geklärt, da erst in den letzten Jahren erste Strukturdaten generiert wurden (Lupardus *et al.*, 2011).

Obwohl der Rezeptor gp130 mit drei verschiedenen Janus Kinasen interagiert (Jak1, Jak2, und Tyk2), haben die letzteren beiden offenbar redundante Funktionen in der IL-6-Signaltransduktion, da ein Fehlen einer der beiden keinen Einfluss auf die STAT-Aktivierung (Guschin *et al.*, 1995) oder die SHP2-Phosphorylierung hat (Schaper *et al.*, 1998). Ohne Jak1 dagegen kommt es zu einer stark verminderten Signaltransduktion IL-6-artiger Zytokine (Rodig *et al.*, 1998).

1.3.2 STAT-Aktivierung

In der Signaltransduktion der Zytokine der IL-6-Familie spielen die STATs eine wichtige Rolle, da sie die Aktivierung der Zielgene vermitteln. Nach der Rezeptorkomplexbildung, bei der die Rezeptor-assoziierten Jaks aktiviert werden und ihrerseits die Rezeptor-Tyrosine phosphorylieren, entstehen neue Bindungsoberflächen an gp130 für die STATs. Sie binden mit ihrer SH2-Domäne an Tyr⁷⁶⁷, Tyr⁸¹⁴, Tyr⁹⁰⁵ und Tyr⁹¹⁵ von gp130 (siehe Abbildung 1.6) wobei die Bindungsoberfläche eine Bindung von STAT3 begünstigt. Dieser ist der wichtigste Transkriptionsfaktor für die IL-6-Familie. Die Tyrosine Y⁹⁰⁵ und Y⁹¹⁵ rekrutieren zusätzlich auch STAT1, was zu einer schwachen Aktivierung dieses Transkriptionsfaktors führt (Gerhartz *et al.*, 1996). Nur IL-27 aktiviert verstärkt auch STAT1 was durch ein Bindemotiv für STAT1 in der

intrazellulären Domäne von WSX-1 zu erklären ist, welches kein STAT3 bindet (Pflanz *et al.*, 2004; Owaki *et al.*, 2008).

Die wichtigsten STATs für die IL-6-Zytokinfamilie sind STAT1, STAT3 und STAT5. STAT3 wird durch Phosphorylierung des Tyr⁷⁰⁵ aktiviert, während in STAT1 Tyr⁷⁰¹ nach der Bindung an den Rezeptor von den Jaks phosphoryliert wird (Mohr *et al.*, 2013). STAT5 wird zur Aktivierung an Tyr⁶⁹⁴ phosphoryliert (Gouilleux *et al.*, 1994).

Die STATs 1, 3 und 4 haben in ihrer Transaktivierungsdomäne neben den Tyrosinen auch jeweils ein phosphorylierbares Serin in einer Erkennungssequenz für Serin-Kinasen (PSMP), dessen Phosphorylierung für die vollständige Aktivität der STATs notwendig ist (Wen *et al.*, 1995).

Lange Zeit wurde angenommen, dass die STATs aufgrund der Phosphorylierung dimerisieren. Neuere Strukturdaten zeigen aber, dass bereits unphosphoryliertes STAT1 dimerisiert im Zytoplasma vorliegt und sich bei Phosphorylierung lediglich die Konformation von einem parallelen in ein antiparalleles Dimer ändert (Mao *et al.*, 2005; Zhong *et al.*, 2005).

Alle STATs fungieren als Transkriptionsfaktoren, allerdings wird ihre Translokation in den Nukleus unterschiedlich reguliert. STAT3 und STAT5 werden konstant in den Nukleus im- und exportiert. Der Import von STAT3 in den Zellkern ist unabhängig von einer Phosphorylierung, da er auch bei Mutation des Y⁷⁰⁵ stattfindet (Liu *et al.*, 2005) und neue Erkenntnisse zeigen, dass der Transkriptionsfaktor auch im unphosphorylierten Zustand DNA binden kann (Nkansah *et al.*, 2013).

STAT1 und STAT4 weisen im unphosphorylierten Zustand kein bis heute identifiziertes NLS (*nuclear localization signal*) auf, d.h. sie liegen vor allem im Zytoplasma vor.

STAT1 wird vor allem von Interferonen, aber auch stark von IL-27 aktiviert. Im unphosphorylierten Zustand liegt es als anti-paralleles Dimer im Zytoplasma vor und ändert seine Konformation durch Phosphorylierung in ein paralleles Dimer. Dieses wird in Abhängigkeit von Importin- α 3 in den Zellkern importiert, bindet dort an DNA und aktiviert Zielgene (Reich, 2013). Verschiedene Ereignisse, wie die Dephosphorylierung durch Phosphatasen oder die Bindung an PIAS (*protein inhibitor of activated STAT*) führen zur Aufhebung der Bindung an die DNA und damit zu einem aktiven Export von STAT1 aus den Zellkern. Auf diese Weise wird die Expressionsinduktion durch den Transkriptionsfaktor gegenreguliert (Shuai und Liu, 2005).

Die Expression von STAT4 ist im Gegensatz zu den anderen STATs auf wenige Gewebe wie die haploiden männlichen Keimzellen, myeloide Zellen und T-Lymphozyten beschränkt. IL-12 ist der wichtigste Aktivator von STAT4 (Bacon *et al.*, 1995; Jacobson *et al.*, 1995), wobei die Aktivierung und Translokation vermutlich vergleichbar mit der von STAT1 abläuft (Berenson *et al.*, 2006), aber bei weitem nicht so ausführlich untersucht wurde.

Die STATs weisen verschiedene Aktivierungsmechanismen auf, die bis heute nicht eindeutig verstanden sind. Ihre Dimerisierung und Translokation hängt von vielfältigen Faktoren ab. In der IL-6-Signaltransduktion kommt es vor allem zu einer Aktivierung von STAT3 und STAT1, welche die Zielgene aktivieren. Ihr Signal wird in erster Linie von SOCS3 gegenreguliert.

1.3.3 Gegenregulation durch SOCS3

Die *suppressor of cytokine signaling* (SOCS) Proteine sind die wichtigsten Gegenspieler der Jak/STAT-Signaltransduktion. Es gibt in Säugetieren acht bisher identifizierte SOCS Proteine, zu denen CIS und SOCS1-7 gehören.

Für die Gegenregulation der IL-6-Signaltransduktion ist ausschließlich SOCS3 notwendig (Croker *et al.*, 2003). Der Signalweg führt über die Phosphorylierung von STAT3 zur Induktion der Expression von SOCS3 (Abbildung 1.7). SOCS3 bindet zunächst mit seiner SH2-Domäne an die Region um das phospho-Tyrosin 759 in aktiviertem gp130 (Nicholson *et al.*, 2000; Schmitz *et al.*, 2000).

An gp130 gebundenes SOCS3 inhibiert die Signaltransduktion über verschiedene Mechanismen. Zum einen hat SOCS3 eine sehr kurze Halbwertszeit und überträgt diese auch auf das gebundene gp130. Der Grund dafür liegt einerseits in einem PEST (Pro-Glu-Ser-Thr)-Motiv, das zu nicht-proteasomalem, proteolytischem Abbau führt (Rogers *et al.*, 1986) und andererseits in der Fähigkeit von SOCS3 einen E3-Ubiquitin-Ligase-Komplex zu rekrutieren und damit den Abbau von sowohl gp130 als auch gebundenen Jaks über das Proteasom einzuleiten (Kershaw *et al.*, 2014).

Der andere Mechanismus, durch den SOCS3 unmittelbar zu einer reduzierten gp130-Signaltransduktion führt, ist die Inhibition der Jaks. Mit seiner Kinase-inhibitorischen Region (KIR) bindet SOCS3 direkt an die Kinase-Domäne der Jaks und verhindert so eine weitere Phosphorylierung von STATs (Sasaki *et al.*, 1999; Abbildung 1.6).

Genau wie gp130 bindet auch SOCS3 ausschließlich an die Janus Kinasen Jak1, Jak2 und Tyk2 und nicht an Jak3. Diese Spezifität wird durch das GQM-Motiv in den Jaks vermittelt, an das SOCS3 mit seiner KIR-Domäne bindet und ATP-abhängig die Kinase-Funktion inhibiert. Jak3 weist dieses Motiv nicht auf (Babon *et al.*, 2012).

SOCS3 ist also ein negativer Regulator der gp130-Signaltransduktion, indem es zu vermehrtem Rezeptorabbau führt, aber auch indem es die Kinase-Funktion der Jaks inhibiert.

1.3.4 Konstitutiv aktive STAT3-Signaltransduktion: Chronische Entzündung und Krebs

STAT3 ist unter den STATs der wichtigste Faktor für die Auslösung der Akut-Phase-Reaktion in der Leber und für die Freisetzung antimikrobieller Peptide als Antwort auf Pathogene verantwortlich. Es ist außerdem notwendig für die Homöostase epithelialer Zellen in den Schleimhäuten und für die Wundheilung.

Es gibt zwei Isoformen von STAT3, STAT3 α und das kürzere STAT3 β , wobei beide überlappende Funktionen haben, STAT3 α aber z.B. in der IL-6- und IL-10-Signaltransduktion eine nicht redundante Rolle spielt (Maritano *et al.*, 2004).

IL-6 und STAT3 sind ausschlaggebend bei der Pathogenese von vielen Krankheiten mit chronischer Entzündung. Der in Abschnitt 1.1.1 erwähnte Effekt eines IL-6 *knock outs* auf die Kollagen-induzierte Arthritis und die experimentelle Autoimmun-Encephalomyelitis, ist vor allem der Signaltransduktion über STAT3 zuzuschreiben. Im Gegensatz zur anti-entzündlichen Wirkung in diesen Modellen führt die IL-6-Defizienz zu einem schwereren Krankheitsverlauf der DSS (*dextran sodium sulfate*)-induzierten Colitis, was durch eine verhinderte STAT3-vermittelte Regeneration erklärt werden kann. Ein weiterer Effekt ist die verringerte Tumorzahl nach Colon-Krebs-Induktion (Grivennikov *et al.*, 2009). Letzteres ist darauf zurückzuführen, dass die STAT3-Aktivität für die Proliferation der intestinalen Endothelzellen notwendig ist, was ebenfalls in einem gewebsspezifischen STAT3 *knock out* gezeigt werden konnte (Bollrath *et al.*, 2009).

Dass entzündliche Prozesse und Krebsentwicklung eng miteinander verknüpft sind, wurde bereits in vielen Modellen gezeigt. Patienten mit entzündlichen Darmerkrankungen entwickeln außerdem häufiger Darmkrebs, als die sonstige Bevölkerung (vgl. Karin und Greten, 2005).

Bei der Tumorentwicklung wird die Proliferation der entarteten Zellen zusätzlich durch die Mikroumgebung stimuliert. Infiltrierende Immunzellen sind die Hauptquelle für pro-inflammatorische und pro-proliferative Zytokine, die in vielen Fällen ein fast ungehindertes Wachstum des Tumors erst möglich machen. Chronische Entzündung ist also nicht die Ursache einer Krebsentstehung, begünstigt aber eine Tumor-Mikroumgebung, die das Wachstum und die Entwicklung des Tumors fördert.

In vielen Tumoren wurde eine vermehrte STAT3-Aktivität nachgewiesen, die mit einer schlechten Prognose korreliert (vgl. Bromberg, 2002). Die Aktivität ist aber in den meisten Fällen nicht auf aktivierende Mutationen in STAT3 selbst zurückzuführen, sondern ist vielmehr in aktivierenden Mutationen in vorgeschalteten Rezeptoren, wie gp130 oder dem EGFR, oder in Kinasen, wie den Jaks begründet.

Zu den Mechanismen, die zu konstitutiv aktivem STAT3 führen, zählen die auto- und parakrine Wirkung von IL-6, das vor allem in der Tumor-Mikroumgebung in myeloiden

Zellen (Greten *et al.*, 2004) und T-Zellen (Becker *et al.*, 2004) produziert wird. Die Produktion von IL-6 führt dann dazu, dass STAT3 nicht nur im Tumor, sondern auch in der Tumor-Mikroumgebung konstitutiv aktiviert wird (Becker *et al.*, 2005).

In Lungen-Adenokarzinomen konnte die konstitutive STAT3-Phosphorylierung auf EGFR-Mutationen zurückgeführt werden, die zu einer verstärkten IL-6-Produktion führten (Gao *et al.*, 2007). Ebenso gibt es Mutationen im IL-6- β -Rezeptor gp130, die zu einer konstitutiven Signaltransduktion führen. Sie wurden in entzündlichen hepatozellulären Adenomen nachgewiesen und führen zu einer verstärkten STAT3-Aktivierung. Bei den Mutationen handelte es sich um kurze Deletionen im Bereich der Bindestelle für IL-6 in gp130 (Rebouissou *et al.*, 2009).

Erst kürzlich wurden zum ersten Mal Mutationen im STAT3-Gen beschrieben, die in einer Überaktivität von STAT3 resultieren. In entzündlichen hepatozellulären Adenomen zeigten Pilati *et al.*, 2011 verschiedene Mutationen vor allem in der SH2-Domäne von STAT3, die zu einer konstitutiven Phosphorylierung führten. Auch in großer granulärer lymphozytärer Leukämie wurde in 31 von 77 Patienten eine Mutation in der SH2-Domäne von STAT3 gefunden (Koskela *et al.*, 2012). Diese Patienten leiden auch häufiger an entzündlichen Erkrankungen, wie rheumatoider Arthritis, als die Vergleichsgruppe.

Therapeutisch kann eine verstärkte IL-6-Signaltransduktion mit verschiedenen spezifischen Antikörpern inhibiert werden (vgl. Garbers und Scheller, 2013). Wenn aber die konstitutive STAT3-Signaltransduktion auf Mutationen in Jaks, den Rezeptoren oder in STATs selbst beruht, sind bis heute die vielversprechendsten Kandidaten für eine Therapie die Jak-Inhibitoren. Diese sind kleine zellpermeable Stoffe, wie Ruxolitinib, das Jak1 und Jak2 blockiert und sowohl für die Behandlung von rheumatoider Arthritis, als auch der Markfibrose getestet wurde. Ein weiterer Jak1/2-Inhibitor ist Baricitinib, der ebenfalls in rheumatoider Arthritis eingesetzt werden soll und Tofacitinib, der Jak1, Jak2 und Jak3 inhibiert und evtl. gegen ulcerative Colitis verwendet werden soll (O'Shea *et al.*, 2013). Diese Inhibitoren sind jedoch wenig spezifisch, weswegen weitere Möglichkeiten der Inhibition der STAT3-Signaltransduktion gefunden werden müssen.

1.4 Protein-Kinase 2 (CK2)

Die Protein Kinase II (CK2) ist eine ubiquitär exprimierte Serin/Threonin-Kinase die hochkonserviert ist und zahlreiche Substrate hat. Sie ist vor allem in zelluläre Prozesse wie Wachstum und Proliferation involviert.

Das Holoenzym ist ein Tetramer aus zwei katalytischen α -Untereinheiten (α und/oder α') und zwei regulatorischen β -Untereinheiten (Gietz *et al.*, 1995). Wie wichtig die Kinase für die zellulären Prozesse ist, zeigt sich in der embryonalen Letalität eines *knock outs* in Mäusen sowohl der α -, als auch der β -Untereinheiten (Buchou *et al.*, 2003; Lou *et*

al., 2008; Seldin *et al.*, 2008). Die Kinase hat Hunderte von Substraten und ist konstitutiv aktiv (Meggio und Pinna, 2003; Pinna, 2003). Trotzdem wird sie teilweise durch Phosphorylierung, Lokalisation und Substratinteraktion reguliert, wobei die genauen Mechanismen noch unvollständig verstanden sind (Olsten *et al.*, 2005).

Die minimale Konsensussequenz für CK2 ist S/T-X-X-Ac, wobei X eine beliebige Aminosäure ist und Ac eine saure oder phosphorylierte Aminosäure. Dabei kann sowohl ATP als auch GTP als Phosphatgruppendonator dienen. Zu den vielen physiologischen Funktionen von CK2 zählt die Zellzyklusprogression und die Inhibition von Apoptose aufgrund von DNA-Schäden oder vermittelt durch Rezeptoren (St-Denis und Litchfield, 2009). Die Kinase ist außerdem ein wichtiger Faktor in der Transkription, da alle drei RNA Polymerasen zu ihren Substraten zählen und ihre Funktionen, von der CK2-Aktivität abhängen (Johnston *et al.*, 2002; Cabrejos *et al.*, 2004; Panova *et al.*, 2006).

Die Proteinkinase B (PKB/Akt) ist ebenfalls ein Substrat der CK2. Die Phosphorylierung aktiviert Akt und hat einen anti-apoptotischen Effekt (Di Maira *et al.*, 2005). CK2 greift in diesen Signalweg noch an einer anderen Stelle ein. Die Phosphatase PTEN ist der Gegenspieler von Akt. Sie wird von CK2 phosphoryliert und ihre Aktivität in negativer Weise reguliert (Torres und Pulido, 2001).

In schnell proliferierenden Zellen ist die Expression von CK2 hochreguliert, d.h. auch in vielen menschlichen Tumoren. CK2 wird in kolorektalem Krebs verstärkt exprimiert und ist für die Proliferation und Invasion der Tumore notwendig (Zou *et al.*, 2011).

CK2 ist ein positiver Regulator des Wnt-Signalweges, welcher in der Embryonalentwicklung von Bedeutung ist und auch in vielen menschlichen Tumoren, wie Brust-Karzinomen, aktiv ist. Die Phosphorylierung von β -Catenin, einem transkriptionalen Ko-Faktor des Signalweges, durch CK2 führt zu seiner Stabilisierung und damit zur einer verstärkten Aktivierung (Seldin *et al.*, 2005). In hämatologischen Krebsformen wie dem multiplen Myelom und der chronischen lymphatischen Leukämie wurde zuletzt ebenfalls eine verstärkte Aktivität von CK2 nachgewiesen, die für die Expansion der malignen Zellen notwendig ist (Piazza *et al.*, 2012).

CK2 ist somit eine Kinase mit vielen verschiedenen Substraten, deren Aktivität Wachstum und Proliferation fördert und die anti-apoptotisch wirkt.

1.5 Ziel der Arbeit

Die Zytokine der IL-6- und IL-12-Familie und ihre Signaltransduktion unterliegen einer strengen Regulation, da ihre unkontrollierte Wirkung zu verschiedenen Krankheitsbildern mit chronischer Entzündung und Krebs führen kann. Ihre Aktivität ist aber unabdingbar für eine effiziente angeborene und erworbene Immunantwort.

Ziel der Arbeit war es, die Signaltransduktion der IL-27-Untereinheit p28 über den IL-6R zu charakterisieren, die Signaltransduktion von IL-35 über verschiedene

Rezeptorkomplexe zu analysieren und zuletzt die Funktion der Protein Kinase 2 (CK2) in der Jak/STAT-Signaltransduktion zu untersuchen.

Für p28 liegen kontroverse Daten in Bezug auf seine Signaltransduktion über den IL-6R vor, die sowohl agonistische als auch antagonistische Eigenschaften nahelegen. Eine Bindung an den löslichen IL-6R analog zur IL-6 trans-Signaltransduktion konnte bisher nicht nachgewiesen werden. Ziel der Arbeit war es daher, zum einen eine mögliche *trans*-Signaltransduktion des neu identifizierten IL-6R-Liganden p28 zu untersuchen und zum anderen, die intrazelluläre Signalwirkung dieses Zytokin/Rezeptor-Komplexes zu charakterisieren.

IL-35 ist das neueste Mitglied der IL-6-/IL-12-Familie. Es wird als anti-inflammatorisches Zytokin angesehen und aktiviert mehrere, eher unkonventionelle Rezeptorkomplexe. Ziel war es, die unterschiedliche Signaltransduktion über die verschiedenen Rezeptorkomplexe zu untersuchen. Zur Produktion von IL-35 sollte ein neuer Ansatz verfolgt werden, bei dem p35 rekombinant in Bakterien exprimiert und anschließend mit EBI3 (IL-35) oder p40 (IL-12) vereinigt wird, da p35 *in vitro* von eukaryotischen Zellen kaum sekretiert wird.

Vor kurzem konnte gezeigt werden, dass die Protein Kinase CK2 in die Signaltransduktion von OSM involviert ist. In dieser Arbeit sollte daher untersucht werden, ob CK2 darüber hinaus eine generelle Rolle in der STAT-Aktivierung durch IL-6-artige Zytokine spielt und auch die konstitutive Aktivierung von STAT3, die in verschiedenen Krankheitsbildern auftritt, von CK2 abhängig ist.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Antibiotika

	Hersteller	Arbeitskonzentration
Ampicillin	AppliChem, Darmstadt	100 µg/ml
Kanamycin	AppliChem, Darmstadt	25 µg/ml
Puromycin	PAA Laboratories, Pasching, A	1,5 µg/ml

2.1.2 Antikörper

2.1.2.1 Primäre Antikörper

anti-phospho STAT1 (Y ⁷⁰¹) (58D6)	Cell Signaling Biotechnology, Frankfurt
anti-STAT1 (42H3)	Cell Signaling Biotechnology, Frankfurt
anti-phospho STAT3 (Y ⁷⁰⁵) (D3A7)	Cell Signaling Biotechnology, Frankfurt
anti-STAT3 (124H6)	Cell Signaling Biotechnology, Frankfurt
anti-Jak1 (6G4)	Cell Signaling Biotechnology, Frankfurt
anti-Jak2 (D2E12)	Cell Signaling Biotechnology, Frankfurt
anti-c-myc (71D10)	Cell Signaling Biotechnology, Frankfurt
anti-phospho-ERK1/2 (T ²⁰² /Y ²⁰⁴)	Cell Signaling Biotechnology, Frankfurt
anti ERK	Cell Signaling Biotechnology, Frankfurt
anti-phospho-Akt (S ⁴⁷³) (D9E)	Cell Signaling Biotechnology, Frankfurt
anti-Akt	Cell Signaling Biotechnology, Frankfurt
anti-β-Actin (C4)	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
anti-SOCS3 (M-20)	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg
anti-FLAG (F7425)	Sigma-Aldrich, Steinheim
anti-hIL-6R (4-11)	Hergestellt wie in Chalaris <i>et al.</i> , 2007.

2.1.2.2 Sekundäre Antikörper

anti-mouse IgG-POD	Thermo Scientific, Waltham, USA
rabbit-anti-human IgG-POD	Thermo Scientific, Waltham, USA
rabbit-anti-goat IgG-POD	Thermo Scientific, Waltham, USA
goat-anti-rabbit IgG-POD	Thermo Scientific, Waltham, USA

2.1.3 Chemikalien

Die hier nicht aufgeführten Chemikalien wurden von Carl Roth GmbH, Karlsruhe bezogen.

6x Orange DNA Loading Dye	Thermo Scientific, Waltham, USA
Agarose	Biozym Scientific, Hessisch Oldendorf
Bovines Serumalbumin (BSA)	Biomol, Hamburg
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich, Steinheim
Cell titer blue reagent	Promega, Mannheim
DMSO	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ethylenglycol-bis(aminoethylether)- tetraessigsäure (EGTA)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ethanol	Merck, Darmstadt
GeneRuler 1kb DNA Ladder	Thermo Scientific, Waltham, USA
Kaliumacetat	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid	AppliChem, Darmstadt
LB-Agar-Pulver	AppliChem, Darmstadt
Methanol	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid	AppliChem, Darmstadt
Natriumfluorid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumhydrogenophosphat	Merck, Darmstadt
Natriumorthovanadat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumpyrophosphat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Nonidet-P40	Sigma-Aldrich, Steinheim
PageRuler Prestained (Proteinmarker)	Thermo Scientific, Waltham, USA
TEMED	Sigma-Aldrich, Steinheim
Triton X-100	VWR, Radnor, USA
Trypanblau	Bio-Rad, München
Tween 20	Sigma-Aldrich, Steinheim
β -Glycerophosphat	Sigma-Aldrich, Steinheim
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim

2.1.4 Enzyme

Alle verwendeten Enzyme, wie Restriktionsenzyme, Polymerasen u.a. wurden von Thermo Scientific, Waltham, USA bezogen. RNase A stammte von Qiagen, Hilden.

2.1.5 Geräte

7500 Real-Time-PCRSystems	Applied Biosystems, Warrington, UK
Analysenwaage	Kern, Balingen-Frommern
ChemoCam Imager	Intas, Göttingen
CO ₂ -Inkubator	Binder, Tuttlingen
Einfrierbehälter Mr. Frosty	Thermo Scientific, Waltham, USA
Einkanalpipetten Research Plus	Eppendorf, Hamburg
Feinwaage	Kern, Balingen-Frommern
Gel iX Imager	Intas, Göttingen
Horizontal Elektrophoresis System	Bio-Rad, München
Inverses Lichtmikroskop Axiovert 25	Zeiss, Jena
Mastercycler	Eppendorf, Hamburg
Mehrkanalpipetten Research Plus	Eppendorf, Hamburg
Multipette	Eppendorf, Hamburg
Nanodrop ND-2000	Peqlab, Erlangen
Neubauerzählkammer	Brand , Wertheim, D
pH-Meter	Sartorius, Göttingen
Rollmischer	NeoLab, Heidelberg
Tecan infinite M200 PRO reader	Tecan, Crailsheim
Thermoblock	Eppendorf, Hamburg
Tischzentrifuge	Eppendorf, Hamburg
Trans-Blot® Turbo™ Transfer System	Bio-Rad, München
UV-Tisch	Bio-Budget Technologies, Krefeld
Vortexer	NeoLab, Heidelberg
Wasserbad Aqualine	Lauda, Lauda-Königshofen

2.1.6 Kits

Midi-Präparation von Plasmid-DNA	NucleoBond Xtra Midi/Maxi, Macherey-Nagel, Düren
Reinigung von PCR-Produkten und Gelextraktion aus Agarosegelen	PCR clean-up, Gel ectraction, Macherey-Nagel, Düren
Bestimmung von Proteinkonzentrationen	BCA Protein Assay Kit, Thermo Scientific, Waltham, USA

Detektion von Chemilumineszenz
Präparation von RNA

ECL Prime, GE Healthcare, München
Nucleospin RNA II, Macherey-Nagel,
Düren

2.1.7 Oligonukleotide

Alle in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von Eurofins Genomics bezogen. Die Sequenzen sind in der Tabelle 1 dargestellt.

Tabelle 1: Übersicht über die verwendeten Oligonukleotide

Name	Oligonukleotidsequenz
AgeI-mp28-Fwd	5'-GATCACCGGTGGGCTTCCCAACAGACCCC-3'
mp28-SacI-NotI-Rev	5'-GATCGAGCTCGCGGCCGCTTAGGAATCCCAGGCTGAGCC-3'
Bsu36I-Fwd	5'-TTCACCCTCAGGAACGAAACCCCATGCC-3'
SmaI-Rev	5'-TGGGAAGCCCACCCC GGT ACCCCTACTCC-3'
SmaI-Fwd	5'-GGAGTAGGGGTACC CGGGT GGGCTTCCCA-3'
p28-XhoI-Rev	5'-AGTGGCGGCCCTCGAGCCGCGCCGCAGAA-3'
p35-Fwd	5'-GGGGTGAGGGTCATTCCAGTCTCTGGA-3'
p35-XhoI-Rev	5'-GCGGCTCGAGGGGCGGAGCTCAGATA-3'
STAT3-AvrII-Fwd	5'-AGAAGCTCCT AGGGCCTGGT-3'
Y640F-Fwd	5'-GTAGAGCCAT T CACCAAGCA-3'
Y640F-Rev	5'-TGCTTGGTG A ATGGCTCTAC-3'
D661V-Fwd	5'-TAAGATCATGG T TGCGACCAAC-3'
D661V-Rev	5'-GTTGGTCGC A ACCATGATCTTA-3'
STAT3-BamHI-Rev	5'-TATCATGTCTGGATCCCCCA-3'

2.1.8 Puffer und Lösungen

10x TBS	0,5 M Tris-HCl 1,5 M NaCl pH 7,5
5x Lämmli-Puffer	62,5 mM Tris-HCl 10% Glycerol 2% SDS 5% β -Mercaptoethanol pH 6,8 Spatelspitze Bromphenolblau
Blocking Puffer	5% Milchpulver in TBS-T

IP-Puffer	50 mM Tris-HCl 150 mM NaCl 1 mM EDTA 1 mM EGTA 1 mM Na ₃ VO ₄ 2,5 mM Na-Pyrophosphat 1 mM β-Glycerophosphat 1% Triton-X-100 complete protease inhibitor cocktail pH 7,5
Lysepuffer	50 mM Tris-HCl 150 mM NaCl 1% Triton-X-100 complete protease inhibitor cocktail pH 7,5
PBS	137 mM NaCl 2,7 mM KCl 1,5 mM KH ₂ PO ₄ 8,1 mM Na ₂ HPO ₄ pH 7,4
p-STAT3-Lysepuffer	50 mM Tris-HCl 150 mM NaCl 2 mM EDTA 1 mM NaF 1 mM Na ₃ VO ₄ 1% Nonidet-P40 1% Triton-X-100 complete protease inhibitor cocktail pH 7,5
S1-Puffer	50 mM Tris-HCl 10 mM EDTA 100 µg/ml RNase A pH 8,0
S2-Puffer	200 mM NaOH 1% SDS
S3-Puffer	2,8 mM Kaliumacetat pH 5,1

Sammelgelpuffer	0,5 M Tris-HCl 0,4% SDS pH 6,8
SDS-Laufpuffer	25 mM Tris-HCl 192 mM Glycin 0,1% SDS pH 8,3
<i>Stripping</i> Puffer	62,5 mM Tris-HCl 2% SDS 0,1% β -Mercaptoethanol pH 6,8
TAE	40 mM Tris-HCl 0,1% Essigsäure 10 mM EDTA pH 8,0
TBS-T	TBS-T 0,05% Tween20
Transferpuffer	192 mM Glycin 25 mM Tris-HCl 20% CH ₃ OH pH 8,5
Trenngelpuffer	1,5 M Tris-HCl 0,4% SDS pH 8,8

2.1.9 Rekombinante Zytokine und Inhibitoren

Cardiotrophin-1 (CT-1)	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt
Emodin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Hyper-IL-6	Exprimiert und gereinigt in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Rose-John, wie zuvor beschrieben (Fischer <i>et al.</i> , 1997; Schroers <i>et al.</i> , 2005).
Interleukin-6 (IL-6)	ImmunoTools, Friesoythe
Interleukin-11 (IL-11)	ImmunoTools, Friesoythe
Interleukin-27 (IL-27)	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt

p28 (IL-30)	Exprimiert und gereinigt von Dr. Björn Spudy (Biochemisches Institut, Universität Kiel), wie beschrieben in Garbers <i>et al.</i> , 2013.
Leukämie inhibierender Faktor (LIF)	Exprimiert und gereinigt von Dr. Ralf Schwanbeck (Biochemisches Institut, Universität Kiel) wie zuvor beschrieben (Robinson <i>et al.</i> , 1994).
Onkostatin-M (OSM)	ImmunoTools, Friesoythe
p35	Exprimiert und gereinigt von Dr. Jens M. Moll, Institut für Biochemie und Molekularbiologie II, Universitätsklinikum Düsseldorf.
sgp130Fc	Exprimiert und gereinigt, wie zuvor beschrieben (Jostock <i>et al.</i> , 2001; Tenhumberg <i>et al.</i> , 2008). Zur Verfügung gestellt von Dr. Georg Wätzig, Conaris Research AG, Kiel.
Src-Inhibitor 1(Src-I)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Tetrabromobenzotriazol (TBB)	Sigma-Aldrich, Steinheim

2.1.10 Verbrauchsmaterialien

10 cm Kulturschalen	TPP, Trasadingen, Schweiz
12-Loch-Platten	TPP, Trasadingen, Schweiz
6-Loch-Platten	TPP, Trasadingen, Schweiz
96-Loch-Platten	TPP, Trasadingen, Schweiz
Corning® Costar® Stripette®	Sigma-Aldrich, Steinheim
Einmalspritzen	B. Braun, Melsungen
Kanülen	B. Braun, Melsungen
Kryoröhrchen	VWR, Radnor, USA
MicroAmp, Optical 96-Well Reaction Plate	Life Technologies, Darmstadt
MicroAmp, Optical Adhesive Film	Life Technologies, Darmstadt
PCR Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
Petrischalen	TPP, Trasadingen, Schweiz
Pipettenspitzen	StarLab, Ahrensburg
PVDF-Membran	Carl Roth, Karlsruhe
Reaktionsgefäße (1,5 ml; 2,0 ml)	Eppendorf, Hamburg
Reaktionsgefäße (15 ml; 50 ml)	BD Biosciences, Heidelberg
Sterilfilter (0,2 µm) PVDF	Carl Roth, Karlsruhe
Zellkulturschaber	Greiner Bio One, Solingen

2.1.11 Zellkulturmedien und –reagenzien

DMEM (-/-)	Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM), high Glucose (4,5 g/l), Life Technologies, Darmstadt.
DMEM (+/+)	DMEM, high Glucose (4,5 g/l), mit 10% fötalem Kälberserum (FCS) und 1% Penicillin/Streptomycin.
Fötales Kälberserum (FCS)	Life Technologies, Darmstadt
Penicillin/Streptomycin	Life Technologies, Darmstadt
Trypsin/EDTA	Life Technologies, Darmstadt
TurboFect Transfection Reagent	Thermo Scientific, Waltham, USA
jetPRIME	Polyplus transfection SA, Illkirch, Frankreich

2.1.12 Zelllinien

Ba/F3-gp130	Murine pro-B-Zelllinie, die in Abhängigkeit von IL-3 oder Hyper-IL-6 wächst. Sie wurde retroviral mit der cDNA für humanes gp130 transduziert (Fischer <i>et al.</i> , 1997).
Ba/F3-gp130-hIL-6R	Stabil mit der cDNA für humanen IL-6R transduzierte Ba/F3-gp130 Zelllinie (Vollmer <i>et al.</i> , 1999).
COS7	SV40-transformierte Nierenfibroblasten aus der grünen Meerkatze (<i>Cercopithecus aethiops</i>), (ATCC-Nummer: CRL-1651).
HEK293	Immortalisierte humane embryonale Nierenzelllinie (ATCC-Nummer: CRL-1573).
HepG2	Hepatozelluläre Karzinomzelllinie aus einem kaukasischen 15 Jahre alten Jungen (ATCC-Nummer: HB-8065).
Jak1 ^{-/-} MEF	Immortalisierte embryonale Mausfibroblasten, defizient für die Janus Kinase Jak1, beschrieben in Rodig <i>et al.</i> , 1998. Die Zellen wurden freundlicherweise von Robert D. Schreiber (Department of Pathology & Immunology, Washington University School of Medicine, USA) zur Verfügung gestellt.
Jak2 ^{-/-} MEF	Immortalisierte embryonale Mausfibroblasten, defizient für die Janus Kinase Jak2, beschrieben in Keil <i>et al.</i> , 2013. Die Zellen wurden freundlicherweise von Eric Keil (Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene, Universität Düsseldorf) zur Verfügung gestellt.

WT MEF	Immortalisierte embryonale Mausfibroblasten, beschrieben in Rodig <i>et al.</i> , 1998. Die Zellen wurden freundlicherweise von Robert D. Schreiber (Department of Pathology & Immunology, Washington University School of Medicine, USA) zur Verfügung gestellt.
Phoenix-Eco	HEK293T, die als Verpackungszelllinie stabil mit cDNA transfiziert ist, die für Antigen, Polymerase und Hüllproteine für ecotrope murine Retroviren kodiert (Ketteler <i>et al.</i> , 2002).

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 Plasmid-DNA Mini-Präparation

Zur Präparation von DNA in kleinem Maßstab wurden 2 ml-LB-Kulturen mit dem entsprechenden Antibiotikum mit einer Kolonie einer LB-Agar-Platte angeimpft und über Nacht bei 37°C und 1000 rpm im 2 ml-Reaktionsgefäß inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien bei 18000 g für 5 min abzentrifugiert und das Pellet in 100 µl S1-Puffer resuspendiert. Nach Zugabe von 200 µl S2-Puffer wurde das 2 ml-Reaktionsgefäß mehrmals invertiert und 5 min auf Eis inkubiert. 150 µl S3-Puffer wurden nun hinzugegeben und nochmals 10 min auf Eis inkubiert. Der Ansatz wurde 10 min bei 18000 g und 4°C zentrifugiert und der Überstand in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt. Hier wurden 900 µl eiskaltes 96%iges Ethanol dazugegeben und 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde erneut bei 18000 g und 4°C für 15 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und 500 µl 70%iges Ethanol auf das entstandene DNA-Pellet gegeben. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt bei 18000 g und 4°C für 5 min bis der Überstand abpipettiert werden konnte und das Pellet 20 min bei RT trocknete. Die so gefällte DNA wurde in 30 µl dH₂O resuspendiert.

2.2.1.2 Plasmid-DNA Midi-Präparation

Um größere Mengen Plasmid-DNA zu erhalten, wurden bei der Plasmid-DNA Midi-Präparation 100 ml-LB-Kulturen in einem 500 ml-Erlenmeyer-Kolben mit entsprechendem Antibiotikum mit einer Kolonie einer LB-Agar-Platte angeimpft und über Nacht bei 37°C und 140 rpm inkubiert. Die Kulturen wurden bei 4000 rpm und 4°C

für 15 min in 50 ml Reaktionsgefäßen zentrifugiert und die DNA wurde mithilfe des NucleoBond Xtra Midi/Maxi Kits von Macherey- Nagel, Düren nach dem Protokoll des Herstellers präpariert. Die erhaltenen DNA-Pellets wurden in 150 µl dH₂O resuspendiert.

2.2.1.3 Isolation und Reinigung von RNA aus Zellen

Zur Isolation und Reinigung von RNA wurde das Nucleospin RNA II Kit von Macherey- Nagel, Düren gemäß den Angaben des Herstellers verwendet. Es wurden jeweils 1x10⁷ Zellen für die Präparation verwendet. Die RNA wurde in 30 µl RNase freiem Wasser eluiert und die erhaltene Konzentration, wie in Abschnitt 2.2.1.4 beschrieben, gemessen.

2.2.1.4 Konzentrationsmessung von DNA und RNA

Die Konzentrationen von DNA und RNA wurden am Nanodrop ND-2000 von Peqlab, Erlangen gemessen. Der Quotient der Absorptionen bei 260 nm und 280 nm, diente als Maß für die Reinheit der Nukleinsäuren und war für DNA größer als 1,8 und für RNA größer als 2,0.

2.2.1.5 Synthese von cDNA mittels reverser Transkription (RT)

Zur Synthese von cDNA aus der isolierten RNA wurde folgender Ansatz 5 min bei 65°C inkubiert:

RNA	2 µg
oligo-dT-Primer	100 µM
ddH ₂ O	ad 13 µl

Nach dem Abkühlen auf Raumtemperatur wurden folgende Reagenzien hinzugegeben:

RT Puffer (5x)	4 µl
dNTP-Mix (10mM)	2 µl (≅ 1 mM)
Revert Aid Reverse Transkriptase	1 µl

Dieser Ansatz wurde 60 min bei 42°C und 10 min bei 70°C inkubiert.

2.2.1.6 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Um spezifische DNA-Sequenzen zu amplifizieren und z.B. in Expressionsplasmide zu klonieren, wurde die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) eingesetzt. Diese wurde unter Verwendung des Mastercycler (Eppendorf, Hamburg) durchgeführt. Der folgende Ansatz wurde für alle PCRs verwendet:

Ausgangs-DNA	100 ng
5'-Primer	0,2 mM
3'-Primer	0,2 mM
dNTPs	0,2 mM
PCR-Puffer (10x)	5 µl
Pfu-Polymerase	1 U
ddH ₂ O	ad 50 µl

Das folgende Programm wurde zum Ablauf der Reaktion verwendet:

95°C	5 min	
95°C	1 min	} 30 Zyklen
60°C	1 min	
72°C	1 min pro 500 bp	
72°C	7 min	

Um gezielt Mutationen in kodierende Sequenzen einzufügen, wurde ein Verfahren in zwei Schritten angewendet. Hierzu wurden vier Primer benötigt, von denen einer *upstream* und einer *downstream* der gewünschten Mutation band und zwei Primer, die komplementär zueinander und der zu mutierenden Region waren und in der Mitte die Mutation trugen. Zunächst wurde je eine PCR mit einem äußeren Primer und einem mutierten Primer durchgeführt. Als Vorlage diente die Ausgangs-cDNA. In der abschließenden, sogenannten *splicing by overlapping extensions* PCR (SOE-PCR), wurden je 1 µl der vorhergehenden PCRs als Vorlage eingesetzt und die beiden äußeren Primer verwendet. Das erhaltene Fragment wurde über Restriktionsschnittstellen, die *up-* und *downstream* der Mutation lagen erneut in die cDNA ligiert.

2.2.1.7 Quantitative Echtzeit-PCR (qPCR)

Die quantitative Echtzeit-PCR (qPCR) zur relativen Quantifizierung von mRNA wurde unter Verwendung des Fast SYBR® Green Master Mix von Life Technologies, Darmstadt nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Hierzu wurde die RNA, wie in Abschnitt 2.2.1.3 beschrieben, isoliert und, wie in Abschnitt 2.2.1.5 beschrieben, revers transkribiert.

Der folgende Ansatz wurde für die qPCR verwendet:

SYBR® Green Master Mix	12,5 µl
5'Primer (10 µM)	1 µl
3'Primer (10 µM)	1 µl
cDNA	≅ 50 ng Ausgangs-RNA
ddH ₂ O	ad 25 µl

Für die Durchführung der qPCR wurde das 7500 Real-Time-PCRSystems (Applied Biosystems, Warrington, UK) mit folgendem Temperaturprogramm verwendet:

95°C	10 min	} 40 Zyklen
95°C	15 s	
60°C	1 min	

Die Auswertung der relativen Quantifizierung mittels qPCR erfolgte mit Hilfe der komparativen Ct-Methode ($2^{-\Delta Ct}$) (Schmittgen und Livak, 2008), wobei alle Ergebnisse auf die endogene Kontrolle GAPDH bezogen wurden. Alle Messungen wurden in Triplikaten durchgeführt.

2.2.1.8 Restriktionsspaltung von DNA

Die enzymatische Spaltung von Plasmid-DNA und PCR-Fragmenten erfolgte mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen.

Zur Präparation von Vektoren für die Klonierung wurden 10 µg Vektor-DNA in einem Gesamtvolumen von 50 µl mit 10 U Enzym und dem entsprechendem Puffer versetzt und für 2 h oder über Nacht bei 37°C inkubiert. Zum Beenden der Reaktion wurde der Ansatz entweder mit dem Gel extraction/PCR clean up Kit von Macherey-Nagel, Düren nach dem Protokoll des Herstellers gereinigt oder DNA-Ladepuffer zugegeben und der Ansatz auf einem Agarosegel der Größe nach voneinander getrennt. PCR-Produkte, die für eine Klonierung verwendet werden sollten, wurden analog behandelt.

Für eine analytische Restriktionsspaltung wurden 0,5 µg Plasmid-DNA in 20 µl Gesamtvolumen mit je 1 U Restriktionsendonuklease und dem entsprechenden Puffer 2 h bei 37°C inkubiert.

2.2.1.9 Agarosegelelektrophorese

Für das Trennen von DNA-Fragmenten nach ihrer Größe mittels Agarosegelelektrophorese wurde das Horizontal Elektrophoresis System von Bio-Rad,

München verwendet. Die verwendeten Gele wurden mit 1% (m/V) Agarose in TAE Puffer hergestellt und 0,01% Ethidiumbromid zugegeben. DNA-Proben wurden vor dem Laden auf das Gel mit 6 x Orange DNA Loading Dye (Thermo Scientific, Waltham, USA) versetzt. Die Elektrophorese erfolgte bei einer konstanten Spannung von 100 V. Anschließend wurde das Bandenmuster mit dem Gel iX Imager von Intas, Göttingen dokumentiert. Als Größenmarker diente der GeneRuler 1 kb DNA Ladder von Thermo Scientific, Waltham, USA.

2.2.1.10 Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Für das Ausschneiden von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen wurden die Gele auf den UV-Tisch gelegt und die Fragmente mit einem Skalpell ausgeschnitten. Zur Extraktion der DNA aus dem Gel wurde das Gel extraction Kit von Macherey- Nagel, Düren gemäß den Angaben des Herstellers verwendet. Die DNA wurde in 30 µl ddH₂O von der Säule eluiert.

2.2.1.11 Ligation von DNA-Fragmenten

Zur Ligation von DNA-Fragmenten in die vorgesehenen Vektoren wurde die T4 DNA-Ligase von Thermo Scientific, Waltham, USA und der dazugehörige 10 x T4-Puffer verwendet. Gespaltener und dephosphorylierter Vektor und gespaltenes Insert wurden in einem molaren Verhältnis von 1:5 eingesetzt. Der Ligationsansatz hatte ein Gesamtvolumen von 20 µl und als Kontrolle diente ein Ansatz ohne Insert, um eine Religation des Vektors ausschließen zu können. Bei einer Ligation von *sticky ends* wurden die Ansätze 1 h bei RT inkubiert, bei *blunt end* Ligationen wurden zusätzlich 2 µl PEG 4000 in die Ansätze gegeben und über Nacht bei 4°C inkubiert.

2.2.1.12 Transformation von Plasmid-DNA in *E. coli*

Zur Transformation von Plasmid-DNA wurde ein 25 µl Aliquot chemisch kompetenter *Escherichia coli* XL-1 Blue Zellen verwendet. Dieses wurde auf Eis aufgetaut und anschließend 100 ng Plasmid-DNA oder 20 µl eines Ligationsansatzes hinzupipettiert. Der Ansatz wurde 5 min auf Eis inkubiert und die Hitzeschock-Transformation erfolgte bei 42°C für 30 s. Es folgte eine erneute Inkubation für 5 min auf Eis und die Zugabe von 500 µl LB-Medium ohne Antibiotikum in dem die Bakterien bei 37°C und 100 g 1 h inkubiert wurden. 150 µl dieses Ansatzes wurden auf einer Agar-Platte mit entsprechendem Antibiotikum ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.2.1.13 Sequenzierung

Alle cDNAs wurden vor der Verwendung von der Firma GATC Biotech AG, Köln sequenziert. Soweit nicht anders angegeben wurde der firmeneigene T7-Primer hierfür verwendet.

2.2.2 Zellbiologische Methoden

2.2.2.1 Kultivierung

Alle Zelllinien wurden in DMEM *High Glucose* (4,5 g/l) Medium (Life Technologies, Darmstadt) mit 10% fötalem Kälberserum (Life Technologies, Darmstadt) und 1% Penicillin/Streptomycin (Life Technologies, Darmstadt) (im Folgenden als DMEM +/- bezeichnet) in 10 cm Zellkulturschalen kultiviert. Zur Subkultivierung wurden adhärenente Zellen einmal mit PBS gewaschen und mit 1 ml Trypsin/EDTA (Life Technologies, Darmstadt) für 5 min bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden anschließend in DMEM +/- resuspendiert, bei 1200 g für 5 min zentrifugiert und das Pellet erneut resuspendiert. HepG2 Zellen wurden bei der Subkultivierung 1:3 verdünnt, HEK293, HeLa und COS7 Zellen 1:10 und MEFs 1:50. Alle Zelllinien wurden zweimal pro Woche subkultiviert.

Die Suspensionszelllinie Ba/F3-gp130 und alle daraus generierten Zelllinien wurden subkultiviert, indem einmal pro Woche 1 µl der Zellsuspension in eine neue 10 cm Zellkulturschale mit 10 ml DMEM +/- und entsprechendem Zytokin überführt wurde.

2.2.2.2 Kryokonservierung

Um Zelllinien zu konservieren, wurden sie bei -80°C, oder über längere Zeiträume in flüssigem Stickstoff eingefroren. Hierzu wurden die Zellen von konfluenten 10 cm Kulturschalen mit Trypsin/EDTA abgelöst, bei 1200 g für 5 min zentrifugiert und das Pellet in DMEM mit 30% FCS und 10% DMSO resuspendiert. Diese Zellsuspension wurde in Kryoröhrchen von VWR, Radnor, USA gegeben und im Einfrierbehälter Mr. Frosty von Thermo Scientific, Waltham, USA, der mit Isopropanol gefüllt war, bei -80°C eingefroren.

2.2.2.3 Transiente Transfektion

Die transiente Transfektion von Zellen wurde mithilfe von TurboFect *Transfection Reagent* (Thermo Scientific, Waltham, USA) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Hierzu wurden 2×10^6 HEK293, 5×10^5 COS7, 6×10^5 HepG2 Zellen oder

7×10^5 MEFs in 10 cm Zellkulturschalen ausgesät. Am nächsten Tag wurden in 1 ml DMEM ohne Zusätze 5 µg Plasmid-DNA gemischt und 10 µl TurboFect zugegeben. Dieser Ansatz wurde 15 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend auf die Zellen getropft. Für die Transfektion von HepG2 Zellen und MEFs wurden 15 µl TurboFect bei gleicher Menge DNA eingesetzt und zusätzlich ein Mediumwechsel auf 4 ml DMEM+/- vor der Transfektion durchgeführt. 48 h nach Transfektion wurde die Proteinexpression analysiert oder Stimulationsexperimente durchgeführt.

