(19) Bundesrepublik Deutschland
Deutsches Patent- und Markenamt

(10) **DE 199 41 897 B4** 2006.06.14

(12) **Patentschrift**

(21) Aktenzeichen: **199 41 897.7**
(22) Anmeldetag: **02.09.1999**
(43) Offenlegungstag: **15.03.2001**
(45) Veröffentlichungstag
der Patenterteilung: **14.06.2006**

(51) Int Cl.[8]: ***C07K 14/715*** (2006.01)

Innerhalb von drei Monaten nach Veröffentlichung der Patenterteilung kann nach § 59 Patentgesetz gegen das Patent Einspruch erhoben werden. Der Einspruch ist schriftlich zu erklären und zu begründen. Innerhalb der Einspruchsfrist ist eine Einspruchsgebühr in Höhe von 200 Euro zu entrichten(§ 6 Patentkostengesetz in Verbindung mit der Anlage zu § 2 Abs. 2 Patentkostengesetz).

(73) Patentinhaber:
GSF - Forschungszentrum für Umwelt und Gesundheit GmbH, 80807 München, DE

(74) Vertreter:
PAe Reinhard, Skuhra, Weise & Partner GbR, 80801 München

(72) Erfinder:
Schäffer, Michael, 80797 München, DE; Schneiderbauer, Michaela, 84503 Altötting, DE; Weidler, Sascha, 80336 München, DE; Hallek, Michael, Dr., 86938 Schondorf, DE

(56) Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht gezogene Druckschriften:
WO 96 09 382 A1
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 88, 1991, 11349-11353;
M. Murakami et al. "Critical cytoplasmic region of the interleukin 6 signal transducer gp130 is conserved in the cytokine receptor family". In: Proc. Natl. Acad. Sci. USA, ISSN 0027-8424, 1991, 88, 11349-53;

(54) Bezeichnung: **IL-6 Rezeptor-Protein, Beta-Kette (gp130) des IL-6 Rezeptor-Proteins, für diese Proteine kodierende DNA, davon abgeleitete RNA, Peptid mit den Aminosäuren 771-811 dieser Beta-Kette oder Teilen davon und deren Verwendungen**

(57) Hauptanspruch: IL-6 Rezeptor-Protein, welches im Bereich der Beta-Kette eine Deletion des Bereichs der Aminosäuren 771-811 oder von Teilen dieses Bereichs aufweist, so dass die spezifische Bindung der Hck-Tyrosinkinase an gp130 unterbunden wird.

Beschreibung

[0001] Die vorliegende Erfindung betrifft Deletionsmutanten des IL-6 Rezeptor-Proteins, insbesondere der Beta-Kette (gp130) des IL-6 Rezeptor-Proteins, DNA, die für dieses Protein kodiert sowie RNA, erhalten durch Transkription dieser DNA. Weiterhin betrifft die Erfindung Peptide mit den Aminosäuren 771-811 dieser Beta-Kette oder Teilen davon und deren Verwendungen gemäß den Patentansprüchen.

[0002] IL-6 ist ein wichtiger Wachstumsfaktor für multiple Myelome (MM). Aus diesem Grunde wurden die Mechanismen, durch die IL-6 das Zellwachstum induziert, untersucht. Wir haben zuvor gezeigt, dass IL-6 die Aktivierung und Tyrosin-Phosphorylierung einer Tyrosinkinase der Src-Familie, Hck, induziert. Es wurde gezeigt, dass Hck in MM-Zell-Linien an die IL-6-Rezeptor-β-Kette gp130 bindet. Es wurde eine Reihe von gp130-Deletionsmutanten auf der Basis eines chimären Rezeptors konstruiert, die den extrazellulären Teil des Erythropoietinrezeptors und den intrazellulären Teil von gp130 umfassen. Die Klonierung von gp130 ist in [Hibi M., 1990] beschrieben. Überraschenderweise führte die Deletion eines 41 Aminosäuren langen Bereichs zwischen den Resten 771 und 811 von gp130 (Δ771-811) zur vollständigen Disruption der Hck-Bindung an gp130. Ein auffälliges Merkmal dieses Bereichs ist sein bemerkenswert hoher Gehalt an negativ geladenen Resten, weshalb er auch als "saure Domäne" bezeichnet wurde. Da die Deletion Δ771-811 zwischen den beiden STAT3-Bindungsstellen an den Tyrosin-(Y)-Resten 814 und 767 lokalisiert war, wurden an diesen Stellen Punktmutationen erzeugt; damit wurde ausgeschlossen, dass Y814 oder Y767 die Hck-Bindung an gp130 beeinflussten. Die Aktivierung von STAT3 durch gp130 wurde außerdem durch die Δ771-811-Mutante nicht beeinträchtigt. Schließlich zeigte eine stabile Transfektion von Rezeptormutanten in eine wachstumsfaktorabhängige pro-B-Zell-Linie, Baf-B03, dass die Deletion Δ771-811 die proliferative Antwort von Zellen auf gp130-Stimulation erheblich reduzierte. Zusammengefasst wurde erstmals gezeigt, dass Hck an eine saure Domäne von gp130 bindet, was für die Vermittlung der proliferativen Antwort durch wachstumsfaktoraktiviertes gp130 entscheidend ist.