Da die Transfektion der Jak1-defizienten MEFs mit TurboFect sehr ineffizient war, wurde für diese Zellen ein anderes Transfektionsreagenz verwendet. Für die Transfektion mit jetPRIME (Polyplus transfection SA, Illkirch, Frankreich) wurden 1×10^6 MEF pro 10 cm Kulturschale ausgesät und 24 h später 500 µl jetPRIME Puffer mit 10 µg DNA versetzt. Es wurden 20 µl jetPRIME Reagenz zugefügt und 10 min bei RT inkubiert. Der Ansatz wurde auf die Zellen getropft und das Medium nach 5 h gewechselt.

Die Transfektion von Phoenix-Eco Zellen erfolgte in 6-Loch-Platten nachdem am Vortag 8×10^5 Zellen pro Loch ausgesät worden waren. 1 µg Plasmid-DNA wurde in 200 µl DMEM ohne Zusätze versetzt und 2 µl TurboFect zugegeben. Der Ansatz wurde 15 min bei RT inkubiert und auf die Zellen getropft. Nach 6 h erfolgte ein Mediumwechsel. Der Zellkulturüberstand wurde nach 24 h für die retrovirale Transduktion von Ba/F3-gp130 Zellen verwendet (s. Abschnitt 2.2.2.4).

2.2.2.4 Retrovirale Transduktion

Die retrovirale Transduktion von Ba/F3-gp130 Zellen wurde unter Verwendung des Zellkulturüberstands transient transfizierter Phoenix-Eco-Zellen nach Ketteler *et al.*, 2002 durchgeführt. Hierzu wurde der Phoenix-Eco-Zellkulturüberstand 24 h nach Transfektion mit pMOWS-Plasmiden (s. Abschnitt 2.2.2.3) 5 min bei 18000 g und 4°C zentrifugiert, um Zellreste zu entfernen. 250 µl dieses Überstands wurden mit 50 µl einer Ba/F3-gp130-Zellsuspension (2×10^6 Zellen/ml) gemischt und 3 µl Polybren zugegeben. Der Ansatz wurde 2 h bei 20°C und 350 g zentrifugiert. Das erhaltene Zellpellet wurde in 5 ml DMEM+/- resuspendiert und die Zellen in einem Loch einer 6-Loch-Platte 48 h mit 10 ng/ml Hyper-IL-6 kultiviert. Zur Selektion stabil transduzierter Zellen wurden die Zellen anschließend mindestens zwei Wochen in Anwesenheit von 1,5 µg/ml Puromycin kultiviert. Die Zellen, die mit dem LIFR transduziert worden waren, wurden im Anschluss mit 10 ng/ml LIF oder CT-1 statt mit Hyper-IL-6 kultiviert.

2.2.2.5 Zytokinstimulation und Behandlung mit Inhibitoren

Um Zellen mit Zytokinen zu stimulieren und die induzierte Signaltransduktion zu analysieren, wurden 4×10^5 MEFs, 3×10^5 HeLa, 6×10^5 NIH3T3, oder $7,5 \times 10^5$ HepG2

Zellen pro Loch einer 6-Loch-Platte ausgesät. Am nächsten Tag wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und anschließend 1 ml DMEM ohne Zusätze in jedes Loch pipettiert. Die Zellen wurden 5 h bei 37°C inkubiert, um die basale Signaltransduktion auf ein Minimum zu reduzieren und anschließend mit Zytokinen in der angegebenen Konzentration stimuliert. Dies erfolgte, soweit nicht anders angegeben für 15 min bei 37°C.

Für die Stimulation von Ba/F3-gp130 Zellen und daraus resultierenden Zelllinien wurden diese bei 1200 g für 5 min zentrifugiert und ebenfalls zweimal in PBS gewaschen. Die Zellen wurden auf eine Dichte von 2×10^6 Zellen/ml DMEM eingestellt und je 1 ml in ein Loch einer 12-Loch-Platte gegeben. Vor der Stimulation wurden sie 3 h bei 37°C gehungert. Die Stimulation erfolgte mit den angegebenen Zytokinkonzentrationen für 15 min bei 37°C soweit nicht anders angegeben.

Die Vorinkubation mit 100 μ M TBB erfolgte in den meisten Fällen 90 min vor der Zytokinzugabe. Bei MEFs wurde TBB mit einer Konzentration von 75 μ M eingesetzt. Als Kontrolle diente die Behandlung mit dem Lösungsmittel DMSO in vergleichbarer Menge. Nach der Behandlung wurden die Zellen in pSTAT3-Lysepuffer lysiert (s. Abschnitt 2.2.3.1). Ba/F3-gp130 Zellen wurden lediglich abzentrifugiert (18000 g, 4°C, 5 min) und in 60 μ l Lämmli-Puffer 10 min bei 95°C aufgeköcht.

2.2.2.6 Proliferationsassay

Zur Messung der Proliferation wurden Zellen ausgesät und unter verschiedenen Stimulationsbedingungen 48 h inkubiert, wobei anschließend die Viabilität mithilfe des Cell titer blue cell viability Assays (Promega, Mannheim) bestimmt wurde. Dieses Reagenz enthält den Redoxfarbstoff Resazurin, der von lebenden Zellen in den fluoreszierenden Farbstoff Resorufin umgewandelt wird, was hier als Maß für die Zahl an lebenden Zellen verwendet wurde und damit indirekt die Stärke der Proliferation im Inkubationszeitraum widerspiegelte.

Zunächst wurden 5×10^3 Ba/F3-gp130 Zellen oder daraus generierte Zelllinien pro Loch einer 96-Loch-Platte in 100 μ l DMEM+/+ ausgesät und die jeweiligen Stimulantien zugegeben. Die Zellen wurden zuvor zweimal in PBS gewaschen. Nach 48 h bei 37°C und 5% CO₂ wurden 20 μ l Cell titer blue Reagenz in jedes Loch pipettiert und das Signal am Tecan infinite M200 PRO reader von Tecan, Crailsheim (Anregung 560 nm, Emission 590 nm) mit der i-control 1.7 Software gemessen. Die Messungen erfolgten jeweils in Triplikaten nach 0 und 60 min und die Differenz wurde als RLU (*relative light units*) +/- Standardabweichung angegeben. Gezeigt wurde jeweils ein Experiment von mindestens drei durchgeführten.

2.2.3 Proteinbiochemische Methoden

2.2.3.1 Lyse von Zellen

48 h nach Transfektion oder nach Stimulation der Zellen wurde das Zellkulturmedium abgesaugt, 1 ml eiskaltes PBS in jedes Loch gegeben und die Kulturschalen auf Eis gestellt. Die Zellen wurden mit einem Zellkulturschaber auf Eis abgeschabt oder in PBS resuspendiert und anschließend in ein 1,5-ml-Reaktionsgefäß überführt. Nach Zentrifugation für 5 min bei 4°C und 18000 g wurde der Überstand entfernt und das Zellpellet in 75 µl (Loch einer 6-Loch-Platte) oder 250 µl (10 cm Kulturschale) Lysepuffer resuspendiert. Zur Analyse von Phosphorylierungen im Western Blot wurde stattdessen pSTAT3-Lysepuffer verwendet. Die Lysate wurden 30 min auf Eis inkubiert und anschließend erneut bei 18000 g und 4°C für 15 min zentrifugiert, um Zelltrümmer zu entfernen. Der Überstand wurde in ein neues 1,5-ml-Reaktionsgefäß überführt und bei -20°C gelagert.

2.2.3.2 Bestimmung des Gesamtproteingehalts mittels BCA

Zur Bestimmung des Gesamtproteingehaltes von Zelllysaten wurde das BCA Protein Assay Kit von Thermo Fisher Scientific gemäß den Anweisungen des Herstellers verwendet. Die Lysate wurden 1:10 in Wasser verdünnt und 25 µl pro Loch einer 96-Loch-Platte in Doppelwerten aufgetragen. Reagenz A und Reagenz B wurden im Verhältnis 50:1 gemischt und 200 µl in jedes Loch gegeben. Nach 30 min bei 37°C wurde die Absorption bei 562 nm am Infinite M200 PRO Microplate Reader von Tecan (Maennedorf, Schweiz) gemessen und die Proteinkonzentration mithilfe einer BSA-Standardgerade berechnet.

2.2.3.3 Präzipitation von Proteinen aus Zelllysaten

Um überexprimierte Proteine aus Zelllysaten zu präzipitieren, wurde zunächst die kodierende Sequenz für die Fc-Region des humanen IgG1 in 3' der kodierenden Sequenzen für die jeweiligen Proteine in die Plasmide kloniert. Das überexprimierte Fusionsprotein konnte auf diese Weise mit Protein-A-Agarose präzipitiert werden.

Hierfür wurden COS7-Zellen, wie in Abschnitt 2.2.2.3 beschrieben, in 10 cm Kulturschalen transfiziert und nach 48 h nach zweimaligem Waschen mit PBS in 250 µl IP-Puffer lysiert (2 h, 4°C). Nach einer Zentrifugation für 3 min bei 100 g und 4°C wurde der Überstand in ein neues 1,5 ml-Reaktionsgefäß gegeben. 50 µl des Lysats wurden mit Lämmli-Puffer aufgekocht und dienten später als *Input*-Kontrolle. Der Rest wurde mit 75 µl Protein-A-Agarose (Thermo Scientific, Waltham, USA) versetzt. Diese wurde vorher

zweimal in IP-Puffer gewaschen. Der Ansatz wurde 4 h bei 4°C inkubiert und die Agarose anschließend fünfmal in IP-Puffer gewaschen (100 µl, 4°C, 5 min). Sie wurde in 50 µl Lämmli-Puffer aufgekocht.

2.2.3.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Trennung von Proteinen nach ihrer Größe aus Zelllysaten vor dem Transfer auf eine PVDF-Membran wurde mithilfe einer diskontinuierlichen Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli, 1970 durchgeführt. Hierfür wurde das Horizontal Elektrophoresis System von Bio-Rad, München verwendet. Die Gele wurden mit einer Dicke von 1,5 mm und mit 10 Probenfächern hergestellt. Die aufgetragenen Proben bestanden aus Zelllysaten oder Zellkultur-Überständen, die mit Lämmli-Puffer 10 min bei 95°C aufgekocht wurden. Als Größenmarker diente der PageRuler Prestained Protein Ladder von Thermo Scientific, Waltham, USA. Die Trennung in den auspolymerisierten Gelen erfolgte bei einer Spannung von 90 – 120 V.

2.2.3.5 Western Blot

Zum Transfer der in der SDS-PAGE voneinander getrennten Proteine auf eine PVDF-Membran wurde das *semi-dry* Western Blot Verfahren angewendet. Hierzu wurde das Trans-Blot® Turbo™ Transfer System von Bio-Rad, München nach Herstellerangaben verwendet.

Die PVDF-Membran von Carl Roth GmbH, Karlsruhe wurde 1 min in Methanol aktiviert, in Transferpuffer gewaschen und auf Filterpapier von Bio-Rad, München, das in Transferpuffer getränkt war, gelegt. Das Acrylamidgel wurde nach der Auftrennung ebenfalls in Transferpuffer gewaschen und auf die Membran gelegt. Abschließend wurde ein weiteres Stück Filterpapier auf das Gel gelegt und eventuell vorhandene Luftblasen ausgestrichen. Die Proteine wurden bei einer konstanten Spannung von 25 V und einer maximalen Stromstärke von 1 A 40 min transferiert. Die Membranen mit den transferierten Proteinen wurden in TBS-T gewaschen und 1 h bei RT oder über Nacht bei 4°C in Blocking Puffer inkubiert. Hierzu wurden die Membranen in einem 50 ml-Reaktionsgefäß auf einen Rollmischer gelegt. Die Inkubation mit den Primärantikörpern erfolgte anschließend bei 4°C über Nacht, wobei die Antikörper 1:1000 in Blocking Puffer verdünnt wurden, außer anti-SOCS3 (M-20), der 1:200 verdünnt wurde. Die Antikörper gegen phosphorylierte Antigene wurden 1:1000 in 5% (m/V) BSA in TBS-T verdünnt. Nach der Inkubation mit dem Primärantikörper wurden die Membranen dreimal in TBS-T gewaschen und 1 h bei RT mit dem Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper, der 1:5000 in Blocking Puffer verdünnt wurde, inkubiert.

Die Detektion der Chemilumineszenz erfolgte nach dreimaligem Waschen in TBS-T mit Hilfe des ECL Prime Western Blotting Detection Reagent von GE Healthcare, München am ChemoCam Imager von Intas, Göttingen.

Um verschiedene Primärantikörper für die Detektion von Proteinen auf derselben Membran einsetzen zu können, wurden die Membranen nach der ersten Detektion 30 min bei 60°C mit Stripping-Puffer inkubiert. Das enthaltene β -Mercaptoethanol zerstört durch seine reduzierende Wirkung die Disulfidbrücken in den verwendeten Antikörpern und diese lassen sich so von der Membran waschen. Die Membranen wurden dreimal in TBS-T gewaschen und erneut, wie beschrieben, mit Antikörpern inkubiert und detektiert.

3 ERGEBNISSE

3.1 *Trans*-Signaltransduktion der IL-27-Untereinheit p28 (IL-30) über den IL-6R und ein gp130-Homodimer

3.1.1 Klonierung und Expression eines IL-6R-p28 Fusionskonstruktes

Der Rezeptorkomplex für IL-6 besteht aus einem gp130-Homodimer und dem membranständigen IL-6R. Die Aktivierung dieses Komplexes durch IL-6 wird als klassische Signaltransduktion bezeichnet. Der IL-6R kann aber auch in löslicher Form vorliegen, aufgrund von alternativem Spleißen und vor allem durch konstitutives und induziertes *shedding*. Die IL-6-vermittelte Signaltransduktion über den löslichen IL-6R wird als *trans*-Signaltransduktion bezeichnet (Rose-John und Heinrich, 1994). Das Serumlevel des löslichen IL-6R liegt beim gesunden Menschen bei 10-50 ng/ml und kann bei Entzündungen und Infektionen ansteigen (Honda *et al.*, 1992).

Da p28 den Rezeptorkomplex aus einem gp130 Homodimer und dem membrangebundenen IL-6R aktivieren kann (Crabé *et al.*, 2009), lag es nah, dass es auch den löslichen IL-6R binden und damit *trans*-Signaltransduktion vermitteln kann. Fusionsproteine aus z. B. IL-6 und dem löslichen IL-6R aktivieren effizient gp130-Homodimere (Fischer *et al.*, 1997). Daher sollte hier ein Fusionskonstrukt aus p28 und dem löslichen IL-6R erstellt werden, um zu untersuchen, ob p28, wie IL-6, *trans*-Signaltransduktion über den löslichen IL-6R induzieren kann.

Ein Schema der Klonierung von sIL-6R-p28 ist in Abbildung 3.1 dargestellt. Die kodierende Sequenz von p28 wurde mittels PCR aus einem Hyper-IL-27-Fusionskonstrukt in pcEP amplifiziert, wobei in 5' eine AgeI Schnittstelle und in 3' ein Stop-Codon, eine NotI und eine SacI Schnittstelle eingefügt wurden. Das PCR-Produkt wurde gereinigt und mit AgeI und SacI gespalten. Die für IL-6 kodierende Sequenz wurde in 5' mit AgeI und in 3' mit SacI aus einem Hyper-IL-6-Konstrukt in pcRScript ausgeschnitten und der Vektor dephosphoryliert, bevor er mit dem p28-Fragment ligiert wurde. Hierdurch entstand ein Fusionskonstrukt aus den drei extrazellulären Domänen des IL-6R, dem Peptidlinker aus Hyper-IL-6 (Fischer *et al.*, 1997, RGGGGSGGGGSVEPV) und p28. Das daraus erhaltene Plasmid wurde als pcRScript-sIL-6R-p28 bezeichnet.

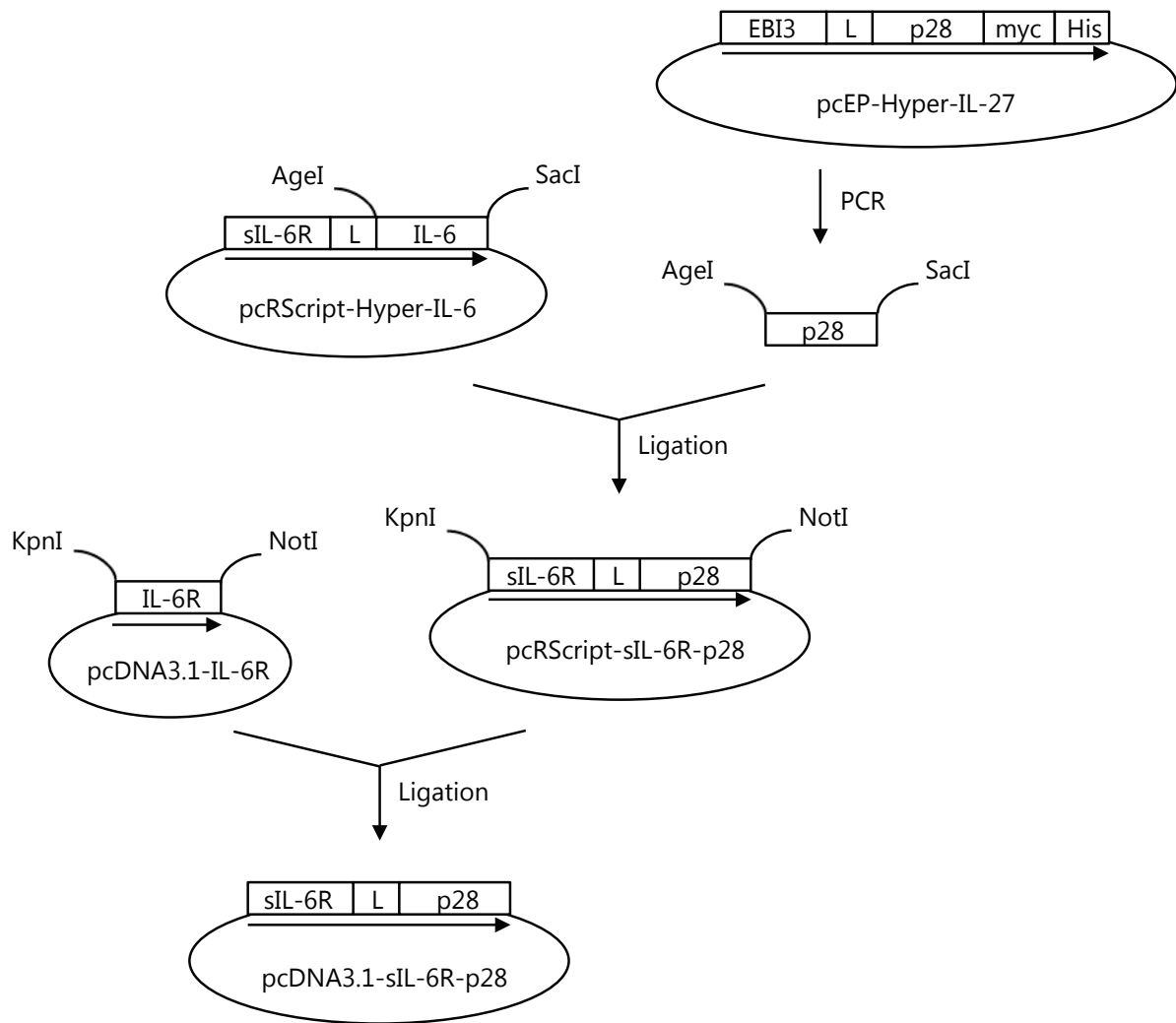


Abbildung 3.1: Klonierungsschema für die Generierung des sIL-6R-p28-Fusionskonstrukts. Die Details der Klonierung sind in Abschnitt 3.1.1 beschrieben.

Um das Fusionskonstrukt in COS7 Zellen zu exprimieren, wurde die gesamte kodierende Sequenz mithilfe der Restriktionsenzyme KpnI und NotI in den Expressionsvektor pcDNA3.1 umklont und der erhaltene Vektor wurde pcDNA3.1-sIL-6R-p28 genannt. Das Fusionskonstrukt sIL-6R-p28 wurde durch Transfektion von pcDNA3.1-sIL-6R-p28 in COS7 Zellen exprimiert, um die konditionierten Überstände für die Analyse der Signaltransduktion durch dieses Hyper-Zytokin zu verwenden. Hierfür wurden 5×10^5 COS7 Zellen in 10 cm Kulturschalen ausgesät und nach 24 h mit 5 μ g Plasmid-DNA transfiziert. Als Kontrollen dienten die Transfektionen mit den Plasmiden peGFP-N1 und pcEP-Hyper-IL-27. Nach weiteren 48 h wurde der Überstand sterilfiltriert und die Zellen lysiert. Der Nachweis der Expression und Sekretion in den Überstand erfolgte per Western Blot. In Abbildung 3.2 A wurde der Western Blot mithilfe eines α -myc Antikörpers entwickelt. Hyper-IL-27 wurde in den COS7 Zellen exprimiert und auch in den Zellkulturüberstand sezerniert. Das Gleiche galt für das Fusionskonstrukt aus dem löslichen IL-6R und p28, was in Abbildung 3.2 B durch Detektion gegen den IL-6R

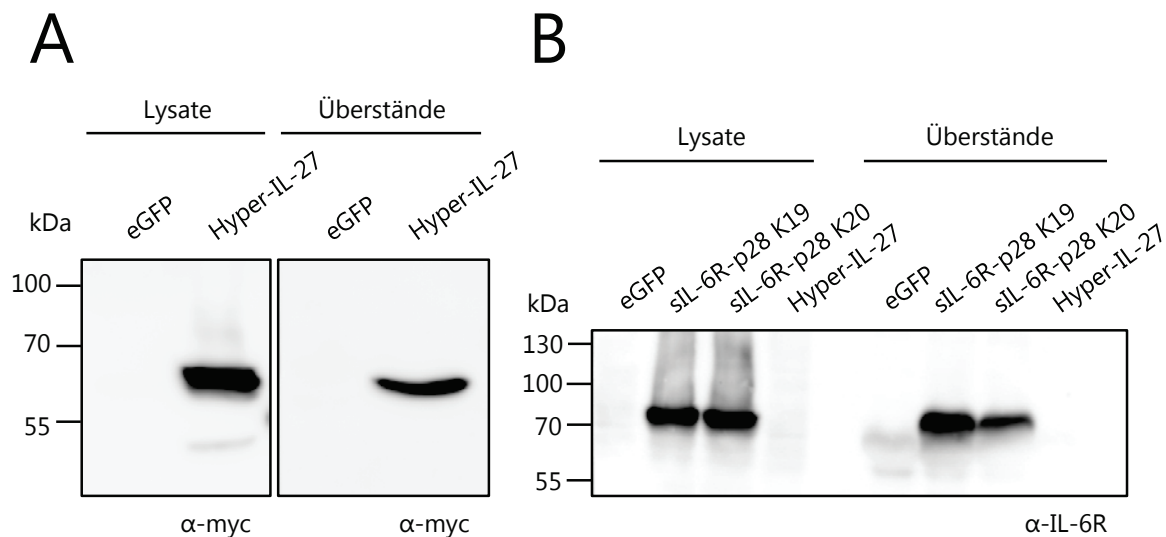


Abbildung 3.2: Expression und Sekretion von sIL-6R-p28 in COS7 Zellen. Die angegebenen Konstrukte wurden in COS7 Zellen transfiziert und die Expression nach 48 h und Trennung der Proteine auf einem 10% SDS-Gel im Western Blot untersucht. Zur Detektion wurde in (A) ein myc-Tag-spezifischer Antikörper und in (B) ein spezifischer Antikörper gegen den IL-6R eingesetzt.

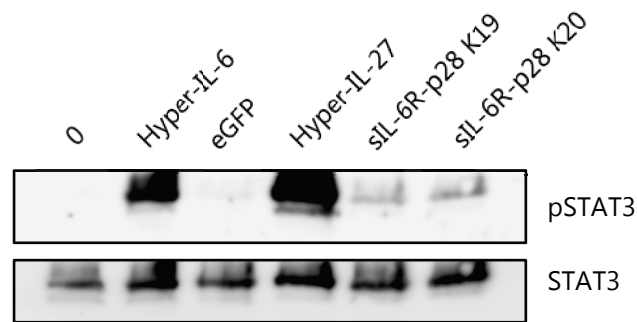
dargestellt ist. Zwei verschiedene Klone des Konstruktes wurden exprimiert und zeigten auch bei Auftragen der Überstände auf das SDS-Gel eine distinkte Bande im Western Blot bei ca. 80 kDa. Die sichtbaren Banden traten weder bei GFP- noch bei Hyper-IL-27-Transfektion auf.

Die so gewonnen konditionierten Überstände wurden im folgenden Abschnitt zur Stimulation von Zellen verwendet.

3.1.2 sIL-6R-p28 induziert STAT3-Phosphorylierung und Proliferation in Ba/F3-gp130 Zellen

Um zu testen, ob das Hyper-Zytokin aus dem löslichen IL-6R und p28 in der Lage ist, Signaltransduktion zu induzieren, wurden Ba/F3-gp130 Zellen verwendet. Ba/F3-Zellen sind eine Zelllinie aus murinen pro-B-Zellen, die aus der IL-6-Familie lediglich den Rezeptor WSX-1 exprimieren und nur in Anwesenheit von IL-3 proliferieren. Auf Zytokinentzug reagieren diese Zellen mit Apoptose (Chalaris *et al.*, 2007). Sie sind ein ideales Werkzeug, um die Signaltransduktion von Zytokinen zu untersuchen, da ihre Proliferation von der Wirkung der Wachstumsfaktoren abhängt. Diese Zellen können retroviral mit den benötigten Rezeptoren transduziert werden (Gearing *et al.*, 1994) und wachsen dann auch in Anwesenheit anderer Zytokine oder Wachstumsfaktoren. Die hier verwendeten Zellen wurden zusätzlich bereits retroviral mit dem Rezeptor gp130 transduziert (Ba/F3-gp130).

A



B

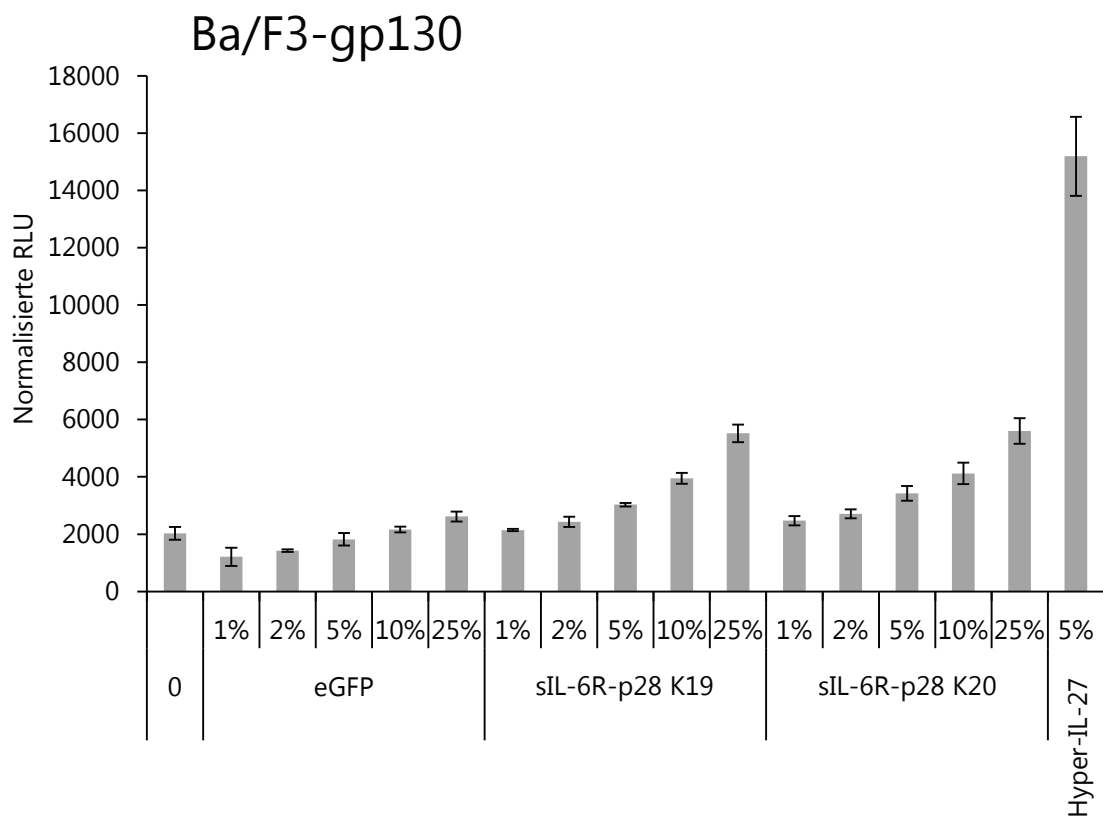


Abbildung 3.3: STAT3-Phosphorylierung und Proliferation von Ba/F3-gp130 Zellen durch sIL-6R-p28. (A) Western Blot Analyse der STAT3-Phosphorylierung nach Stimulation von Ba/F3-gp130 Zellen mit konditionierten Überständen von COS7 Zellen oder 10 ng/ml rekombinantem Hyper-IL-6. (B) Proliferationsassay mit Ba/F3-gp130 Zellen. Die Stimulation erfolgte mit konditionierten Überständen von COS7 Zellen in den angegebenen prozentualen Anteilen am Gesamtvolumen über 48 h bei 37°C. Die Proliferation wurde wie in Abschnitt 2.2.2.6 angegeben bestimmt.

Zur Detektion der Signaltransduktion wurden die Zellen mit konditionierten Überständen stimuliert, die Phosphorylierung von STAT3 im Western Blot analysiert und zusätzlich das Wachstum der Zellen im Proliferationsassay in Abhängigkeit der verschiedenen Zytokine gemessen.

Zur Analyse der STAT3-Phosphorylierung wurden die Ba/F3-gp130 Zellen zunächst dreimal in PBS gewaschen und anschließend 6 h in serumfreiem DMEM gehungert. Die

Zellen wurden dann in 500 µl konditioniertem Überstand oder in 500 µl DMEM mit 10 ng/ml Hyper-IL-6 resuspendiert und für 15 min bei 37°C stimuliert. Anschließend wurden sie in pSTAT3-Lysepuffer lysiert und 50 µg des Gesamtproteins auf ein 10%iges SDS-Gel aufgetragen. Bei Stimulation mit konditioniertem Überstand von GFP-transfizierten Zellen und ohne Stimulation konnte im Western Blot kein Signal mit dem phosphospezifischen Antikörper gegen STAT3 (pTyr⁷⁰⁵) nachgewiesen werden. Die Behandlung mit 10 ng/ml rekombinantem Hyper-IL-6 löste dagegen eine starke Phosphorylierung von STAT3 aus, ebenso wie die Stimulation mit Hyper-IL-27 aus konditioniertem Überstand (Abbildung 3.3 A). Interessanterweise löste auch die Stimulation mit sIL-6R-p28-Überstand eine Aktivierung von STAT3 aus, die allerdings wesentlich schwächer ausfiel, als die Aktivierung in den Positivkontrollen. Das Expressionslevel von STAT3 war in allen Proben vergleichbar.

In Abbildung 3.3 B ist das Ergebnis eines Proliferationsassays mit Ba/F3-gp130 Zellen und den konditionierten Überständen mit sIL-6R-p28 gezeigt. Hierfür wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und 5×10^3 Zellen pro Loch einer 96-Loch-Platte in Kulturmedium ausgesät. Anschließend wurden die Stimulanzen zugegeben und die Zellen in 100 µl Endvolumen 48 h bei 37°C inkubiert. Alle Werte wurden in Dreifachbestimmungen ermittelt. Die Auswertung erfolgte mithilfe des Cell titer blue reagent von Promega, Mannheim. Bei ansteigender Konzentration von sIL-6R-p28 konnte eine ebenfalls ansteigende Proliferation gemessen werden. Im Vergleich zur Proliferation in Abhängigkeit von IL-27, fiel diese aber eher gering aus. 5% des mit IL-27 konditionierten Überstands induzierten eine mehr als doppelt so starke Proliferation, wie 25% sIL-6R-p28 konditionierter Überstand.

Das Fusionsprotein sIL-6R-p28 löste also in hohen Konzentrationen eine, wenn auch schwache Aktivierung des Jak-STAT-Signalweges und als Resultat Zellproliferation aus.

3.1.3 Der Rezeptor für sIL-6R-p28 ist ein gp130-Homodimer

Da gezeigt werden konnte, dass p28 nicht nur über EBI3, sondern auch über den α -Rezeptor IL-6R Signaltransduktion induzieren kann, sollte nun die Zusammensetzung der β -Rezeptoren im Rezeptorkomplex untersucht werden. IL-27 (p28/EBI3) signalisiert über ein Heterodimer aus gp130 und WSX-1 (Pflanz *et al.*, 2004), während IL-6 mit dem IL-6R ein gp130-Homodimer rekrutieren kann (Murakami *et al.*, 1993). Lösliches gp130 ist ein natürlicher Inhibitor der *trans*-Signaltransduktion über gp130-Homodimere. Mit rekombinantem sgp130Fc lässt sich also eine Hyper-IL-6-induzierte Signaltransduktion inhibieren (Jostock *et al.*, 2001), nicht aber die durch IL-27 induzierte (Scheller *et al.*, 2005). Um zu untersuchen, ob sIL-6R-p28-induzierte STAT-Aktivierung durch sgp130Fc inhibierbar ist, wurden Ba/F3-gp130 Zellen dreimal mit PBS gewaschen und 6 h in DMEM ohne Zusätze gehungert, bevor sie für 15 min bei 37°C

mit konditionierten Überständen stimuliert wurden. Wo angegeben, wurden diese Überstände 30 min bei 37°C mit sgp130-Fc vorinkubiert, damit sich der Komplex aus Zytokin und Rezeptor bilden konnte.

Eine Inkubation der Zellen mit IL-27- oder sIL-6R-p28-Überständen induzierte eine STAT3-Phosphorylierung, die wie zuvor bei IL-27 wesentlich stärker war. Die STAT3-Aktivierung durch sIL-6R-p28 war nicht zu beobachten, wenn der Überstand mit sgp130Fc vorinkubiert wurde (Abbildung 3.4 A). Im Proliferationsassay zeigte sich nach 48 h ebenfalls eine dosisabhängige Inhibition der sIL-6R-p28-induzierten Proliferation durch sgp130Fc (Abbildung 3.4 B). Aufgrund der langen Inkubationszeit wurde in diesem Experiment auf eine Vorinkubation mit sgp130Fc verzichtet, sondern der lösliche Rezeptor zeitgleich mit dem Zytokin zu den Zellen gegeben.

Beide Experimente waren ein erster Hinweis darauf, dass die Signaltransduktion von sIL-6R-p28 möglicherweise über ein gp130-Homodimer abläuft, da sgp130Fc eine hohe Affinität zu Zytokinen aufweist, die ein gp130-Homodimer binden, aber eine niedrige für solche, die ein Heterodimer binden, wie IL-27. Da die Signaltransduktion von sIL-6R-p28 durch sgp130Fc unterbunden wurde, spricht dies für ein Homodimer als Rezeptor.

Um weitere Hinweise zu sammeln, sollte eine Zelllinie gefunden werden, die zwar gp130, aber kein WSX-1 exprimiert. Zu diesem Zweck wurden verschiedene Zelllinien mittels quantitativer Echtzeit-PCR auf die Expression von WSX-1 mRNA getestet und zusätzlich ihre Responsivität auf IL-27 im Western Blot analysiert. Wie in Abbildung 3.5 dargestellt, exprimierten HEK293 Zellen geringe Mengen an WSX-1 mRNA im Gegensatz zu Ba/F3-gp130 Zellen, die wesentlich mehr WSX-1 mRNA jeweils im Verhältnis zu GAPDH aufwiesen. NIH3T3 exprimierten nur ungefähr ein Zehntel der mRNA-Menge in HEK293 im Verhältnis zu GAPDH. Entscheidend war aber, ob die Zellen den funktionalen

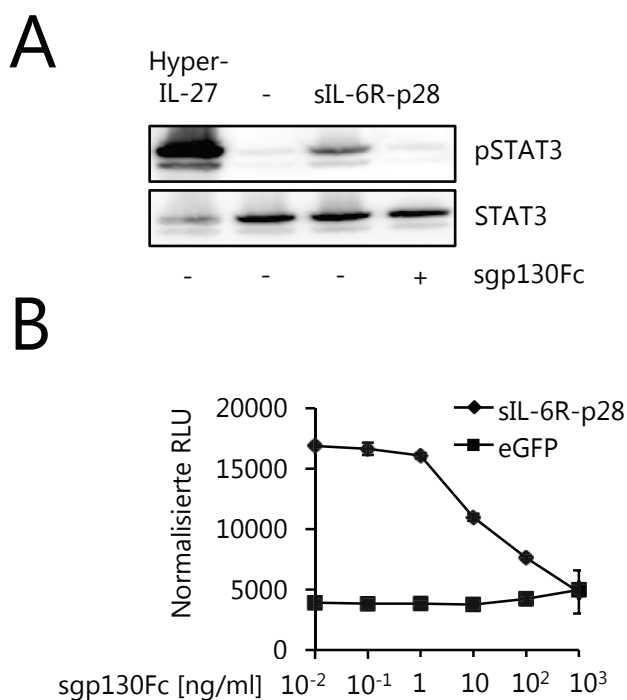


Abbildung 3.4: p28 *trans*-Signaltransduktion wird durch sgp130Fc inhibiert. (A) Ba/F3-gp130 wurden 6 h gehungert und 15 min mit konditionierten Überständen von transient transfizierten COS7 Zellen stimuliert. Wo angegeben wurden die Überstände 30 min bei 37°C mit 100 ng/ml sgp130Fc vorinkubiert. 50 µg Gesamtprotein wurden auf ein SDS-Gel geladen und die STAT3-Phosphorylierung mittels Western Blot analysiert. Zur Detektion wurde ein STAT3- und ein phospho-spezifischer (Y⁷⁰⁵) STAT3-Antikörper verwendet. (B) Proliferationsassay von Ba/F3-gp130 Zellen mit sIL-6R-p28 und sgp130Fc (0,01-1000 ng/ml). Das Protokoll ist in Abschnitt 2.2.2.6 beschrieben.

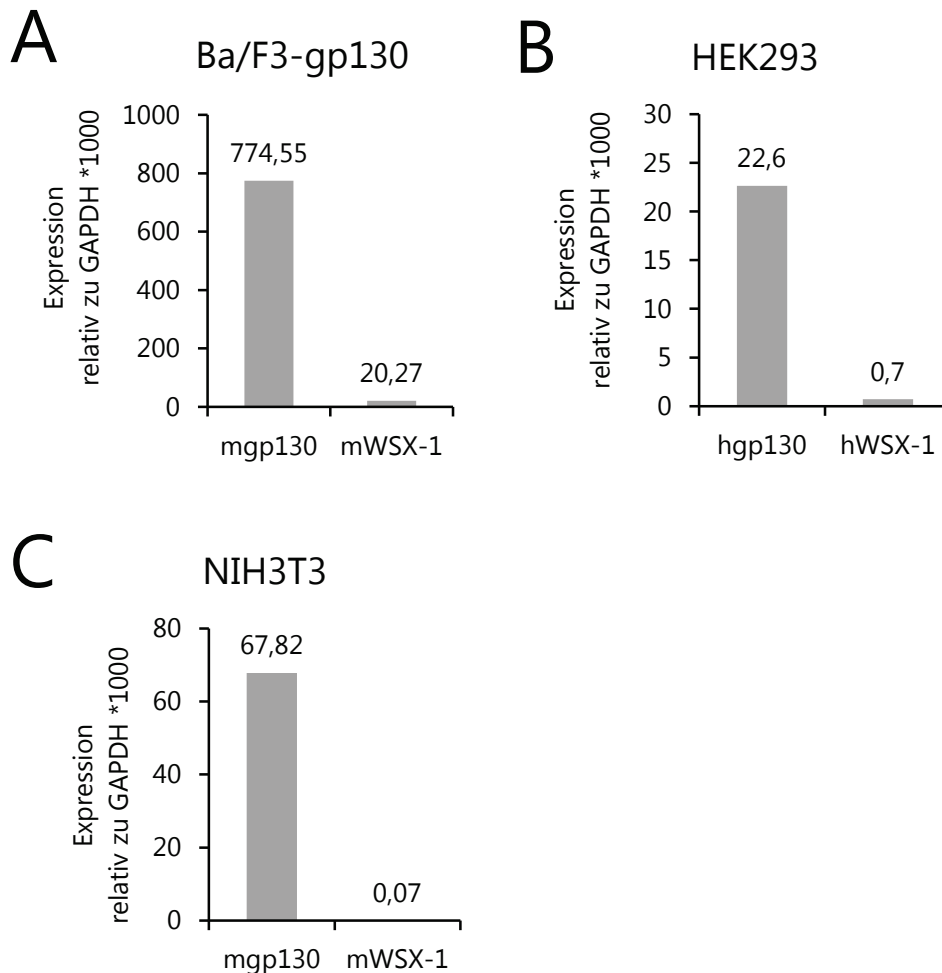


Abbildung 3.5: Gp130- und WSX-1-Expression in Ba/F3-gp130, HEK293 und NIH3T3 Zellen. (A) Quantitative Echtzeit-PCR in Ba/F3-gp130 Zellen von gp130 und WSX-1. Hierfür wurde RNA isoliert und jeweils 2 µg davon in cDNA umgeschrieben. Für die qPCR wurde eine cDNA Menge verwendet, die 50 ng Ausgangs-mRNA entsprach. Dargestellt ist jeweils $2^{(-\Delta C_t)} \times 1000$ relativ zu GAPDH als endogener Kontrolle. (B) Das gleiche Experiment wie in (A) wurde mit HEK293 Zellen durchgeführt. (C) In NIH3T3 Zellen wurden wie in (A) die Expressionslevel von gp130 und WSX-1 bestimmt.

Rezeptor trugen. Um dieses herauszufinden, wurden HEK293 und NIH3T3 Zellen, nachdem sie über Nacht in DMEM ohne Zusätze gehungert worden waren, mit 10 ng/ml Hyper-IL-6 oder 10% konditioniertem Überstand mit Hyper-IL-27 von COS7 Zellen für 15 min stimuliert. HEK293 Zellen zeigten eine Phosphorylierung von STAT3 durch Hyper-IL-27, die im Vergleich zu Hyper-IL-6 schwächer war, während IL-27 in NIH3T3 Zellen keine STAT3-Aktivierung im Gegensatz zu Hyper-IL-6 auslöste (Abbildung 3.6 A). Daraus wurde geschlossen, dass NIH3T3 Zellen zwar sehr geringe Mengen an WSX-1 mRNA exprimieren, aufgrund einer zu schwachen Rezeptorexpression jedoch nicht responsiv für IL-27 sind.

Die NIH3T3 Zellen wurden zum Nachweis einer Signaltransduktion von p28 ohne WSX-1 transient mit dem IL-6R oder eGFP transfiziert und nach 48 h gehungert und mit Hyper-IL-6 (HIL-6, 10 ng/ml), Hyper-IL-27 (10 ng/ml), p28 (200 ng/ml) oder IL-6

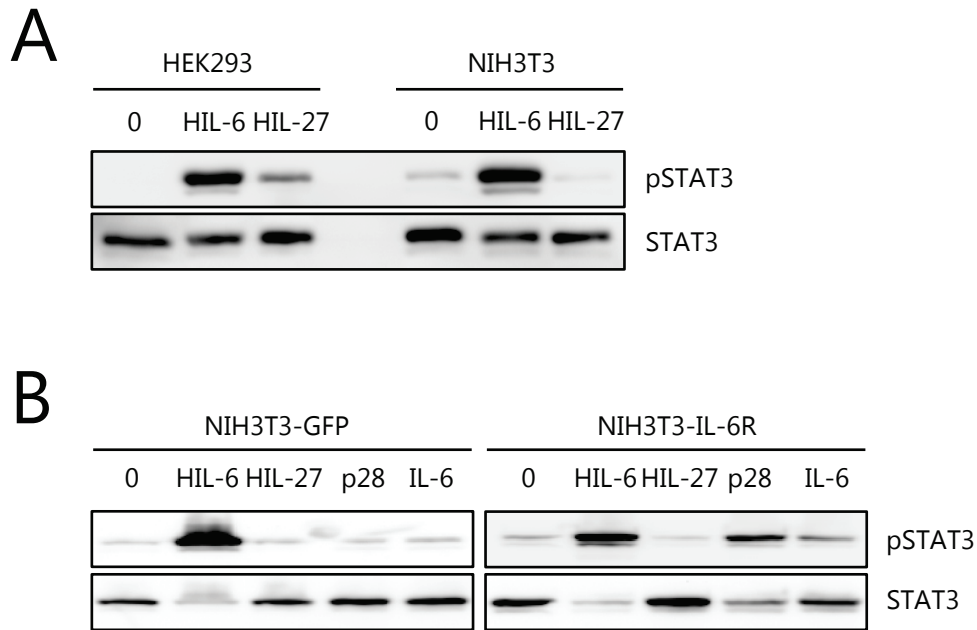


Abbildung 3.6: Der signaltransduzierende Rezeptor für p28 über den IL-6R ist ein gp130-Homodimer. (A) HEK293 oder NIH3T3 Zellen wurden in 6-Loch-Platten ausgesät und 24 h später über Nacht in serumfreiem DMEM gehungert. Die Stimulation erfolgte mit 10 ng/ml Hyper-IL-6 (HIL-6) oder 10% Hyper-IL-27 (HIL-27) Überstand für 15 min bei 37°C. Die Zellen wurden in je 75 µl pSTAT3-Lysepuffer lysiert und 50 µg Gesamtprotein wurden auf ein SDS-Gel geladen, um die STAT3-Phosphorylierung per Western Blot zu analysieren. (B) Das Experiment wurde analog zu (A) durchgeführt, allerdings wurden die NIH3T3 Zellen 48 h vor Stimulation mit eGFP oder dem IL-6R transient transfiziert und zusätzlich mit rekombinantem p28 oder IL-6 (10 ng/ml) stimuliert. Das Experiment in (B) wurde von Dr. Christoph Garbers durchgeführt.

(50 ng/ml) für 15 min stimuliert. Die Zellen reagierten mit der Kontrolltransfektion wie zuvor nicht auf Hyper-IL-27 aber auch nicht auf p28 oder IL-6 (Abbildung 3.6 B). Bei Transfektion des IL-6R konnte eine STAT3-Aktivierung sowohl bei IL-6- als auch bei p28-Stimulation beobachtet werden, nicht aber mit Hyper-IL-27. Das zeigte, dass für eine Signaltransduktion von p28 über den IL-6R kein WSX-1 notwendig ist und war ein weiterer Hinweis für ein gp130-Homodimer als signaltransduzierender Rezeptorkomplex.

3.2 Rekombinantes p35 bildet IL-12 mit p40, aber kein IL-35 mit EBI3.

3.2.1 Klonierung eines Fusionskonstruktes aus EBI3 und p35

Die heterodimeren Zytokine der IL-6/IL-12-Familie üben viele verschiedene Funktionen in der Immunregulation aus. Sie haben gemeinsam, dass sie alle primär den Jak/STAT-Signalweg aktivieren, wobei die meisten dies über gp130-Homo- oder Heterodimere auf

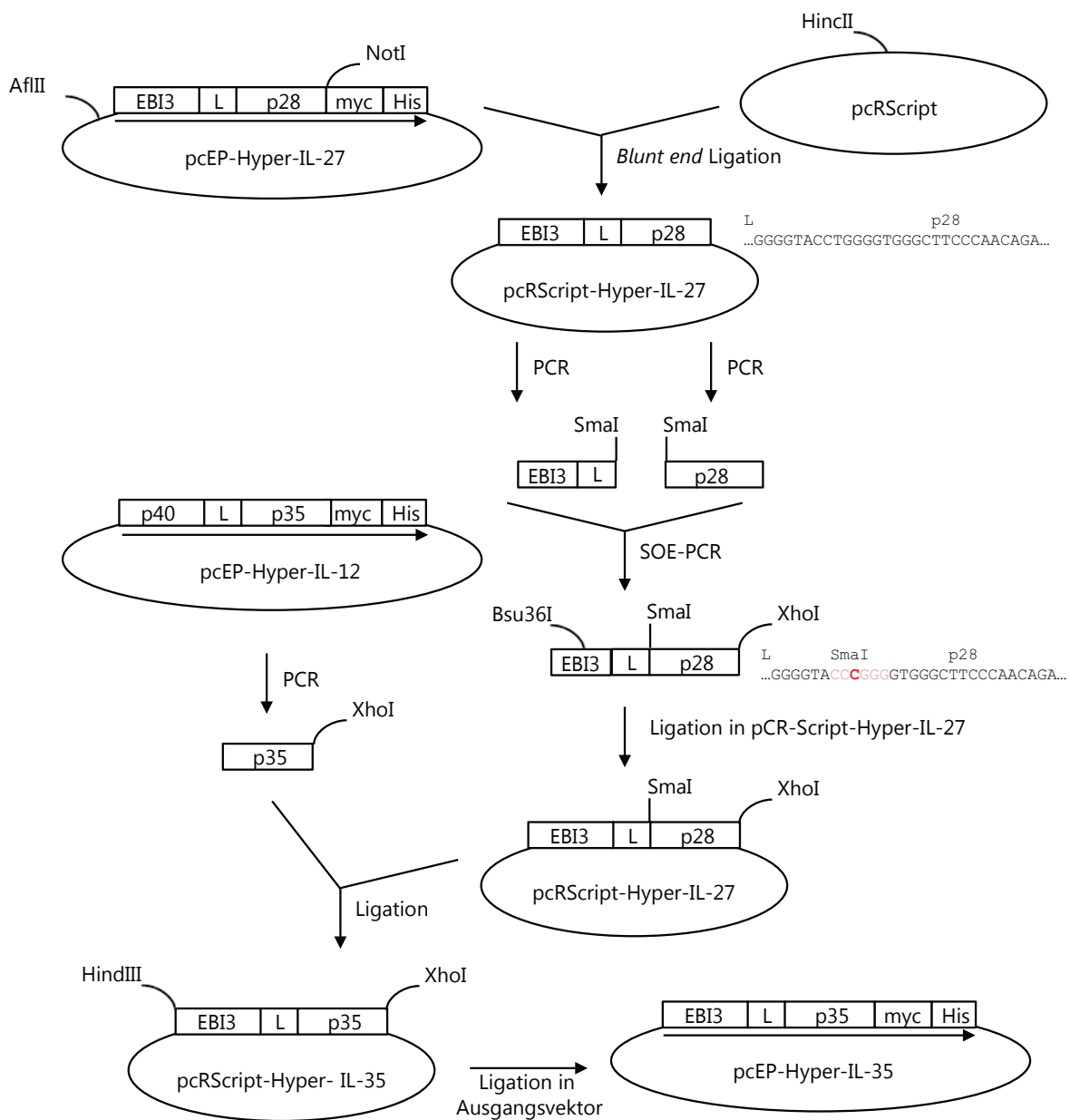


Abbildung 3.7: Klonierungsschema für die Generierung eines Hyper-IL-35-Fusionskonstruktes mit myc- und His-tag. Die Details der Klonierung sind in Abschnitt 3.2.1 beschrieben.

der Zelloberfläche tun. Gentechnisch ist es möglich, die beiden Untereinheiten der Zytokine durch eine flexible Peptidsequenz zu fusionieren, und so ihre Aktivität ca. 100-fach zu steigern (Fischer *et al.*, 1997). Diese sogenannten Hyper-Zytokine können dann effektiv exprimiert und zur Analyse der Signaltransduktion oder zur Zellstimulation verwendet werden.

IL-35 ist das neueste Mitglied der IL-12-Zytokinfamilie. Die durch dieses Zytokin induzierte Signaltransduktion ist bis heute nicht genau verstanden. Es wurden vier Varianten eines Rezeptorkomplexes für IL-35 publiziert und ebenso verschiedene STAT-Aktivierungsmuster. Erstaunlich ist die alleinige STAT1-Aktivierung durch IL-35 über ein gp130-Homodimer, welches vor allem Bindungsstellen für STAT3 aufweist und nach Aktivierung durch IL-6 und IL-11 auch primär STAT3 aktiviert. Daher sollte hier ein Hyper-IL-35-Konstrukt generiert werden, um diese Signaltransduktion zu untersuchen. Zur Generierung eines Hyper-IL-35-Fusionskonstruktes mit myc- und His-tag, wurde zunächst eine SmaI-Restriktionsschnittstelle zwischen dem Linker und der kodierenden Sequenz für p28 in einem Hyper-IL-27-Fusionskonstrukt eingefügt, um p28 durch p35 ersetzen zu können (Abbildung 3.7). Die Sequenz für EBI3, den Linker und p28 wurde zunächst mit AflIII und NotI aus dem Expressionsvektor pcEP gespalten und mit glatten Enden in den Klonierungsvektor pcRScript ligiert. Die nötige Punktmutation wurde mithilfe einer SOE-PCR eingefügt und das erhaltene Fragment über die Restriktionsenzyme Bsu36I und XhoI in den pcRScript-Hyper-IL-27-Vektor kloniert. Das Fragment für p35 wurde mittels PCR amplifiziert und über ein glattes Ende und eine XhoI-Schnittstelle in den zuvor mit SmaI und XhoI geschnittenen pcRScript-Hyper-IL-27 ligiert. So entstand ein Fusionskonstrukt aus EBI3, einem Linker und p35 das über HindIII und XhoI in den pcEP Vektor umkloniert wurde.

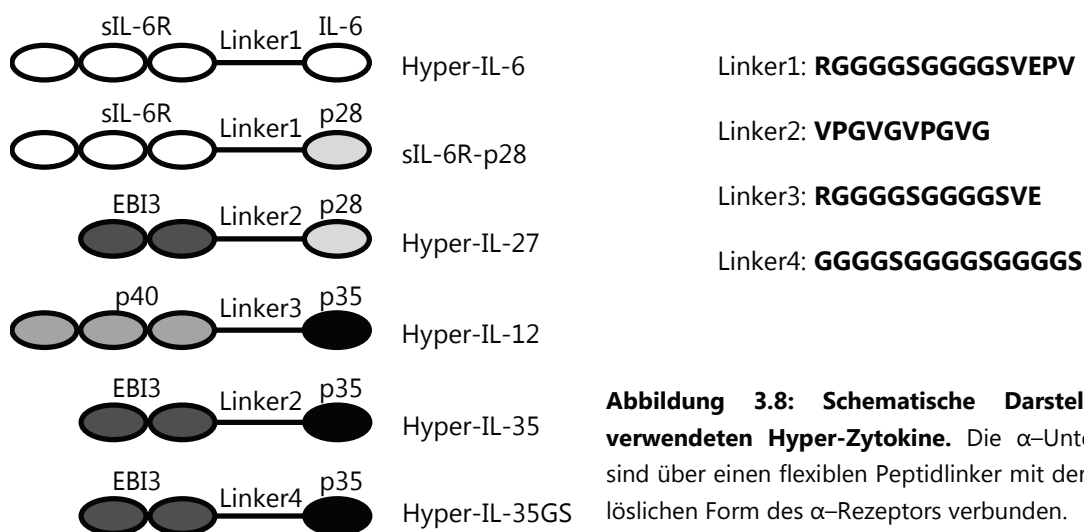


Abbildung 3.8: Schematische Darstellung der verwendeten Hyper-Zytokine. Die α -Untereinheiten sind über einen flexiblen Peptidlinker mit der jeweiligen löslichen Form des α -Rezeptors verbunden.

3.2.2 Alle Hyper-Zytokine außer Hyper-IL-35 werden in den Überstand sekretiert

In Abbildung 3.8 sind alle hier verwendeten Hyper-Zytokine schematisch dargestellt. Hyper-IL-6 wurde zuerst in Fischer *et al.*, 1997 verwendet, die Klonierung von sIL-6R-p28 ist in Abschnitt 3.1.1 dargestellt. Die Expression und Sekretion von Hyper-IL-35 sollte hier mit den seit Langem bekannten Hyper-Zytokinen verglichen werden.

In Abbildung 3.9 ist die Expressionsanalyse mittels Western Blot aller verwendeten Hyper-Zytokine in HEK293 Zellen dargestellt. Hierzu wurden 2×10^6 Zellen in 10 cm Kulturschalen ausgesät, nach 24 h mit 5 μ g Plasmid-DNA transient transfiziert und 48 h

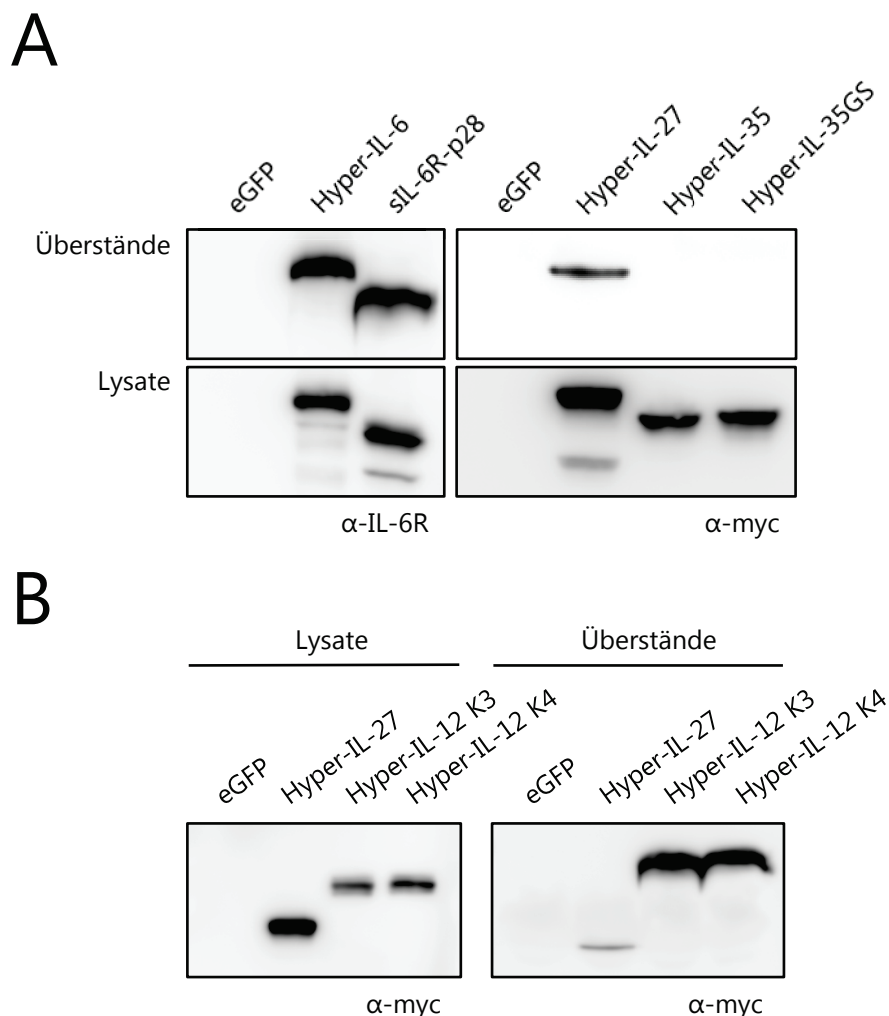


Abbildung 3.9: Expressions- und Sekretionsanalyse der Hyper-Zytokine in HEK293 Zellen. HEK293 Zellen wurden mit einer Dichte von 2×10^6 Zellen pro 10 cm-Kulturschale ausgesät und nach 24 h mit 5 μ g Plasmid-DNA transient transfiziert. Nach weiteren 48 h wurden die Zellen lysiert und die Überstände steriltrifert. (A) Die Expression und Sekretion von Hyper-IL-6 und sIL-6R-p28 wurde mit einem IL-6R-spezifischen Antikörper, die von Hyper-IL-27 und Hyper-IL-35 mit einem myc-spezifischen Antikörper nachgewiesen. (B) Dargestellt ist die Expression und Sekretion von Hyper-IL-27 und Hyper-IL-12, die mit einem myc-spezifischen Antikörper nachgewiesen wurde.

später lysiert, während die Überstände sterilfiltriert wurden. Hyper-IL-6 und sIL-6R-p28 wurden mit einem IL-6R-Antikörper nachgewiesen, alle anderen Konstrukte mit einem Antikörper, der gegen den *myc-tag* gerichtet war. Alle Hyper-Zytokine wurden in den HEK293 Zellen effizient exprimiert und konnten daher im Lysat nachgewiesen werden. Da sie das Signalpeptid der α -Rezeptoruntereinheiten enthielten, sollten sie von den exprimierenden Zellen in den Zellkulturüberstand sekretiert werden. Die Western Blots der Zellkulturüberstände zeigten, dass Hyper-IL-6, Hyper-IL-30 und Hyper-IL-12 zu einem großen Anteil sekretiert wurden, während die Sekretion von Hyper-IL-27 wesentlich schwächer war. Die Sekretion eines Hyper-IL-35-Konstruktes, gleich mit welchem Peptidlinker, konnte trotz nachweisbarer Expression im Zelllysat, im Gegensatz zu allen anderen Hyper-Zytokinen nicht im Western Blot nachgewiesen werden.

3.2.3 Hyper-Zytokin-induzierte Proliferation von Ba/F3-gp130-IL-12R β 1-IL-12R β 2

Um die Signaltransduktion der Hyper-Zytokine zu untersuchen, wurden Ba/F3-gp130-IL-12R β 1-IL-12R β 2 Zellen verwendet, die von Dr. Doreen Floss (Institut für Biochemie und Molekularbiologie II, Universitätsklinikum Düsseldorf) generiert wurden. Diese Zellen tragen alle hier benötigten Rezeptoren der IL-12-Familie, wie gp130, IL-12R β 1, IL-12R β 2 und WSX-1. Sie wurden mit 10% konditionierten Überständen, die in Abschnitt 3.2.2 beschrieben wurden, für einen Proliferationsassay stimuliert, der in Abbildung 3.10 A dargestellt ist. Als Kontrolle dienten unstimulierte Zellen oder die Stimulation mit konditioniertem Überstand von GFP-transfizierten Zellen. Beide zeigten eine vergleichbar schwache Proliferation, während Hyper-IL-6 und Hyper-IL-12 in den Zellen, wie erwartet, eine starke Proliferation auslösten. Trotz der wesentlich schwächeren Sekretion von Hyper-IL-27 im Vergleich zu Hyper-IL-6 oder Hyper-IL-12, zeigte dieses Hyper-Zytokin eine vergleichbare Aktivität. Es induziert ebenso wie die anderen beiden Zytokine eine starke Proliferation von Ba/F3-gp130-IL-12R β 1-IL-12R β 2 Zellen. Die Zellen, die mit Hyper-IL-35-Überständen stimuliert worden waren, zeigten vermutlich aufgrund der fehlenden Sekretion der Konstrukte, keine Proliferation.

Die Zellen wurden außerdem in Bezug auf ihre STAT3-Aktivierung untersucht. Hierzu wurden die Zellen zweimal in PBS gewaschen und 2 h in DMEM ohne Zusätze gehungert. Anschließend wurden sie 15 min bei 37°C mit 10% konditionierten Überständen stimuliert. Die Analyse der Phosphorylierung von STAT3 im Western Blot zeigte eine starke Aktivität von Hyper-IL-6, Hyper-IL-12 und Hyper-IL-27, aber keine in den Kontrollen oder bei den Hyper-IL-35-Varianten (Abbildung 3.10 B). Da aber keine Sekretion dieser Proteine nachgewiesen werden konnte, war auch keine Aktivität erwartbar.

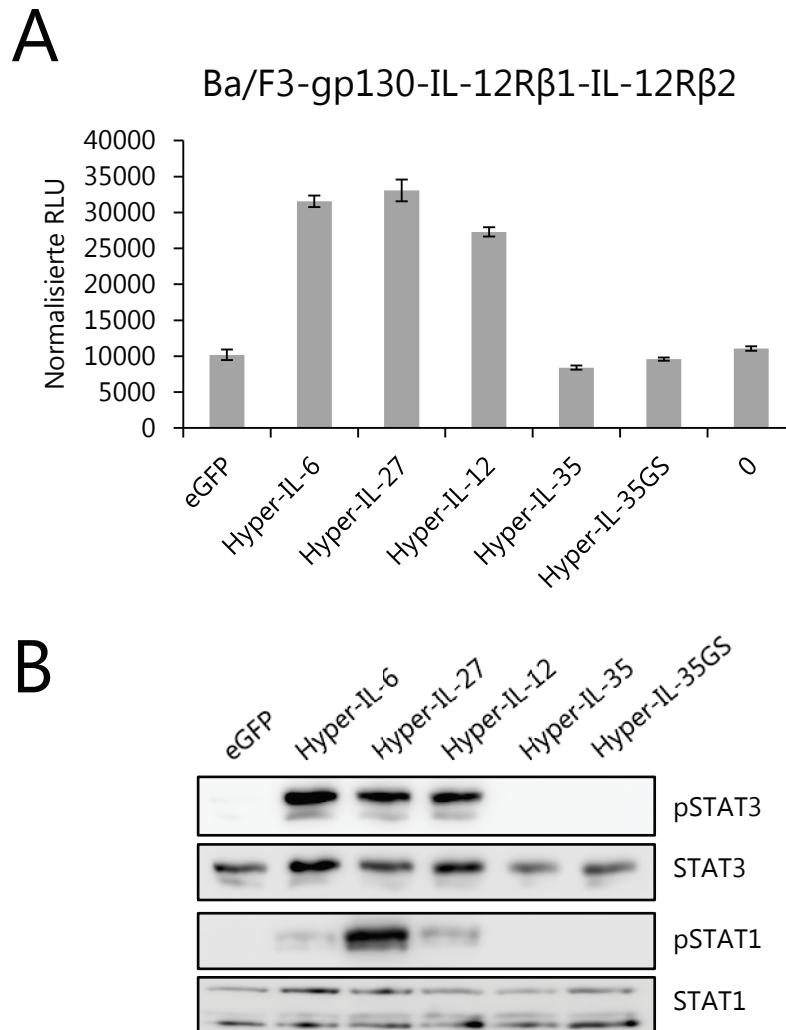


Abbildung 3.10: Proliferation und STAT-Aktivierung in Ba/F3-gp130-IL-12R β 1-IL-12R β 2 Zellen durch Stimulation mit Hyper-Zytokinen. (A) Ba/F3-gp130-IL-12R β 1-IL-12R β 2 Zellen wurden mit 10% konditioniertem Überstand von Hyper-Zytokin- oder GFP-transfizierten HEK293-Zellen für 48 h stimuliert. Die induzierte Proliferation wurde, wie in Abschnitt 2.2.2.6 beschrieben, in Triplikaten mithilfe des Cell titer blue reagent gemessen. Dargestellt sind Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung. (B) Ba/F3-gp130-IL-12R β 1-IL-12R β 2 Zellen wurden 15 min bei 37°C mit 10% konditionierten Überständen von HEK293 Zellen stimuliert. Die STAT-Aktivierung wurde mithilfe phospho-spezifischer Antikörper für STAT1 (Y⁷⁰¹) oder STAT3 (Y⁷⁰⁵) im Western Blot nachgewiesen.

Die Hyper-Zytokine scheinen insgesamt eine effiziente Methode der Produktion der heterodimeren Zytokine der IL-12-Familie zu sein und zeigen eine hohe Aktivität. Lediglich IL-35 konnte hier nicht auf diese Weise produziert werden, da keine Sekretion in den Zellkulturüberstand erreicht werden konnte.

3.2.4 Koexpression von α -Untereinheiten der Zytokine und löslicher α -Rezeptoren: Heterodimeres IL-35 wird nicht nachweisbar sekretiert

Da IL-35 als Hyper-Zytokin nicht sezerniert worden war, sollte nun untersucht werden, ob es als heterodimeres Zytokin ohne Linker im Zellkulturüberstand nachgewiesen

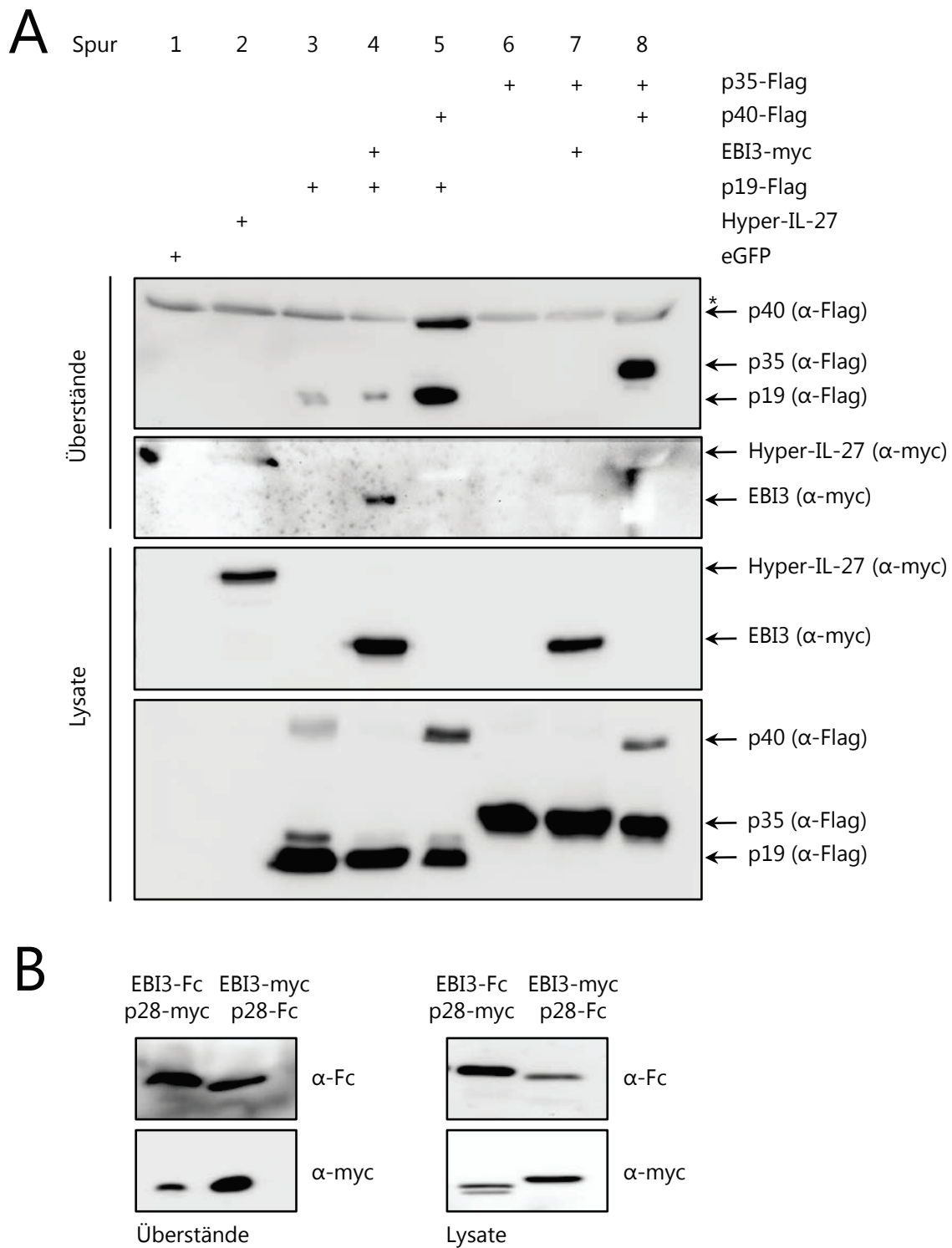


Abbildung 3.11: Koexpression der Zytokin-Untereinheiten von IL-12, IL-35 und IL-27. (A) COS7 Zellen wurden mit einer Dichte von 5×10^5 Zellen pro 10 cm Kulturschale ausgesät und 24 h später mit je 2,5 μ g Plasmid-DNA der jeweiligen Untereinheit transfiziert. Nach 6 h wurde das Medium gewechselt und nach 48 h die Zellen lysiert und die Überstände sterilfiltriert. Die Expression und Sekretion wurde durch Western Blot Analyse mit 15% SDS-Gelen und Detektion der Zytokine mit einem Flag- oder myc-spezifischen Antikörper nachgewiesen. (B) Das Experiment wurde wie in (A) durchgeführt. Die Detektion erfolgte mit einem myc-spezifischen Antikörper oder einem Antikörper, der gegen den Fc-Anteil von humanem IgG gerichtet ist.

werden konnte. Um zunächst zu verifizieren, dass beide Untereinheiten funktional exprimiert werden konnten, wurde EBI3 in Kombination mit p28 und jeweils mit unterschiedlichen *tags* in COS7 Zellen transfiziert und die Expression und Sekretion nach 48 h mittels Western Blot untersucht. Beide Untereinheiten wurden exprimiert und auch effizient als IL-27 in den Zellkulturüberstand sekretiert (Abbildung 3.11 B). Die andere Untereinheit von IL-35 ist p35, das zusammen mit p40 IL-12 bildet. In einer weiteren Koexpression wurde ebenfalls die Sekretion dieses Zytokins untersucht, wie in Abbildung 3.11 A Spur 8 zu sehen ist. Beide Untereinheiten wurden exprimiert und auch gemeinsam sekretiert, während p35 alleine zwar exprimiert, aber nicht sekretiert wurde (Spur 6). Auch IL-23 (p19 mit p40) konnte im Zellkulturüberstand nachgewiesen werden (Spur 5), wobei p19 im Gegensatz zu p35 auch alleine schwach sekretiert wurde, was bereits so beschrieben wurde (Oppmann *et al.*, 2000). Wenn allerdings p35 mit EBI3 koexprimiert wurde, wurden zwar beide exprimiert, keine der beiden Untereinheiten konnte aber im Überstand detektiert werden (Spur 7).

In Abbildung 3.12 ist ein Proliferationsassay von Ba/F3-gp130-IL-12R β 1-IL-12R β 2 Zellen, die mit den in Abbildung 3.11 gezeigten Überständen von COS7 Zellen stimuliert wurden, dargestellt. Die Ba/F3-gp130-IL-12R β 1-IL-12R β 2 Zellen wurden 72 h mit 10% konditioniertem Überstand behandelt und anschließend die Proliferation mithilfe des Cell titer blue reagent gemessen. Als Negativkontrolle dienten unstimulierte Zellen oder die Stimulation mit konditioniertem Überstand von GFP-transfizierten Zellen, als Positivkontrolle die Stimulation mit Hyper-IL-12 konditioniertem Überstand. Sowohl die

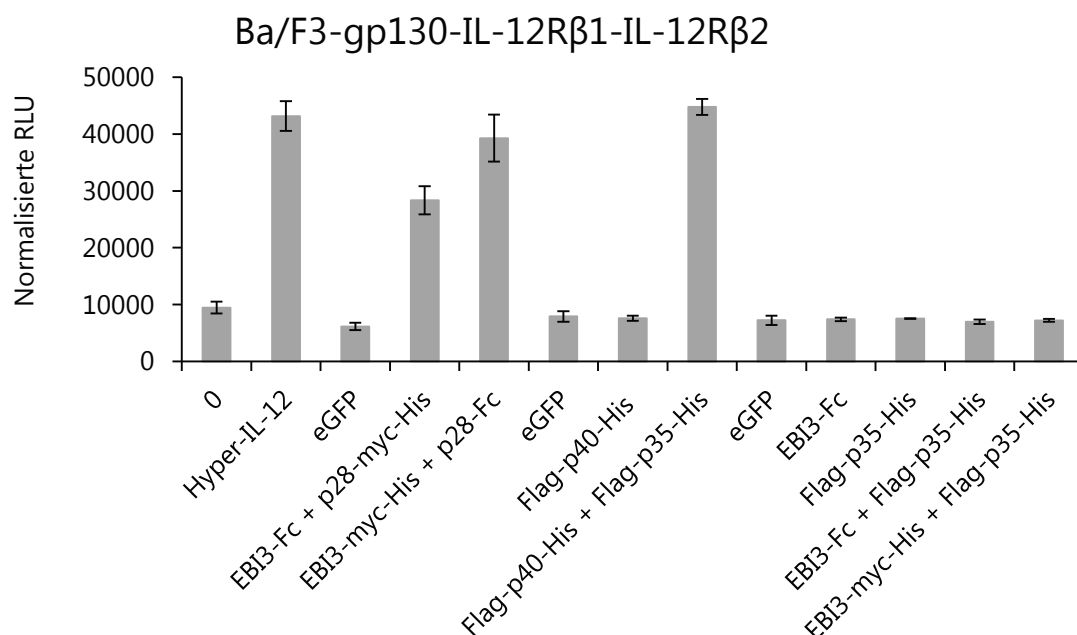


Abbildung 3.12: Proliferation von Ba/F3-gp130-IL-12R β 1-IL12-R β 2 Zellen mit konditionierten Überständen von IL-27, IL-12 und IL-35. Die Zellen wurden 72 h mit 10% konditionierten Überständen behandelt. Das Protokoll des Proliferationsassays ist in Abschnitt 2.2.2.6 beschrieben. Dargestellt sind Mittelwerte von Triplikaten +/- Standardabweichung.

Stimulation mit IL-27, das durch die Koexpression von EBI3 mit p28 gebildet wurde, als auch die Stimulation mit IL-12 (aus p40 und p35) führten zu einer vergleichbaren Proliferation der Zellen, wie mit Hyper-IL-12. Die Stimulation mit koexprimiertem EBI3 mit p35 führte im Gegensatz dazu nicht zu einer Proliferation der Ba/F3-gp130-IL-12R β 1-IL-12R β 2 Zellen.

Letztlich wurden alle untersuchten Kombinationen der Untereinheiten effizient exprimiert und in den Zellkulturüberstand sekretiert, außer p35 mit EBI3 (IL-35). Beide Untereinheiten waren aber in anderen Kombinationen funktional (p35 in IL-12 und EBI3 in IL-27). Konditionierter IL-35-Überstand konnte demnach auch nicht durch Koexpression der beiden Untereinheiten hergestellt werden.

3.2.5 p35 interagiert mit EBI3

Da p35 in Kombination mit EBI3 in eukaryotischen Zellen nicht sekretiert wurde, sollte zunächst getestet werden, ob die beiden Untereinheiten unter den gegebenen Bedingungen überhaupt miteinander interagierten. Hierzu wurde eine Fällung von EBI3-Fc mit Protein A Agarose *beads* durchgeführt und die Ko-Präzipitation von p35-Flag mittels Western Blot untersucht. Dieses Experiment wurde mit Zelllysaten durchgeführt, da p35, wie zuvor gezeigt, nicht in den Zellkulturüberstand sekretiert wurde (Abbildung 3.11 und Jones *et al.*, 2012).

Wie in Abbildung 3.13 gezeigt, konnte eine Interaktion der beiden Untereinheiten nachgewiesen werden. In der gebundenen Fraktion war ein starkes Signal für p35 (Flag)

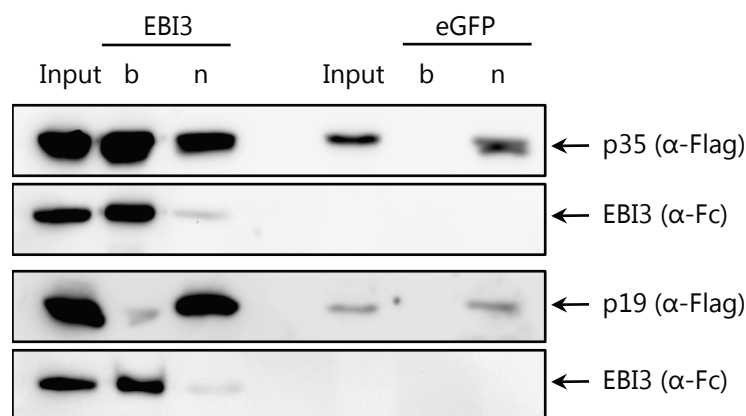


Abbildung 3.13: Ko-Präzipitation von p35 mit EBI3. COS7 Zellen wurden mit je 2,5 μ g Plasmid-DNA von pcDNA3.1 mit der kodierenden Sequenz für EBI3-Fc und p35-Flag oder p19-Flag transfiziert. Nach 48 h wurden die Zellen in IP-Puffer lysiert und die Lysate 4 h bei 4°C mit Potein-A-Agarose auf einem Rollmischer inkubiert. Die Agarose beads wurden bei 100 g und 4°C abzentrifugiert, der Überstand abgenommen und als nicht-gebundene Fraktion (n) auf das 15%ige SDS-Gel aufgetragen. Die Agarose wurde fünf Mal mit IP-Puffer gewaschen und anschließend in Lämmli-Puffer aufgekocht (gebundene Fraktion (b)). Als Input wurde eine entsprechende Menge Lysat aufgetragen. Als Kontrolle diente die Kotransfektion von p35 oder p19 mit GFP.

zu sehen. Dies war nicht der Fall, wenn das Experiment mit p19-Flag durchgeführt wurde. Auch in der Kontrolle mit eGFP statt EBI3 konnte kein gebundenes p35 detektiert werden. EBI3 und p35 interagierten also in den Zelllysaten miteinander, konnten aber nicht sekretiert werden.

3.2.6 Die intermolekulare Disulfidbrücke in IL-12 ist für die Funktion nicht notwendig

Beide bisherigen Herangehensweisen, also die Klonierung eines Hyper-Zytokins oder die Koexpression der Untereinheiten in eukaryotischen Zellen führten nicht zur Produktion von funktionalem IL-35. In der Arbeit zu p28 wurde u.a. rekombinantes p28 aus *E. coli* in Kombination mit EBI3 aus konditioniertem Zellkulturüberstand verwendet und bildete aktives IL-27, unter dessen Einfluss Ba/F3-gp130 Zellen proliferierten (Garbers *et al.*, 2013). Daher entstand die Vermutung, dass dieser Ansatz auch für IL-35 funktionieren könnte. Die Aktivität des dafür benötigten rekombinanten p35 müsste dann zunächst mit p40 Überstand (als IL-12) getestet werden. In IL-12 wird im Gegensatz zu IL-27 eine intermolekulare Disulfidbrücke zwischen p40 und p35 ausgebildet (Abbildung 3.14 A). In Abwesenheit von p35 bildet p40 Homodimere, die ebenfalls über eine Disulfidbrücke verbunden sind und antagonistisch zu IL-12 wirken (Gillessen *et al.*, 1995). Um p40 aus konditioniertem Überstand zu verwenden, wurde daher eine cDNA verwendet, bei der das Cystein 197, das für die Ausbildung der

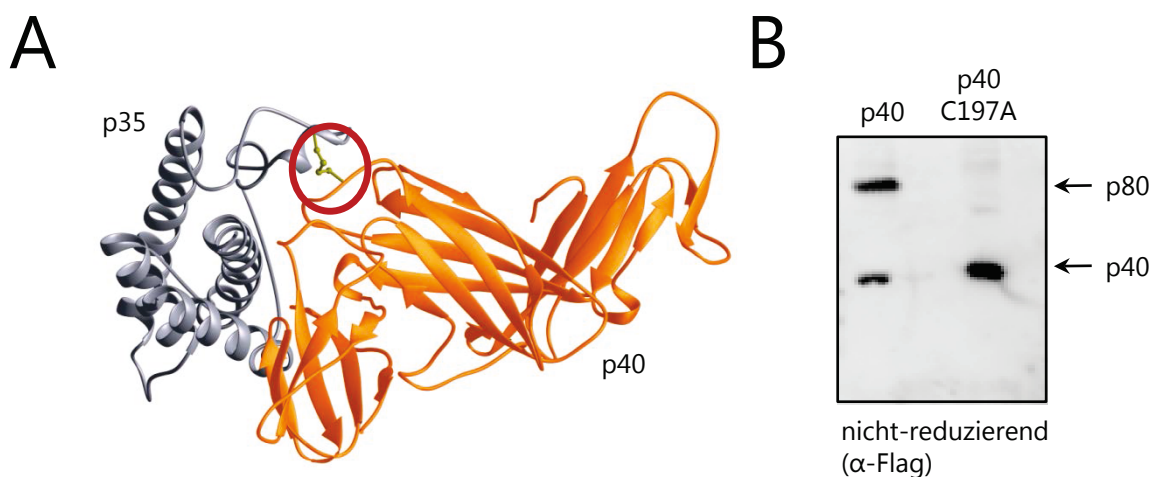


Abbildung 3.14: Das Cystein 197 in p40 bildet in Dimeren die Disulfidbrücke aus. (A) Schematische Darstellung von IL-12 nach Yoon *et al.*, 2000. Die Disulfidbrücke zwischen p35 C92 und p40 C197 ist rot umrandet. Das Modell wurde freundlicherweise von Prof. Dr. Joachim Grötzinger (Biochemisches Institut, CAU Kiel) zur Verfügung gestellt. (B) Nicht-reduzierendes SDS-Gel von p40 und p40 C197A konditioniertem Überstand von HEK293 Zellen und detektiert mit einem Flag-spezifischen Antikörper. Dieses Experiment wurde von Dr. Jens M. Moll durchgeführt.

Disulfidbrücke notwendig ist (Yoon *et al.*, 2000), in ein Alanin mutiert war (diese cDNA wurde von Jutta Schröder, Institut für Biochemie und Molekularbiologie II, Universitätsklinikum Düsseldorf zur Verfügung gestellt). Das p40 C197A wurde in HEK293 Zellen exprimiert und der konditionierte Überstand nach 48 h unter nicht-reduzierenden Bedingungen im Western Blot analysiert (Abbildung 3.14 B). Wildtyp p40 lag im Überstand sowohl als Monomer, als auch als Dimer vor, während die C197A Mutation zum alleinigen Vorliegen der monomeren Form führte. Um zu untersuchen, ob p40 C197A in der Lage ist, funktionales IL-12 zu bilden, wurde es in HEK293 Zellen mit p35 koexprimiert, wie auch mit Mutanten von p35, die statt des C92 ein Alanin oder ein Serin trugen und damit ebenfalls nicht mehr in der Lage waren, die intermolekulare Disulfidbrücke zu p40 auszubilden (Yoon *et al.*, 2000). Diese Mutationen wurden mittels SOE-PCR (beschrieben in Abschnitt 2.2.1.6) in die cDNA des p35 WT eingefügt. In Abbildung 3.15 ist die Western Blot Analyse der Expression und Sekretion der p40- und p35-Varianten dargestellt. Sowohl p40 WT, als auch p40 C197A wurden effizient exprimiert und sekretiert, unabhängig davon, ob sie alleine oder in Kombination mit p35-Varianten transfiziert wurden. Die WT Variante von p35 wurde sowohl mit p40 WT, als auch mit p40 C197A stark exprimiert, allerdings nur mit p40 WT auch sekretiert. Für die C92 Mutanten von p35 machte es für die Sekretion keinen Unterschied, mit welcher p40 Variante sie exprimiert wurden.

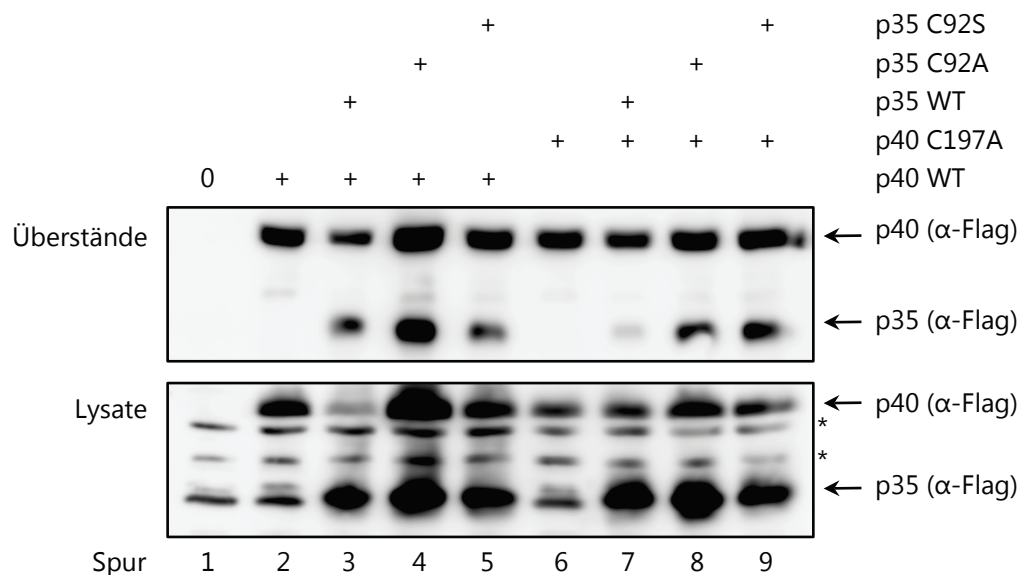


Abbildung 3.15: Western Blot Analyse der Expression und Sekretion von p40- und p35-Varianten in HEK293 Zellen. 2×10^6 HEK293 Zellen wurden pro 10 cm Kulturschale ausgesät und 24 h später mit je 2,5 µg Plasmid-DNA der p35- und der p40-Variante transfiziert. Nach 48 h wurden die Zellen lysiert und die Überstände sterilfiltriert. Die Proteine wurden auf einem 15%igen SDS-Gel getrennt und die Proteine auf dem Western Blot mit einem Flag-spezifischen Antikörper detektiert. *: unspezifische Bande.

Die Aktivität der so gewonnenen konditionierten Überstände wurde zum einen durch Messung der Proliferation von Ba/F3-gp130-IL-12R β 1-IL-12R β 2 Zellen (Abbildung 3.16 A) und zum anderen durch Western Blot Analyse der STAT3-Aktivierung in diesen Zellen bestimmt (Abbildung 3.16 B). IL-12 aus p35 und p40 WT zeigte die stärkste Aktivität, die vergleichbar war mit Hyper-IL-12. Eine etwas schwächere Aktivität zeigte die Kombination aus p40 WT mit p35 C92A/S, wie auch p40 C197A mit den p35-Mutanten. p40 C197A induzierte mit p35 WT kaum Proliferation und nur eine schwache STAT3-Aktivierung, was auf die reduzierte Sekretion zurückzuführen sein könnte. Diese Ergebnisse zeigen, dass die intermolekulare Disulfidbrücke in IL-12 nicht notwendig für die Aktivität des Zytokins ist, sie aber verstärkt und daher eine Rolle für die Stabilität des Dimers spielt.

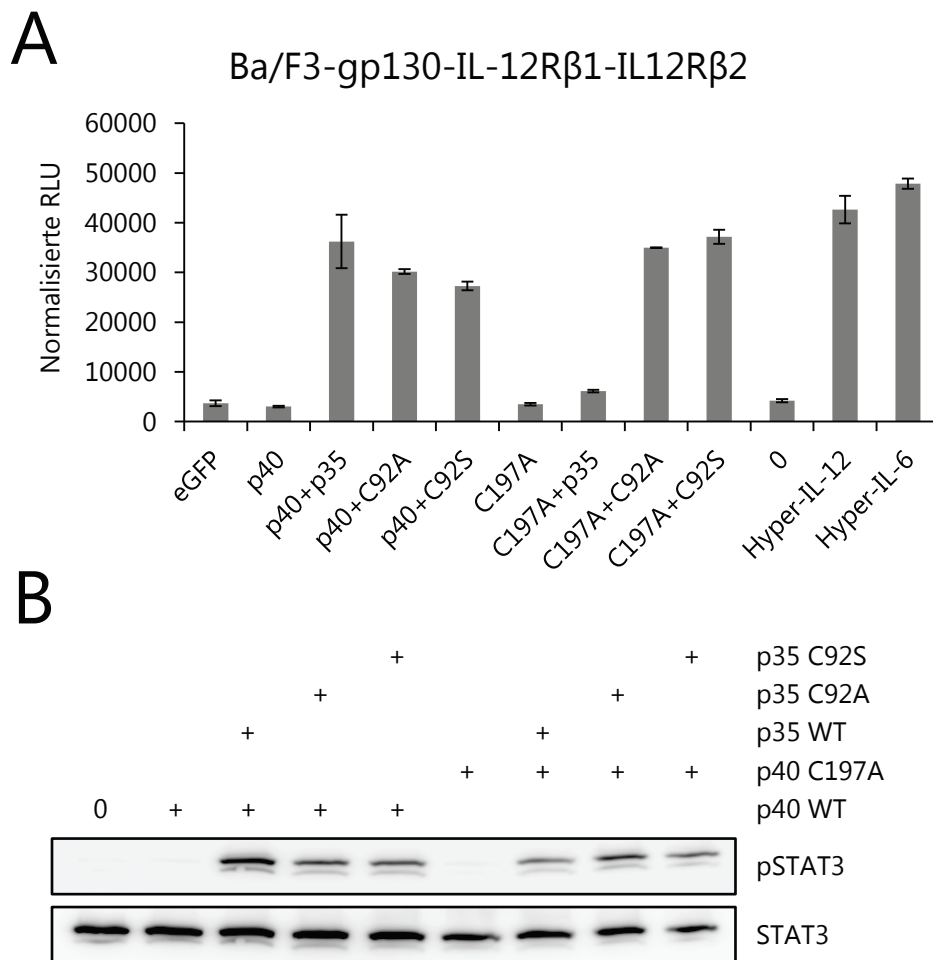


Abbildung 3.16: Proliferation und STAT3-Aktivierung in Ba/F3-gp130-IL-12R β 1-IL-12R β 2 Zellen durch IL12 ohne intermolekulare Disulfidbrücke. Ba/F3-gp130-IL-12R β 1-IL-12R β 2 Zellen wurden mit den in Abbildung 3.15 beschriebenen Überständen stimuliert. (A) Die Zellen wurden 48 h 10% konditioniertem Überstand stimuliert und die Proliferation, wie in 2.2.2.6 beschrieben, gemessen. (B) Analyse der STAT3-Phosphorylierung (Y⁷⁰⁵) nach Stimulation für 15 min mit 50% konditioniertem Überstand im Western Blot mithilfe spezifischer Antikörper.

3.2.7 Rekombinantes p35 aus *E. coli* bildet funktionales IL-12 mit p40 C197A aus konditioniertem Überstand

Da p35 zusammen mit EBI3 nicht in den Zellkulturüberstand sekretiert worden war, entstand der Gedanke, p35 in Bakterien herzustellen. Dies hatte bereits für p28 aus Bakterien mit konditioniertem Überstand von EBI3 funktioniert (Garbers *et al.*, 2013). Daher wurden p35 WT und p35 C70A von Dr. Jens M. Moll (Institut für Biochemie und

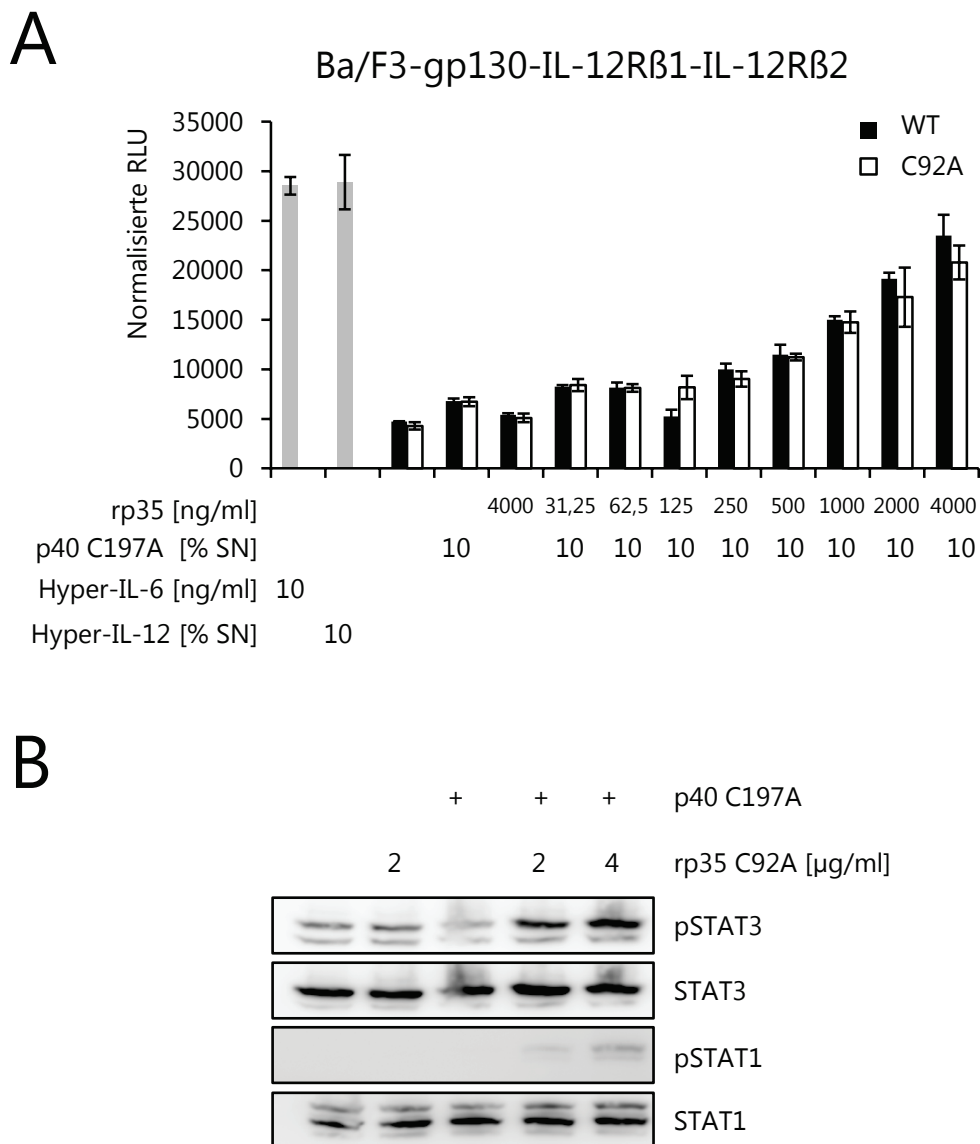


Abbildung 3.17: Proliferation und STAT-Aktivierung in Ba/F3-gp130-IL-12R β 1-IL-12R β 2 Zellen durch Stimulation mit rekombinantem p35 C92A und p40 C197A-Überstand. (A) Ba/F3-gp130-IL-12R β 1-IL-12R β 2 Zellen wurden 48 h bei 37°C mit den angegebenen Zytokinen stimuliert und ihre Proliferation gemessen. Das Protokoll ist in Abschnitt 2.2.2.6 beschrieben. Dargestellt sind Mittelwerte von Triplikaten $\pm$ Standardabweichung. (B) Western Blot Analyse der Phosphorylierung von STAT3 und STAT1 in Ba/F3-gp130-IL-12R β 1-IL-12R β 2 Zellen. Die Zellen wurden 15 min bei 37°C mit rekombinantem p35 C92A und p40 C197A aus konditioniertem Überstand stimuliert. Die Detektion erfolgte mit spezifischen Antikörpern gegen STAT3 und STAT1, sowie mit phospho-spezifischen Antikörpern.

Molekularbiologie II, Universitätsklinikum Düsseldorf) exprimiert, rückgefaltet und per Größenausschlusschromatographie gereinigt. Hierfür wurden die kodierenden Sequenzen von p35 WT und C92A in das bakterielle Expressionsplasmid pET-23a kloniert.

Um die Aktivität des IL-12 aus bakteriellem p35 und p40 C197A aus konditioniertem Zellkulturüberstand zu testen, wurden Ba/F3-gp130-IL-12R β 1-IL-12R β 2 Zellen mit 10% p40 C197A-Überstand und ansteigenden Konzentrationen von p35 WT oder C92A behandelt und ihre Proliferation gemessen. Die Proliferation der Zellen nahm konzentrationsabhängig sowohl mit der WT Variante, als auch mit p35 C92A zu. Die Aktivität war aber auch mit der höchsten gemessenen Konzentration von 4 μ g/ml noch etwas geringer, als mit 10 ng/ml Hyper-IL-6 oder 10% konditioniertem Überstand von Hyper-IL-12 (Abbildung 3.17 A).

Die Aktivität konnte ebenfalls im Western Blot nachgewiesen werden, wo eine Stimulation mit 2 μ g/ml p35 C92A eine STAT3-Phosphorylierung auslöste und bei 4 μ g/ml ebenfalls eine Aktivierung von STAT1 erkennbar war (Abbildung 3.17 B).

IL-12 konnte also *in vitro* aus p40 C197A-Zellkulturüberstand und bakteriell exprimiertem p35 C92A rekonstituiert werden und die biologische Aktivität konnte in Ba/F3-gp130-IL-12R β 1-IL-12R β 2 Zellen nachgewiesen werden. Die hohen benötigten Konzentrationen waren vermutlich auf eine ineffiziente Rückfaltung und einen daher großen Anteil inaktiven Proteins zurückzuführen.

3.2.8 Rekombinantes p35 bildet kein funktionales IL-35 mit EBI3 aus konditioniertem Überstand

Da das rekombinant in *E. coli* hergestellte p35 biologische Aktivität im Komplex mit p40 C197A als IL-12 aufgewiesen hatte, sollte es nun zusammen mit EBI3 getestet werden. In Abbildung 3.18 A ist das Ergebnis des Proliferationsassays mit Ba/F3-gp130 Zellen dargestellt, da der Rezeptor für IL-35, der STAT1 aktiviert, ein gp130-Homodimer ist (Collison *et al.*, 2012). Die Zellen wurden mit 4 μ g/ml p35 C92A und 10% konditioniertem EBI3-Überstand 48 h bei 37°C stimuliert. Es wurde jedoch keine Proliferation induziert und auch eine Stimulation für 15 min und anschließende Analyse der STAT1- und STAT3-Phosphorylierung im Western Blot konnte keinerlei Aktivität nachweisen (Abbildung 3.18 B).

Insgesamt konnte zwar IL-12 durch diesen neuen Ansatz generiert werden, die Bildung von IL-35 konnte auf diese Weise aber nicht erreicht werden. Die Kombination aus rekombinantem p35 und EBI3 aus konditioniertem Überstand zeigte keinerlei biologische Aktivität.

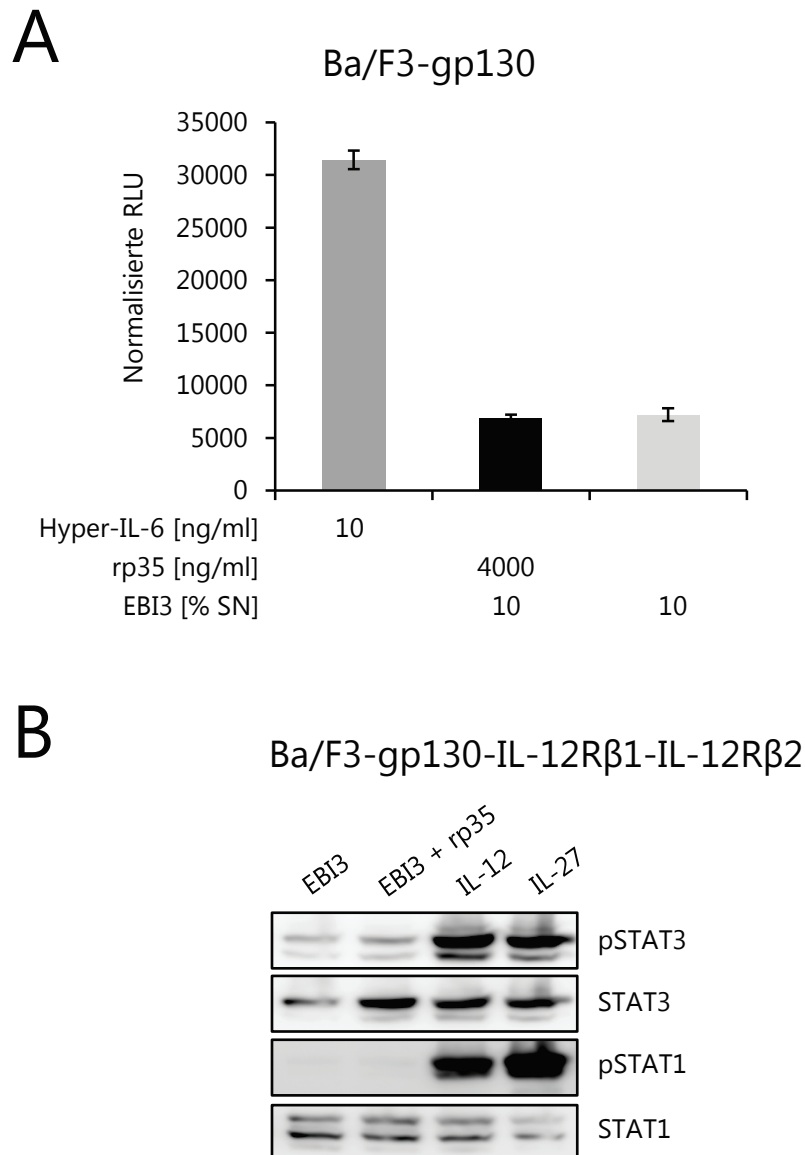


Abbildung 3.18: Proliferation Ba/F3-gp130 und STAT-Aktivierung in Ba/F3-gp130-IL-12R β 1-IL-12R β 2 Zellen durch Stimulation mit rekombinantem p35 C92A und EBI3-Überstand. (A) Ba/F3-gp130 Zellen wurden 48 h bei 37°C mit 10 ng/ml Hyper-IL-6, 10% EBI3-Überstand oder 4 μ g/ml p35 C92A zusammen mit EBI3-Überstand stimuliert und ihre Proliferation gemessen. Das Protokoll ist in Abschnitt 2.2.2.6 beschrieben. Dargestellt sind Mittelwerte von Triplikaten $\pm$ Standardabweichung. (B) Ba/F3-gp130-IL12R β 1-IL12R β 2 Zellen wurden wie in Abbildung 3.17 B beschrieben behandelt. Und mit 10% konditioniertem EBI3-Überstand und 2 μ g/ml p35 C92A stimuliert. Als Positivkontrolle dienten 10 ng/ml Hyper-IL-27 oder 10% konditionierter Hyper-IL-12 Überstand.

3.3 Die Rolle der Protein-Kinase 2 (CK2) in der Jak-STAT-Aktivierung durch Zytokine der IL-6-Familie

3.3.1 OSM-induzierte STAT3-Aktivierung ist CK2-abhängig

Der wohl wichtigste Aspekt in der Signaltransduktion von IL-6-artigen Zytokinen ist die Aktivierung des Jak-STAT-Signalweges. Die Zytokine der IL-6-Familie induzieren dabei vor allem die Aktivierung der Janus Kinase Jak1 und die darauffolgende Phosphorylierung von STAT1 und STAT3 (vgl. Heinrich *et al.*, 2003). Die Protein-Kinase 2 (CK2) wurde erst vor kurzem mit der OSM-vermittelten STAT-Aktivierung in Verbindung gebracht (Zheng *et al.*, 2011). Um zu bestätigen, dass eine Inhibition von CK2 die STAT3-Aktivierung durch OSM unterbindet, wurden HepG2 Zellen in 6-Loch-Platten ausgesät, 6 h in serumfreiem DMEM gehungert und anschließend mit 10 ng/ml OSM stimuliert. Dies erfolgte nach Vorbehandlung für 90 min mit verschiedenen Konzentrationen von zwei unterschiedlichen CK2-Inhibitoren. 4,5,6,7-Tetrabromobenzotriazol (TBB) ist ein ATP-kompetitiver, CK2-spezifischer, chemischer Inhibitor (Sarno *et al.*, 2001). Emodin ist ebenfalls ein ATP-kompetitiver CK2-Inhibitor,

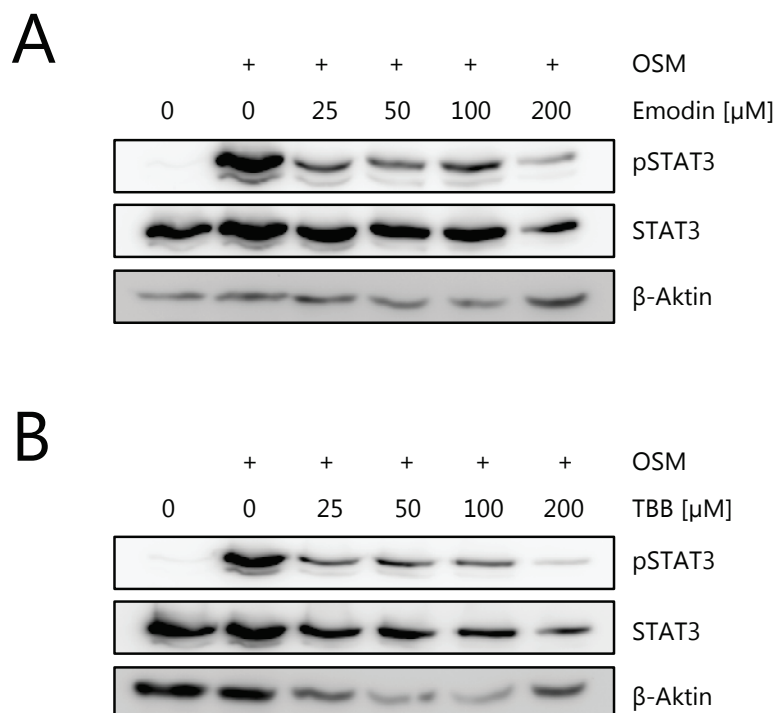


Abbildung 3.19: Inhibition von CK2 verhindert OSM-vermittelte STAT3-Aktivierung. (A) HepG2 Zellen wurden mit einer Dichte von 1×10^6 pro Loch einer 6-Loch Platte ausgesät. Nach 24 h wurden sie zweimal mit PBS gewaschen und 4,5 h in DMEM ohne Zusätze gehungert, bevor der Inhibitor Emodin in den angegebenen Konzentrationen zugegeben wurde. Nach weiteren 1,5 h wurden die Zellen 15 min mit 10 ng/ml OSM stimuliert. Zur Detektion im Western Blot wurde ein STAT3-spezifischer und ein phospho-spezifischer STAT3-Antikörper verwendet. β-Aktin diente als endogene Ladekontrolle. (B) Das Experiment wurde wie in (A) durchgeführt. Als Inhibitor diente TBB in den angegebenen Konzentrationen.

der aus dem Rhizom des *Rheum palmatum* (Zier-Rhabarber) gewonnen wird (Yim *et al.*, 1999).

Wie in Abbildung 3.19 A und B zu sehen ist, induzierte die Behandlung mit OSM eine Phosphorylierung von STAT3, die durch Vorbehandlung mit beiden Inhibitoren konzentrationsabhängig abnahm. Dies bestätigte den beschriebenen Effekt einer CK2-Inhibition in der Signaltransduktion von OSM. Im Folgenden sollte also geklärt werden, ob CK2 eine ähnliche Rolle auch für andere IL-6-artigen Zytokine spielt.

3.3.2 STAT3-Aktivierung durch IL-6-artige Zytokine in HepG2-Zellen und Expression der Rezeptoren der IL-6-Familie

Für die weiteren Experimente zur Rolle von CK2 in der Signaltransduktion der IL-6-Familie sollte eine Zelllinie ausgewählt werden, die responsiv für die meisten der IL-6-artigen Zytokine ist und eine physiologische Jak/STAT-Aktivierung zeigt.

Die humane Leberkarzinomzelllinie HepG2 wurde daher über verschiedenen Zeiträume mit IL-6 stimuliert und die Signaltransduktion mittels Western Blot analysiert (Abbildung 3.20 A). Sowohl die Phosphorylierung von STAT3, als auch von STAT1 war bereits nach 15 min Stimulation deutlich mit phospho-spezifischen Antikörpern

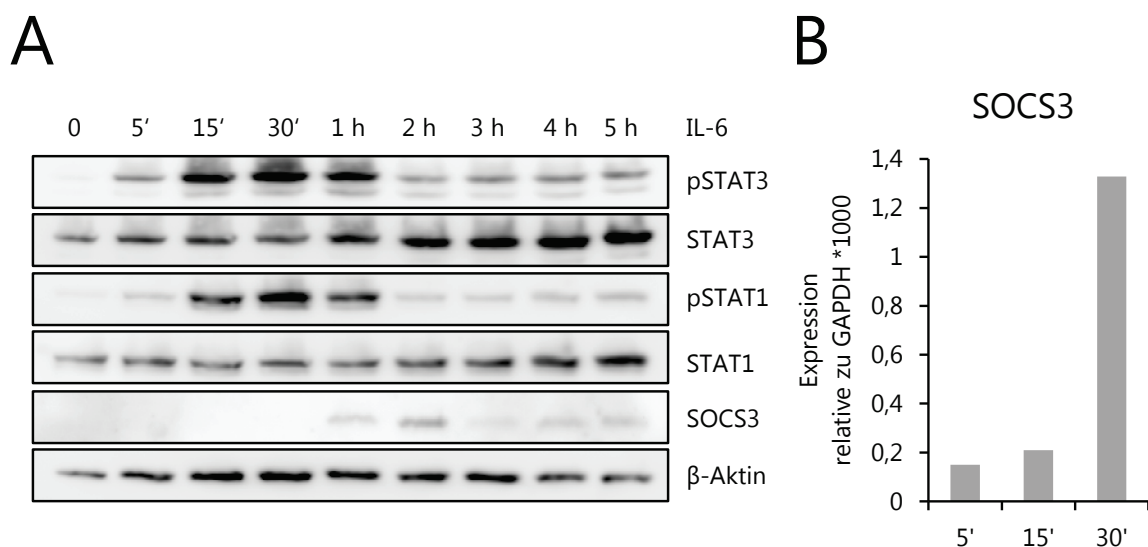


Abbildung 3.20: Signaltransduktion von IL-6 in HepG2 Zellen. (A) 1×10^6 HepG2 Zellen wurden pro Loch einer 6-Loch-Platte ausgesät und nach 24 h für 6 h in DMEM ohne Zusätze gehungert. Die Stimulation erfolgte bei 37°C mit 10 ng/ml IL-6 in den angegebenen Zeiträumen. Die Zellen eines Lochs wurden in 75 µl pSTAT3-Lysepuffer lysiert und eine Lysatmenge, die 50 µg Gesamtprotein entsprach, wurde auf ein SDS-Gel geladen. Die Detektion im Western Blot erfolgte mithilfe von spezifischen Antikörpern gegen STAT3, STAT1, SOCS3, β-Aktin oder phospho-spezifischen Antikörpern für STAT3 oder STAT1. (B) Das Experiment wurde wie in (A) durchgeführt. Die RNA wurde mithilfe des Nucleospin RNA II Kits von Macherey-Nagel nach Herstellerangaben gereinigt. Die reverse Transkription und Durchführung der qPCR sind in den Abschnitten 2.2.1.4 und 2.2.1.7 beschrieben. Dargestellt ist jeweils $2^{(-\Delta Ct)}$ in Bezug auf GAPDH als Mittelwert von Triplikaten.

nachzuweisen und erreichte nach 30 min ein Maximum. Der wichtigste Gegenspieler der STAT-Aktivierung durch IL-6 ist SOCS3 (Babon *et al.*, 2014). Die Expression von SOCS3 war in unstimulierten HepG2 nicht nachweisbar. Nach 1 h Stimulation war aber mit einem SOCS3-spezifischen Antikörper eine schwache Bande sichtbar, die ihr Maximum nach 2 h erreichte. Die Induktion der Expression von SOCS3 konnte auch auf Ebene der mRNA mittels quantitativer Echtzeit-PCR (qPCR) nachgewiesen werden, wo nach 30 min bereits eine Vervielfachung des Transkript-Levels zu beobachten war (Abbildung 3.20). Die HepG2 Zellen zeigen also eine physiologische STAT-Aktivierung durch IL-6, die durch SOCS3 gegenreguliert wird.

Als humane Leberzellen exprimieren HepG2 den IL-6R und sind damit responsiv für IL-6. Um auch die Expression der anderen Rezeptoren der IL-6-Familie zu untersuchen, wurde eine qPCR durchgeführt, deren Ergebnis in Abbildung 3.21 A dargestellt ist. Vor Allem für WSX-1, aber auch für gp130, den OSMR und den LIFR konnte eine starke Expression auf mRNA Ebene nachgewiesen werden. Die Menge an IL-6R mRNA war vergleichbar schwach und CNTFR-mRNA konnte kaum nachgewiesen werden.

Die Responsivität von HepG2 Zellen auf die IL-6-artigen Zytokine sollte auch funktional untersucht werden. Hierfür wurden sie mit 10 ng/ml des angegebenen Zytokins für

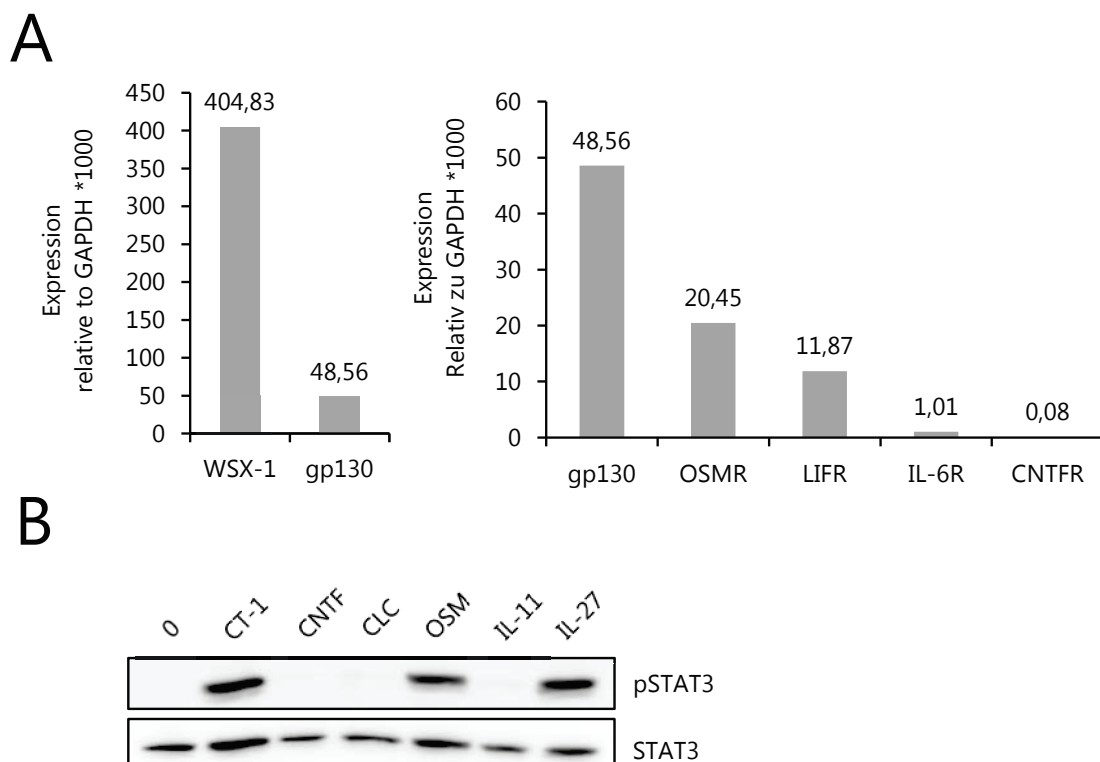


Abbildung 3.21: Expression der Rezeptoren der IL-6-Familie in HepG2 Zellen. (A) Die RNA wurde aus HepG2 Zellen mit Hilfe des Nucleospin RNA II Kits von Macherey-Nagel nach Herstellerangaben isoliert und gereinigt. Die reverse Transkription sowie die qPCR wurden wie in 2.2.1.4 und 2.2.1.7 beschrieben durchgeführt. Dargestellt ist jeweils $2^{(-\Delta Ct)}$ bezogen auf GAPDH als Mittelwert von Triplikaten. (B) HepG2 Zellen wurden mit 10 ng/ml der angegebenen Zytokine für 15 min bei 37°C stimuliert und in pSTAT3-Lysepuffer lysiert. 50 µg Gesamtprotein wurden auf ein SDS-Gel aufgetragen und STAT3 und phosphoryliertes STAT3 wurden im Western Blot mithilfe spezifischer Antikörper nachgewiesen.

15 min bei 37°C stimuliert und anschließend die STAT3-Aktivierung im Western Blot nachgewiesen (Abbildung 3.21 B). Die bereits gezeigte STAT-Aktivierung in HepG2 Zellen durch IL-6 bewies eine funktionale Expression von gp130 und dem IL-6R. Zusätzlich reagierten die Zellen auf eine Stimulation mit CT-1, OSM und IL-27, was bedeutet, dass auch der LIFR und WSX-1 funktional exprimiert wurden. Da OSM sowohl ein Heterodimer aus gp130 und dem LIFR, als auch aus gp130 und dem OSMR aktivieren kann, war dies kein Beweis für die funktionale Expression von OSMR in HepG2. Weder CNTF noch CLC führten zu einer STAT3-Aktivierung, was auf die zu geringe Expression des CNTFR zurückzuführen war. Auch die Expression des IL-11R schien gering zu sein, da die Zellen keine Responsivität auf eine Stimulation mit 10 ng/ml IL-11 zeigten. Insgesamt exprimierten die HepG2 Zellen alle Rezeptoren der Zytokinfamilie, außer dem CNTFR und dem IL-11R. Die Stimulation mit IL-6, CT-1, IL-27, LIF und OSM führte zu einer STAT3-Aktivierung in diesen Zellen.

3.3.3 Alle Zytokine der IL-6-Familie benötigen die Aktivität von CK2 für die STAT-Aktivierung

Da für OSM gezeigt werden konnte, dass die STAT-Aktivierung CK2-abhängig ist, sollte nun untersucht werden, ob dieses auch für die anderen Zytokine der IL-6-Familie zutrifft. Zunächst wurde das Experiment in Abbildung 3.19 mit Hyper-IL-6 wiederholt. Die STAT3-Aktivierung durch Hyper-IL-6 in HepG2 nahm konzentrationsabhängig sowohl durch Emodin (Abbildung 3.22 A), als auch durch TBB (Abbildung 3.22 B) ab. Da beide Inhibitoren einen vergleichbaren Effekt aufwiesen, wurde für die folgenden Experimente TBB verwendet, da dieser Inhibitor eine höhere Spezifität für CK2 aufweist (Sarno *et al.*, 2001).

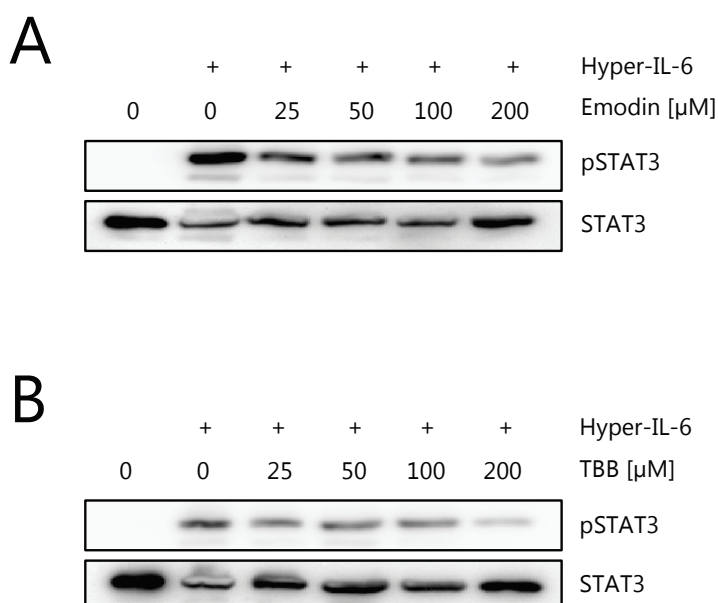


Abbildung 3.22: CK2-Abhängigkeit von Hyper-IL-6-induzierter STAT3-Aktivierung.

(A) HepG2 Zellen wurden in 6-Loch-Platten ausgesät (1×10^6 pro Loch) und am nächsten Tag 4,5 h in DMEM ohne Zusätze gehungert. Die Behandlung mit Emodin erfolgte in den angegebenen Konzentrationen für 1,5 h, bevor die Zellen 15 min mit 10 ng/ml Hyper-IL-6 stimuliert wurden. Sie wurden in pSTAT3-Lysepuffer lysiert und 50 μg Gesamtprotein auf ein SDS-Gel aufgetragen. Die Detektion im Western Blot erfolgte mit spezifischen Antikörpern gegen STAT3 oder phospho-STAT3. (B) Das Experiment wurde wie in (A) durchgeführt. Statt Emodin wurde TBB verwendet.

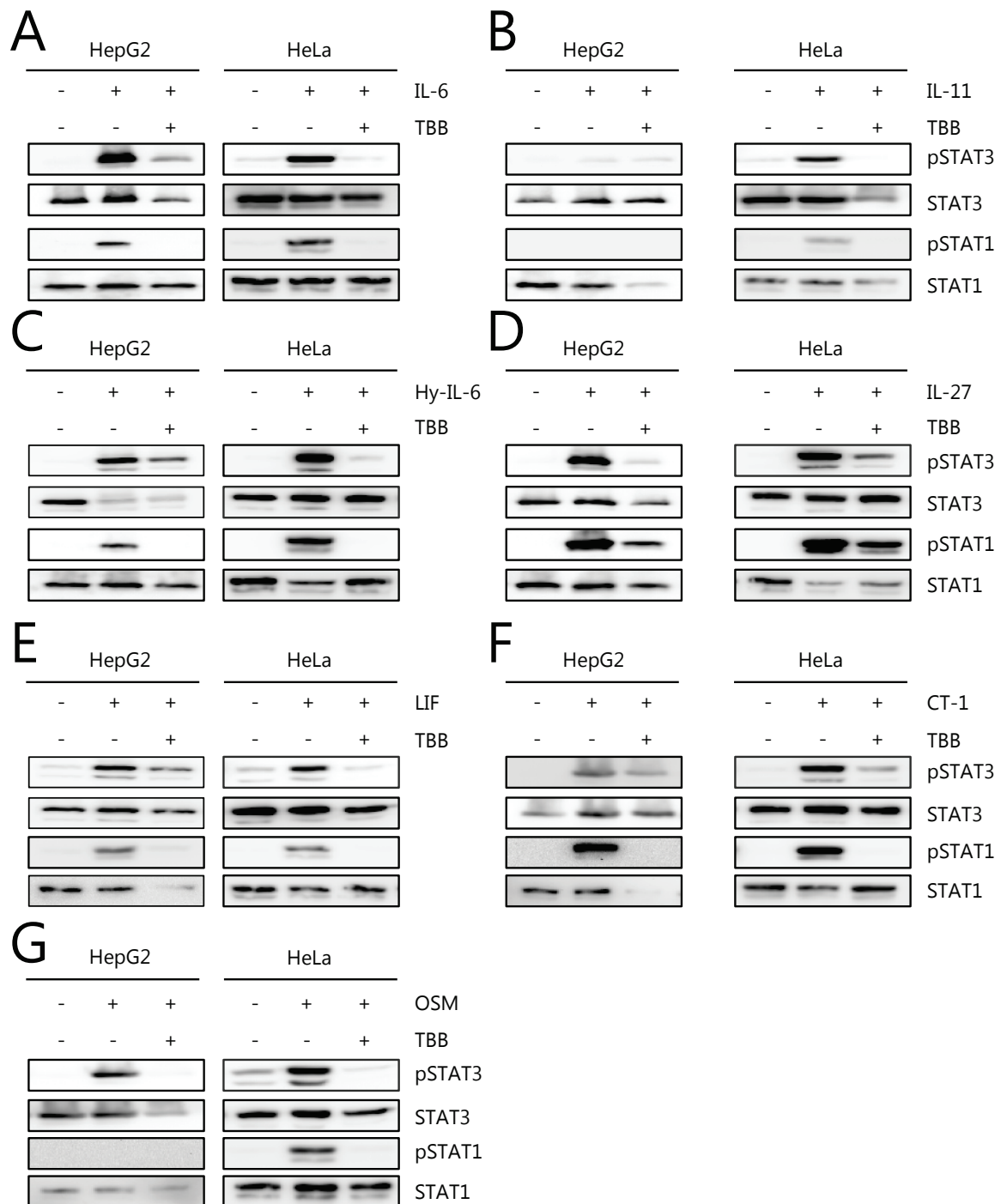


Abbildung 3.23: CK2-Abhängigkeit der Signaltransduktion von IL-6-artigen Zytokinen. Die Zellen wurden wie in Abbildung 3.22 beschrieben behandelt. Als CK2-Inhibitor diente TBB in einer Konzentration von 100 μ M. (A) HepG2 Zellen: 10 ng/ml IL-6; HeLa: 20 ng/ml IL-6, (B) HepG2 Zellen: 10 ng/ml IL-11; HeLa Zellen: 20 ng/ml IL-11, (C) 10 ng/ml Hyper-IL-6, (D) 10 ng/ml IL-27, (E) 10 ng/ml LIF, (F) 10 ng/ml CT-1 und (G) 10 ng/ml OSM. Die Phosphorylierung von STAT3 und STAT1 wurde im Western Blot mithilfe spezifischer Antikörper nachgewiesen.

Es wurden HepG2 und HeLa Zellen, die im Gegensatz zu HepG2 Zellen auch responsiv für IL-11 waren, mit den IL-6-artigen Zytokinen stimuliert und der Effekt einer Vorbehandlung mit dem CK2-Inhibitor TBB analysiert. Abbildung 3.23 zeigt im Western Blot die Phosphorylierung von STAT3 und STAT1 nach Stimulation mit IL-6 (A), IL-11

(B), Hyper-IL-6 (C), IL-27 (D), LIF (E) und CT-1 (F) verglichen mit OSM (G) und den Einfluss von TBB.

Die Stimulation mit allen Zytokinen führte sowohl zu einer Phosphorylierung von STAT3, als auch von STAT1, wenn auch in unterschiedlichem Maße. Dieser Effekt konnte in allen Fällen durch eine Vorbehandlung mit TBB inhibiert werden, sodass die STAT-Phosphorylierung nicht mehr nachgewiesen werden konnte. IL-27 führte im Unterschied zu den anderen Zytokinen vor allem zu einer starken STAT1-Aktivierung und weniger zu einer STAT3-vermittelten Signaltransduktion (Abbildung 3.23 D). Diese Phosphorylierung von STAT1 konnte unter den gewählten Bedingungen nur teilweise inhibiert werden.

Der α -Rezeptor für IL-11 war in HepG2 Zellen augenscheinlich nicht oder nur sehr schwach exprimiert, da in diesen Zellen kaum eine STAT3- und keine STAT1-Phosphorylierung durch IL-11-Stimulation nachgewiesen werden konnte. Der Effekt von TBB auf die IL-11-Signaltransduktion war aber in HeLa Zellen mit allen anderen Zytokinen vergleichbar (Abbildung 3.23 B).

Für alle Zytokine der IL-6-Familie, die hier getestet wurden, konnte eine Abhängigkeit der Signaltransduktion über STAT1 und STAT3 von CK2 gezeigt werden. Sowohl in HepG2, als auch in HeLa Zellen wurde die STAT-Aktivierung, die durch 10 ng/ml Zytokin induziert worden war, durch 100 μ M TBB stark reduziert oder vollständig inhibiert.

3.3.4 Generierung von Ba/F3-gp130-LIFR Zellen

Um die Signaltransduktion von Zytokinen der IL-6-Familie untersuchen zu können, wurden Ba/F3-gp130, Ba/F3-gp130-IL-6R und Ba/F3-gp130-LIFR Zellen benötigt, wovon nur Letztere aus Ba/F3-gp130 Zellen generiert werden mussten, da sie nicht in der Arbeitsgruppe vorhanden waren. Hierfür wurden Ba/F3-gp130 Zellen retroviral mit dem Plasmid pMOWS-LIFR transduziert, das eine Resistenz gegen das Antibiotikum Puromycin trug, mit dem die Zellen anschließend selektiert wurden.

Die so erhaltenen Zellen proliferierten, wie in Abbildung 3.24 A gezeigt, weiterhin in Abhängigkeit von Hyper-IL-6, diese Proliferation konnte aber zusätzlich mit LIF und OSM induziert werden, was zeigte, dass der LIFR exprimiert wurde und funktional war. In Abhängigkeit von CNTF proliferierten die Ba/F3-gp130-LIFR Zellen nicht, da ihnen der CNTFR fehlte. Ebenfalls gezeigt werden konnte die Phosphorylierung von STAT3 in Abhängigkeit der LIFR-bindenden Zytokine LIF und CT-1, genauso wie durch Hyper-IL-6 (Abbildung 3.24 B). Diese Ergebnisse deuteten ebenfalls auf eine funktionale Oberflächenexpression des LIFRs hin.

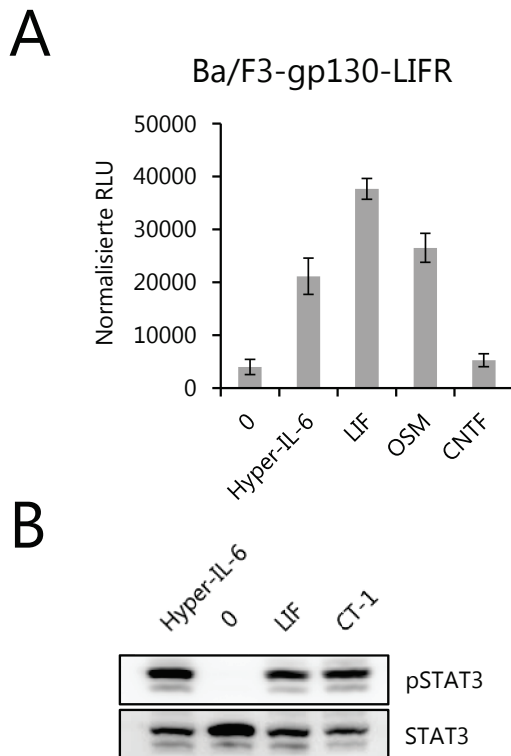


Abbildung 3.24: Proliferation und STAT-Aktivierung von stabil transduzierten Ba/F3-gp130-LIFR Zellen.

(A) Ba/F3-gp130-LIFR Zellen wurden, wie in Abschnitt 2.2.2.6 beschrieben, 48 h mit 10 ng/ml der angegebenen Zytokine stimuliert und ihre Proliferation gemessen. Dargestellt sind Mittelwerte von Triplikaten $\pm$ Standardabweichung. (B) Ba/F3-gp130-LIFR Zellen wurden 3 h in DMEM ohne Zusätze gehungert und 15 min mit 10 ng/ml der angegebenen Zytokine stimuliert. Die Detektion im Western Blot erfolgte mit einem STAT3- und einem phospho-spezifischen STAT3-Antikörper.

3.3.5 Proliferation und STAT-Signaltransduktion in Ba/F3-gp130, Ba/F3-gp130-IL-6R und Ba/F3-gp130-LIFR Zellen sind CK2-abhängig

Dass CK2 essentiell für die STAT-Aktivierung durch IL-6-artige Zytokine ist, konnte bereits in HepG2 und HeLa Zellen gezeigt werden (Abschnitt 3.3.3). Hier sollte nun untersucht werden, ob dieses auch in Ba/F3-gp130-Zelllinien der Fall ist und damit auch deren Proliferation von CK2 abhängig ist. Hierzu wurden Ba/F3-gp130, Ba/F3-gp130-IL-6R und Ba/F3-gp130-LIFR mit den entsprechenden Zytokinen in einer Konzentration von 10 ng/ml mit oder ohne Vorinkubation mit TBB stimuliert. Im Western Blot konnte gezeigt werden, dass Ba/F3-gp130 Zellen in Abhängigkeit von Hyper-IL-6 und IL-27 eine starke Phosphorylierung von STAT3 aufwiesen, die bei einer Vorbehandlung mit TBB nicht nachzuweisen war (Abbildung 3.25 A). Eine Stimulation mit IL-6 führte in diesen Zellen zu keiner Aktivierung, wohl aber in Ba/F3-gp130-IL-6R Zellen, in denen alle drei Zytokine eine CK2-abhängige STAT3- und STAT1-Phosphorylierung induzierten (Abbildung 3.25 B). In Ba/F3-gp130-LIFR Zellen führten LIF und CT-1, aber nicht mit IL-6, zu einer starken STAT3- und einer schwachen STAT1-Phosphorylierung, die insgesamt durch TBB inhibiert werden konnten (Abbildung 3.25 C).

Eine der Hauptfunktionen der IL-6-artigen Zytokine ist die Proliferationsinduktion in hämatopoetischen Zellen. Daher sollte hier getestet werden, ob auch diese Funktion CK2-abhängig ist. Ba/F3-gp130, Ba/F3-gp130-IL-6R und Ba/F3-gp130-LIFR Zellen wurden dafür über 48 h mit 10 ng/ml Zytokin und ansteigenden Konzentrationen TBB (0-250 μ M) behandelt. Die Stimulation von Ba/F3-gp130 Zellen mit Hyper-IL-6 oder

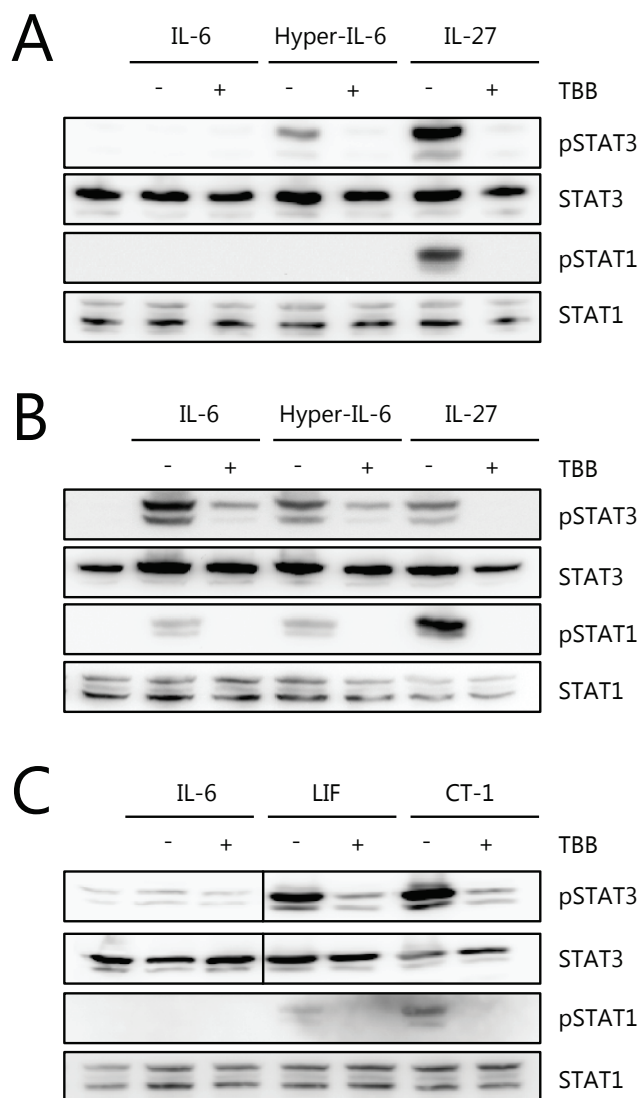
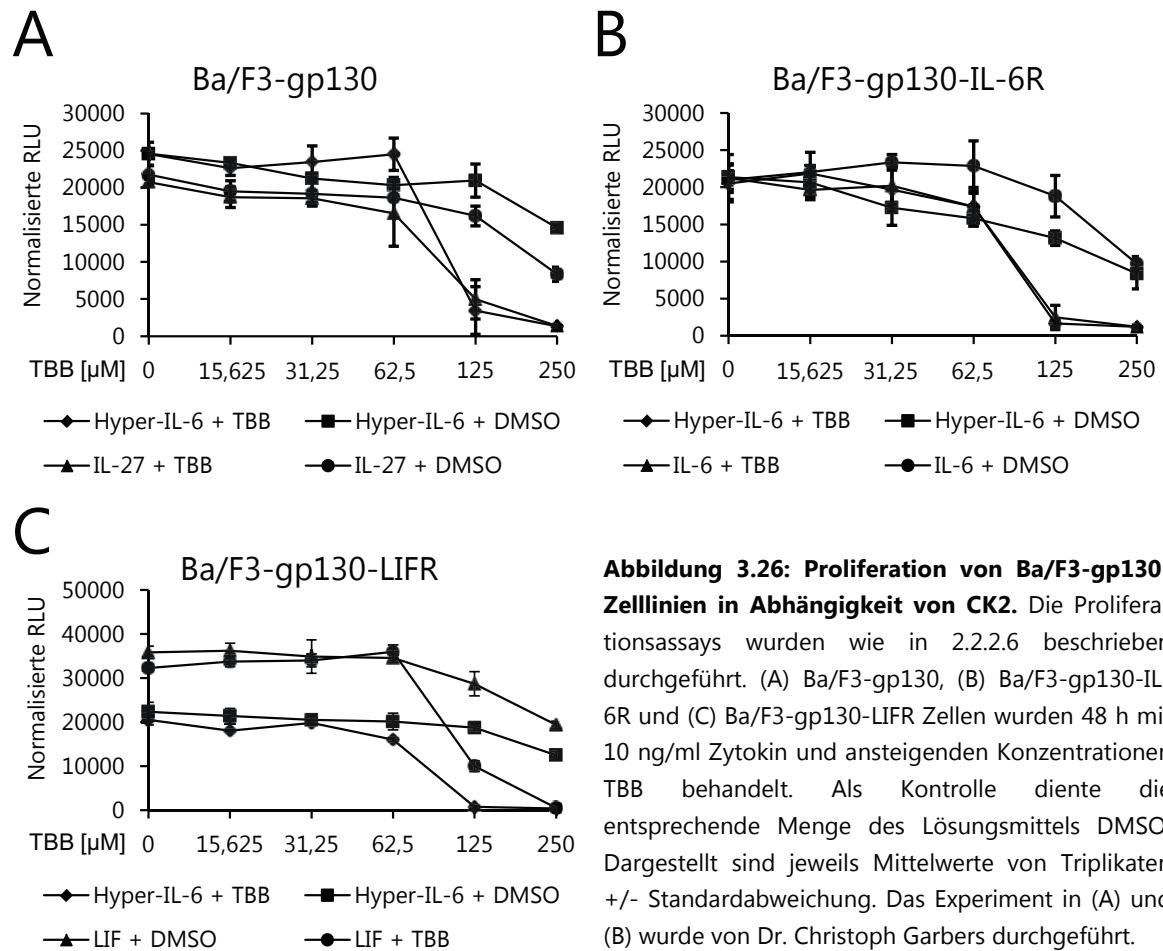


Abbildung 3.25: STAT-Aktivierung in Ba/F3-gp130-Zelllinien in Abhängigkeit von CK2. (A) Ba/F3-gp130, (B) Ba/F3-gp130-IL-6R und (C) Ba/F3-gp130-LIFR Zellen wurden 90 min in serumfreiem DMEM gehungert und weitere 90 min mit 100 μ M TBB oder der entsprechenden Menge DMSO behandelt, bevor sie 15 min mit 10 ng/ml Zytokin stimuliert wurden. Das Zellpellet wurde in Lämmli-Puffer aufgekocht. Die Menge des auf das SDS-Gel aufgetragenen Lysats entsprach 7×10^5 Zellen. Die Detektion im Western Blot erfolgte mit STAT1- oder STAT3-spezifischen Antikörpern oder mit phospho-spezifischen Antikörpern gegen einen der beiden Transkriptionsfaktoren.

IL-27 führte zu einer konstanten Proliferation, die durch Behandlung mit ansteigenden Konzentrationen TBB reduziert werden konnte. Bei einer TBB-Konzentration von 125 μ M war die Proliferation bereits fast vollständig unterbunden (Abbildung 3.26 A). Das Gleiche galt, wenn Ba/F3-gp130-IL-6R Zellen mit IL-6 oder Hyper-IL-6 stimuliert wurden (Abbildung 3.26 B). In Ba/F3-gp130-LIFR Zellen war die durch LIF induzierte Proliferation zwar wesentlich stärker, als die durch Hyper-IL-6, beide konnten aber mit vergleichbaren Konzentrationen TBB gehemmt werden (Abbildung 3.26 C). Bei allen Zelllinien diente die Behandlung mit dem Lösungsmittel DMSO als Kontrolle, das in Konzentrationen, die 250 μ M TBB entsprachen, bereits zu einer leichten Reduktion der Proliferation führte.

Da die Wirkung der Zytokine konzentrationsabhängig ist, wurden ebenfalls Proliferationsassays mit steigender Zytokinkonzentration bei gleichbleibender TBB-Konzentration (125 μ M) angefertigt. Die verschiedenen Zytokine wurden in Konzentrationen von 0,01 bis 100 ng/ml auf die drei Zelllinien gegeben und erneut die Proliferation nach 48 h gemessen. In Ba/F3-gp130 Zellen konnte selbst die höchste



Zytokinkonzentration von 100 ng/ml keine Proliferation induzieren, wenn die Zellen mit TBB behandelt wurden (Abbildung 3.27 A). Bei Kontrollbehandlung mit DMSO induzierten 1 ng/ml IL-27 und 10 ng/ml Hyper-IL-6 eine starke Proliferation. In Ba/F3-gp130-IL-6R Zellen zeigte sich ein ähnliches Ergebnis. Mit TBB induzierten selbst 100 ng/ml Zytokin keine Proliferation, während 10 ng/ml IL-6 oder Hyper-IL-6 ohne TBB dies taten (Abbildung 3.27 B). Ba/F3-gp130-LIFR Zellen zeigten bei Zytokinkonzentrationen ab 10 ng/ml einen leichten Anstieg der Proliferation unter TBB-Behandlung, der aber immer noch wesentlich schwächer war, als mit DMSO (Abbildung 3.27 C). In BaF3-gp130 Zellen und den LIFR- und IL-6R-transduzierten Varianten, resultierte eine Inhibition von CK2 in einer fehlenden Jak/STAT-Aktivierung durch die IL-6-artigen Zytokine, wie es zuvor auch in HepG2 und HeLa Zellen gezeigt werden konnte. Dieses konnte in den Ba/F3 Zellen auch anhand einer reduzierten Proliferation dargestellt werden. Der pharmakologische Block der CK2-Aktivität wurde auch vom Einsatz von Zytokinkonzentrationen von 100 ng/ml nicht kompensiert.

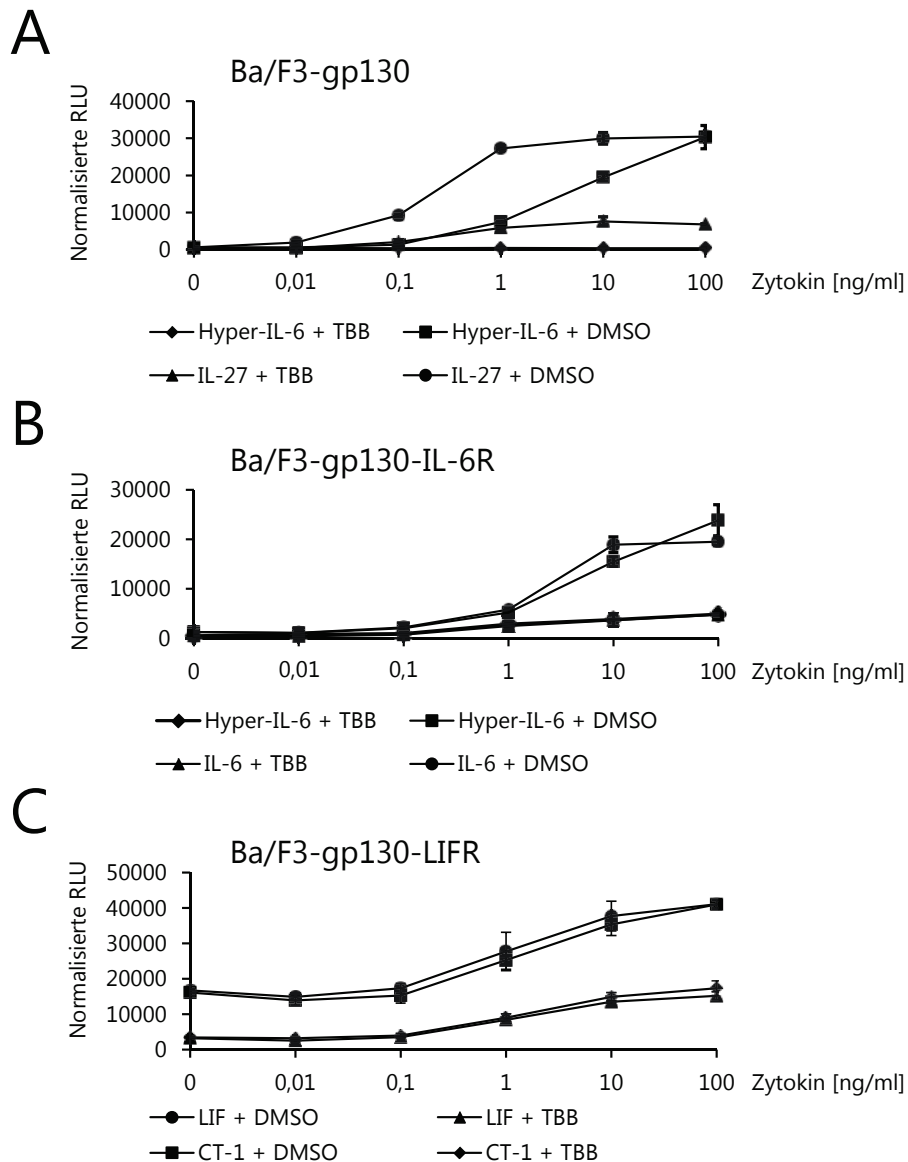


Abbildung 3.27: Hohe Zytokinkonzentrationen können die CK2-Inhibition nicht kompensieren. (A) Ba/F3-gp130, (B) Ba/F3-gp130-IL-6R und (C) Ba/F3-gp130-LIFR Zellen wurden mit 125 µM TBB oder der entsprechenden Menge DMSO behandelt. Zudem wurden sie 48 h mit ansteigenden Zytokinkonzentrationen stimuliert. Die Durchführung der Proliferationsassays ist in Abschnitt 2.2.2.6 genauer beschrieben. Dargestellt sind jeweils Mittelwerte von Triplikaten +/- Standardabweichung.

3.3.6 CK2-Inhibition führt zur Reduktion von Akt-Expression und -Signaltransduktion

CK2 spielt eine Schlüsselrolle in vielen zellulären Signalwegen und hat vor allem auf die PI3K/Akt-Signaltransduktion einen großen Einfluss. CK2 erhöht die Expression von Akt und inhibiert gleichzeitig die Phosphatase PTEN, die einen Gegenspieler von Akt darstellt (Di Maira *et al.*, 2005). Auch die IL-6-artigen Zytokine aktivieren neben der STAT-Signaltransduktion weitere Signalwege, zu denen auch der PI3K/Akt-Weg zählt

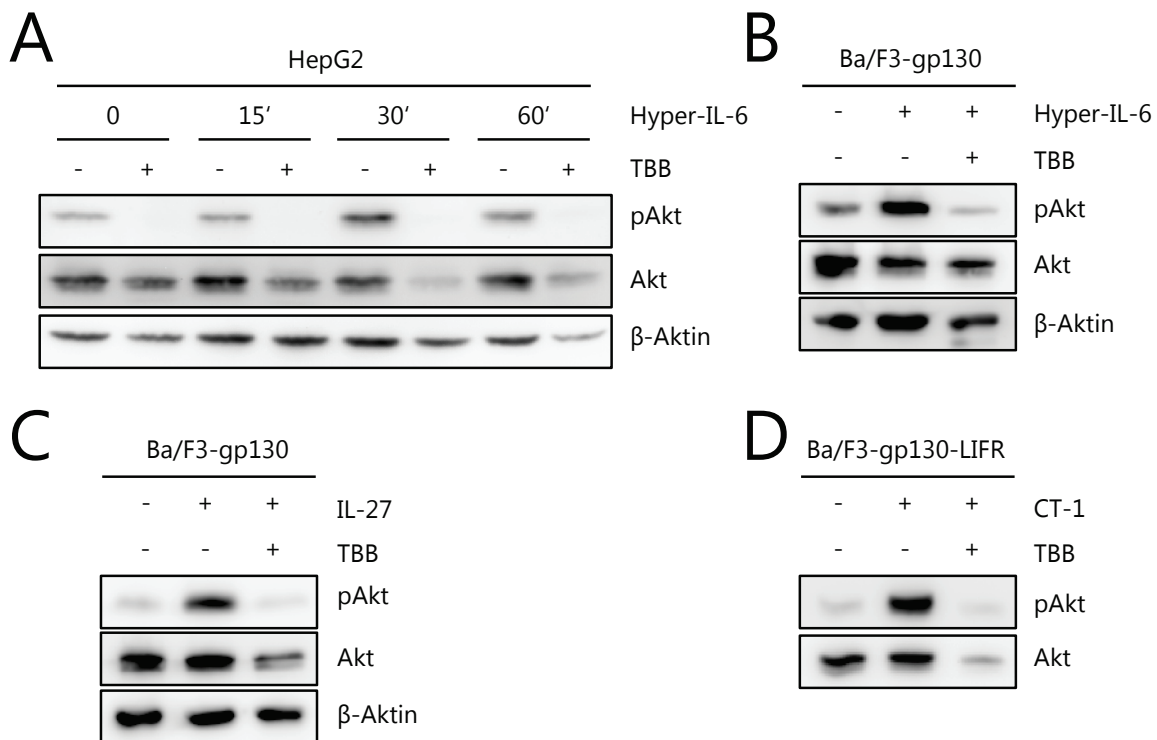


Abbildung 3.28: Akt-Expression und -Phosphorylierung durch IL-6-artige Zytokine unter CK2-Inhibition.

(A) 1×10^6 HepG2 Zellen wurden pro Loch einer 6-Loch-Platte ausgesät und über Nacht in DMEM ohne Zusätze gehungert. Die Zellen wurden 90 min mit 100 μ M TBB behandelt, bevor sie mit 10 ng/ml Hyper-IL-6 für 15, 30 oder 60 min stimuliert wurden. Sie wurden in pSTAT3-Lysepuffer lysiert und 50 μ g Gesamtprotein auf ein SDS-Gel geladen. (B) Ba/F3-gp130 Zellen wurden 90 min in DMEM ohne Zusätze gehungert und weitere 90 min mit 100 μ M TBB oder der entsprechenden Menge DMSO behandelt. Die Stimulation erfolgte mit 10 ng/ml Hyper-IL-6 für 15 min. Das Zellpellet wurde in Lämmli-Puffer aufgekocht und eine Menge des Lysats, die 7×10^5 Zellen entsprach, auf ein SDS-Gel aufgetragen. (C) Ba/F3-gp130 Zellen wurden wie in (B) behandelt, aber mit 10 ng/ml IL-27 stimuliert. (D) Ba/F3-gp130-LIFR Zellen wurden wie in (B) behandelt, aber mit 10 ng/ml CT-1 stimuliert. Die Detektion im Western Blot erfolgte mit einem Akt-spezifischen und einem phospho-spezifischen Antikörper gegen Akt. Als endogene Ladekontrolle diente β -Aktin.

(Eulenfeld *et al.*, 2012). Um zu überprüfen, ob die Effekte einer Behandlung mit TBB in den gewählten Zelllinien mit den in der Literatur beschriebenen übereinstimmen, wurde die Expression und Phosphorylierung von Akt mittels Immunoblot analysiert.

Wie in Abbildung 3.28 A dargestellt, war nach 12-stündigem Hungern der HepG2 Zellen ohne Serum noch eine basale Akt-Phosphorylierung zu erkennen. Diese konnte durch Stimulation mit 10 ng/ml Hyper-IL-6 weiter gesteigert werden und erreichte nach 30 min ihr Maximum. Durch Vorbehandlung mit TBB war sowohl die basale, als auch die induzierte Phosphorylierung von Akt nicht mehr nachweisbar und nach insgesamt 2 h Behandlung mit TBB (90 min Vorinkubation und 30 min Stimulation) war auch die Expression von Akt sehr deutlich reduziert. In der Abbildung 3.28 B und C wurden Ba/F3-gp130 Zellen ebenfalls 90 min mit TBB oder DMSO vorbehandelt und 15 min stimuliert, um die Expression und Phosphorylierung von Akt zu analysieren. Wie erwartet führte auch hier eine Stimulation zu einer Phosphorylierung von Akt, die bei

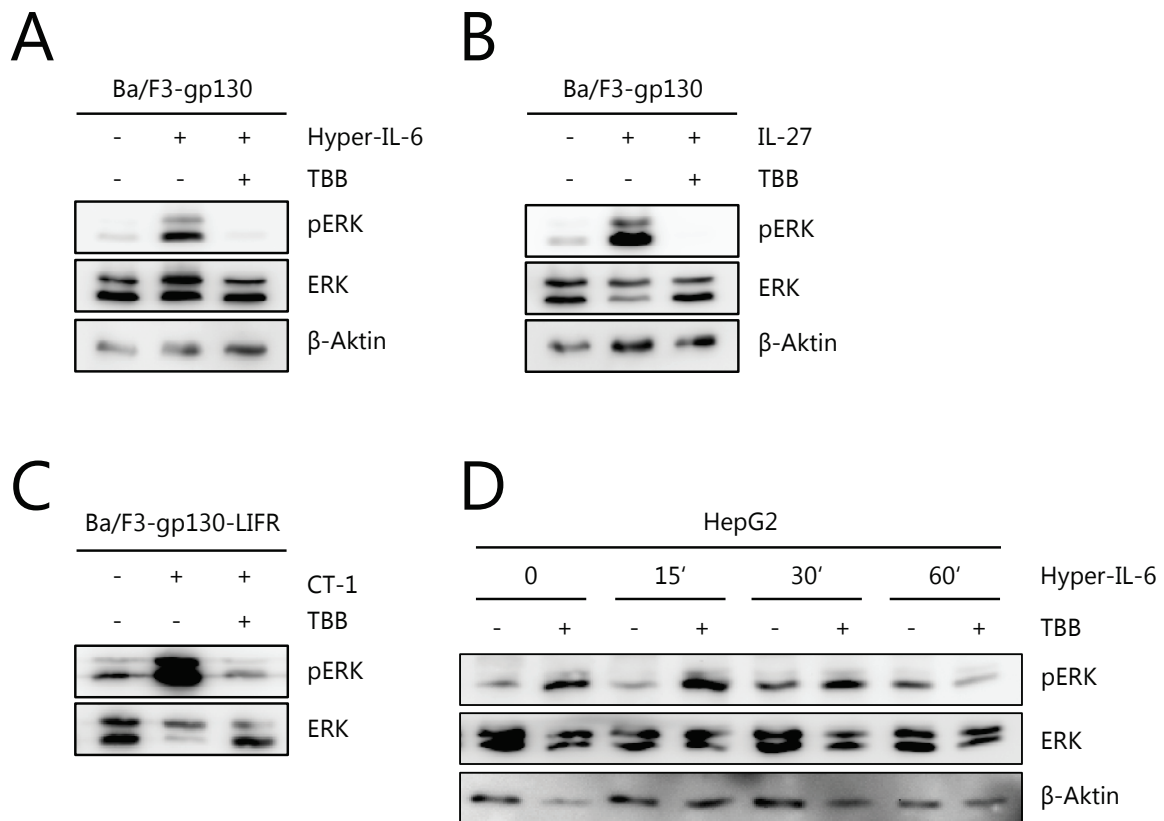


Abbildung 3.29: CK2-Abhängigkeit der ERK-Aktivierung durch Zytokine der IL-6-Familie. (A) Ba/F3-gp130 Zellen wurden, wie in Abbildung 3.28B beschrieben, behandelt. (B) Nach Behandlung wie in (A) wurden die Zellen 15 min mit 10 ng/ml IL-27 stimuliert. (C) Nach Behandlung wie in (A) wurden die Ba/F3-gp130-LIFR Zellen 15 min mit 10 ng/ml CT-1 stimuliert. (D) HepG2 Zellen wurden mit einer Dichte von 1×10^6 Zellen pro Loch einer 6-Loch-Platte ausgesät und über Nacht in DMEM ohne Zusätze gehungert. Die Zellen wurden dann 90 min mit 100 μ M TBB oder DMSO behandelt und 15, 30 oder 60 min mit 10 ng/ml Hyper-IL-6 stimuliert. Sie wurden in pSTAT3-Lysepuffer lysiert und 50 μ g Gesamtprotein auf ein SDS-Gel geladen. Die Detektion im Western Blot erfolgte mit einem ERK1/2-spezifischen und einem phospho-spezifischen Antikörper gegen ERK1/2. Als endogene Ladekontrolle diente β -Aktin.

CK2-Inhibition nicht auftrat. Die Expression von Akt war, wie in HepG2 Zellen nach 15 min Stimulation, leicht reduziert. Dabei spielte es keine Rolle, ob es sich um Hyper-IL-6 oder IL-27 als Zytokin handelte. Auch die CT-1-Stimulation in Ba/F3-gp130-LIFR Zellen ergab das gleiche Resultat (Abbildung 3.28 D). Insgesamt konnte eine Vorbehandlung mit TBB wie erwartet die Phosphorylierung von Akt verhindern und führte auch in allen getesteten Zelllinien zu einer Reduktion der Akt Expression.

3.3.7 CK2 ist involviert in die ERK-Aktivierung durch IL-6-artige Zytokine

Wie im vorherigen Abschnitt gezeigt, aktivieren die Zytokine der IL-6-Familie nicht nur den Jak/STAT-Signalweg. Einen weiteren wichtigen Anteil an der gp130-Signaltransduktion haben die MAP-Kinasen (Eulenfeld *et al.*, 2012).

Um den Einfluss einer CK2-Inhibition auf die Hyper-IL-6- und IL-27-induzierte ERK-Phosphorylierung zu untersuchen, wurden wie zuvor Ba/F3-gp130 Zellen 90 min gehungert, 90 min mit 100 μ M TBB oder DMSO behandelt und anschließend für 15 min mit 10 ng/ml Zytokin stimuliert. Phosphorylierung und Expression von ERK wurden per Western Blot analysiert. Als Ladekontrolle diente β -Aktin (Abbildung 3.29 A und B). Dasselbe Experiment wurde mit Ba/F3-gp130-LIFR Zellen und CT-1 durchgeführt (Abbildung 3.29 C). In allen Fällen führte eine Zytokinstimulation für 15 min zu einer starken Phosphorylierung von ERK, die durch Vorbehandlung mit TBB inhibiert wurde. Das ERK-Expressionslevel zeigte keine Beeinflussung durch die CK2-Inhibition.

In Abbildung 3.29 D ist ein vergleichbares Experiment mit HepG2 Zellen dargestellt. Die Zellen wurden über Nacht gehungert und 90 min mit 100 μ M TBB oder DMSO behandelt. Die Stimulation mit 10 ng/ml Hyper-IL-6 führte in dieser Zelllinie allerdings nur zu einer sehr schwachen ERK-Aktivierung, die erst nach 30 min sichtbar war. Interessanterweise führte schon die Behandlung mit TBB ohne Zytokinstimulation zu einer weitaus stärkeren Aktivierung von ERK, als Hyper-IL-6 alleine. Einzig nach 60 min Stimulation war die Phosphorylierung von ERK stärker ohne, als mit TBB.

Alles in allem zeigte die CK2-Inhibition einen starken Einfluss auf die ERK-Aktivierung durch Zytokine der IL-6-Familie.

3.3.8 Jak1 ist im Gegensatz zu Jak2 notwendig für die CK2-abhängige STAT-Aktivierung

Die Aktivierung von STATs durch die Bildung von Rezeptorkomplexen mit gp130 Homo- oder Heterodimeren ist abhängig von Janus-Kinasen, die mit den Rezeptoren assoziiert vorliegen. Bei Bindung der Zytokine phosphorylieren die Janus-Kinasen die intrazellulären Domänen der Rezeptoren, sowie die dort bindenden STATs. Die phosphorylierten Tyrosine in gp130 dienen als Bindungsoberflächen für STAT-Transkriptionsfaktoren, die nach der Phosphorylierung in den Zellkern translozieren, wo sie die Expression von Zielgenen regulieren (Stahl *et al.*, 1994; Stahl *et al.*, 1995).

In Zheng *et al.*, 2011 wurde eine bedeutende Rolle von Jak2 für die OSM-induzierte, CK2-abhängige Aktivierung von STATs postuliert. Da Zytokine der IL-6-Familie aber vor allem die Kinase Jak1 aktivieren (Guschin *et al.*, 1995), sollte hier mithilfe von Jak2- bzw. Jak1-defizienten murinen embryonalen Fibroblasten (MEFs) die Rolle der beiden Kinasen untersucht werden.

Hierzu wurden zunächst Jak2-defiziente MEFs mit Jak2 retransfiziert. Als Kontrolle diente die Transfektion mit dem pN1-eGFP-Plasmid. Wie in Abbildung 3.30 A dargestellt, war in den MEFs keine Proteinexpression von Jak2 nachweisbar, diese konnte aber durch Retransfektion erreicht werden. Die MEFs wurden zusätzlich 48 h nach Transfektion für 15 min mit verschiedenen Konzentrationen Hyper-IL-6 stimuliert und

die Aktivierung von STAT3 im Western Blot analysiert (Abbildung 3.30 B). Hierbei hatte die Präsenz von Jak2 keinen Einfluss auf die Responsivität der Zellen gegenüber der Hyper-IL-6-Stimulation. STAT3 lag in beiden Fällen bei hohen Zytokinkonzentrationen in phosphorylierter Form vor. Wie Abbildung 3.30 C zeigt, führte die Stimulation mit 10 ng/ml Hyper-IL-6, CT-1 und auch OSM auch in Abwesenheit von Jak2 zu einer Aktivierung von STAT3 und diese war mit TBB hemmbar. Beim Fehlen von Jak1 in Jak1^{-/-} MEFs dagegen, kam es durch Hyper-IL-6-Stimulation auch bei einer hohen Konzentration von 10 ng/ml nur zu einer sehr schwachen Phosphorylierung von STAT3 (Abbildung 3.31). Diese konnte allerdings durch Retransfektion von Jak1 rekonstituiert werden. Auch der Vergleich von Jak1-defizienten MEFs mit WT MEFs zeigte eine

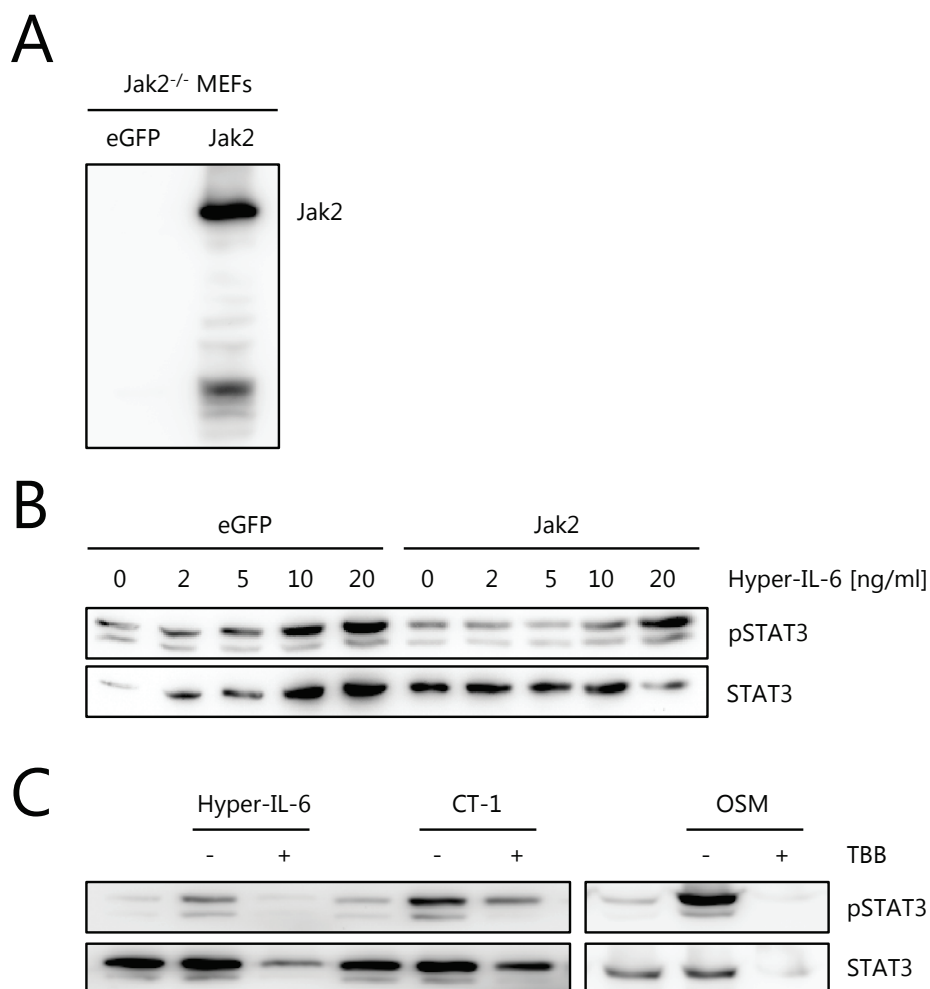


Abbildung 3.30: Jak2 ist entbehrlich für die Jak/STAT-Aktivierung durch IL-6-artige Zytokine. (A) Jak2-defiziente (Jak2^{-/-}) MEFs wurden transient mit Jak2 oder als Kontrolle mit eGFP transfiziert und die Proteinexpression nach 48 h mit einem Jak2-spezifischen Antikörper im Western Blot analysiert. (B) Jak2^{-/-} MEFs wurden wie in (A) transfiziert, 5 h in DMEM ohne Zusätze gehungert und 15 min mit den angegebenen Konzentrationen Hyper-IL-6 stimuliert. Die Analyse der STAT3-Phosphorylierung erfolgte im Western Blot. (C) Die Jak2^{-/-} MEFs wurden in 6-Loch-Platten ausgesät und 24 h später für 3,5 h in DMEM ohne Zusätze gehungert. Sie wurden dann 90 min mit 75 µM TBB oder DMSO vorinkubiert und 15 min mit 10 ng/ml Hyper-IL-6, CT-1 oder OSM stimuliert.

konzentrationsabhängige STAT3-Phosphorylierung sowohl durch Hyper-IL-6, als auch durch CT-1 in den WT Zellen, wie auch in Jak2-defizienten Zellen. In den Jak1-defizienten Zellen kam es zu einer Aktivierung von STAT3 (Abbildung 3.32).

Die ausschlaggebende Kinase bei der STAT-Aktivierung durch IL-6-artige Zytokine ist also Jak1 und nicht Jak2. Ein Fehlen von Jak2 führt nicht zu einer verminderten STAT3-Phosphorylierung und diese STAT3-Aktivierung ist auch weiterhin CK2-abhängig. CK2 spielt daher wahrscheinlich eine Rolle in der Jak2-Aktivierung, wie in Zheng *et al.*, 2011 postuliert, diese ist allerdings wenig relevant in der Signaltransduktion der IL-6-artigen Zytokine. Auch Jak1 scheint daher von der CK2-Aktivität abhängig zu sein.

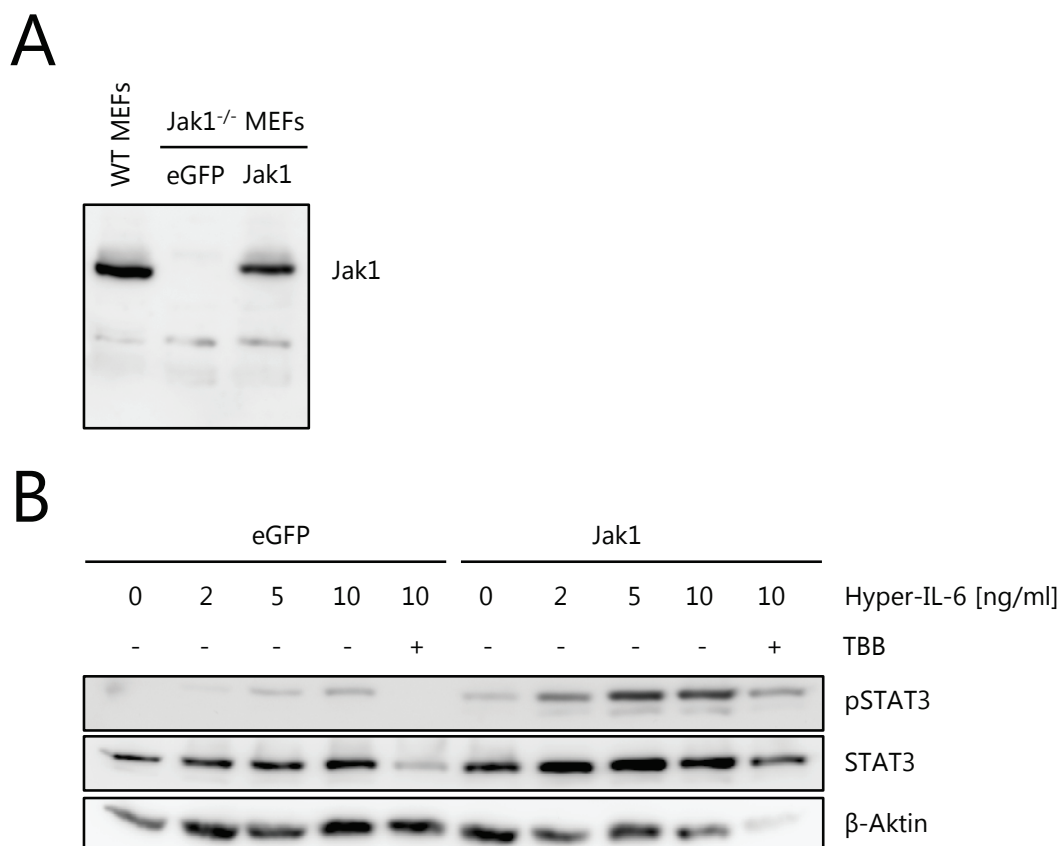


Abbildung 3.31: Jak1 ist für die Hyper-IL-6-induzierte Jak/STAT-Aktivierung notwendig. (A) Jak1-defiziente (Jak1^{-/-}) MEFs wurden transient mit Jak1 oder eGFP transfiziert und die Proteinexpression 48 h später im Western Blot mit einem Jak1-spezifischen Antikörper analysiert. (B) Die Jak1^{-/-} MEFs wurden wie in (A) transfiziert, in 6-Loch-Platten ausgesät, 5h in serumfreiem DMEM gehungert und anschließend 15 min mit den angegebenen Konzentrationen Hyper-IL-6 stimuliert. Wo angegeben erfolgte eine Vorinkubation für 90 min mit 75 µM TBB. Die STAT3-Phosphorylierung wurde mithilfe spezifischer Antikörper im Western Blot analysiert. B-Aktin diente als endogene Ladekontrolle.

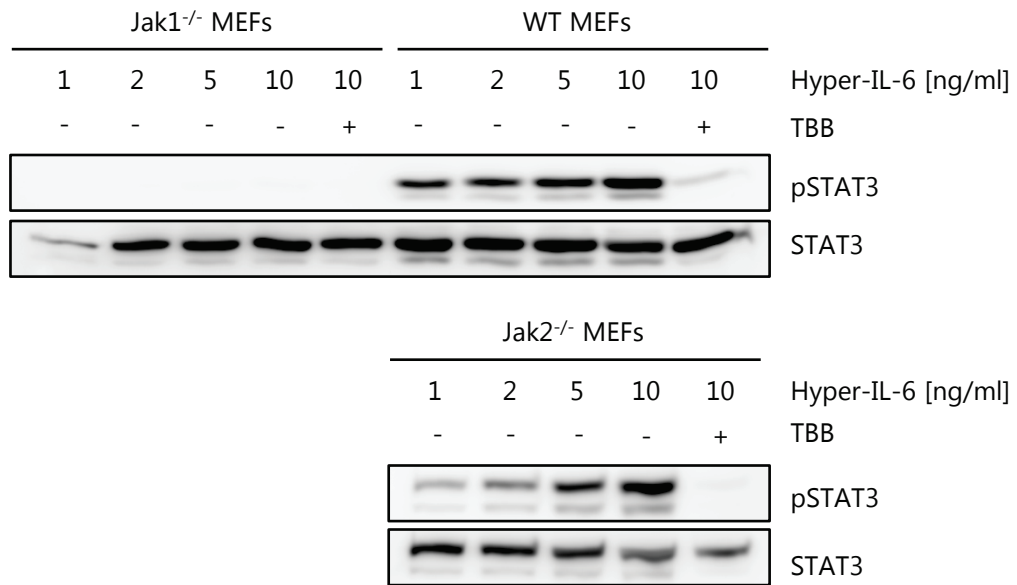
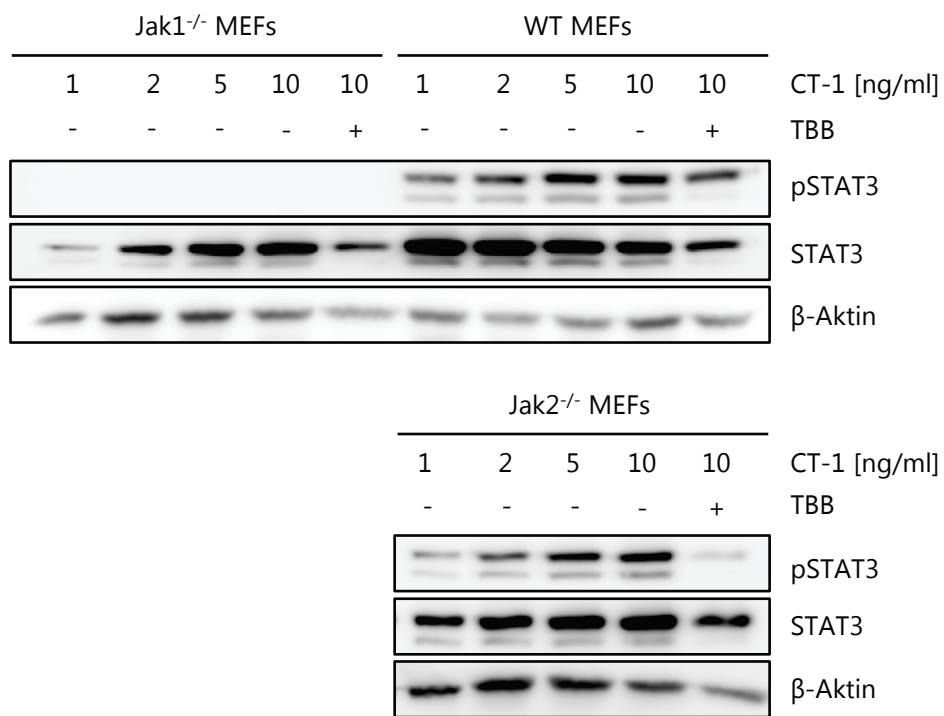
A**B**

Abbildung 3.32: Vergleich von Jak1^{-/-}, Jak2^{-/-} und WT MEFs. Jeweils 4×10^5 Zellen der drei Zelllinien wurden pro Loch einer 6-Loch-Platte ausgesät, 5 h in serumfreiem DMEM gehungert und 15 min mit den angegebenen Konzentrationen von (A) Hyper-IL-6 oder (B) CT-1 stimuliert. Wo angegeben, wurden die Zellen 90 min mit 75 μ M TBB vorinkubiert. Die Phosphorylierung von STAT3 wurde mithilfe spezifischer Antikörper im Western Blot analysiert. β -Aktin diente als endogene Ladekontrolle.

3.4 CK2 in der Signaltransduktion von konstitutiv aktiven Mutanten von gp130 und STAT3

3.4.1 Signaltransduktion der konstitutiv-aktiven gp130-Mutante $\Delta\text{Tyr186-Tyr190}$ (ΔYY) ist CK2-abhängig

Entzündliche hepatozelluläre Adenome (IHCA) sind benigne Lebertumore, von denen 60% Mutationen in gp130 aufweisen. Diese führen zu einer konstitutiven Aktivierung der STAT-Signaltransduktion, nicht aber zur Aktivierung des ERK-Signalweges (Rebouissou *et al.*, 2009). Alle diese Mutationen sind kurze *in-frame* Deletionen in der extrazellulären Domäne 2, die zusammen mit der Domäne 3 das ZBM bildet, welches für die Zytokinbindung verantwortlich ist. Eine dieser gp130-Varianten ist die $\Delta\text{Tyr186-Tyr190}$ (gp130 ΔYY) Variante. Sie wurde für diese Experimente ausgewählt da 20 von 26 IHCA-Patienten mit gp130-Mutationen, Deletionen im Bereich dieser Aminosäuren aufweisen. Die Variante wurde von Jan Sommer in Ba/F3-gp130 Zellen transduziert und induzierte konstitutive Signaltransduktion (Sommer *et al.*, 2012), die sich in Zytokin-unabhängiger Proliferation äußerte (Abbildung 3.33).

Um zu untersuchen, ob die konstitutive Signaltransduktion durch gp130 ebenso wie die IL-6-induzierte CK2-abhängig ist, wurden Ba/F3-gp130-gp130 ΔYY -myc oder -gp130WT-myc Zellen mit dem CK2-Inhibitor TBB behandelt. In Abbildung 3.34 C ist ein Proliferationsassay mit Ba/F3-gp130-gp130WT-myc und Ba/F3-gp130-gp130 ΔYY -myc Zellen dargestellt. Die Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen an TBB oder der entsprechenden Menge DMSO ohne Zytokinstimulation behandelt. Die Zellen, die mit WT gp130 transduziert wurden, proliferierten, wie zuvor, nicht zytokinunabhängig, während die gp130 ΔYY Zellen ohne TBB proliferierten. Diese Proliferation konnte durch ansteigende Konzentrationen von TBB inhibiert werden. Bei einer Konzentration von 125 μM TBB konnte die maximale Inhibition beobachtet werden. Das Gleiche galt für die Zellen, die zusätzlich mit Hyper-IL-6 stimuliert wurden (Abbildung 3.34 D).

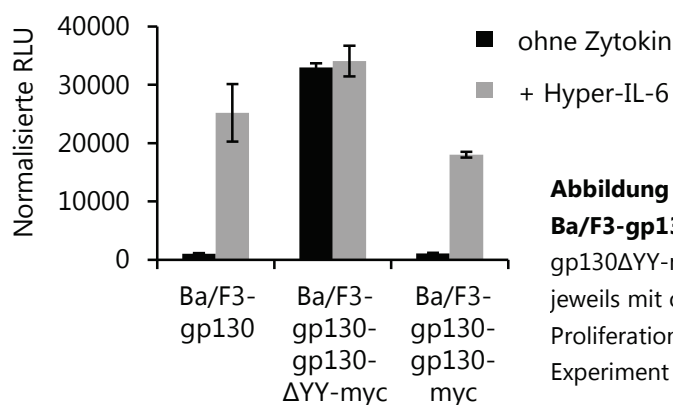


Abbildung 3.33: Zytokin-unabhängige Proliferation von Ba/F3-gp130-gp130 ΔYY -myc Zellen. Ba/F3-gp130-gp130 ΔYY -myc Zellen und die Kontrollzelllinie wurden 48 h jeweils mit oder ohne 10 ng/ml Hyper-IL-6 kultiviert und die Proliferation, wie in 2.2.2.6 beschrieben, gemessen. Dieses Experiment wurde von Dr. Christoph Garbers durchgeführt.

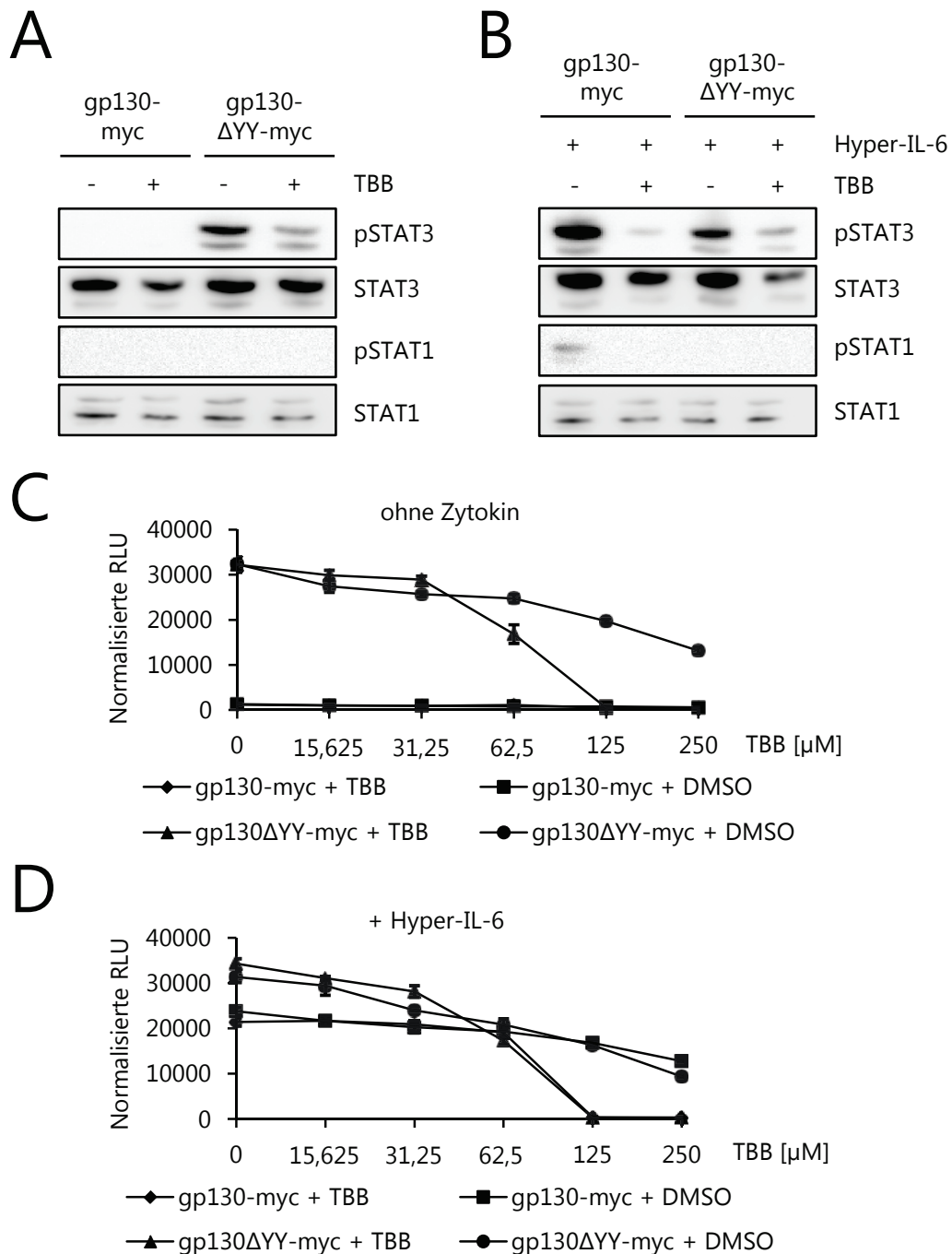


Abbildung 3.34: STAT-Aktivierung durch die konstitutiv aktive Mutante gp130 Δ YY ist CK2-abhängig. (A) Ba/F3-gp130-gp130-myc und Ba/F3-gp130-gp130 Δ YY-myc Zellen wurden 90 min in DMEM ohne Zusätze gehungert und weitere 90 min mit 100 μ M TBB behandelt. Das Zellpellet wurde in Lämmli-Puffer aufgekocht und eine Menge entsprechend 7×10^5 Zellen auf ein SDS-Gel aufgetragen. Die Analyse der Phosphorylierung von STAT3 und STAT1 erfolgte im Western Blot mithilfe spezifischer Antikörper. (B) Die Zellen wurden wie in (A) behandelt und außerdem 15 min mit 10 ng/ml Hyper-IL-6 stimuliert. (C) Ba/F3-gp130-gp130-myc und Ba/F3-gp130-gp130 Δ YY-myc Zellen wurden 48 h mit Konzentrationen von 0-250 μ M TBB behandelt und die Proliferation, wie in 2.2.2.6 beschrieben gemessen. Dargestellt sind Mittelwerte von Triplikaten $\pm$ Standardabweichung. (D) Die Zellen wurden wie in (C) behandelt und zusätzlich mit 10 ng/ml Hyper-IL-6 stimuliert.

Auf Proteinebene konnte im Western Blot eine konstitutive Phosphorylierung von STAT3 nachgewiesen werden, die bei Vorbehandlung mit TBB nicht auftrat (Abbildung 3.34 A). STAT1 war allerdings nicht konstitutiv phosphoryliert und konnte auch durch Hyper-IL6 nur schwach aktiviert werden. Die Hyper-IL-6-Stimulation in Ba/F3-gp130-gp130 Δ YY-myc Zellen konnte keine Phosphorylierung von STAT1 induzieren (Abbildung 3.34 B).

Insgesamt konnte gezeigt werden, dass die Aktivität von CK2 für die konstitutive STAT3-Aktivierung durch die gp130 Δ YY-Mutation notwendig ist.

3.4.2 Klonierung von konstitutiv-aktiven STAT3-Mutanten

In den im vorigen Abschnitt erwähnten entzündlichen hepatozellulären Adenomen wurden neben den gp130-Mutationen auch in 12% der Fälle aktivierende STAT3-Mutationen gefunden (Pilati *et al.*, 2011). Diese sind zumeist Punktmutationen in der SH2-Domäne von STAT3, die für die Dimerisierung des Transkriptionsfaktors verantwortlich ist.

Auch in anderen Krebsformen spielen aktivierende Mutationen im Jak/STAT-Signalweg eine Rolle. Bei Patienten mit großzelliger granulärer Lymphozyten-Leukämie (LGLL) wurden in 40% der Fälle Mutationen in der SH2-Domäne von STAT3 nachgewiesen (Koskela *et al.*, 2012). Die beiden Mutationen Y640F und D661V, die am häufigsten auftraten, wurden in dieser Arbeit in die cDNA von STAT3 eingebracht, um ihre Signaltransduktion auf eine CK2-Abhängigkeit hin zu untersuchen.

Hierzu wurde die kodierende Sequenz von STAT3 aus dem Expressionsvektor pcEP4 mit KpnI und EcoRV gespalten und mit glatten Enden in den Klonierungsvektor pcRScript ligiert. Anschließend wurde eine SOE-PCR durchgeführt, um die Punktmutationen einzufügen. Die genaue Vorgehensweise ist in Abschnitt 2.2.1.6 erläutert. Die erhaltenen Fragmente aus der SOE-PCR wurden nach einer enzymatischen Spaltung mit AvrII und BamHI erneut in pcRScript ligiert und die kodierende Sequenz für die STAT3-Mutanten unter Verwendung von NotI und BamHI in pcEP4 kloniert. Ein Schema der Klonierung ist in Abbildung 3.35 dargestellt.

3.4.3 Die Y640F und D661V Mutationen in STAT3 führen zu konstitutiver CK2-abhängiger Phosphorylierung bei Überexpression

Die STAT3-Mutanten Y640F und D661V, die in Patientenproben eine konstitutive STAT3-Phosphorylierung des Tyr⁷⁰⁵ aufwiesen, deren Ursache nicht genau geklärt werden konnte (Pilati *et al.*, 2011; Koskela *et al.*, 2012), wurden zunächst in HepG2 Zellen überexprimiert, um die konstitutive Phosphorylierung zu reproduzieren. Sie

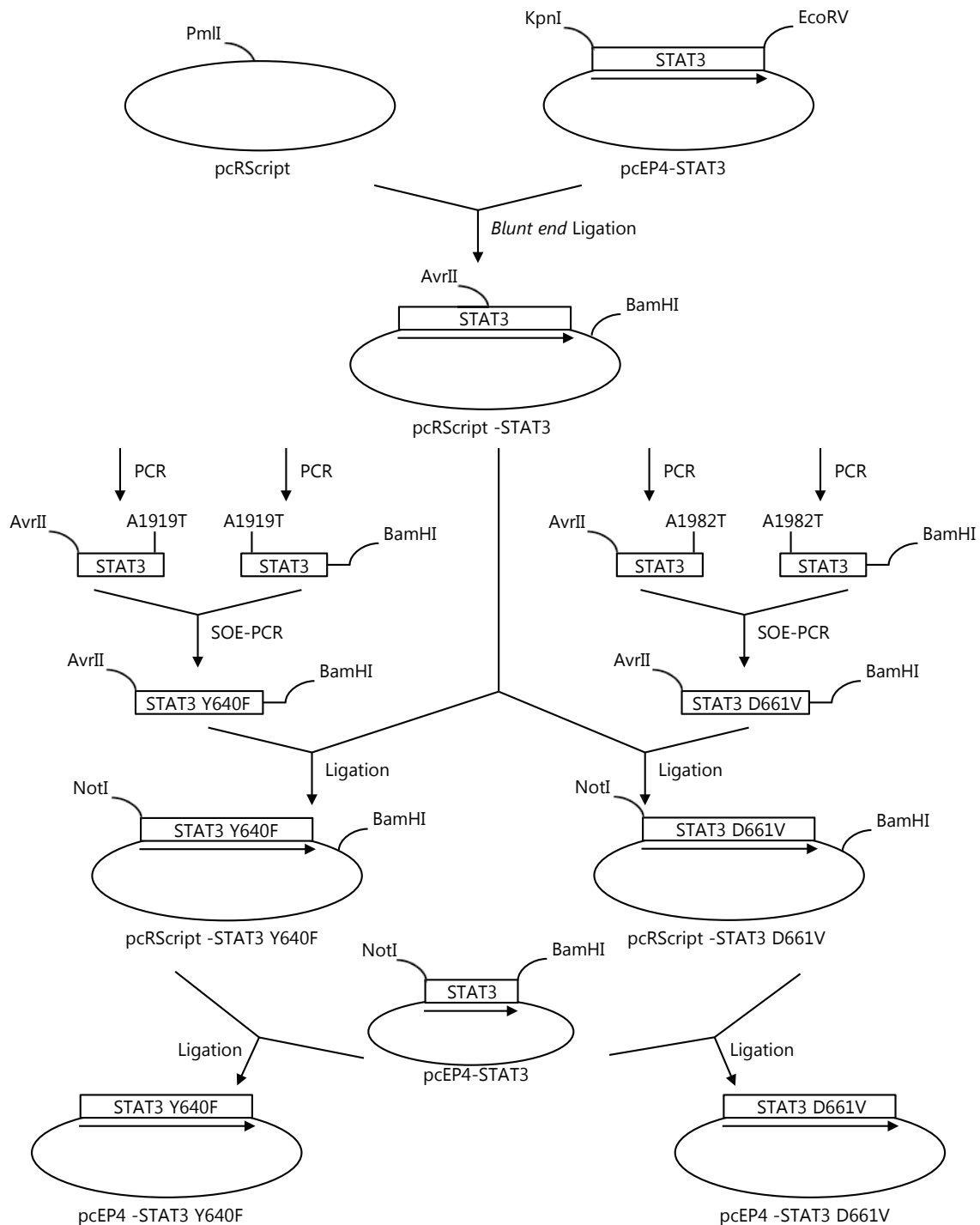


Abbildung 3.35: Schematische Darstellung der Klonierung von STAT3 Y640F und D661V. Die Details der Klonierung sind in Abschnitt 3.4.2 beschreiben.

wurden dann mit TBB behandelt, um einen möglichen Einfluss von CK2 zu untersuchen. Als Kontrolle dienen die Transfektionen mit STAT3 WT oder eGFP.

Bei Transfektion der Kontrollen war ohne Stimulation keine Phosphorylierung von STAT3 erkennbar. Es war aber ein deutlicher Anstieg des Gesamtproteins bei Transfektion von STAT3 WT im Vergleich zu eGFP zu sehen. Eine konstitutive Aktivierung von STAT3 trat nur bei Transfektion von STAT3 Y640F auf (Abbildung

3.36). Diese Zellen zeigten ohne Stimulation eine Phosphorylierung von STAT3, die durch TBB fast vollständig inhibierbar war. Im Vergleich war die Phosphorylierung durch Stimulation mit 10 ng/ml Hyper-IL-6 aber mindestens doppelt so stark.

In allen Zellen war eine STAT1-Phosphorylierung ausschließlich bei Stimulation mit Hyper-IL-6 zu sehen, was zeigte, dass die Zellen ausreichend gehungert waren und es sich nicht um eine basale Phosphorylierung in STAT3 handelte, die z.B. durch Komponenten des Medium ausgelöst worden war.

In Abbildung 3.36 B ist zusätzlich die Transfektion mit der Mutante D661V dargestellt. Die konstitutive Phosphorylierung war hier weniger stark, als bei Y640F. Allerdings war auch die Expression dieser STAT3-Variante wesentlich schwächer. Die schwache konstitutive Phosphorylierung konnte durch TBB ebenfalls fast vollständig inhibiert werden. Aufgrund der schwachen Expression der D661V Mutante, wurde für die folgenden Transfektionen nur die Y640F Variante verwendet.

Die hier dargestellten Experimente zeigten, dass die Aktivität von CK2 neben ihrer Rolle in der Zytokin-induzierten STAT3-Aktivierung auch für die konstitutive Aktivierung notwendig ist.

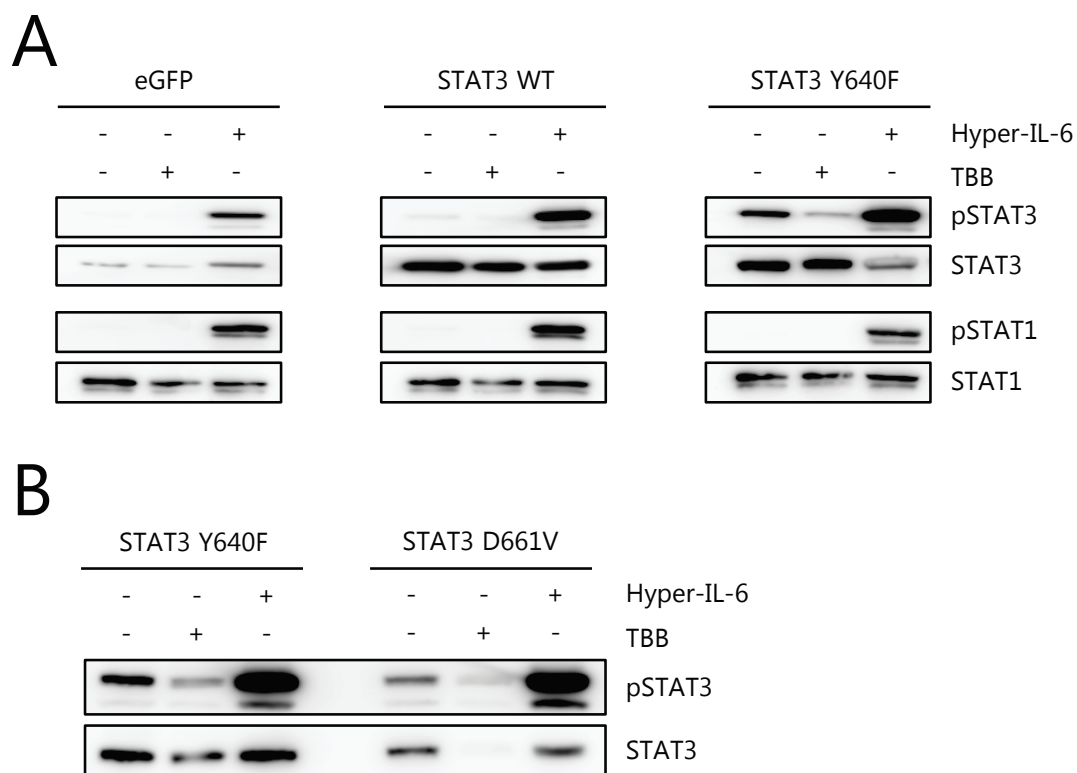


Abbildung 3.36: Konstitutive STAT-Aktivierung durch STAT3 Y640F. (A) HepG2 Zellen wurden transient mit eGFP, STAT3 WT oder STAT3 Y640F transfiziert und nach 48h für 3,5 h in DMEM ohne Zusätze gehungert. Es folgte eine Behandlung für 90 min mit 100 μ M TBB und eine Stimulation mit 10 ng/ml Hyper-IL-6 für 15 min. Die Analyse der STAT-Phosphorylierung erfolgte im Western Blot mithilfe spezifischer Antikörper. (B) HepG2 Zellen wurden wie in (A) behandelt aber mit STAT3 Y640F oder D661V transfiziert.

3.4.4 Generierung und Charakterisierung von Ba/F3-gp130-STAT3 Y640F und -STAT3 D661V Zellen

Die Signaltransduktion der konstitutiv aktiven STAT3-Varianten sollten ebenfalls in Ba/F3-gp130 Zellen untersucht werden. Hierzu wurden die kodierenden Sequenzen in den retroviralen Vektor pMOWS-Puro-GFP umklontiert indem sie mit NotI und BamHI aus pcEP4 ausgeschnitten und mit glatten Enden in pMOWS ligiert wurden. Aus diesem wurde zuvor die cDNA für GFP mit EcoNI und BamHI entfernt (Abbildung 3.37).

Ba/F3-gp130 Zellen wurden retroviral mit den STAT3-Varianten transduziert, wie in Abschnitt 2.2.2.4 beschrieben. Zur Analyse der STAT3-Phosphorylierung wurden die Zellen zweimal in PBS gewaschen, 2 h in serumfreiem DMEM gehungert und anschließend mit 10 ng/ml Hyper-IL-6 stimuliert oder unbehandelt belassen. Wie in Abbildung 3.38 zu sehen, zeigten die STAT3 WT transduzierten Zellen ausschließlich eine Aktivierung von STAT3 durch Hyper-IL-6, während die STAT3 Y640F exprimierenden Zellen auch eine schwache konstitutive Phosphorylierung aufwiesen. Diese konnte mit TBB Behandlung reduziert werden. Wie schon bei den Transfektionen in HepG2 Zellen wurde die STAT3 D661V Variante nur sehr schwach exprimiert und eine konstitutive Phosphorylierung konnte evtl. aus diesem Grund nicht nachgewiesen werden. STAT1 war in allen Zellen vergleichbar exprimiert und auch nur durch Hyper-IL-6-Stimulation aktiviert (Abbildung 3.38 B).

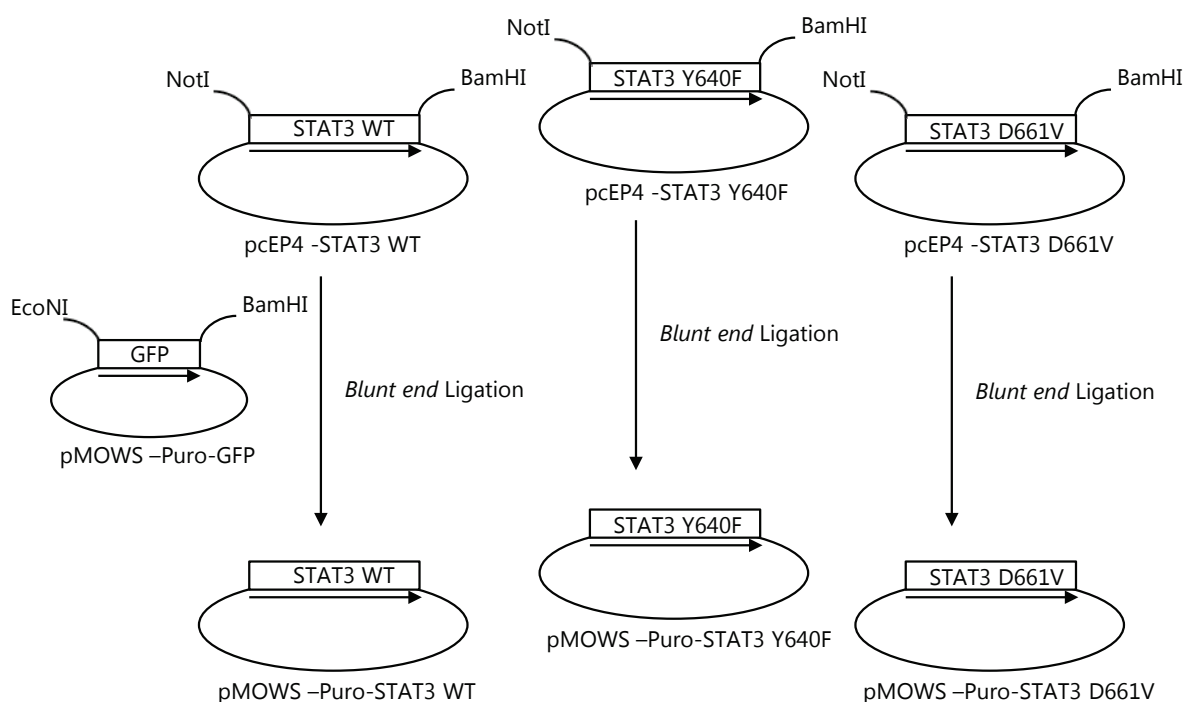


Abbildung 3.37: Schematische Darstellung der Klonierung retroviraler Vektoren die für STAT3 WT, Y640F oder D661V kodieren. Die Details der Klonierung sind in Abschnitt 3.4.4 beschrieben.

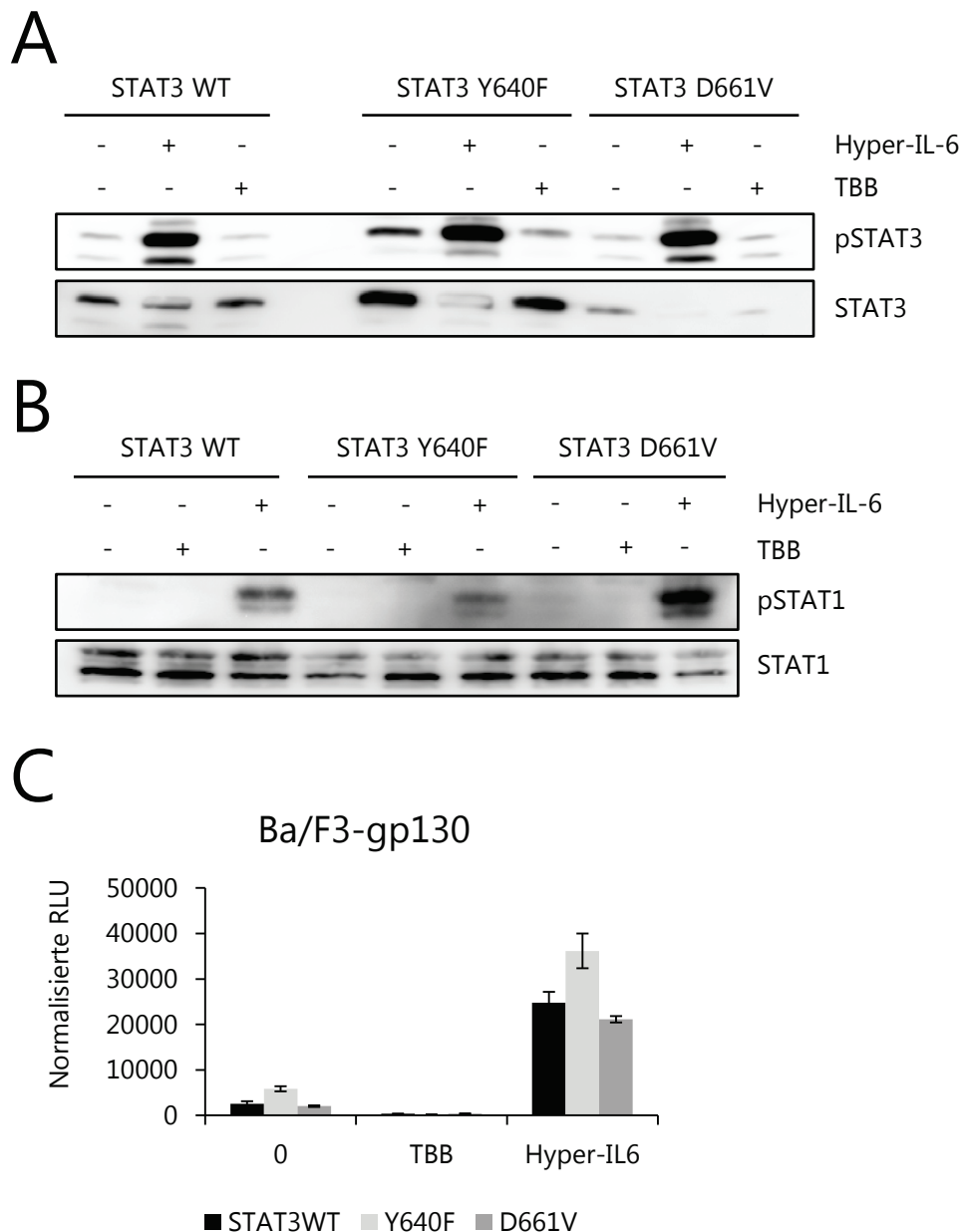


Abbildung 3.38: Konstitutive Phosphorylierung von STAT3 in stabil transduzierten Ba/F3-gp130 Zellen mit STAT3 Y640F. (A) Stabil transduzierte Ba/F3-gp130 Zellen mit STAT3 WT, Y640F oder D661V wurden 3 h in DMEM ohne Zusätze gehungert und 15 min mit 10 ng/ml Hyper-IL-6 stimuliert. Wo angegeben wurden sie vor der Stimulation 90 min mit 100 μ M TBB behandelt. Die STAT-Phosphorylierung wurde im Western Blot mithilfe von spezifischen Antikörpern analysiert. (B) Stabil transduzierte Ba/F3-gp130 Zellen mit STAT3 WT, Y640F oder D661V wurden 48 h mit oder ohne 10 ng/ml Hyper-IL-6 oder mit 100 μ M TBB inkubiert und die Proliferation, wie in 2.2.2.6 beschrieben, gemessen.

Der Proliferationsassay mit den STAT3 transduzierten Ba/F3-gp130 in Abbildung 3.38 C zeigte eine durch Hyper-IL-6 induzierbare Proliferation. Allerdings proliferierten die Zellen mit den konstitutiv aktiven STAT3 Varianten nicht Zytokin-unabhängig, wie es bei der konstitutiv aktiven gp130 Variante gp130 Δ YY in Abbildung 3.33 der Fall war.

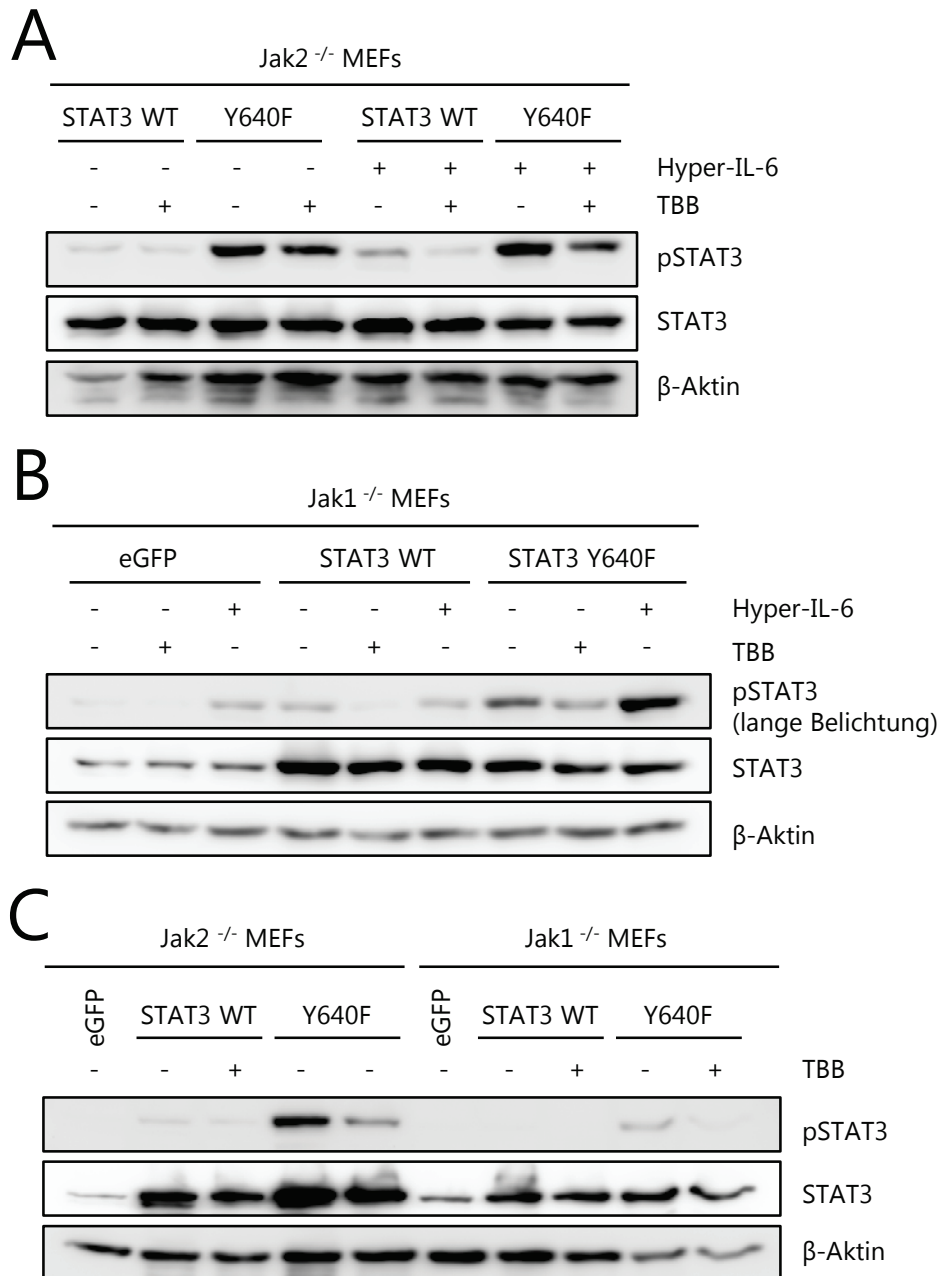


Abbildung 3.39: STAT3 Y640F zeigt eine stark reduzierte konstitutive Phosphorylierung in Jak1^{-/-} MEFs. (A) Jak2^{-/-} MEFs wurden transient mit STAT3 WT oder Y640F transfiziert. Nach 48 h wurden die Zellen 3,5 h in DMEM ohne Zusätze gehungert und 90 min mit 75 μM TBB oder DMSO behandelt. Wo angegeben wurden sie dann 15 min mit 10 ng/ml Hyper-IL-6 stimuliert. Die STAT3-Phosphorylierung wurde im Western Blot mithilfe spezifischer Antikörper analysiert. β-Aktin diente als endogene Ladekontrolle. (B) Jak1^{-/-} MEFs wurden wie in (A) behandelt und im Western Blot analysiert. (C) Jak1^{-/-} und Jak2^{-/-} MEFs wurden wie in (A) behandelt und im Western Blot analysiert.

Die konstitutiv aktive STAT3 Variante Y640F zeigte also eine konstitutive Phosphorylierung von STAT3, aber keine Zytokin-unabhängige Proliferation in Ba/F3-gp130. Die D661V Variante zeigte keine Unterschiede zum WT, was vermutlich an der sehr schwachen Expression lag.

3.4.5 Die Phosphorylierung von STAT3 Y640F ist abhängig von CK2 und Jak1

In den vorhergehenden Abschnitten konnte gezeigt werden, dass die konstitutive Signaltransduktion der Y640F Mutante von STAT3 CK2-abhängig ist. Die STAT3-Phosphorylierung, die durch gp130 induziert wird, kann durch Jak1, Jak2 oder Tyk2 vermittelt werden. Daher sollte hier untersucht werden, ob und wenn ja, welche dieser Kinasen in die konstitutive Phosphorylierung von STAT involviert ist.

Hierzu wurden erneut MEFs verwendet, die defizient für Jak1 oder Jak2 waren. STAT3 WT oder Y640F wurden transient in diese Zellen transfiziert und die STAT3-Phosphorylierung im Western Blot analysiert. In Jak2-defizienten MEFs konnte eine starke STAT3-Phosphorylierung bei Überexpression von STAT3 Y640F nachgewiesen werden, die bei STAT3 WT nicht auftrat. Diese konnte durch CK2-Inhibition reduziert, aber nicht vollständig blockiert werden (Abbildung 3.39 A). In Jak1^{-/-} MEFs war die STAT3-Phosphorylierung in STAT3 Y640F-transfizierten Zellen wesentlich schwächer und war auch nicht annähernd so stark, wie unter Hyper-IL-6-Stimulation. Die Phosphorylierung war im Western Blot überhaupt nur unter sehr starker Belichtung zu sehen (Abbildung 3.39 B). Beim Vergleich der beiden Zelllinien in Abbildung 3.39 C ist ein Unterschied der Phosphorylierungslevel deutlich zu erkennen, allerdings ist auch die Expression der STAT3 Varianten in Jak1^{-/-} MEFs etwas schwächer. Die Daten unterstreichen aber die in Pilati *et al.*, 2011 postulierte Notwendigkeit der Jak1-Aktivität für die konstitutive Phosphorylierung der STAT3-Mutante Y640F. In dieser Arbeit wird ebenfalls eine Src-Kinase-Abhängigkeit der konstitutiven Phosphorylierung vorgeschlagen.

Um die Beteiligung der Src-Kinase zu untersuchen, wurden Jak2^{-/-} und Jak1^{-/-} MEFs transient mit STAT3 WT oder Y640F transfiziert und nach Behandlung mit dem Src-Kinase Inhibitor 1 (Src-I) die STAT3-Phosphorylierung im Western Blot analysiert. Wie zuvor kam es in Jak2^{-/-} MEFs zu einer starken konstitutiven Phosphorylierung von STAT3, die durch den Src-Inhibitor nur wenig beeinflusst wurde. CK2-Inhibition hatte einen wesentlich stärkeren negativen Effekt (Abbildung 3.40 A). In Jak1^{-/-} MEFs hatte die Src-Inhibition ebenfalls einen schwachen Effekt auf die ohnehin geringe konstitutive Phosphorylierung. In beiden Zelllinien führt die gleichzeitige Inhibition von Src und CK2 zu einer vollständigen Blockade der konstitutiven STAT3 Y640F-Aktivierung.

Sowohl CK2 als auch Jak1 spielen eine wichtige Rolle in der konstitutiven STAT3-Phosphorylierung durch die Y640F Mutation. Die Src-Kinase Aktivität scheint ebenfalls einen, wenn auch geringeren Einfluss zu haben. Was genau die Funktion von CK2 in dieser Signalkaskade ist, und ob Jak1 oder evtl. eine andere Kinase das Substrat für CK2 ist, bleibt aber noch weitgehend ungeklärt.



Abbildung 3.40: Gleichzeitige Inhibition der Src-Kinase und CK2 in STAT3 Y640F überexprimierenden Jak-defizienten MEFs. (A) Jak2^{-/-} oder (B) Jak1^{-/-} MEFs wurden transient mit STAT3 WT oder Y640F transfiziert. Nach 48 h wurden die über Nacht in DMEM ohne Zusätze gehungerten Zellen 9 h mit 10 µM Src-Inhibitor 1 (Src-I) und wo angegeben 90 min mit 75 µM TBB behandelt. Die STAT3-Phosphorylierung und Expression wurde im Western Blot mithilfe spezifischer Antikörper analysiert. β-Aktin diente als endogene Ladekontrolle.

4 DISKUSSION

4.1 *Trans*-Signaltransduktion von p28 über den löslichen IL-6R

Sowohl in der IL-6, als auch in der IL-12-Zytokinfamilie binden die Zytokine mit verschiedenen Affinitäten an unterschiedliche α - und β -Rezeptoren. Es gibt nicht immer genau einen Rezeptorkomplex für ein Zytokin, vielmehr besteht ein Netzwerk an Zytokinen und Rezeptoren, das in Abhängigkeit von der Expressionsstärke der Rezeptoren und der Konzentration der Zytokine unterschiedlich reagiert. Der IL-6R hat neben IL-6 daher noch weitere Liganden wie CNTF, und auch der CNTFR wird nicht ausschließlich von CNTF aktiviert, wie man an den unterschiedlichen Phänotypen der *knock out* Mäuse für CNTF und dem CNTFR sehen kann. Der CNTFR *knock out* ist embryonal letal, während der CNTF *knock out* hauptsächlich zu einer leichten Muskelschwäche führt (Takahashi *et al.*, 1994; DeChiara *et al.*, 1995). Dies liegt begründet in der Tatsache, dass CLC ein weiterer Ligand für den Rezeptorkomplex aus gp130, dem LIFR und dem CNTFR ist, der wichtige Funktionen übernimmt. Der *knock out* des CNTFR entspricht damit einem Fehlen von sowohl CNTF, als auch CLC. Diese unterschiedliche Verwendung von Rezeptoren durch unterschiedliche Zytokine wird als *cross-talk* bezeichnet (Garbers *et al.*, 2012).

Das Zytokin IL-27 besteht aus den Untereinheiten EBI3 und p28, die das Rezeptor-Heterodimer gp130/WSX-1 aktivieren. Auch bei diesem Zytokin zeigte ein *knock out* von EBI3 (Siebler *et al.*, 2008) einen sehr unterschiedlichen Phänotyp zum *knock out* von WSX-1 (Yamanaka *et al.*, 2004), sodass vermutlich mindestens eins der beteiligten Proteine IL-27-unabhängige Funktionen hat. Für EBI3 konnte mittlerweile gezeigt werden, dass es zusätzlich in die Bildung von IL-35 involviert ist. Aber auch die Untereinheit p28 zeigt eine Aktivität unabhängig von EBI3. Zwar wird p28 alleine nur sehr schwach von Zellen sezerniert (Pflanz *et al.*, 2002), kann aber, genau wie CLC, mit dem es strukturell eng verwandt ist, in Komplex mit CLF (*cytokine-like factor*) sezerniert werden (Crabé *et al.*, 2009).

Für diese Untereinheit von IL-27, wurde vor kurzem auch eine Bindung an den membranständigen IL-6R nachgewiesen. Ob die Wirkung dabei agonistisch oder antagonistisch war, wurde kontrovers diskutiert (Crabé *et al.*, 2009; Stumhofer *et al.*, 2010).

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass p28 auch über den löslichen IL-6R Signaltransduktion auslösen kann, analog zur *trans*-Signaltransduktion von IL-6 und dass diese Wirkung agonistisch ist. Bisher gezeigte Funktionen des löslichen IL-6R bezogen sich vor allem auf die Bindung von IL-6. Es konnte aber ebenfalls bereits die Bindung von CNTF an den sIL-6R nachgewiesen werden (Schuster *et al.*, 2003). Dies ist damit schon die zweite Beschreibung einer IL-6-unabhängigen Funktion des löslichen IL-6R. Es wurde hier ein Fusionsprotein aus dem löslichen IL-6R und p28, verbunden durch einen flexiblen Peptidlinker generiert, das in COS7 Zellen exprimiert wurde. Der so erhaltene konditionierte Überstand löste in Ba/F3-gp130 Zellen die Aktivierung von STAT3 aus. Diese Aktivierung führte in der Konsequenz zu einer verstärkten Proliferation der Zellen im Vergleich zur Stimulation mit Überständen von eGFP-transfizierten COS7 Zellen. p28 kann also nicht nur Signaltransduktion durch Bindung an den membranständigen IL-6R auslösen, sondern auch an den löslichen IL-6R binden und damit *trans*-Signaltransduktion auslösen.

Wenn CLC in Komplex mit CLF sezerniert wird, ersetzt CLF hierbei nicht den α -Rezeptor. Es ist lediglich an der Sekretion beteiligt, d.h. CLC bindet mit der *Site I* an den CNTFR, mit der *Site II* an gp130 und mit der *Site III* an den LIFR (Elson *et al.*, 2000). Für die Komplexbildung ist also kein CLF mehr notwendig, es wird vielmehr vom LIFR aus der Bindung zum CLC verdrängt. Vermutlich gilt für p28 dasselbe Konzept, wenn es an den IL-6R bindet. p28 bindet in IL-27 mit der *Site I* an EBI3, mit der *Site II* an WSX-1, da

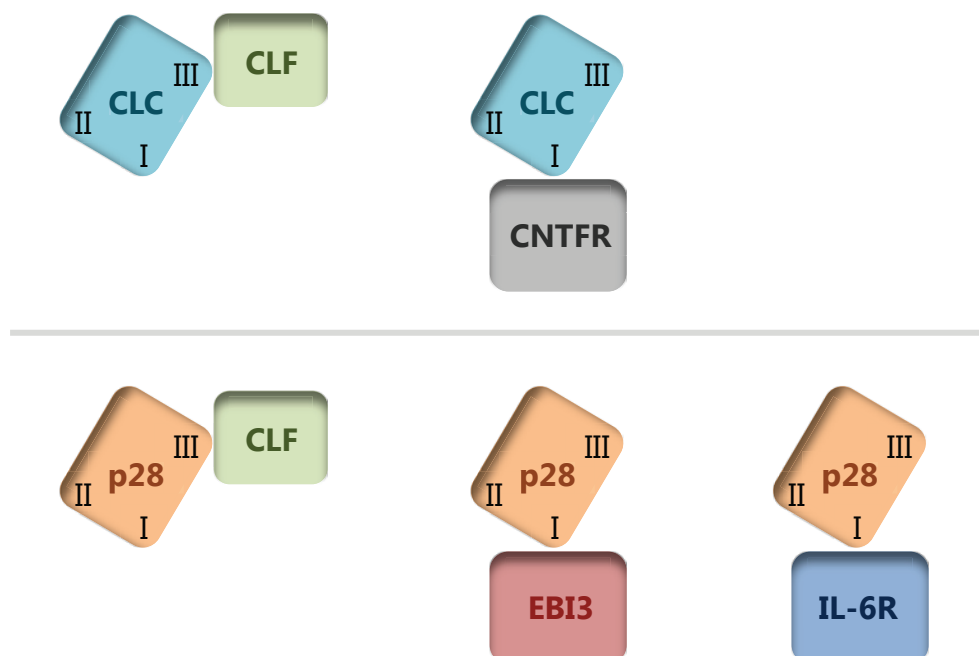


Abbildung 4.1: Vereinfachte schematische Darstellung der CLF- und α -Rezeptor-Bindung von CLC und p28. CLC wird in Komplex mit CLF sezerniert. Dabei bindet CLF an die *Site III* von CLC. Die Bindung an den α -Rezeptor erfolgt aber über die *Site I*. Da p28 und CLC strukturell eng verwandt sind, wäre es denkbar, dass die Interaktion mit CLF ebenfalls über die *Site III* von p28 erfolgt. Die *Site I* wäre dann frei, um α -Rezeptoren, wie EBI3 und den IL-6R zu binden.

dieser Rezeptor keine *Ig-like* Domäne aufweist und mit der *Site* III an gp130. Bei einer Bindung an den IL-6R erfolgt diese über die *Site* I des p28. CLC bindet CLF über die *Site* III (Perret *et al.*, 2004 und Abbildung 4.1). Wenn der p28/CLF-Komplex strukturell ähnlich ist, bindet der IL-6R also eine andere Bindungsregion im p28, als CLF. Im Serum würde CLF die p28-IL6R Bindung für eine mögliche *trans*-Signaltransduktion also nicht stören. Auf diese Weise kann p28 dann Signaltransduktion über den IL-6R und ein β -Rezeptordimer auslösen.

Eine weitere Frage, die beantwortet werden sollte, war, welchen Komplex aus β -Rezeptoren sIL-6R-p28 aktivierte, da die BaF3-gp130 Zellen neben gp130 auch den Rezeptor WSX-1 exprimieren. In Komplex mit EBI3, also als IL-27, signalisiert p28 über das Rezeptor-Heterodimer aus gp130 und WSX-1. Im Fall von CNTF, das ebenso wie p28 an den IL-6R bindet, aktiviert dieses einen heterodimeren Komplex aus gp130 und dem LIFR, ebenso wie über seinen spezifischeren α -Rezeptor CNTFR. Übertragen auf p28 würde dieses für ein Heterodimer aus gp130 und WSX-1 sprechen. Um dieser Frage nachzugehen, wurden Ba/F3-gp130 Zellen zunächst in Anwesenheit des Inhibitors sgp130Fc mit dem konditionierten sIL-6R-p28 Überstand stimuliert. Lösliches gp130 bindet IL-6 in Komplex mit dem löslichen IL-6R und inhibiert damit in niedrigen Konzentrationen spezifisch die *trans*-Signaltransduktion von IL-6 (Garbers *et al.*, 2011). Zytokine die ein gp130-Heterodimer aktivieren, wie IL-27, inhibiert sgp130Fc nicht (Scheller *et al.*, 2005). Hier konnte gezeigt werden, dass auch die *trans*-Signaltransduktion von p28 über den löslichen IL-6R durch sgp130Fc inhibiert wurde. Es kam zu einer verringerten STAT3-Phosphorylierung und Proliferation durch sIL-6R-p28 in BaF3-gp130 Zellen unter Verwendung des Inhibitors. Zusätzlich wurden NIH3T3 Zellen, die weder den IL-6R, noch WSX-1 exprimierten, mit dem IL-6R transfiziert und damit responsiv für sowohl IL-6, als auch für p28 gemacht. Auf IL-27 reagierten diese Zellen nicht. Die Signaltransduktion von p28 über den IL-6R benötigte also keine funktionale Expression von WSX-1. Diese Ergebnisse werden bestärkt durch den Fakt, dass p28 auch in WSX-1-defizienten Mäusen Concanavalin-A-induzierte Leberschäden verhindert und damit seine anti-inflammatorische Wirkung entfaltet, ohne dass der Rezeptor exprimiert wird (Dibra *et al.*, 2012).

Der Inhibitor sgp130Fc wird zurzeit für die klinische Anwendung bei chronischen Entzündungen getestet und soll dabei spezifisch die IL-6-*trans*-Signaltransduktion hemmen (Jones *et al.*, 2011). IL-6 ist nicht das einzige Zytokin, das über ein gp130-Homodimer signalisiert. Allerdings ist eine *trans*-Signaltransduktion von IL-11, also das Vorkommen des löslichen IL-11R *in vivo* noch nicht nachgewiesen worden. Es konnte aber gezeigt werden, dass ein artifizielles Hyper-Zytokin aus IL-11 und dem IL-11R Signaltransduktion über ein gp130-Homodimer auslösen kann. (Dams-Kozłowska *et al.*, 2012). IL-6 und IL-11 binden gp130 aber nur in Komplex mit ihrem α -Rezeptor, weswegen sgp130Fc kein IL-11 im Serum bindet, wenn kein löslicher IL-11R vorhanden

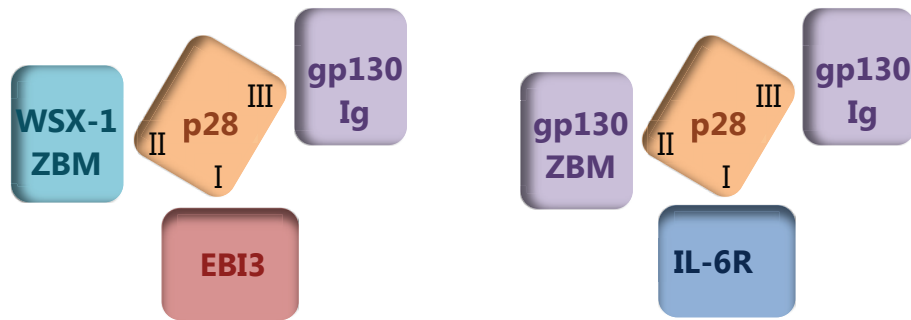


Abbildung 4.2: Vereinfachte schematische Darstellung der Bindung von p28 an seine Rezeptoren. Die Site II von p28 bindet je nach involviertem α -Rezeptor an das ZBM von gp130 oder WSX-1.

ist. Die *trans*-Signaltransduktion von p28 über den löslichen IL-6R ist damit neben der von IL-6 und CNTF das dritte Beispiel einer Funktion des löslichen IL-6Rs und p28 somit das dritte Zytokin dessen Signaltransduktion von sgp130Fc und auch dem natürlich vorkommenden löslichen gp130 inhibiert werden kann.

Für p28 bedeutet dies, dass es zwei verschiedene β -Rezeptorkomplexe aktiviert. In Komplex mit EBI3 bindet es mit der Site II an WSX-1 und in Komplex mit dem IL-6R bindet diese Site II an gp130 (Abbildung 4.2). Beide Bindungen erfolgen aber hochspezifisch. Das deutet daraufhin dass die Bindung an den α -Rezeptor die Bindungsepitope im Zytokin in ihrer Struktur verändert und diese Veränderung je nach involviertem α -Rezeptor unterschiedlich ist. Dieses Phänomen würde auch erklären, warum z.B. IL-6 an gp130 nur in Komplex mit dem IL-6R binden kann. Diese Strukturvermittelte Spezifität bedarf aber noch weiterer Aufklärung und ist bisher nicht genau verstanden.

4.2 Rekombinantes p35 (rp35) bildet extrazellulär IL-12 mit p40, aber nicht IL-35 mit EBI3

4.2.1 Die Sekretion von IL-35

IL-35 ist das neueste Mitglied der IL-6/IL-12-Zytokinfamilie. Es besteht aus EBI3 und p35 und seine Wirkung wird als anti-inflammatorisch charakterisiert. Als signaltransduzierende Rezeptoren sind bis heute vier verschiedene Komplexe beschrieben und außerdem verschiedene Aktivierungsmuster für STATs. Damit IL-35 auf seine Zielzellen wirken kann, muss es zunächst von den produzierenden Zellen, welche in Mäusen regulatorische T-Zellen und B-Zellen sind (Collison *et al.*, 2007; Shen *et al.*, 2014),

sezerniert werden. Hierbei wäre es denkbar, dass die beiden Untereinheiten im Komplex oder EBI3 und p35 separat voneinander exprimiert und sezerniert werden.

EBI3 bildet im Gegensatz zu p40 keine Disulfidbrücke zu den α -Untereinheiten der Zytokine aus. IL-27 wird dadurch wesentlich schwächer von Zellen sezerniert, als z.B. IL-12 (Vignali und Kuchroo, 2012 und eigene Ergebnisse). In den hier durchgeführten Experimenten war es aber auch in geringerer Konzentration vergleichbar aktiv und löste bei Stimulation von Ba/F3-gp130 Zellen sowohl eine STAT1 und STAT3-Aktivierung aus, als auch eine verstärkte Proliferation im Vergleich zu unstimulierten Zellen. IL-35 dagegen wurde nicht nachweisbar sezerniert, weder als Hyper-Zytokin, noch bei einer Koexpression der beiden Untereinheiten EBI3 und p35. Die fehlende STAT-Aktivierung und Proliferation in den mit den konditionierten Überständen stimulierten Zellen war daher vermutlich auf das Fehlen des Zytokins zurückzuführen. Zwar konnte eine Expression beider Untereinheiten von IL-35 bei Transfektion in den Zelllysaten nachgewiesen werden und auch das Hyper-Zytokin wurde stark exprimiert, allerdings wurde es in den verwendeten Zelllinien nicht in den Überstand sezerniert. Für einige IL-6- und IL-12-artige Zytokine ist bekannt, dass ihre Sekretion von Ko-Faktoren abhängt. CLC wird nur in Komplex mit CLF sezerniert oder bei Ko-Transfektion mit dem löslichen CNTFR. Für p28 wurde neben der Sekretion in Komplex mit EBI3 auch eine Sekretion in Abhängigkeit von CLF beschrieben, aber keine unabhängige Sekretion.

Die Untereinheit p35 bildet mit p40 auch extrazellulär IL-12 (Abdi *et al.*, 2014) und in der Milz werden die beiden Untereinheiten in unterschiedlichen Regionen, also von unterschiedlichen Zelltypen exprimiert und sezerniert (Bette *et al.*, 1994). Es wäre daher denkbar, dass auch p35, wie p28 und CLC, einen bislang nicht identifizierten Ko-Faktor, wie CLF, bei der Sekretion benötigt und unabhängig von p40 sezerniert wird. Bei Überexpression in COS7 oder HEK293 Zellen wurde p35 alleine nicht sezerniert, in Kombination mit p40 aber schon. Der notwendige Faktor wäre, wie bei p28 und CLC, lediglich für die Sekretion wichtig, wie es bei CLF der Fall ist und nicht an der Rezeptorkomplexbildung beteiligt. Das so sezernierte p35 wäre dann in der Lage entweder an p40 oder an EBI3 zu binden und so IL-12 oder IL-35 zu formen.

Die Interaktion zwischen EBI3 und p35 scheint im Gegensatz zur Interaktion zwischen p40 und p35 sehr untypisch für IL-6-/IL-12-artige Zytokine zu sein. Zwar konnte die Bindung von p35 an EBI3 hier und in anderen Arbeiten nachgewiesen werden, allerdings spielen die für EBI3 (in IL-27) und für p35 (in IL-12) identifizierten Aminosäuren, die für die jeweilige Site I-Bindung verantwortlich sind, in IL-35 keine Rolle. In Jones *et al.*, 2012 konnte keine Punktmutation gefunden werden, die die EBI3-p35-Interaktion verhindert hätte. Die Struktur der Bindung scheint also in IL-35 anders aufgebaut zu sein, als in IL-12 und IL-27 und ist bis heute nicht geklärt.

4.2.2 Die Rolle der intermolekularen Disulfidbrücke in IL-12

Da eine Sekretion von IL-35 in den Zellkulturüberstand weder durch Koexpression der Untereinheiten, noch durch Überexpression eines Hyper-Zytokins erreicht werden konnte, sollte hier ein anderer Ansatz, der bereits in der Studie zur p28-Signaltransduktion erfolgreich war, angewendet werden. Hierzu sollte gereinigtes und rückgefaltetes, rekombinantes p35 aus *E. coli* (rp35) mit EBI3 aus konditioniertem Zellkulturüberstand zur Bildung von IL-35 genutzt werden. Um zunächst die biologische Aktivität des rp35 zu testen, sollte es zusammen mit p40 aus konditioniertem Zellkulturüberstand zur Stimulation von Zellen verwendet werden. Wenn p40 alleine exprimiert wird, bildet es sowohl Monomere als auch Homodimere aus, bei denen die Untereinheiten über eine Disulfidbrücke verbunden sind. Das p40-Homodimer wirkt antagonistisch für die IL-12-Signaltransduktion (Gillesen *et al.*, 1995). Daher sollte auch getestet werden, wie sich das Fehlen der an der Ausbildung der Disulfidbrücke beteiligten Cysteine in p40 und p35 auf die Sekretion und Signaltransduktion des IL-12 auswirkt.

Es konnte hier gezeigt werden, dass das Ersetzen des Cysteins C197 durch ein Alanin zur alleinigen Bildung des Monomers führte, die p40-Homodimerbildung also vor allem von der Ausbildung einer intermolekularen Disulfidbrücke abhing. Um das monomere p40 für die Tests zur biologischen Aktivität des rp35 verwenden zu können, wurde zunächst untersucht, ob das p40 C197A bei Koexpression mit p35 zur Bildung von funktionalem IL-12 führte. Zusätzlich wurden Varianten von p35 getestet, denen ebenfalls das Cystein 92, das die Disulfidbrücke zum C197 in p40 ausbildet, fehlte. Die Sekretion von p35 WT mit der C197A Variante von p40 war gegenüber der mit WT p40 deutlich reduziert, was zu einer schwächeren Signaltransduktionswirkung führte. Wenn allerdings auch in p35 das C92, durch ein Alanin ersetzt wurde, war die Sekretion ebenso stark, wie bei dem WT Zytokin. IL-12 aus p40 C197A und p35 C92A oder p35 C92S induzierte in Ba/F3-gp130-IL-12R β 1-IL-12R β 2 Zellen STAT-Aktivierung und Proliferation im Vergleich zu unstimulierten Zellen, allerdings mit einer leicht verminderten Aktivität im Vergleich zum WT IL-12, obwohl die Sekretion in den Zellkulturüberstand bei Überexpression vergleichbar war. Dies bedeutete, dass die Disulfidbrücke in IL-12 für die vollständige Aktivität des Zytokins notwendig war. Um aber eine antagonisierende Wirkung eines p40-Homodimers auszuschließen, konnte bei der Testung der biologischen Aktivität des rp35 p40 C197A konditionierter Zellkulturüberstand verwendet werden, da auch diese p40-Variante funktionsfähiges IL-12 bildete.

4.2.3 Extrazelluläre Bildung von IL-12 aber nicht von IL-35

Der Rezeptor für IL-12 ist ein Heterodimer aus dem IL-12R β 1 und dem IL-12R β 2 (Presky *et al.*, 1996). Daher sollte die Funktionalität des rp35 in Ba/F3-gp130 Zellen, die zusätzlich retroviral mit den beiden β -Rezeptoren transduziert worden waren, getestet

werden. Die Kombination von rp35 und p40 C197A aus konditioniertem Zellkulturüberstand induzierte in Ba/F3-gp130-IL-12R β 1-IL-12R β 2 Zellen eine Aktivierung von STAT1 und STAT3 und eine verstärkte Proliferation im Vergleich zu unstimulierten Zellen. Hierfür waren allerdings sehr hohe Konzentrationen an rp35 notwendig. Bei Verwendung von 10% p40 C197A Zellkulturüberstand war eine Menge von 1 μ g/ml rp35 notwendig, um eine Proliferation hervorzurufen, die allerdings noch wesentlich schwächer, als die Proliferation durch Stimulation mit 10 ng/ml Hyper-IL-6 war. Bei Verwendung von rekombinantem p35 konnte dabei kein Unterschied zwischen dem WT und der C92A Variante festgestellt werden. Mit 4 μ g/ml rp35 C92A konnte nach 15 min eine starke STAT3-Phosphorylierung detektiert werden. Das mit diesem Ansatz gewonnene IL-12 war also aktiv, die benötigten Konzentrationen des rp35 aber ungewöhnlich hoch. Dies war vermutlich durch eine ineffiziente Rückfaltung des Proteins zu erklären, das in *E. coli* in Einschlusskörpern anfällt. Vermutlich lag ein Teil des monomeren p35 nicht in seiner α -helikalen Konformation vor, was die hohen benötigten Konzentrationen erklären würde, da nur ein Teil des Zytokins aktiv war. Um dies zu testen, wäre es notwendig gewesen, eine CD (Circulardichroismus)-Spektroskopie durchzuführen, was aufgrund der geringen Mengen des rückgefalteten rp35 nicht möglich war.

Im Gegensatz zur Kombination mit p40 konnte das rp35 trotz hoher Konzentrationen in Kombination mit EBI3 aus Zellkulturüberstand keine Aktivierung von STAT3 oder STAT1 und auch keine Induktion einer Proliferation weder in Ba/F3-gp130, noch in Ba/F3-gp130-IL-12R β 1-IL-12R β 2 Zellen auslösen. Über den Grund dafür kann nur spekuliert werden. Zum einen könnte er in einer fehlenden Formierung des Zytokins liegen, die, wie zuvor beschrieben, unkonventionell ist (Jones *et al.*, 2012) und zum anderen sind die involvierten Signaltransduktionswege nicht genau beschrieben. Ein gp130-Homodimer aktiviert nach Bindung von IL-35 ausschließlich STAT1 (Collison *et al.*, 2012). Ob andere Faktoren für die Signaltransduktion notwendig sind, die z. B. in Ba/F3 Zellen nicht vorhanden sind, ist unklar. STAT4, das für die Signaltransduktion von IL-35 über den IL-12R β 2 offenbar notwendig ist, wird in Ba/F3 Zellen nicht exprimiert. Dies könnte ein Hindernis bei der Analyse der Signalgebung dieses Zytokins in den Ba/F3-Zellen sein. Die Wirkung des hier eventuell extrazellulär gebildeten IL-35 sollte daher in der Zukunft auch in regulatorischen T-Zellen getestet werden.

Insgesamt konnte hier gezeigt werden, dass rp35 mit p40 auch extrazellulär IL-12 bildete, mit EBI3 konnte aber kein funktionales IL-35 nachgewiesen werden. Außerdem wurde belegt, dass die intermolekulare Disulfidbrücke in IL-12 für die Funktion nicht notwendig ist. Im Gegensatz zu IL-12 bestehend aus den WT Untereinheiten war die Aktivität des IL-12 ohne Disulfidbrücke allerdings leicht vermindert. Das Fehlen des für die Bildung der Disulfidbrücke notwendigen Cysteins in p40 führte zur reinen Bildung des Monomers und damit nicht zur Bildung des antagonistischen p40-Dimers.

4.3 CK2 als Komponente des Jak/STAT-Signalwegs

4.3.1 CK2 ist notwendig für die Signaltransduktion der IL-6-Familie

Die Zytokine der IL-6-Familie sind von großer Bedeutung für die Embryonalentwicklung, sowie verschiedenste entzündliche Prozesse und die Krebsentstehung. Sie aktivieren verschiedene Rezeptorkomplexe auf ihren unterschiedlichen Zielzellen. Gemeinsam haben sie, dass einer ihrer β -Rezeptoren gp130 ist, der Homo- oder Heterodimere mit dem LIFR, dem OSMR oder WSX-1 bildet, mit der Ausnahme von IL-31, das an ein Heterodimer aus GPL und dem OSMR bindet. Zusätzliche Spezifität erhalten die Rezeptorkomplexe durch die α -Rezeptoren IL-6R, IL-11R und CNTFR, die allerdings nicht in die Signaltransduktion involviert sind (Garbers *et al.*, 2012). Die Signaltransduktion wird durch die intrazellulären Domänen der Rezeptoren eingeleitet, die konstitutiv mit den Janus Kinasen (Jaks) interagieren. Bei Rezeptoraktivierung durch Zytokinbindung werden die Jaks aktiviert und phosphorylieren sich gegenseitig und die intrazellulären Tyrosine des Rezeptors. Dieser Vorgang bildet die Grundlage für die Bindung von STATs, die am Rezeptor von den Jaks phosphoryliert werden und daraufhin in den Zellkern translozieren um die Genexpression zu regulieren.

Die Protein Kinase CK2 spielt eine pro-proliferative Rolle in vielen zellulären Prozessen und ist in viele Signalwege involviert. Hinweise, dass diese Kinase auch im Jak/STAT-Signalweg eine Rolle spielt, gibt es bisher wenige. In Zheng *et al.*, 2011 wurde zum ersten Mal beschrieben, dass die Aktivität der CK2 notwendig für die OSM-vermittelte STAT-Aktivierung ist. Es sollte daher hier untersucht werden, ob CK2 auch für die anderen IL-6-artigen Zytokine und ihre Signaltransduktion eine Rolle spielt und ob auch Zytokin-unabhängige STAT3-Signaltransduktion, die in einigen malignen Erkrankungen auftritt, von der Aktivität der CK2 abhängt.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen zunächst, dass die Behandlung mit dem CK2-spezifischen Inhibitor TBB in HepG2 Zellen die STAT-Aktivierung durch OSM stark verringert, was die Ergebnisse von Zheng *et al.*, 2011 bestätigt. Dieser Effekt konnte auch in HeLa Zellen beobachtet werden, wodurch ein rein zelltyp-spezifischer Effekt ausgeschlossen werden konnte. Die beiden Zelllinien wurden verwendet, da sie viele Rezeptoren der IL-6-Familie endogen exprimieren und in HepG2 Zellen auch der physiologische Gegenregulationsmechanismus über SOCS3 nachgewiesen werden konnte. In der Folge konnte für IL-6, Hyper-IL-6, IL-11, IL-27, LIF und CT-1 gezeigt werden, dass sowohl für die Aktivierung von STAT3, als auch von STAT1, eine CK2-Aktivität notwendig war. Allerdings wurde die Phosphorylierung vor allem bei starker Aktivierung nicht vollständig unterbunden. Dies könnte zum einen an kompensatorischen Effekten durch andere Kinasen liegen und zum anderen an einer nicht vollständigen Inhibition der CK2 durch TBB. In HepG2 Zellen konnte in vielen Fällen

auch eine Reduktion des STAT3-Levels durch die TBB Behandlung beobachtet werden. Da STAT3 unter anderem seine eigene Expression reguliert und eine mehrstündige Stimulation beispielsweise mit IL-6 auch die STAT1- und STAT3-Expression verstärkte, resultierte eine Inhibition des Signalweges in vielen Fällen in der Reduktion der Expression der STATs.

Ba/F3 Zellen sind ein gutes Werkzeug, um die Signaltransduktion von Zytokinen zu untersuchen, da sie endogen von den Rezeptoren der IL-6 Familie ausschließlich WSX-1 exprimieren. Ba/F3-Zellen wachsen ausschließlich in der Anwesenheit von IL-3. Ohne diesen Wachstumsfaktor sterben die Zellen durch Apoptose. Durch retrovirale Transduktion können jedoch andere Zytokinrezeptoren stabil exprimiert werden, und die so entstandenen Ba/F3-Zelllinien proliferieren dann in Abhängigkeit der entsprechenden Zytokine. Es wurden in dieser Arbeit Ba/F3-gp130-LIFR Zellen aus Ba/F3-gp130 Zellen generiert, um die Wirkung einer CK2-Inhibition auf die Zytokin-abhängige Proliferation dieser Zellen zu untersuchen. Wie erwartet proliferierten diese generierten Zellen nicht ohne Zytokin, aber weiterhin in Abhängigkeit von Hyper-IL-6 und zusätzlich auch in Abhängigkeit von LIF und OSM, da es sich hier um den humanen LIFR und humanes OSM handelt und dieses sowohl über den Komplex aus gp130 und dem OSMR, als auch über das gp130/LIFR-Heterodimer signalisieren kann. Es ist also nicht auf die Expression des OSMR angewiesen, im Gegensatz zu murinem OSM, das lediglich an gp130/OSMR binden kann. Jegliche STAT3- oder STAT1-Phosphorylierung und auch die Proliferation, die in diesen Zellen durch Zytokine ausgelöst werden konnte, waren ebenso wie in HepG2 und HeLa Zellen abhängig von CK2 und damit durch TBB inhibierbar. Diese Inhibition konnte auch durch sehr hohe Zytokinkonzentrationen von 100 ng/ml nicht aufgehoben werden.

Die CK2 ist in verschiedene intrazelluläre Signalwege involviert. Besonders prominent ist ihre Rolle im PI3K/Akt-Signalweg, wo sie für die Hochregulation der Akt-Expression sorgt und diese Kinase auch phosphoryliert und damit aktiviert. Auch der negative Gegenspieler von Akt, die Phosphatase PTEN, wird von CK2 phosphoryliert und damit inaktiviert, sodass es zu einer weiteren Verstärkung des Signalweges kommt (Piazza *et al.*, 2012). Hier sollte untersucht werden, ob die beschriebenen Funktionen von CK2 im PI3K/Akt-Signalweg auch in den getesteten Zelllinien unter den gewählten Bedingungen nachzuweisen waren. Sowohl in HepG2 Zellen, als auch in allen getesteten Ba/F3 Zelllinien führte die CK2-Inhibition zu einer Reduktion der Akt-Expression und sowohl die basale, als auch die Zytokin-induzierte Phosphorylierung von Akt konnten vollständig inhibiert werden. Diese Daten stimmten also mit bisher publizierten Ergebnissen zur Wirkung von CK2 auf den Akt-Signalweg überein. Die Wirkung von CK2 auf diese Signalkaskade konnte auch auf die Signaltransduktion von IL-6-artigen Zytokinen übertragen werden.

In Bezug auf die ERK1/2-Aktivierung waren die Ergebnisse weniger eindeutig. In allen Ba/F3-Zelllinien hatte eine CK2-Inhibition auch eine Inhibition der ERK1/2-Phosphorylierung zur Folge, während die Expression nicht beeinflusst wurde. Dies stimmte überein mit publizierten Daten, die zeigen dass CK2 mit dem Adapterprotein KSR (*Kinase Suppressor of Ras*) interagiert und in diesem Komplex als Serin-Kinase für C-Raf und B-Raf fungiert. Hierdurch ist die CK2 dann in die Aktivierung der ERK-Signalkaskade involviert (Ritt *et al.*, 2007). Eine Inhibition der Kinase-Aktivität von CK2 würde demnach ebenfalls in einer verminderten ERK-Phosphorylierung resultieren, was in den Ba/F3-Zelllinien auch der Fall war. Die ERK-Aktivierung durch die meisten IL-6-artigen Zytokine ist vergleichsweise schwach. In HepG2 Zellen bewirkte die Behandlung mit 10 ng/ml Hyper-IL-6 erst nach 30 min einen leichten Anstieg der ERK1/2-Phosphorylierung. TBB induzierte allerdings schon ohne den Einfluss von Zytokinen eine Aktivierung. Lediglich beim Zeitpunkt von 60 min zeigte sich eine stärkere ERK-Aktivierung mit Hyper-IL-6, die sich durch Vorbehandlung mit TBB verringerte. Der Einfluss einer CK2-Inhibition auf die ERK-Aktivierung durch Hyper-IL-6 konnte in HepG2 Zellen daher nicht eindeutig geklärt werden.

Die Aktivierung der STAT-Transkriptionsfaktoren erfolgt durch Phosphorylierung eines Tyrosins in der Transaktivierungsdomäne durch die Rezeptor-assoziierten Jaks. Die Janus Kinasen, die in die Signaltransduktion der IL-6-Familie involviert sind, sind Jak1, Jak2 und Tyk2, wobei nur Jak1 eine nicht-redundante Rolle spielt (Tanner *et al.*, 1995; Rodig *et al.*, 1998). In Zheng *et al.*, 2011 konnte eine konstitutive Interaktion von CK2 mit Jak2 und Jak1 nachgewiesen werden. In dieser Arbeit wurden Jak1- oder Jak2-defiziente MEFs verwendet, um zu untersuchen, welche der beiden Kinasen in Abhängigkeit von CK2 für die Zytokin-vermittelte STAT-Aktivierung verantwortlich ist. Wie zuvor beschrieben, führte das Fehlen von Jak2 nicht zu einer verringerten Signaltransduktion der IL-6-artigen Zytokine. Jak2 ist zwar in deren Signaltransduktion involviert, die Funktionen können aber vermutlich größtenteils von Jak1 kompensiert werden. Das Fehlen von Jak1 konnte im Gegensatz dazu in den MEFs, wie zuvor beschrieben, nicht kompensiert werden, wodurch auch eine CK2-Inhibition keinen Einfluss hatte. In Jak2-defizienten MEFs führte die Behandlung mit TBB zu einer fehlenden STAT3-Aktivierung, was darauf hindeutete, dass die CK2-abhängige Signaltransduktion der IL-6-artigen Zytokine von Jak1 vermittelt wird.

Da eine konstitutive STAT3-Signaltransduktion durch verschiedene Mutationen, vor allem in der SH2-Domäne von STAT3, aber auch in vorgeschalteten Rezeptoren, ausgelöst werden kann und dann unter anderem in der Entstehung von Adenomen und Leukämien eine Rolle spielt, sollte daraufhin der Einfluss der CK2 auf diese, nicht Zytokin-abhängige, STAT3-Signaltransduktion untersucht werden.

4.3.2 Die konstitutive Signaltransduktion von STAT3 benötigt CK2-Aktivität

Verschiedene pathophysiologische Ereignisse führen zu einer dauerhaften Aktivierung von STAT3, die nicht Zytokin-abhängig ist oder die zwar durch Zytokine und ihre Rezeptoren ausgelöst wird, aber nicht mehr physiologisch gegenreguliert wird. Die Ursachen sind häufig Mutationen in den Genen, die für die Rezeptoren kodieren, aber auch Mutationen in den Genen für die signaltransduzierenden Proteine. In einigen Krebsarten wird ein sich selbst verstärkender Kreislauf in Gang gesetzt, in dem eine verstärkte IL-6-Expression durch onkogene Signalwege wie EGFR/HER2, Ras/Raf/MEK oder PI3K über Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B, AP-1 und STAT3 einsetzt. IL-6 selbst verstärkt dann noch die weitere Expression von IL-6 und damit die STAT3-Aktivierung und -Expression (Grivennikov und Karin, 2008).

Ein Beispiel für aktivierende Rezeptor-Mutationen sind kurze somatische Deletionen im Rezeptor gp130, die in entzündlichen hepatozellulären Adenomen gefunden wurden (Rebouissou *et al.*, 2009). Diese Deletionen befinden sich in der extrazellulären Domäne 2 des Rezeptors und führen zu einer konstanten, Zytokin-unabhängigen STAT3(Tyr⁷⁰⁵)-Phosphorylierung.

Da die CK2 in die STAT-Aktivierung aller IL-6-artiger Zytokine involviert war, sollte in dieser Arbeit folglich untersucht werden, ob auch die Zytokin-unabhängige Signaltransduktion von der CK2-Aktivität abhängig ist.

Die konstitutiv aktive gp130-Variante gp130 Δ YY (Δ Y186-Y190) ist eine der häufigsten und potentesten STAT3-aktivierenden Mutanten in entzündlichen hepatozellulären Adenomen. Sie wurde retroviral in Ba/F3-gp130 Zellen transduziert und induzierte in diesen Zellen eine Zytokin-unabhängige STAT3-Aktivierung und Proliferation (Sommer *et al.*, 2012). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die STAT3-Aktivierung in diesen Zellen trotz der Unabhängigkeit von Zytokinen auf die Aktivität der CK2 angewiesen war. Sowohl die Phosphorylierung von STAT3, als auch die Proliferation der Ba/F3-gp130-gp130 Δ YY Zellen konnten mit TBB inhibiert werden, ähnlich wie die Inhibition der Zytokin-induzierten Signaltransduktion.

Die aktivierenden Mutationen in gp130 führen zwar zu einer konstitutiven STAT-Phosphorylierung, aktivieren aber nicht den SHP2-Ras-ERK-Signalweg, wenn sie in Zellen überexprimiert werden (Rebouissou *et al.*, 2009). Der Erklärung hierfür liegt vermutlich in der zellulären Lokalisation der Mutanten, die sich offenbar von der des Wildtyps unterscheidet. Die Mutanten reifen im ER nicht wie der Wildtyp und sind daher anders glykosyliert und in HEK293 und COS7 Zellen hauptsächlich im ER und in frühen Endosomen lokalisiert (Schmidt-Arras *et al.*, 2013; Rinis *et al.*, 2014). Diese Lokalisation bei Überexpression erklärt, warum zwar der Jak/STAT-Signalweg konstitutiv aktiviert wird, der Ras/ERK-Signalweg aber nicht. Die Adapterproteine und

Ras-Proteine binden an Phospholipide der Plasmamembran und gelangen damit nicht in räumliche Nähe zu den Mutanten. Jaks dagegen binden direkt an gp130 und können daher konstant aktiviert werden.

Wenn gp130 nicht von der Zelloberfläche signalisiert, kommen blockierende Antikörper für die therapeutische Inhibition dieses Signals nicht in Frage, da sie den Rezeptor nicht erreichen. Eine inhibierende Therapie müsste daher mit Agenzien erfolgen, die ihre Wirkung intrazellulär entfalten. Hierbei kommen Jak-Inhibitoren in Frage (Schütt *et al.*, 2013) und nach den hier gezeigten Ergebnissen auch Inhibitoren für CK2. Allerdings konnte die gp130 Δ YY-Signaltransduktion in Ba/F3-gp130 Zellen in Sommer *et al.*, 2012 mit einem Antikörper, der normalerweise die IL-11-Signaltransduktion inhibiert, gehemmt werden. Die zelluläre Lokalisation des gp130 Δ YY scheint somit Zelltyp-spezifisch unterschiedlich zu sein und wird daher vermutlich noch Gegenstand weiterer Untersuchungen sein. Unabhängig davon führte eine CK2-Inhibition zum Fehlen der konstitutiven Aktivierung durch den Rezeptor.

Neben der Zytokin-induzierten und der durch Mutationen in Rezeptoren induzierten konstitutiven STAT3-Aktivierung kann diese auch durch Mutationen im Gen für STAT3 selbst hervorgerufen werden. Diese Mutationen treten vor allem in der SH2-Domäne auf, die für die Dimerisierung der STATs verantwortlich ist und führen zu einer konstitutiven Phosphorylierung des Tyr⁷⁰⁵ in der Transaktivierungsdomäne des Transkriptionsfaktors. Diese somatischen Mutationen wurden bislang in entzündlichen hepatozellulären Adenomen gefunden und traten ebenfalls bei Patienten mit großer granulärer lymphozytärer Leukämie auf (Pilati *et al.*, 2011; Koskela *et al.*, 2012). Mittlerweile sind auch fünf Individuen beschrieben, die aktivierende STAT3-Keimzell-Mutationen aufweisen, die in frühem Lebensalter zum Auftreten autoimmuner Erkrankungen, wie Typ-1-Diabetes führen (Flanagan *et al.*, 2014).

Hier sollte daher untersucht werden, ob auch die durch aktivierende STAT3-Mutationen ausgelöste, konstitutive Signaltransduktion von der CK2 abhängig ist und diese damit auch einen therapeutischen Angriffspunkt darstellt.

Stellvertretend wurden zwei der am stärksten aktivierenden Mutationen (Y640F und D661V) in die cDNA von STAT3 eingefügt und diese in HepG2 Zellen transfiziert. In Zellen, die für 5 h ohne Serum kultiviert wurden, konnte keine Phosphorylierung von STAT3 nachgewiesen werden, wenn diese STAT3 WT überexprimierten. Beide Mutanten zeigten dagegen eine konstitutive Phosphorylierung des Tyr⁷⁰⁵ bei Überexpression. Diese konnte durch Behandlung mit dem CK2-Inhibitor TBB inhibiert werden und wurde durch Hyper-IL-6-Stimulation noch verstärkt. Diese Ergebnisse konnten in einer weiteren Zelllinie, Ba/F3-gp130 Zellen, die retroviral mit den STAT3-Varianten transduziert worden waren, bestätigt werden. Eine Expression der STAT3 Y640F Variante führte zu einer konstitutiven STAT3-Phosphorylierung, die mit TBB inhibierbar war. Die Expression der D661V Variante von STAT3 war schon in den HepG2 Zellen sehr

schwach, zeigte aber eine konstitutive Phosphorylierung. In den Ba/F3-gp130 Zellen war die Expression so gering, dass keine konstitutive, sondern nur eine durch Hyper-IL-6 induzierbare Phosphorylierung nachgewiesen werden konnte. Für die weiteren Experimente wurde aufgrund der geringen Expression der D661V Variante die Y640F Variante verwendet. Beide Varianten führten bei Expression in Ba/F3-gp130 Zellen nicht zu einer Zytokin-unabhängigen Proliferation. Im Vergleich zu unstimulierten Zellen stieg die Proliferation der STAT3 Y640F-exprimierenden Zellen zwar leicht an, war aber nicht vergleichbar mit der unabhängigen Proliferation von Zellen, die mit gp130 Δ YY transduziert waren. Der Grund dafür ist unklar, da die Zellen eine konstitutive STAT3-Aktivierung zeigten, ebenso wie die Ba/F3-gp130-gp130 Δ YY Zellen. Die gp130 Δ YY-Mutation führte allerdings zusätzlich auch zu einer STAT1-Aktivierung, die in den Zellen mit der aktivierenden STAT3-Mutation fehlte. Ob dies allerdings der alleinige Grund für die fehlende Zytokin-unabhängige Proliferation in den Ba/F3-gp130 Zellen mit transduziertem STAT3 Y640F war, ist unklar.

Eine Inhibition von CK2 konnte die Proliferation der murinen Prä-B-Zelllinie in Abhängigkeit der IL-6-artigen Zytokine fast vollständig unterbinden, aber auch die Signaltransduktion von den konstitutiv aktiven Mutanten von STAT3 konnte ohne eine Aktivität von CK2 nicht ablaufen. Dies zeigte, dass CK2 nicht nur für die induzierte, sondern auch für die konstitutive STAT3-Signaltransduktion von Bedeutung ist. Eine Zusammenfassung der von CK2 abhängigen Signalwege ist in Abbildung 4.3 dargestellt. Für gp130 Δ YY konnte von Poussin *et al.*, 2013 gezeigt werden, dass Jak1 die Signalvermittelnde Kinase ist. Hier sollte nun mithilfe von Jak1- oder Jak2-defizienten MEFs untersucht werden, welche der beiden Kinasen die konstitutive Phosphorylierung der STAT3-Mutanten vermittelt.

Bei Transfektion der cDNA für die Mutante Y640F in Jak2^{-/-} MEFs konnte wie zuvor in HepG2 Zellen eine STAT3-Phosphorylierung nachgewiesen werden, die durch das Fehlen von Jak2 nicht beeinträchtigt war. Die Phosphorylierung trat nur bei Transfektion der Mutante und nicht in der Kontrolle, die mit dem Wildtyp transfiziert worden war, auf. Im Gegensatz dazu war in Jak1-defizienten MEFs nur eine sehr schwache Phosphorylierung der Y640F Variante sichtbar, obwohl ebenfalls ein hohes Expressionslevel von STAT3 durch die Transfektion erreicht werden konnte. Jak1 war ebenso wie für die IL-6-induzierte STAT3-Aktivierung von größerer Bedeutung, als Jak2. Ein Fehlen von Jak1 führte zu einer kaum nachweisbaren konstitutiven STAT3-Aktivierung im direkten Vergleich der beiden Zelllinien und auch im Vergleich zur Hyper-IL-6-induzierten STAT3-Aktivierung.

In verschiedenen Karzinomen wurde eine konstitutive STAT3-Aktivierung nachgewiesen, die durch Jaks, aber auch durch die Src-Kinase vermittelt wird (Garcia *et al.*, 1997; Garcia *et al.*, 2001). Eine onkogene Transformation durch die virale Src-Kinase wird durch STAT3 potenziert und durch dominant-negatives STAT3 inhibiert (Bromberg *et*

al., 1998). Auch für die STAT3 Variante Y640F wurde bei Src-Inhibition eine verminderte DNA-Bindung nachgewiesen (Pilati *et al.*, 2011). Die hier gezeigten Ergebnisse legen nur eine begrenzte Funktion der Src-Kinase in der Phosphorylierung von STAT3 Y640F am Tyr⁷⁰⁵ nahe. In Jak2-defizienten MEFs hatte die Src-Inhibition nur einen sehr schwachen Einfluss auf die Phosphorylierung der Y640F Variante, während eine zusätzliche CK2-Inhibition die Phosphorylierung fast komplett unterband. Beim Fehlen von Jak1 wurde die ohnehin schwache Phosphorylierung durch Src-Inhibition verringert, aber auch hier führte nur die gemeinsame Inhibition von Src und CK2 zum vollständigen Fehlen der Phosphorylierung. Es ist möglich, dass das hohe

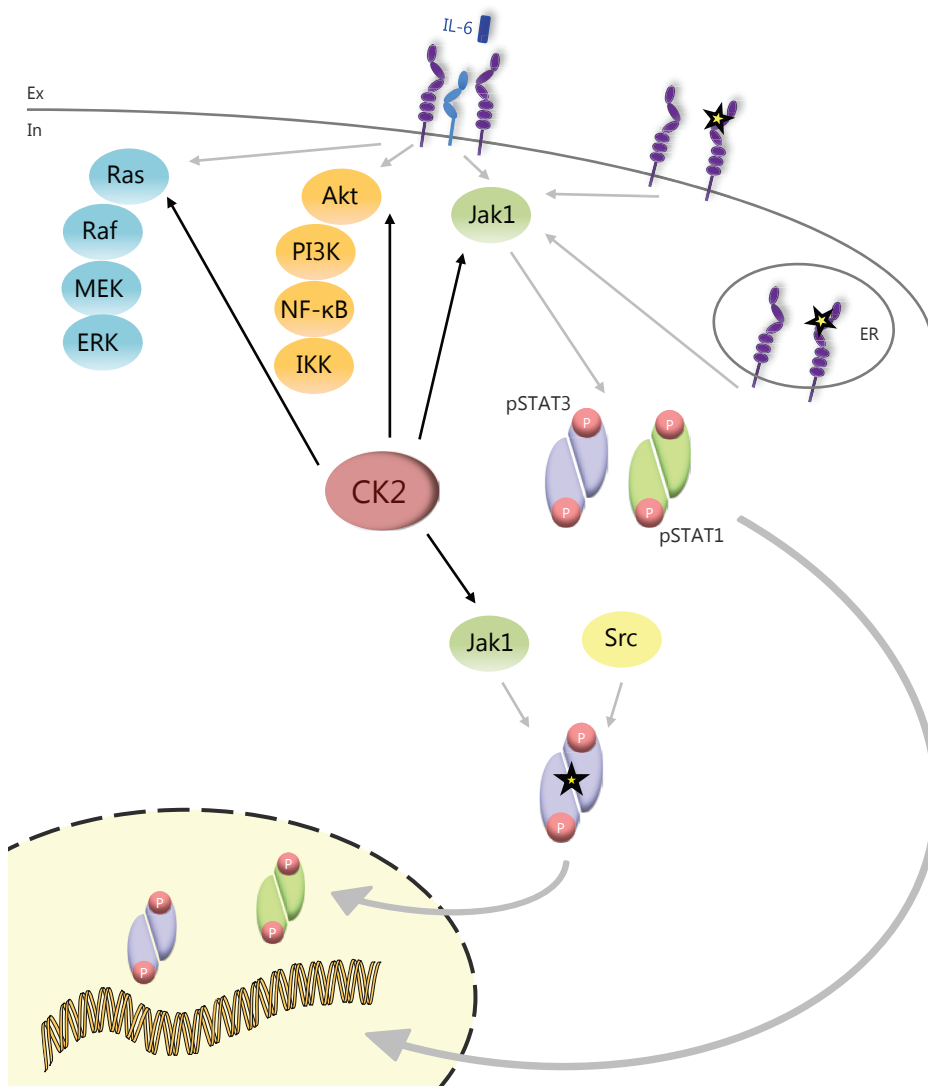


Abbildung 4.3: Die Protein-Kinase CK2 ist in die induzierte und konstitutive STAT3-Signaltransduktion involviert. Die CK2 ist notwendig für die Induktion verschiedener Signalwege darunter der ERK1/2- und der PI3K/Akt-Signalweg. Sie spielt aber auch eine zentrale Rolle in der Weiterleitung von Zytokin-Signalen über den Jak/STAT-Signalweg. Außerdem hängt auch die durch verschiedene Mutationen hervorgerufene konstitutive STAT3-Aktivierung von der CK2 ab. Ex: Extrazellulärraum, In: Intrazellulärraum.

Expressionslevel von Src in manchen Krebsformen zu einer größeren Bedeutung der Src-Kinase für die STAT3-Aktivierung führt. Unter den hier getesteten Bedingungen war vor allem Jak1 für die Phosphorylierung von STAT3 Y640F verantwortlich und dies in Abhängigkeit von CK2.

Einer der wichtigsten Signalwege für die Proliferation und Differenzierung von hämatopoetischen Zellen ist der Jak/STAT-Signalweg. In Piazza *et al.*, 2012 wurde eine verstärkte Aktivität und Expression der CK2 in hämatologischen malignen Entartungen beschrieben. In dieser Arbeit konnte eine Verbindung zwischen dieser verstärkten Aktivität von CK2 und der Aktivität des Jak/STAT-Signalweges in hämatologischen Krebsarten hergestellt werden.

Die Möglichkeit die IL-6-gp130-STAT3-Signaltransduktion therapeutisch zu inhibieren, wurde bereits viel diskutiert (Jones *et al.*, 2011). In einigen Tumoren gibt es eine konstitutive Aktivität von STAT3, ohne dass der Transkriptionsfaktor selbst mutiert ist. Vorgeschaltete Rezeptoren und zytoplasmatische Kinasen wie die Janus Kinasen, können ebenfalls Mutationen aufweisen und auch die verstärkte Bildung IL-6-artiger Zytokine können dann zu einer konstitutiven Signaltransduktion führen. Die starke Aktivität von STAT3 in vielen Tumoren und seine Fähigkeit, Zellen zumindest *in vitro* zu transformieren, hat dazu geführt, dass STAT3 selbst mittlerweile als Onkogen angesehen wird (Bromberg *et al.*, 1999). Es konnte hier gezeigt werden, dass im Falle einer aktivierenden Mutation von gp130 (gp130 Δ YY) aber auch bei aktivierenden Mutationen in STAT3 die CK2-Aktivität notwendig für die Signaltransduktion ist. Das bedeutet, dass unabhängig von der vorliegenden Mutation eine konstitutive STAT3-Aktivierung auch von der CK2 abhängt. Für die Therapie solcher STAT3-abhängiger Krebsformen scheinen spezifische CK2-Inhibitoren daher eine neue Option zu sein.

Verschiedene ATP-kompetitive chemische Inhibitoren wurden entwickelt und haben die Phase I klinischer Studien für solide Tumore bereits durchlaufen. Die Inhibitoren CX-4945 und CIGB-300, ein zellpermeables Peptid, werden mittlerweile auch für hämatologische Krebsformen getestet (Martins *et al.*, 2014; Martins *et al.*, 2014(2)).

Aufgrund der hier gezeigten Daten kann davon ausgegangen werden, dass CK2-Inhibitoren auch bei STAT3-abhängigen Tumoren therapeutisch verwendet werden könnten.

In dieser Arbeit werden verschiedene Aspekte der Zytokin-Signaltransduktion beleuchtet. Hierbei handelt es sich sowohl um extrazelluläre Vorgänge auf der Ebene der Rezeptorassamblierung, als auch um die intrazelluläre Signalweiterleitung. Das Beispiel der CK2 zeigt, dass die Signalkaskaden der Zytokine noch nicht bis ins Detail verstanden sind und in der Zukunft vermutlich noch weitere involvierte Enzyme und Regulationsmechanismen identifiziert werden können.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Die Zytokine der IL-6- und IL-12-Familie spielen wichtige Rollen in der Hämatopoese und in der Regulation von Entzündungsreaktionen. Ihre Rezeptoren sind zwar sehr spezifisch, zeigen aber auch eine hohe Plastizität in Bezug auf ihre Bindungsoberflächen. Der β -Rezeptor gp130 bindet fast alle IL-6- und einige IL-12-artige Zytokine und das Zytokin OSM bindet zwei verschiedene Rezeptorkomplexe. Zudem haben auch die α -Rezeptoren teilweise mehrere Liganden und in der IL-12-Familie formen die Untereinheiten unterschiedliche Zytokine in unterschiedlichen Kombinationen. Das Ausmaß dieses sogenannten *cross-talks* ist noch nicht vollständig untersucht. Um spezifische Therapien für entzündliche Erkrankungen zu finden, ist das Verständnis des Zytokin-Netzwerks aber von großer Bedeutung.

IL-6 kann neben der Signaltransduktion über den membrangebunden IL-6R, der nur auf wenigen Zellen exprimiert wird, auch an eine lösliche Form des IL-6R (sIL-6R) binden und damit auch auf Zellen wirken, die diesen Rezeptor nicht tragen. Dieser Vorgang wird als *trans*-Signaltransduktion bezeichnet.

In dieser Arbeit wurde neben dem bekannten Liganden IL-6, die IL-27-Untereinheit p28 als ein weiterer Ligand für den sIL-6R identifiziert. Diese *trans*-Signaltransduktion von p28 in Komplex mit dem sIL-6R wirkte agonistisch über ein gp130-Homodimer als β -Rezeptor-Komplex und induzierte eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors STAT3. Damit war p28 in der Lage über dasselbe Bindungsepitop, seine *Site II*, zwei verschiedene β -Rezeptoren, gp130 und WSX-1, zu aktivieren.

Das neueste Zytokin der IL-12-Familie, IL-35, besteht aus den Untereinheiten EBI3 und p35. Seine Rezeptorkomplexe sind Kombinationen aus den β -Rezeptoren gp130, dem IL-12R β 2 und WSX-1. Um die Signaltransduktion dieses Zytokins zu untersuchen, sollte überprüft werden, ob IL-35 *in vitro* aus rekombinantem, gereinigtem p35 (rp35) aus *E. coli* und EBI3 aus Zellkulturüberstand hergestellt werden konnte, da p35 von Zelllinien nur in Kombination mit p40 stark sezerniert wurde, aber nicht alleine oder in Kombination mit EBI3. In IL-12 bilden p35 und p40 eine intermolekulare Disulfidbrücke aus. Über das beteiligte Cystein 197 kann p40 allerdings auch Homodimere formen, die antagonistisch zu IL-12 wirken. Hier konnte gezeigt werden, dass das Fehlen dieses Cysteins zur alleinigen Bildung des Monomers von p40 führte. In Kombination mit rp35, bei dem ebenfalls das für die Disulfidbrücke notwendige Cystein 92 mutiert war, konnte

extrazellulär funktionales IL-12 gebildet werden. In Kombination mit EBI3 führte rp35 allerdings nicht zur Bildung von IL-35.

Die Signaltransduktion der IL-6-artigen Zytokine verläuft über verschiedene Signalwege wie die PI3K- und die ERK1/2-Signalkaskade und vor allem über den Jak/STAT-Signalweg. Die ubiquitär exprimierte Protein Kinase CK2 wurde in dieser Arbeit als Teil der durch IL-6-artige Zytokine induzierten STAT3- und STAT1-Aktivierung identifiziert. Eine Inhibition der CK2 verhinderte die Signaltransduktion dieser Zytokine in Abhängigkeit von Jak1. Ebenso war die konstitutive STAT3-Aktivierung, die in verschiedenen Krebsformen vorkommt, von einer Aktivität der CK2 abhängig. Aktivierende Mutationen in gp130 und STAT3 führten unter CK2-Inhibition nicht zu konstitutiver Signaltransduktion, womit diese Protein Kinase einen neuen Angriffspunkt in der therapeutischen Intervention bei entzündlichen und malignen Erkrankungen darstellt.

6 SUMMARY

Cytokines of the IL-6- and IL-12-family of cytokines play important roles in hematopoiesis and the regulation of inflammatory processes. The receptors of these cytokines are highly specific but also show a strong plasticity of their binding interfaces. The β -receptor gp130 is able to bind virtually all IL-6-type cytokines and some members of the IL-12-family. OSM binds two different receptor complexes. Furthermore, some of the α -receptors are also shared by several cytokines. Within the IL-12-family, subunits are shared between the individual cytokines, and the different combinations give rise to cytokines with remarkable different functions. This cytokine cross-talk is so far not well investigated. It is crucial to understand the cytokine network to establish specific therapies for inflammatory diseases.

IL-6 signal transduction can be either mediated by a membrane-bound form of the IL-6-R, which is only expressed on the surface of a few cells, or can occur via a soluble form of the IL-6R (sIL-6R), thereby rendering cells responsive to IL-6 which do not express the membrane-bound receptor. The latter is called IL-6 trans-signaling.

In the present study the IL-27 subunit p28 was identified as an additional ligand for the sIL-6R. This agonistic trans-signaling of p28 activates the transcription factor STAT3 via the recruitment of a gp130 homodimer. These results showed that p28 was able to activate two different β -receptors, gp130 and WSX-1, via the same binding epitope.

The recently identified cytokine IL-35 comprises of the subunits EBI3 and p35. Its receptor complexes are combinations of gp130, the IL-12R β 2 and WSX-1. To examine the signal transduction of this cytokine it should be tested if recombinant purified p35 (rp35) from *E. coli* and EBI3 from cell culture supernatant could form IL-35 *in vitro*, because p35 is secreted from cells in combination with p40 but only poorly with EBI3 or when expressed alone. In IL-12 p35 and p40 form an inter-chain disulfide bridge. Using the involved cysteine 197 p40 is also able to form homodimers which act as antagonists of IL-12 signaling. It could be shown here that lack of this cysteine leads to exclusive formation of the monomer of p40 when overexpressed and that this monomer in combination with rp35, which also lacks the critical cysteine residue C92, can form functional IL-12 extracellularly. However, in combination with EBI3 rp35 did not form functional IL-35.

The signal transduction of IL-6-type cytokines proceeds via different pathways like PI3K and the ERK1/2 signaling cascade but the Jak/STAT pathway is the most prominent one. The ubiquitously expressed protein kinase CK2 was identified in this study as an integral part of the signal transduction pathway that leads to the activation of STAT3- and STAT1 by IL-6-type cytokines. Inhibition of CK2 prevented the signal transduction of these cytokines in a Jak1-dependent manner. Similarly, the constitutive activation of STAT3 that is reported for different malignancies was critically dependent on CK2 activity. Activating mutations in gp130 and STAT3 did not result in constitutive signaling under CK2 inhibition. Thus, CK2 was characterized here as a new therapeutic target in inflammatory and malignant diseases.

7 LITERATURVERZEICHNIS

Abdi, K, Singh, NJ, Spooner, E, Kessler, BM, Radaev, S, Lantz, L, Xiao, TS, Matzinger, P, Sun, PD und Ploegh, HL (2014). "Free IL-12p40 Monomer Is a Polyfunctional Adaptor for Generating Novel IL-12-like Heterodimers Extracellularly." J Immunol 192(12): 6028-6036.

Aggarwal, S, Ghilardi, N, Xie, MH, de Sauvage, FJ und Gurney, AL (2003). "Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17." J Biol Chem 278(3): 1910-1914.

Albasanz-Puig, A, Murray, J, Preusch, M, Coan, D, Namekata, M, Patel, Y, Dong, ZM, Rosenfeld, ME und Wijelath, ES (2011). "Oncostatin M is expressed in atherosclerotic lesions: a role for Oncostatin M in the pathogenesis of atherosclerosis." Atherosclerosis 216(2): 292-298.

Alonzi, T, Fattori, E, Cappelletti, M, Ciliberto, G und Poli, V (1998). "Impaired Stat3 activation following localized inflammatory stimulus in IL-6-deficient mice." Cytokine 10(1): 13-18.

Alonzi, T, Fattori, E, Lazzaro, D, Costa, P, Probert, L, Kollias, G, De Benedetti, F, Poli, V und Ciliberto, G (1998). "Interleukin 6 is required for the development of collagen-induced arthritis." J Exp Med 187(4): 461-468.

Babon, JJ, Kershaw, NJ, Murphy, JM, Varghese, LN, Laktyushin, A, Young, SN, Lucet, IS, Norton, RS und Nicola, NA (2012). "Suppression of cytokine signaling by SOCS3: characterization of the mode of inhibition and the basis of its specificity." Immunity 36(2): 239-250.

Babon, JJ, Varghese, LN und Nicola, NA (2014). "Inhibition of IL-6 family cytokines by SOCS3." Semin Immunol 26(1): 13-19.

Bacon, CM, Petricoin, EF, 3rd, Ortaldo, JR, Rees, RC, Larner, AC, Johnston, JA und O'Shea, JJ (1995). "Interleukin 12 induces tyrosine phosphorylation and activation of STAT4 in human lymphocytes." Proc Natl Acad Sci U S A 92(16): 7307-7311.

Bardel, E, Larousserie, F, Charlot-Rabiega, P, Coulomb-L'Hermine, A und Devergne, O (2008). "Human CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ regulatory T cells do not constitutively express IL-35." J Immunol 181(10): 6898-6905.

Barton, VA, Hall, MA, Hudson, KR und Heath, JK (2000). "Interleukin-11 signals through the formation of a hexameric receptor complex." J Biol Chem 275(46): 36197-36203.

Bazan, JF (1990). "Haemopoietic receptors and helical cytokines." Immunol Today 11(10): 350-354.

Becker, C, Fantini, M, Schramm, C, Lehr, H, Wirtz, S, Nikolaev, A, Burg, J, Strand, S, Kiesslich, R, Huber, S, Ito, H, Nishimoto, N, Yoshizaki, K, Kishimoto, T, Galle, P, Blessing, M, Rose-John, S und Neurath, M (2004). "TGF-beta suppresses tumor progression in colon cancer by inhibition of IL-6 trans-signaling." Immunity 21(4): 491-501.

Becker, C, Fantini, MC, Wirtz, S, Nikolaev, A, Lehr, HA, Galle, PR, Rose-John, S und Neurath, MF (2005). "IL-6 signaling promotes tumor growth in colorectal cancer." Cell Cycle 4(2): 217-220.

Berenson, LS, Gavrieli, M, Farrar, JD, Murphy, TL und Murphy, KM (2006). "Distinct characteristics of murine STAT4 activation in response to IL-12 and IFN-alpha." J Immunol 177(8): 5195-5203.

Bette, M, Jin, SC, Germann, T, Schafer, MK, Weihe, E, Rude, E und Fleischer, B (1994). "Differential expression of mRNA encoding interleukin-12 p35 and p40 subunits in situ." Eur J Immunol 24(10): 2435-2440.

Blechacz, BR, Smoot, RL, Bronk, SF, Werneburg, NW, Sirica, AE und Gores, GJ (2009). "Sorafenib inhibits signal transducer and activator of transcription-3 signaling in cholangiocarcinoma cells by activating the phosphatase shatterproof 2." Hepatology 50(6): 1861-1870.

Boileau, C, Houde, M, Dulude, G, Clegg, CH und Perreault, C (2000). "Regulation of extrathymic T cell development and turnover by oncostatin M." J Immunol 164(11): 5713-5720.

Bollrath, J, Phesse, TJ, von Burstin, VA, Putoczki, T, Bennecke, M, Bateman, T, Nebelsiek, T, Lundgren-May, T, Canli, O, Schwitalla, S, Matthews, V, Schmid, RM, Kirchner, T, Arkan, MC, Ernst, M und Greten, FR (2009). "gp130-mediated Stat3 activation in enterocytes regulates cell survival and cell-cycle progression during colitis-associated tumorigenesis." Cancer Cell 15(2): 91-102.

Boulanger, MJ, Chow, DC, Brevnova, EE und Garcia, KC (2003). "Hexameric structure and assembly of the interleukin-6/IL-6 alpha-receptor/gp130 complex." Science 300(5628): 2101-2104.

Bromberg, J (2002). "Stat proteins and oncogenesis." J Clin Invest 109(9): 1139-1142.

Bromberg, J, Wrzeszczynska, M, Devgan, G, Zhao, Y, Pestell, R, Albanese, C und Darnell, J (1999). "Stat3 as an oncogene." Cell 98(3): 295-303.

Bromberg, JF, Horvath, CM, Besser, D, Lathem, WW und Darnell, JE, Jr. (1998). "Stat3 activation is required for cellular transformation by v-src." Mol Cell Biol 18(5): 2553-2558.

Brooks, AJ, Dai, W, O'Mara, ML, Abankwa, D, Chhabra, Y, Pelekanos, RA, Gardon, O, Tunny, KA, Blucher, KM, Morton, CJ, Parker, MW, Sierecki, E, Gambin, Y, Gomez, GA, Alexandrov, K, Wilson, IA, Doxastakis, M, Mark, AE und Waters, MJ (2014). "Mechanism of activation of protein kinase JAK2 by the growth hormone receptor." Science 344(6185): 1249783.

Buchou, T, Vernet, M, Blond, O, Jensen, H, Pointu, H, Olsen, B, Cochet, C, Issinger, O-G und Boldyreff, B (2003). "Disruption of the regulatory beta subunit of protein kinase CK2 in mice leads to a cell-autonomous defect and early embryonic lethality." Mol Cell Biol 23(3): 908-915.

Cabrejos, ME, Allende, CC und Maldonado, E (2004). "Effects of phosphorylation by protein kinase CK2 on the human basal components of the RNA polymerase II transcription machinery." J Cell Biochem 93(1): 2-10.

Chalaris, A, Garbers, C, Rabe, B, Rose-John, S und Scheller, J (2011). "The soluble Interleukin 6 receptor: generation and role in inflammation and cancer." Eur J Cell Biol 90(6-7): 484-494.

Chalaris, A, Rabe, B, Paliga, K, Lange, H, Laskay, T, Fielding, CA, Jones, SA, Rose-John, S und Scheller, J (2007). "Apoptosis is a natural stimulus of IL6R shedding and contributes to the pro-inflammatory trans-signaling function of neutrophils." Blood 110: 1748-1755.

Cheng, JG, Chen, JR, Hernandez, L, Alvord, WG und Stewart, CL (2001). "Dual control of LIF expression and LIF receptor function regulate Stat3 activation at the onset of uterine receptivity and embryo implantation." Proc Natl Acad Sci U S A 98(15): 8680-8685.

Chow, D, He, X, Snow, AL, Rose-John, S und Garcia, KC (2001). "Structure of an extracellular gp130 cytokine receptor signaling complex." Science 291(5511): 2150-2155.

Chow, D, Ho, J, Nguyen Pham, TL, Rose-John, S und Garcia, KC (2001). "In vitro reconstitution of recognition and activation complexes between interleukin-6 and gp130." Biochemistry 40(25): 7593-7603.

Collison, L, Delgoffe, G, Guy, C, Vignali, K, Chaturvedi, V, Fairweather, D, Satoskar, A, Garcia, K, Hunter, C, Drake, C, Murray, P und Vignali, DA (2012). "The composition and signaling of the IL-35 receptor are unconventional." Nat Immunol 13(3): 290-299.

Collison, L, Workman, C, Kuo, T, Boyd, K, Wang, Y, Vignali, K, Cross, R, Sehy, D, Blumberg, R und Vignali, DA (2007). "The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function." Nature 450(7169): 566-569.

Collison, LW, Chaturvedi, V, Henderson, AL, Giacomini, PR, Guy, C, Bankoti, J, Finkelstein, D, Forbes, K, Workman, CJ, Brown, SA, Rehg, JE, Jones, ML, Ni, HT, Artis, D, Turk, MJ und Vignali, DA (2010). "IL-35-mediated induction of a potent regulatory T cell population." Nat Immunol 11(12): 1093-1101.

Cornelissen, C, Luscher-Firzlaff, J, Baron, JM und Luscher, B (2012). "Signaling by IL-31 and functional consequences." Eur J Cell Biol 91(6-7): 552-566.

Crabé, S, Guay-Giroux, A, Tormo, AJ, Duluc, D, Lissilaa, R, Guilhot, F, Mavoungou-Bigouagou, U, Lefouili, F, Cognet, I, Ferlin, WG, Elson, G, Jeannin, P und Gauchat, JF (2009). "The IL-27 p28 subunit binds cytokine-like factor 1 to form a cytokine regulating NK and T cell activities requiring IL-6R for signaling." J Immunol 183(12): 7692-7702.

Croker, BA, Krebs, DL, Zhang, JG, Wormald, S, Willson, TA, Stanley, EG, Robb, L, Greenhalgh, CJ, Forster, I, Clausen, BE, Nicola, NA, Metcalf, D, Hilton, DJ, Roberts, AW und Alexander, WS (2003). "SOCS3 negatively regulates IL-6 signaling in vivo." Nat Immunol 4(6): 540-545.

Dams-Kozłowska, H, Gryśka, K, Kwiatkowska-Borowczyk, E, Izycki, D, Rose-John, S und Mackiewicz, A (2012). "A designer hyper interleukin 11 (H11) is a biologically active cytokine." BMC Biotechnol 12: 8.

Dann, SM, Spehlmann, ME, Hammond, DC, Iimura, M, Hase, K, Choi, LJ, Hanson, E und Eckmann, L (2008). "IL-6-dependent mucosal protection prevents establishment of a microbial niche for attaching/effacing lesion-forming enteric bacterial pathogens." J Immunol 180(10): 6816-6826.

Davis, S, Aldrich, TH, Valenzuela, DM, Wong, VV, Furth, ME, Squinto, SP und Yancopoulos, GD (1991). "The receptor for ciliary neurotrophic factor." Science 253(5015): 59-63.

DeChiara, TM, Vejsada, R, Poueymirou, WT, Acheson, A, Suri, C, Conover, JC, Friedman, B, McClain, J, Pan, L, Stahl, N, Ip, NY und Yancopoulos, GD (1995). "Mice lacking the CNTF receptor, unlike mice lacking CNTF, exhibit profound motor neuron deficits at birth." Cell 83(2): 313-322.

Devergne, O, Birkenbach, M und Kieff, E (1997). "Epstein-Barr virus-induced gene 3 and the p35 subunit of interleukin 12 form a novel heterodimeric hematopoietin." Proc Natl Acad Sci U S A 94(22): 12041-12046.

Di Maira, G, Salvi, M, Arrigoni, G, Marin, O, Sarno, S, Brustolon, F, Pinna, L und Ruzzene, M (2005). "Protein kinase CK2 phosphorylates and upregulates Akt/PKB." Cell Death Differ 12(6): 668-677.

Diamant, M, Rieneck, K, Mechti, N, Zhang, XG, Svenson, M, Bendtzen, K und Klein, B (1997). "Cloning and expression of an alternatively spliced mRNA encoding a soluble form of the human interleukin-6 signal transducer gp130." FEBS Lett 412(2): 379-384.

Dibra, D, Cutrera, J, Xia, X, Kallakury, B, Mishra, L und Li, S (2012). "Interleukin-30: a novel antiinflammatory cytokine candidate for prevention and treatment of inflammatory cytokine-induced liver injury." Hepatology 55(4): 1204-1214.

Dittrich, A, Quaiser, T, Khouri, C, Gortz, D, Monnigmann, M und Schaper, F (2012). "Model-driven experimental analysis of the function of SHP-2 in IL-6-induced Jak/STAT signaling." Mol Biosyst 8(8): 2119-2134.

Dominitzki, S, Fantini, MC, Neufert, C, Nikolaev, A, Galle, PR, Scheller, J, Monteleone, G, Rose-John, S, Neurath, MF und Becker, C (2007). "Cutting edge: trans-signaling via the soluble IL-6R abrogates the induction of FoxP3 in naive CD4+CD25 T cells." J Immunol 179(4): 2041-2045.

Drechsler, J, Grotzinger, J und Hermanns, HM (2012). "Characterization of the rat oncostatin M receptor complex which resembles the human, but differs from the murine cytokine receptor." PLoS One 7(8): e43155.

Elson, GC, Lelievre, E, Guillet, C, Chevalier, S, Plun-Favreau, H, Froger, J, Suard, I, de Coignac, AB, Delneste, Y, Bonnefoy, JY, Gauchat, JF und Gascan, H (2000). "CLF associates with CLC to form a functional heteromeric ligand for the CNTF receptor complex." Nat Neurosci 3(9): 867-872.

Eulendorf, R, Dittrich, A, Khouri, C, Muller, PJ, Mutze, B, Wolf, A und Schaper, F (2012). "Interleukin-6 signalling: more than Jaks and STATs." Eur J Cell Biol 91(6-7): 486-495.

Fischer, M, Goldschmitt, J, Peschel, C, Brakenhoff, JP, Kallen, KJ, Wollmer, A, Grotzinger, J und Rose-John, S (1997). "I. A bioactive designer cytokine for human hematopoietic progenitor cell expansion." Nat Biotechnol 15(2): 142-145.

Fitzgerald, DC, Ciric, B, Touil, T, Harle, H, Grammatikopolou, J, Das Sarma, J, Gran, B, Zhang, GX und Rostami, A (2007). "Suppressive effect of IL-27 on encephalitogenic Th17 cells and the effector phase of experimental autoimmune encephalomyelitis." J Immunol 179(5): 3268-3275.

Flanagan, SE, Haapaniemi, E, Russell, MA, Caswell, R, Lango Allen, H, De Franco, E, McDonald, TJ, Rajala, H, Ramelius, A, Barton, J, Heiskanen, K, Heiskanen-Kosma, T, Kajosaari, M, Murphy, NP, Milenkovic, T, Seppanen, M, Lernmark, A, Mustjoki, S, Otonkoski, T, Kere, J, Morgan, NG, Ellard, S und Hattersley, AT (2014). "Activating germline mutations in STAT3 cause early-onset multi-organ autoimmune disease." Nat Genet 46(8): 812-814.

Gao, S, Mark, K, Leslie, K, Pao, W, Motoi, N, Gerald, W, Travis, W, Bornmann, W, Veach, D, Clarkson, B und Bromberg, J (2007). "Mutations in the EGFR kinase domain mediate STAT3 activation via IL-6 production in human lung adenocarcinomas." J Clin Invest 117(12): 3846-3856.

Garbers, C, Hermanns, H, Schaper, F, Müller-Newen, G, Grötzinger, J, Rose-John, S und Scheller, J (2012). "Plasticity and cross-talk of Interleukin 6-type cytokines." Cytokine Growth Factor Rev 23(3): 85-182.

Garbers, C und Scheller, J (2013). "Interleukin-6 and interleukin-11: same same but different." Biol Chem 394(9): 1145-1161.

Garbers, C, Spudy, B, Aparicio-Siegmund, S, Waetzig, GH, Sommer, J, Holscher, C, Rose-John, S, Grotzinger, J, Lorenzen, I und Scheller, J (2013). "An Interleukin-6 Receptor-dependent Molecular Switch Mediates Signal Transduction of the IL-27 Cytokine Subunit p28 (IL-30) via a gp130 Protein Receptor Homodimer." J Biol Chem 288(6): 4346-4354.

Garbers, C, Thaiss, W, Jones, GW, Waetzig, GH, Lorenzen, I, Guilhot, F, Lissilaa, R, Ferlin, WG, Grötzinger, J, Jones, SA, Rose-John, S und Scheller, J (2011). "Inhibition of classic signaling is a novel function of soluble glycoprotein 130 (sgp130), which is controlled by the ratio of interleukin 6 and soluble interleukin 6 receptor." J Biol Chem 286(50): 42959-42970.

Garcia, R, Bowman, TL, Niu, G, Yu, H, Minton, S, Muro-Cacho, CA, Cox, CE, Falcone, R, Fairclough, R, Parsons, S, Laudano, A, Gazit, A, Levitzki, A, Kraker, A und Jove, R (2001). "Constitutive activation of Stat3 by the Src and JAK tyrosine kinases participates in growth regulation of human breast carcinoma cells." Oncogene 20(20): 2499-2513.

Garcia, R, Yu, CL, Hudnall, A, Catlett, R, Nelson, KL, Smithgall, T, Fujita, DJ, Ethier, SP und Jove, R (1997). "Constitutive activation of Stat3 in fibroblasts transformed by diverse oncoproteins and in breast carcinoma cells." Cell Growth Differ 8(12): 1267-1276.

Gearing, DP, Gough, NM, King, JA, Hilton, DJ, Nicola, NA, Simpson, RJ, Nice, EC, Kelso, A und Metcalf, D (1987). "Molecular cloning and expression of cDNA encoding a murine myeloid leukaemia inhibitory factor (LIF)." EMBO J 6(13): 3995-4002.

Gearing, DP, Ziegler, SF, Comeau, MR, Friend, D, Thoma, B, Cosman, D, Park, L und Mosley, B (1994). "Proliferative responses and binding properties of hematopoietic cells transfected with low-affinity receptors for leukemia inhibitory factor, oncostatin M, and ciliary neurotrophic factor." Proc Natl Acad Sci U S A 91(3): 1119-1123.

Gerhartz, C, Heesel, B, Sasse, J, Hemmann, U, Landgraf, C, Schneider-Mergener, J, Horn, F, Heinrich, PC und Graeve, L (1996). "Differential activation of acute phase response factor/STAT3 and STAT1 via the cytoplasmic domain of the interleukin 6 signal transducer gp130. I. Definition of a novel phosphotyrosine motif mediating STAT1 activation." J Biol Chem 271(22): 12991-12998.

Gietz, RD, Graham, KC und Litchfield, DW (1995). "Interactions between the subunits of casein kinase II." J Biol Chem 270(22): 13017-13021.

Gillessen, S, Carvajal, D, Ling, P, Podlaski, F, Stremlo, D, Familletti, P, Gubler, U, Presky, D, Stern, A und Gately, M (1995). "Mouse interleukin-12 (IL-12) p40 homodimer: a potent IL-12 antagonist." Eur J Immunol 25(1): 200-206.

Gouilleux, F, Wakao, H, Mundt, M und Groner, B (1994). "Prolactin induces phosphorylation of Tyr694 of Stat5 (MGF), a prerequisite for DNA binding and induction of transcription." EMBO J 13(18): 4361-4369.

Grenier, A, Combaux, D, Chastre, J, Gougerot-Pocidalo, MA, Gibert, C, Dehoux, M und Chollet-Martin, S (2001). "Oncostatin M production by blood and alveolar neutrophils during acute lung injury." Lab Invest 81(2): 133-141.

Greten, FR, Eckmann, L, Greten, TF, Park, JM, Li, ZW, Egan, LJ, Kagnoff, MF und Karin, M (2004). "IKKbeta links inflammation and tumorigenesis in a mouse model of colitis-associated cancer." Cell 118(3): 285-296.

Grivennikov, S, Karin, E, Terzic, J, Mucida, D, Yu, GY, Vallabhapurapu, S, Scheller, J, Rose-John, S, Cheroutre, H, Eckmann, L und Karin, M (2009). "IL-6 and Stat3 are required for survival of intestinal epithelial cells and development of colitis-associated cancer." Cancer Cell 15(2): 103-113.

Grivennikov, S und Karin, M (2008). "Autocrine IL-6 signaling: a key event in tumorigenesis?" Cancer Cell 13(1): 7-9.

Grötzinger, J, Kernebeck, T, Kallen, KJ und Rose-John, S (1999). "IL-6 type cytokine receptor complexes: hexamer, tetramer or both?" Biol Chem 380(7-8): 803-813.

Guillet, C, Auguste, P, Mayo, W, Kreher, P und Gascan, H (1999). "Ciliary neurotrophic factor is a regulator of muscular strength in aging." J Neurosci 19(4): 1257-1262.

Guschin, D, Rogers, N, Briscoe, J, Witthuhn, B, Watling, D, Horn, F, Pellegrini, S, Yasukawa, K, Heinrich, P und Stark, G (1995). "A major role for the protein tyrosine kinase JAK1 in the JAK/STAT signal transduction pathway in response to interleukin-6." EMBO J 14(7): 1421-1429.

Heinrich, P, Behrmann, I, Haan, S, Hermanns, H, Müller-Newen, G und Schaper, F (2003). "Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation." Biochem J 374(Pt 1): 1-20.

Heinrich, PC, Behrmann, I, Muller-Newen, G, Schaper, F und Graeve, L (1998). "Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway." Biochem J 334 (Pt 2): 297-314.

Helgren, ME, Squinto, SP, Davis, HL, Parry, DJ, Boulton, TG, Heck, CS, Zhu, Y, Yancopoulos, GD, Lindsay, RM und DiStefano, PS (1994). "Trophic effect of ciliary neurotrophic factor on denervated skeletal muscle." Cell 76(3): 493-504.

Hermanns, HM, Radtke, S, Schaper, F, Heinrich, PC und Behrmann, I (2000). "Non-redundant signal transduction of interleukin-6-type cytokines. The adapter protein Shc is specifically recruited to the oncostatin M receptor." J Biol Chem 275(52): 40742-40748.

Hirano, T, Yasukawa, K, Harada, H, Taga, T, Watanabe, Y, Matsuda, T, Kashiwamura, S, Nakajima, K, Koyama, K, Iwamatsu, A und et al. (1986). "Complementary DNA for a novel human interleukin (BSF-2) that induces B lymphocytes to produce immunoglobulin." Nature 324(6092): 73-76.

Honda, M, Yamamoto, S, Cheng, M, Yasukawa, K, Suzuki, H, Saito, T, Osugi, Y, Tokunaga, T und Kishimoto, T (1992). "Human soluble IL-6 receptor: its detection and enhanced release by HIV infection." J Immunol 148(7): 2175-2180.

Ishibashi, T, Kimura, H, Uchida, T, Kariyone, S, Friese, P und Burstein, SA (1989). "Human interleukin 6 is a direct promoter of maturation of megakaryocytes in vitro." Proc Natl Acad Sci U S A 86(15): 5953-5957.

Jacobson, NG, Szabo, SJ, Weber-Nordt, RM, Zhong, Z, Schreiber, RD, Darnell, JE, Jr. und Murphy, KM (1995). "Interleukin 12 signaling in T helper type 1 (Th1) cells involves tyrosine phosphorylation of signal transducer and activator of transcription (Stat)3 and Stat4." J Exp Med 181(5): 1755-1762.

Jana, M, Dasgupta, S, Pal, U und Pahan, K (2009). "IL-12 p40 homodimer, the so-called biologically inactive molecule, induces nitric oxide synthase in microglia via IL-12R beta 1." Glia 57(14): 1553-1565.

Jana, M und Pahan, K (2009). "IL-12 p40 homodimer, but not IL-12 p70, induces the expression of IL-16 in microglia and macrophages." Mol Immunol 46(5): 773-783.

Johnston, IM, Allison, SJ, Morton, JP, Schramm, L, Scott, PH und White, RJ (2002). "CK2 forms a stable complex with TFIIIB and activates RNA polymerase III transcription in human cells." Mol Cell Biol 22(11): 3757-3768.

Jones, L, Chaturvedi, V, Uyttenhove, C, Van Snick, J und Vignali, DA (2012). "Distinct subunit pairing criteria within the heterodimeric IL-12 cytokine family." Mol Immunol 51(2): 234-244.

Jones, L und Vignali, DA (2011). "Molecular interactions within the IL-6/IL-12 cytokine/receptor superfamily." Immunol Res 51(1): 5-14.

Jones, SA, Scheller, J und Rose-John, S (2011). "Therapeutic strategies for the clinical blockade of IL-6/gp130 signaling." J Clin Invest 121(9): 3375-3383.

Jostock, T, Müllberg, J, Özbek, S, Atreya, R, Blinn, G, Voltz, N, Fischer, M, Neurath, MF und Rose-John, S (2001). "Soluble gp130 is the natural inhibitor of soluble IL-6R transsignaling responses." Eur J Biochem 268: 160-167.

Kamiya, A, Kinoshita, T, Ito, Y, Matsui, T, Morikawa, Y, Senba, E, Nakashima, K, Taga, T, Yoshida, K, Kishimoto, T und Miyajima, A (1999). "Fetal liver development requires a paracrine action of oncostatin M through the gp130 signal transducer." EMBO J 18(8): 2127-2136.

Karin, M und Greten, FR (2005). "NF-kappaB: linking inflammation and immunity to cancer development and progression." Nat Rev Immunol 5(10): 749-759.

Keil, E, Finkenstädt, D, Wufka, C, Trilling, M, Liebfried, P, Strobl, B, Müller, M und Pfeffer, K (2013). "Important scaffold function of the Janus kinase 2 uncovered by a novel mouse model harboring a Jak2 activation loop mutation." Blood.

Kershaw, NJ, Laktyushin, A, Nicola, NA und Babon, JJ (2014). "Reconstruction of an active SOCS3-based E3 ubiquitin ligase complex in vitro: identification of the active components and JAK2 and gp130 as substrates." Growth Factors 32(1): 1-10.

Ketteler, R, Glaser, S, Sandra, O, Martens, UM und Klingmüller, U (2002). "Enhanced transgene expression in primitive hematopoietic progenitor cells and embryonic stem cells efficiently transduced by optimized retroviral hybrid vectors." Gene Ther 9(8): 477-487.

Khader, SA, Partida-Sanchez, S, Bell, G, Jelley-Gibbs, DM, Swain, S, Pearl, JE, Ghilardi, N, Desauvage, FJ, Lund, FE und Cooper, AM (2006). "Interleukin 12p40 is required for dendritic cell migration and T cell priming after Mycobacterium tuberculosis infection." J Exp Med 203(7): 1805-1815.

Kishimoto, T, Akira, S, Narazaki, M und Taga, T (1995). "Interleukin-6 family of cytokines and gp130." Blood 86(4): 1243-1254.

Koskela, H, Eldfors, S, Ellonen, P, van Adrichem, A, Kuusanmäki, H, Andersson, E, Lagström, S, Clemente, M, Olson, T, Jalkanen, S, Majumder, M, Almusa, H, Edgren, H, Lepistö, M, Mattila, P, Guinta, K, Koistinen, P, Kuittinen, T, Penttinen, K, Parsons, A, Knowles, J, Saarela, J, Wennerberg, K, Kallioniemi, O, Porkka, K, Loughran, T, Heckman, C, Maciejewski, J und Mustjoki, S (2012). "Somatic STAT3 mutations in large granular lymphocytic leukemia." N Engl J Med 366(20): 1905-1913.

Kurth, I, Horsten, U, Pflanz, S, Dahmen, H, Kuster, A, Grotzinger, J, Heinrich, PC und 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(3): 1480-1487.

Kurth, I, Horsten, U, Pflanz, S, Timmermann, A, Kuster, A, Dahmen, H, Tacke, I, Heinrich, PC und Müller-Newen, G (2000). "Importance of the membrane-proximal extracellular domains for activation of the signal transducer glycoprotein 130." J Immunol 164(1): 273-282.

Laemmli, UK (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature 227(5259): 680-685.

Larsen, JV, Hansen, M, Moller, B, Madsen, P, Scheller, J, Nielsen, M und Petersen, CM (2010). "Sortilin facilitates signaling of ciliary neurotrophic factor and related helical type 1 cytokines targeting the gp130/leukemia inhibitory factor receptor beta heterodimer." Mol Cell Biol 30(17): 4175-4187.

Li, X, Yang, Q, Yu, H, Wu, L, Zhao, Y, Zhang, C, Yue, X, Liu, Z, Wu, H, Haffty, BG, Feng, Z und Hu, W (2014). "LIF promotes tumorigenesis and metastasis of breast cancer through the AKT-mTOR pathway." Oncotarget 5(3): 788-801.

Liu, L, McBride, KM und Reich, NC (2005). "STAT3 nuclear import is independent of tyrosine phosphorylation and mediated by importin-alpha3." Proc Natl Acad Sci U S A 102(23): 8150-8155.

Lou, D, Dominguez, I, Toselli, P, Landesman-Bollag, E, O'Brien, C und Seldin, D (2008). "The alpha catalytic subunit of protein kinase CK2 is required for mouse embryonic development." Mol Cell Biol 28(1): 131-139.

Lupardus, P, Skiniotis, G, Rice, A, Thomas, C, Fischer, S, Walz, T und Garcia, K (2011). "Structural snapshots of full-length Jak1, a transmembrane gp130/IL-6/IL-6R α cytokine receptor complex, and the receptor-Jak1 holocomplex." Structure 19(1): 45-55.

Lupardus, PJ, Ultsch, M, Wallweber, H, Bir Kohli, P, Johnson, AR und Eigenbrot, C (2014). "Structure of the pseudokinase-kinase domains from protein kinase TYK2 reveals a mechanism for Janus kinase (JAK) autoinhibition." Proc Natl Acad Sci U S A 111(22): 8025-8030.

Lust, J, Donovan, K, Kline, M, Greipp, P, Kyle, R und Maihle, N (1992). "Isolation of an mRNA encoding a soluble form of the human interleukin-6 receptor." Cytokine 4(2): 96-100.

Lütticken, C, Wegenka, UM, Yuan, J, Buschmann, J, Schindler, C, Ziemiecki, A, Harpur, AG, Wilks, AF, Yasukawa, K, Taga, T und et al. (1994). "Association of transcription factor APRF and protein kinase Jak1 with the interleukin-6 signal transducer gp130." Science 263(5143): 89-92.

Mao, X, Ren, Z, Parker, GN, Sondermann, H, Pastorello, MA, Wang, W, McMurray, JS, Demeler, B, Darnell, JE, Jr. und Chen, X (2005). "Structural bases of unphosphorylated STAT1 association and receptor binding." Mol Cell 17(6): 761-771.

Maritano, D, Sugrue, ML, Tininini, S, Dewilde, S, Strobl, B, Fu, X, Murray-Tait, V, Chiarle, R und Poli, V (2004). "The STAT3 isoforms alpha and beta have unique and specific functions." Nat Immunol 5(4): 401-409.

Martins, L, Lúcio, P, Melão, A, Antunes, I, Cardoso, B, Stansfield, R, Bertilaccio, M, Ghia, P, Drygin, D, Silva, M und Barata, J (2014). "Activity of the clinical-stage CK2-specific inhibitor CX-4945 against chronic lymphocytic leukemia." Leukemia 28(1): 179-182.

Martins, LR, Perera, Y, Lucio, P, Silva, MG, Perea, SE und Barata, JT (2014). "Targeting chronic lymphocytic leukemia using CIGB-300, a clinical-stage CK2-specific cell-permeable peptide inhibitor." Oncotarget 5(1): 258-263.

Meggio, F und Pinna, L (2003). "One-thousand-and-one substrates of protein kinase CK2?" FASEB J 17(3): 349-368.

Mohr, A, Fahrenkamp, D, Rinis, N und Muller-Newen, G (2013). "Dominant-negative activity of the STAT3-Y705F mutant depends on the N-terminal domain." Cell Commun Signal 11: 83.

Müllberg, J, Schooltink, H, Stoyan, T, Günther, M, Graeve, L, Buse, G, Mackiewicz, A, Heinrich, P und Rose-John, S (1993). "The soluble interleukin-6 receptor is generated by shedding." Eur J Immunol 23(fd779f5a-c7b9-454c-c98a-33d5e6339932): 473-553.

Müller-Newen, G, Kohne, C, Keul, R, Hemmann, U, Müller-Esterl, W, Wijdenes, J, Brakenhoff, JP, Hart, MH und Heinrich, PC (1996). "Purification and characterization of the soluble interleukin-6 receptor from human plasma and identification of an isoform generated through alternative splicing." Eur J Biochem 236(3): 837-842.

Müller-Newen, G, Kuster, A, Hemmann, U, Keul, R, Horsten, U, Martens, A, Graeve, L, Wijdenes, J und Heinrich, PC (1998). "Soluble IL-6 receptor potentiates the antagonistic activity of soluble gp130 on IL-6 responses." J Immunol 161(11): 6347-6355.

Murakami, M, Hibi, M, Nakagawa, N, Nakagawa, T, Yasukawa, K, Yamanishi, K, Taga, T und Kishimoto, T (1993). "IL-6-induced homodimerization of gp130 and associated activation of a tyrosine kinase." Science 260(5115): 1808-1810.

Nicholson, SE, De Souza, D, Fabri, LJ, Corbin, J, Willson, TA, Zhang, JG, Silva, A, Asimakis, M, Farley, A, Nash, AD, Metcalf, D, Hilton, DJ, Nicola, NA und Baca, M (2000). "Suppressor of cytokine signaling-3 preferentially binds to the SHP-2-binding site on the shared cytokine receptor subunit gp130." Proc Natl Acad Sci U S A 97(12): 6493-6498.

Nkansah, E, Shah, R, Collie, GW, Parkinson, GN, Palmer, J, Rahman, KM, Bui, TT, Drake, AF, Husby, J, Neidle, S, Zinzalla, G, Thurston, DE und Wilderspin, AF (2013). "Observation of unphosphorylated STAT3 core protein binding to target dsDNA by PEMS and X-ray crystallography." FEBS Lett 587(7): 833-839.

O'Shea, J, Kontzias, A, Yamaoka, K, Tanaka, Y und Laurence, A (2013). "Janus kinase inhibitors in autoimmune diseases." Ann Rheum Dis 72 Suppl 2.

Okada, M, Kitahara, M, Kishimoto, S, Matsuda, T, Hirano, T und Kishimoto, T (1988). "IL-6/BSF-2 functions as a killer helper factor in the in vitro induction of cytotoxic T cells." J Immunol 141(5): 1543-1549.

Olsten, ME, Weber, JE und Litchfield, DW (2005). "CK2 interacting proteins: emerging paradigms for CK2 regulation?" Mol Cell Biochem 274(1-2): 115-124.

Oppenheim, RW, Prevette, D, Yin, QW, Collins, F und MacDonald, J (1991). "Control of embryonic motoneuron survival in vivo by ciliary neurotrophic factor." Science 251(5001): 1616-1618.

Oppmann, B, Lesley, R, Blom, B, Timans, J, Xu, Y, Hunte, B, Vega, F, Yu, N, Wang, J, Singh, K, Zonin, F, Vaisberg, E, Churakova, T, Liu, M, Gorman, D, Wagner, J, Zurawski, S, Liu, Y, Abrams, J, Moore, K, Rennick, D, de Waal-Malefyt, R, Hannum, C, Bazan, J und Kastelein, R (2000). "Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12." Immunity 13(5): 715-725.

Owaki, T, Asakawa, M, Morishima, N, Mizoguchi, I, Fukai, F, Takeda, K, Mizuguchi, J und Yoshimoto, T (2008). "STAT3 is indispensable to IL-27-mediated cell proliferation but not to IL-27-induced Th1 differentiation and suppression of proinflammatory cytokine production." J Immunol 180(5): 2903-2911.

Panova, TB, Panov, KI, Russell, J und Zomerdiijk, JC (2006). "Casein kinase 2 associates with initiation-competent RNA polymerase I and has multiple roles in ribosomal DNA transcription." Mol Cell Biol 26(16): 5957-5968.

Parham, C, Chirica, M, Timans, J, Vaisberg, E, Travis, M, Cheung, J, Pflanz, S, Zhang, R, Singh, K, Vega, F, To, W, Wagner, J, O'Farrell, A-M, McClanahan, T, Zurawski, S, Hannum, C, Gorman, D, Rennick, D, Kastelein, R, de Waal Malefyt, R und Moore, K (2002). "A receptor for the heterodimeric cytokine IL-23 is composed of IL-12Rbeta1 and a novel cytokine receptor subunit, IL-23R." J Immunol 168(11): 5699-5708.

Pennica, D, Arce, V, Swanson, TA, Vejsada, R, Pollock, RA, Armanini, M, Dudley, K, Phillips, HS, Rosenthal, A, Kato, AC und Henderson, CE (1996). "Cardiotrophin-1, a cytokine present in embryonic muscle, supports long-term survival of spinal motoneurons." Neuron 17(1): 63-74.

Pennica, D, King, KL, Shaw, KJ, Luis, E, Rullamas, J, Luoh, SM, Darbonne, WC, Knutzon, DS, Yen, R und Chien, KR (1995). "Expression cloning of cardiotrophin 1, a

cytokine that induces cardiac myocyte hypertrophy." Proc Natl Acad Sci U S A 92(4): 1142-1146.

Perret, D, Guillet, C, Elson, G, Froger, J, Plun-Favreau, H, Rousseau, F, Chabbert, M, Gauchat, JF und Gascan, H (2004). "Two different contact sites are recruited by cardiotrophin-like cytokine (CLC) to generate the CLC/CLF and CLC/sCNTFRalpha composite cytokines." J Biol Chem 279(42): 43961-43970.

Pflanz, S, Hibbert, L, Mattson, J, Rosales, R, Vaisberg, E, Bazan, JF, Phillips, JH, McClanahan, TK, de Waal Malefyt, R und Kastelein, RA (2004). "WSX-1 and glycoprotein 130 constitute a signal-transducing receptor for IL-27." J Immunol 172(4): 2225-2231.

Pflanz, S, Kurth, I, Grotzinger, J, Heinrich, PC und Muller-Newen, G (2000). "Two different epitopes of the signal transducer gp130 sequentially cooperate on IL-6-induced receptor activation." J Immunol 165(12): 7042-7049.

Pflanz, S, Tacke, I, Grötzinger, J, Jacques, Y, Minvielle, S, Dahmen, H, Heinrich, P und Müller-Newen, G (1999). "A fusion protein of interleukin-11 and soluble interleukin-11 receptor acts as a superagonist on cells expressing gp130." FEBS Lett 450(1-2): 117-122.

Pflanz, S, Timans, JC, Cheung, J, Rosales, R, Kanzler, H, Gilbert, J, Hibbert, L, Churakova, T, Travis, M, Vaisberg, E, Blumenschein, WM, Mattson, JD, Wagner, JL, To, W, Zurawski, S, McClanahan, TK, Gorman, DM, Bazan, JF, de Waal Malefyt, R, Rennick, D und Kastelein, RA (2002). "IL-27, a heterodimeric cytokine composed of EBI3 and p28 protein, induces proliferation of naive CD4(+) T cells." Immunity 16(6): 779-790.

Piazza, F, Manni, S, Ruzzene, M, Pinna, L, Gurrieri, C und Semenzato, G (2012). "Protein kinase CK2 in hematologic malignancies: reliance on a pivotal cell survival regulator by oncogenic signaling pathways." Leukemia 26(6): 1174-1179.

Pilati, C, Amessou, M, Bihl, M, Balabaud, C, Nhieu, J, Paradis, V, Nault, J, Izard, T, Bioulac-Sage, P, Couchy, G, Poussin, K und Zucman-Rossi, J (2011). "Somatic mutations activating STAT3 in human inflammatory hepatocellular adenomas." J Exp Med 208(7): 1359-1366.

Pinna, L (2003). "The raison d'être of constitutively active protein kinases: the lesson of CK2." Acc Chem Res 36(6): 378-384.

Plun-Favreau, H, Elson, G, Chabbert, M, Froger, J, deLapeyriere, O, Lelievre, E, Guillet, C, Hermann, J, Gauchat, JF, Gascan, H und Chevalier, S (2001). "The ciliary

neurotrophic factor receptor alpha component induces the secretion of and is required for functional responses to cardiotrophin-like cytokine." *EMBO J* 20(7): 1692-1703.

Plun-Favreau, H, Perret, D, Diveu, C, Froger, J, Chevalier, S, Lelievre, E, Gascan, H und Chabbert, M (2003). "Leukemia inhibitory factor (LIF), cardiotrophin-1, and oncostatin M share structural binding determinants in the immunoglobulin-like domain of LIF receptor." *J Biol Chem* 278(29): 27169-27179.

Poussin, K, Pilati, C, Couchy, G, Calderaro, J, Bioulac-Sage, P, Bacq, Y, Paradis, V, Leteurtre, E, Sturm, N, Ramos, J, Guettier, C, Bardier-Dupas, A, Boulai, A, Wendum, D, Selves, J, Izard, T, Nault, JC und Zucman-Rossi, J (2013). "Biochemical and functional analyses of gp130 mutants unveil JAK1 as a novel therapeutic target in human inflammatory hepatocellular adenoma." *Oncoimmunology* 2(12): e27090.

Presky, D, Yang, H, Minetti, L, Chua, A, Nabavi, N, Wu, C, Gately, M und Gubler, U (1996). "A functional interleukin 12 receptor complex is composed of two beta-type cytokine receptor subunits." *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(24): 14002-14007.

Putoczki, T und Ernst, M (2010). "More than a sidekick: the IL-6 family cytokine IL-11 links inflammation to cancer." *J Leukoc Biol* 88(6): 1109-1117.

Rabe, B, Chalaris, A, May, U, Waetzig, GH, Seegert, D, Williams, AS, Jones, SA, Rose-John, S und Scheller, J (2008). "Transgenic blockade of interleukin 6 transsignaling abrogates inflammation." *Blood* 111(3): 1021-1028.

Rebouissou, S, Amessou, M, Couchy, G, Poussin, K, Imbeaud, S, Pilati, C, Izard, T, Balabaud, C, Bioulac-Sage, P und Zucman-Rossi, J (2009). "Frequent in-frame somatic deletions activate gp130 in inflammatory hepatocellular tumours." *Nature* 457(7226): 200-204.

Reich, NC (2013). "STATs get their move on." *JAKSTAT* 2(4): e27080.

Richards, CD, Langdon, C, Pennica, D und Gauldie, J (1996). "Murine cardiotrophin-1 stimulates the acute-phase response in rat hepatocytes and H35 hepatoma cells." *J Interferon Cytokine Res* 16(1): 69-75.

Rinis, N, Kuster, A, Schmitz-Van de Leur, H, Mohr, A und Muller-Newen, G (2014). "Intracellular signaling prevents effective blockade of oncogenic gp130 mutants by neutralizing antibodies." *Cell Commun Signal* 12(1): 14.

Ritt, D, Zhou, M, Conrads, T, Veenstra, T, Copeland, T und Morrison, D (2007). "CK2 Is a component of the KSR1 scaffold complex that contributes to Raf kinase activation." *Curr Biol* 17(2): 179-184.

Robinson, R, Grey, L, Staunton, D, Vankelecom, H, Vernallis, A, Moreau, J, Stuart, D, Heath, J und Jones, E (1994). "The crystal structure and biological function of leukemia inhibitory factor: implications for receptor binding." Cell 77(7): 1101-1116.

Rodig, SJ, Meraz, MA, White, JM, Lampe, PA, Riley, JK, Arthur, CD, King, KL, Sheehan, KCF, Yin, L, Pennica, D, Johnson, EM und Schreiber, RD (1998). "Disruption of the Jak1 Gene Demonstrates Obligatory and Nonredundant Roles of the Jaks in Cytokine-Induced Biologic Responses." Cell 93.

Rogers, S, Wells, R und Rechsteiner, M (1986). "Amino acid sequences common to rapidly degraded proteins: the PEST hypothesis." Science 234(4774): 364-368.

Rose-John, S, Ehlers, M, Grötzinger, J und Müllberg, J (1995). "The soluble interleukin-6 receptor." Ann N Y Acad Sci 762: 207-220; discussion 220-201.

Rose-John, S und Heinrich, PC (1994). "Soluble receptors for cytokines and growth factors: generation and biological function." Biochem J 300 (Pt 2): 281-290.

Samoilova, EB, Horton, JL, Hilliard, B, Liu, TS und Chen, Y (1998). "IL-6-deficient mice are resistant to experimental autoimmune encephalomyelitis: roles of IL-6 in the activation and differentiation of autoreactive T cells." J Immunol 161(12): 6480-6486.

Sarno, S, Reddy, H, Meggio, F, Ruzzene, M, Davies, SP, Donella-Deana, A, Shugar, D und Pinna, LA (2001). "Selectivity of 4,5,6,7-tetrabromobenzotriazole, an ATP site-directed inhibitor of protein kinase CK2 ('casein kinase-2')." FEBS Lett 496(1): 44-48.

Sasaki, A, Yasukawa, H, Suzuki, A, Kamizono, S, Syoda, T, Kinjyo, I, Sasaki, M, Johnston, JA und Yoshimura, A (1999). "Cytokine-inducible SH2 protein-3 (CIS3/SOCS3) inhibits Janus tyrosine kinase by binding through the N-terminal kinase inhibitory region as well as SH2 domain." Genes Cells 4(6): 339-351.

Schaper, F, Gendo, C, Eck, M, Schmitz, J, Grimm, C, Anhuf, D, Kerr, IM und Heinrich, PC (1998). "Activation of the protein tyrosine phosphatase SHP2 via the interleukin-6 signal transducing receptor protein gp130 requires tyrosine kinase Jak1 and limits acute-phase protein expression." Biochem J 335 (Pt 3): 557-565.

Scheller, J, Chalaris, A, Schmidt-Arras, D und Rose-John, S (2011). "The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6." Biochim Biophys Acta 1813(5): 878-888.

Scheller, J, Schuster, B, Hölscher, C, Yoshimoto, T und Rose-John, S (2005). "No inhibition of IL-27 signaling by soluble gp130." Biochem Biophys Res Commun 326(4): 724-728.

Schmidt-Arras, D, Müller, M, Stevanovic, M, Horn, S, Schütt, A, Bergmann, J, Wilkens, R, Lickert, A und Rose-John, S (2013). "Oncogenic deletion mutants of gp130 signal from intracellular compartments." J Cell Sci 127(Pt 2):341-53.

Schmittgen, TD und Livak, KJ (2008). "Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method." Nat Protoc 3(6): 1101-1108.

Schmitz, J, Weissenbach, M, Haan, S, Heinrich, PC und Schaper, F (2000). "SOCS3 exerts its inhibitory function on interleukin-6 signal transduction through the SHP2 recruitment site of gp130." J Biol Chem 275(17): 12848-12856.

Schroers, A, Hecht, O, Kallen, KJ, Pachta, M, Rose-John, S und Grotzinger, J (2005). "Dynamics of the gp130 cytokine complex: a model for assembly on the cellular membrane." Protein Sci 14(3): 783-790.

Schuster, B, Kovaleva, M, Sun, Y, Regenhard, P, Matthews, V, Grotzinger, J, Rose-John, S und Kallen, KJ (2003). "Signaling of human ciliary neurotrophic factor (CNTF) revisited. The interleukin-6 receptor can serve as an alpha-receptor for CTNF." J Biol Chem 278(11): 9528-9535.

Schütt, A, Zacharias, M, Schneider, N, Horn, S, Grötzinger, J, Rose-John, S und Schmidt-Arras, D (2013). "gp130 activation is regulated by D2-D3 interdomain connectivity." Biochem J 450(3):487-96.

Seldin, D, Lou, D, Toselli, P, Landesman-Bollag, E und Dominguez, I (2008). "Gene targeting of CK2 catalytic subunits." Mol Cell Biochem 316(1-2): 141-147.

Seldin, DC, Landesman-Bollag, E, Farago, M, Currier, N, Lou, D und Dominguez, I (2005). "CK2 as a positive regulator of Wnt signalling and tumourigenesis." Mol Cell Biochem 274(1-2): 63-67.

Shan, Y, Gnanasambandan, K, Ungureanu, D, Kim, ET, Hammaren, H, Yamashita, K, Silvennoinen, O, Shaw, DE und Hubbard, SR (2014). "Molecular basis for pseudokinase-dependent autoinhibition of JAK2 tyrosine kinase." Nat Struct Mol Biol 21(7): 579-584.

Shen, P, Roch, T, Lampropoulou, V, O'Connor, RA, Stervbo, U, Hilgenberg, E, Ries, S, Dang, VD, Jaimes, Y, Daridon, C, Li, R, Jouneau, L, Boudinot, P, Wilantri, S, Sakwa, I, Miyazaki, Y, Leech, MD, McPherson, RC, Wirtz, S, Neurath, M, Hoehlig, K, Meinl, E, Grutzkau, A, Grun, JR, Horn, K, Kuhl, AA, Dorner, T, Bar-Or, A, Kaufmann, SH, Anderton, SM und Fillatreau, S (2014). "IL-35-producing B cells are critical regulators of immunity during autoimmune and infectious diseases." Nature 507(7492): 366-370.

Shuai, K und Liu, B (2005). "Regulation of gene-activation pathways by PIAS proteins in the immune system." Nat Rev Immunol 5(8): 593-605.

Siebler, J, Wirtz, S, Frenzel, C, Schuchmann, M, Lohse, AW, Galle, PR und Neurath, MF (2008). "Cutting edge: a key pathogenic role of IL-27 in T cell- mediated hepatitis." J Immunol 180(1): 30-33.

Sommer, J, Effenberger, T, Volpi, E, Waetzig, G, Bernhardt, M, Suthaus, J, Garbers, C, Rose-John, S, Floss, D und Scheller, J (2012). "Constitutively active mutant gp130 receptor protein from inflammatory hepatocellular adenoma is inhibited by an anti-gp130 antibody that specifically neutralizes interleukin 11 signaling." J Biol Chem 287(17): 13743-13751.

Sommer, J, Garbers, C, Wolf, J, Trad, A, Moll, JM, Sack, M, Fischer, R, Grötzinger, J, Waetzig, GH, Floss, DM und Scheller, J (2014). "Alternative Intronic Polyadenylation Generates the Interleukin-6 Trans-signaling Inhibitor sgp130-E10." J Biol Chem 289(32): 22140-22150.

St-Denis, NA und Litchfield, DW (2009). "Protein kinase CK2 in health and disease: From birth to death: the role of protein kinase CK2 in the regulation of cell proliferation and survival." Cell Mol Life Sci 66(11-12): 1817-1829.

Stahl, N, Boulton, TG, Farruggella, T, Ip, NY, Davis, S, Witthuhn, BA, Quelle, FW, Silvennoinen, O, Barbieri, G, Pellegrini, S und et al. (1994). "Association and activation of Jak-Tyk kinases by CNTF-LIF-OSM-IL-6 beta receptor components." Science 263(5143): 92-95.

Stahl, N, Farruggella, TJ, Boulton, TG, Zhong, Z, Darnell, JE, Jr. und Yancopoulos, GD (1995). "Choice of STATs and other substrates specified by modular tyrosine-based motifs in cytokine receptors." Science 267(5202): 1349-1353.

Stewart, CL, Kaspar, P, Brunet, LJ, Bhatt, H, Gadi, I, Kontgen, F und Abbondanzo, SJ (1992). "Blastocyst implantation depends on maternal expression of leukaemia inhibitory factor." Nature 359(6390): 76-79.

Stumhofer, JS, Tait, ED, Quinn, WJ, 3rd, Hosken, N, Spudy, B, Goenka, R, Fielding, CA, O'Hara, AC, Chen, Y, Jones, ML, Saris, CJ, Rose-John, S, Cua, DJ, Jones, SA, Elloso, MM, Grotzinger, J, Cancro, MP, Levin, SD und Hunter, CA (2010). "A role for IL-27p28 as an antagonist of gp130-mediated signaling." Nat Immunol 11(12): 1119-1126.

Takahashi, R, Yokoji, H, Misawa, H, Hayashi, M, Hu, J und Deguchi, T (1994). "A null mutation in the human CNTF gene is not causally related to neurological diseases." Nat Genet 7(1): 79-84.

Tanaka, M, Hirabayashi, Y, Sekiguchi, T, Inoue, T, Katsuki, M und Miyajima, A (2003). "Targeted disruption of oncostatin M receptor results in altered hematopoiesis." Blood 102(9): 3154-3162.

Tanaka, M, Kishimura, M, Ozaki, S, Osakada, F, Hashimoto, H, Okubo, M, Murakami, M und Nakao, K (2000). "Cloning of novel soluble gp130 and detection of its neutralizing autoantibodies in rheumatoid arthritis." J Clin Invest 106(1): 137-144.

Tanner, JW, Chen, W, Young, RL, Longmore, GD und Shaw, AS (1995). "The conserved box 1 motif of cytokine receptors is required for association with JAK kinases." J Biol Chem 270(12): 6523-6530.

Tenhumberg, S, Schuster, B, Zhu, L, Kovaleva, M, Scheller, J, Kallen, KJ und Rose-John, S (2006). "gp130 dimerization in the absence of ligand: preformed cytokine receptor complexes." Biochem Biophys Res Commun 346(3): 649-657.

Tenhumberg, S, Waetzig, GH, Chalaris, A, Rabe, B, Seegert, D, Scheller, J, Rose-John, S und Grotzinger, J (2008). "Structure-guided optimization of the interleukin-6 trans-signaling antagonist sgp130." J Biol Chem 283(40): 27200-27207.

Timmermann, A, Pflanz, S, Grötzinger, J, Kuster, A, Kurth, I, Pitard, V, Heinrich, PC und Müller-Newen, G (2000). "Different epitopes are required for gp130 activation by interleukin-6, oncostatin M and leukemia inhibitory factor." FEBS Lett 468(2-3): 120-124.

Torres, J und Pulido, R (2001). "The tumor suppressor PTEN is phosphorylated by the protein kinase CK2 at its C terminus. Implications for PTEN stability to proteasome-mediated degradation." J Biol Chem 276(2): 993-998.

Varghese, JN, Moritz, RL, Lou, MZ, Van Donkelaar, A, Ji, H, Ivancic, N, Branson, KM, Hall, NE und Simpson, RJ (2002). "Structure of the extracellular domains of the human interleukin-6 receptor alpha -chain." Proc Natl Acad Sci U S A 99(25): 15959-15964.

Vasse, M, Pourtau, J, Trochon, V, Muraine, M, Vannier, JP, Lu, H, Soria, J und Soria, C (1999). "Oncostatin M induces angiogenesis in vitro and in vivo." Arterioscler Thromb Vasc Biol 19(8): 1835-1842.

Vignali, DA und Kuchroo, VK (2012). "IL-12 family cytokines: immunological playmakers." Nat Immunol 13(8): 722-728.

Villarino, AV, Stumhofer, JS, Saris, CJ, Kastelein, RA, de Sauvage, FJ und Hunter, CA (2006). "IL-27 limits IL-2 production during Th1 differentiation." J Immunol 176(1): 237-247.

Vollmer, P, Oppmann, B, Voltz, N, Fischer, M und 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(2): 438-446.

Walker, F, Zhang, HH, Matthews, V, Weinstock, J, Nice, EC, Ernst, M, Rose-John, S und Burgess, AW (2008). "IL6/sIL6R complex contributes to emergency granulopoietic responses in G-CSF- and GM-CSF-deficient mice." Blood 111(8): 3978-3985.

Wang, RX, Yu, CR, Dambuza, IM, Mahdi, RM, Dolinska, M, Sergeey, YV, Wingfield, PT, Kim, SH und Egwuagu, CE (2014). "Interleukin-35 induces regulatory B cells that suppress autoimmune disease." Nat Med 20(6):633-41.

Wen, Z, Zhong, Z und Darnell, JE, Jr. (1995). "Maximal activation of transcription by Stat1 and Stat3 requires both tyrosine and serine phosphorylation." Cell 82(2): 241-250.

Yamanaka, A, Hamano, S, Miyazaki, Y, Ishii, K, Takeda, A, Mak, TW, Himeno, K, Yoshimura, A und Yoshida, H (2004). "Hyperproduction of proinflammatory cytokines by WSX-1-deficient NKT cells in concanavalin A-induced hepatitis." J Immunol 172(6): 3590-3596.

Yim, H, Lee, YH, Lee, CH und Lee, SK (1999). "Emodin, an anthraquinone derivative isolated from the rhizomes of *Rheum palmatum*, selectively inhibits the activity of casein kinase II as a competitive inhibitor." Planta Med 65(1): 9-13.

Yoon, C, Johnston, S, Tang, J und Stahl, M (2000). "Charged residues dominate a unique interlocking topography in the heterodimeric cytokine interleukin-12." EMBO J 19(14): 3530-3541.

Zheng, Y, Qin, H, Frank, S, Deng, L, Litchfield, D, Tefferi, A, Pardanani, A, Lin, F-T, Li, J, Sha, B und Benveniste, E (2011). "A CK2-dependent mechanism for activation of the JAK-STAT signaling pathway." Blood 118(1): 156-166.

Zhong, M, Henriksen, MA, Takeuchi, K, Schaefer, O, Liu, B, ten Hoeve, J, Ren, Z, Mao, X, Chen, X, Shuai, K und Darnell, JE, Jr. (2005). "Implications of an antiparallel dimeric structure of nonphosphorylated STAT1 for the activation-inactivation cycle." Proc Natl Acad Sci U S A 102(11): 3966-3971.

Zou, J, Luo, H, Zeng, Q, Dong, Z, Wu, D und Liu, L (2011). "Protein kinase CK2alpha is overexpressed in colorectal cancer and modulates cell proliferation and invasion via regulating EMT-related genes." J Transl Med 9: 97.

8 ANHANG

Abkürzungsverzeichnis

ADAM	Disintegrin-ähnliche Metalloprotease
Akt	Proteinkinase B
BCA	Bicinchoninsäure
BSA	Bovines Serumalbumin
CD	<i>cluster of differentiation</i>
cDNA	<i>copy DNA</i>
CK2	Protein Kinase II
CLC	<i>cardiotrophin-like cytokine</i>
CLF-1	<i>cytokine-like factor 1</i>
cm	Zentimeter
CNTF	<i>ciliary neurotrophic factor</i>
CNTFR	<i>ciliary neurotrophic factor α-receptor</i>
CT-1	Cardiotrophin-1
C-terminal	Carboxy-terminal
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (engl. <i>desoxy ribonucleic acid</i>)
dNTP	Desoxyribonukleotide
DSS	<i>dextran sodium sulfate</i>
EBI3	<i>Epstein-Barr virus-induced protein 3</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor</i>
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)- tetraessigsäure
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERK	<i>extracellular regulated kinase</i>
<i>et al.</i>	und weitere

Fc	invariables Antikörperfragment
FCS	<i>fetal calf serum</i>
FERM	<i>four-point-one, ezrin, radixin and moesin</i>
FNIII	Fibronektin-TypIII-ähnliche
Foxp3	<i>forkhead box protein P3</i>
g	Erdbeschleunigung bzw. Gramm
Gab1	<i>Grb2-associated-binding protein 1</i>
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
eGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
gp130	Glykoprotein 130
GPI	Glycosylphosphatidylinositol
GPL	<i>gp130-like receptor</i>
Grb2	<i>growth factor receptor-bound protein 2</i>
h	Stunde bzw. human
HEK	<i>human embryonic kidney</i>
Hyper-IL-6	Fusionsprotein aus dem IL-6-Rezeptor, einem Linker und IL-6
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
Ig-like	Immunglobulin-ähnliche
IHCA	Entzündliche hepatozelluläre Adenome
IL	Interleukin
Jak	Janus kinase
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
KIR	Kinase-inhibitorische Region
LIF	Leukämie inhibierender Faktor
m	murin
M	molar
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
MEF	<i>murine embryonale Fibroblasten</i>
mg	Milligramm
min	Minuten
µg	Mikrogramm
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
mM	Millimolar
µM	Mikromolar
ng	Nanogramm
NLS	<i>nuclear localization signal</i>

nm	Nanometer
N-terminal	Amino-Terminal
OSM	Onkostatin-M
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
PI3K	Phosphatidylinositol 3 Kinase
PIAS	<i>protein inhibitor of activated STAT</i>
PKB	Proteinkinase B
POD	Peroxidase
PTEN	<i>phosphatase and tensin homologue</i>
PVDF	Polyvinylidenfluorid
qPCR	Quantitative Echtzeit-PCR
R	Rezeptor
Ras	<i>rat sarcoma</i>
RLU	<i>relative light units</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	<i>rounds per minute</i>
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat (engl. <i>sodium dodecylsulfate</i>)
sgp130	lösliches gp130
SH2	<i>Src-homology 2</i>
SHP2	<i>SH2 containing phosphatase</i>
sIL-6R	löslicher IL-6R
SOCS	<i>suppressor of cytokine signaling</i>
SOE-PCR	<i>splicing by overlapping extensions PCR</i>
STAT	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA Puffer
TBB	Tetrabromobenzotriazol
TBS	<i>Tris buffered saline</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl-)Aminomethan
Tween20	<i>Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat</i>
Tyk2	<i>non-receptor tyrosine-protein kinase</i>
U	<i>Units</i>
V	Volt

WB	Western Blot
WT	Wildtyp
ZBM	Zytokinbindemodul

Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Jürgen Scheller, meinem Erstgutachter und Betreuer, für die Möglichkeit danken, die vorliegende Arbeit in seinem Institut anfertigen zu können. Ich danke ihm außerdem für die Überlassung des Themas und die schnelle Korrektur der Arbeit.

Bei Prof. Dr. Lutz Schmitt möchte ich mich für die Übernahme des Koreferats bedanken.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Christoph Garbers für die Betreuung in den ersten zwei Jahren und darüber hinaus. Ich danke ihm für das große Vertrauen in meine Arbeit und die Möglichkeit selbstständig zu arbeiten, sowie für die vielen konstruktiven Diskussionen. Vor allem bin ich dankbar für seine Freundschaft und sein großes Verständnis.

Verschiedenen Kooperationspartnern gilt mein Dank für eine unkomplizierte und produktive Zusammenarbeit. Dr. Eric Keil danke ich für die Jak1- und Jak2-defizienten MEFs. Melanie Grusdat und PD Dr. med. Philipp Lang danke ich für die Unterstützung bei T-Zell-Experimenten. Dr. Jens M. Moll danke ich für die Zusammenarbeit im p35-Projekt.

Der Doppelkopfrunde aus Dr. Christoph Garbers, Dr. Fabian Kuck und Dr. Jan Sommer danke ich für schöne Abende an denen manchmal auch Karten gespielt wurde.

Für eine abwechslungsreiche Zeit im und außerhalb des Labors und tägliche gemeinsame Mittagessen danke ich den Mitgliedern der AG Scheller und denen, die es mal waren. Insbesondere Niloufar Monhasery danke ich für geteilte Nussecken und Kaffeepausen. Petra Oprea danke ich für vertrauensvolle Gespräche und immer ein offenes Ohr.

Zu guter Letzt möchte ich meiner Familie, danken, die wahrscheinlich unterschätzen, wieviel sie zu dieser Arbeit beigetragen haben und die mich immer unterstützen. Vor allem Juan möchte ich für sein Verständnis, seine Geduld und so vieles mehr von Herzen danken.

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere an Eides Statt, dass die Dissertation von mir selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“ erstellt worden ist.

Die Dissertation wurde in der vorgelegten oder in einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Es wurden bisher keine erfolglosen Promotionsversuche von mir unternommen.

Düsseldorf, im August 2014

Samadhi Aparicio Siegmund