[0003] Interleukin 6 ist ein Haupt-Wachstumsfaktor für MM-Zellen in vitro und in vivo [Klein B., Zhang X. G, 1995; Hallek M., 1998; Klein B., 1992; Klein B., 1995; Kawano M., 1988; Zhang X.G., 1989]. Trotz eines Hinweises auf eine Rolle von IL-6 bei der Pathogenese von MM ist wenig über die Signal-Mechanismen bekannt, die für das IL-6-vermittelte Zellwachstum in MM verantwortlich sind.

[0004] Zur Ausübung dieser biologischen Wirkungen muss IL-6 an den IL-6-Rezeptor (IL-6R) binden, der aus zwei α-Ketten (IL-6Rα, 80 kDa) und zwei β-Ketten IL-6Rβ oder gp130, (130 kDa) besteht. Zwei IL-6-Einheiten und zwei Paare dieser Rezeptorketten bilden einen funktionellen hexameren IL-6R-Komplex [Simpson R. J., 1997; Somers W., 1997; Ward L. D., 1996]. Die anschließenden intrazellulären Signalisierungsereignisse werden durch gp130 aktiviert. Die Aktivierung von IL-6R stimuliert mindestens zwei Haupt-Signaltransduktionswege, die Ras/Mitogen-aktivierte Proteinkinase-(MAPK)-Signalkaskade [Neumann C., 1996; Ogata A., 1997; Takahashi-Tezuka M., 1998; Shi Z. Q., 1998; Boulton T. G., 1994] und den Janus-Kinase-(JAK)/Signal-Transduktor und -Aktivator der Transkription (STAT)-Weg [Berger L. C., 1994; Ihle J. N., 1994; Stahl N., 1994; Gerhartz C., 1996]. Die Signalkaskaden, die IL-6-induziertes Zellwachstum vermitteln, sind nicht gut definiert. Es wurde jedoch früher gezeigt, dass JAK- und STAT-Proteine in MM-Zellen unabhängig von der proliferativen Reaktion durch IL-6 aktiviert werden. MAPK wurde dagegen nur in Zellen und Zell-Linien aktiviert, die eine proliferative Reaktion auf IL-6 zeigten [Ogata A., 1997].

[0005] Die Erfinder haben zuvor gezeigt, dass mindestens drei Mitglieder der Tyrosin-Kinasen der Src-Familie, Fyn, Hck und Lyn, in MM-Zellen an gp130 binden [Hallek M., 1997]. Die Stimulation der Zellen mit IL-6 steigerte die Aktivität dieser Kinasen.

[0006] Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 88, 11349 bis 11353 (1991) beschreibt IL-6-Rezeptoren, bei denen gp130 in Teilen deletiert ist.

[0007] Die WO96/09382 beschreibt gp130, welchem die Transmembrandomäne fehlt.

[0008] Die vorliegende Erfindung hat die Aufgabe, Mittel bereitzustellen, die die Stimulation von Zellen des multiplen Myeloms durch IL-6 verhindern oder zumindest deutlich reduzieren, um die Proliferation von Tumorzellen, insbesondere Myelomzellen, zumindest deutlich zu verringern.

[0009] Erfindungsgemäß wird ein IL-6 Rezeptor-Protein bereitgestellt, welches im Bereich der Beta-Kette eine Deletion des Bereichs der Aminosäuren 771-811 aufweist. In weiteren Versuchen kann dieser Bereich weiter eingeschränkt werden, so daß enger gefaßte Deletionsbereiche innerhalb des Bereichs 771-811 ermittelt werden können, die die Hck-Bindung hemmen. Bevorzugt erfolgt eine mehr als 90 %ige Abnahme der Bindung von Hck an gp130. Selbstverständlich ist es auch möglich, einen breiteren Bereich von gp130 zu deletieren, der die oben genannte Aminosäuresequenz oder Teile hiervon umfaßt. Bevorzugt sind jedoch solche Deletionsmutanten, die den Bereich der Aminosäuren 771-811 oder Teile hiervon umfassen.

[0010] Erfindungsgemäß beansprucht wird nicht nur

das IL-6 Rezeptor-Protein mit der oben genannten Deletion im gp130, sondern auch das gp130 selbst, das die Deletion im Bereich 771-811 oder Teilen hiervon trägt. Auch Deletionen, die über den Bereich von 771-811 hinausgehen und zu einer Hemmung der Interaktion zwischen Hck und gp130 führen, werden von der Erfindung mitumfaßt.

[0011] Erfindungsgemäß beansprucht wird auch DNA, die für die oben charakterisierten IL-6 Rezeptor-Proteine oder das mutierte gp130 kodiert sowie RNA, erhalten durch Transkription dieser DNA.

[0012] Erfindungsgemäß wurde überraschend gefunden, daß bei Deletion eines bestimmten Bereichs von gp130 die Bindung der Hck-Kinase unterbunden wird. Überraschenderweise lag dieser Deletionsbereich nicht im Bereich von Homologie-Boxen, die bekannterweise bei mehreren verschiedenen Wachstumsfaktorrezeptoren vorkommen und von denen gezeigt wurde, daß Signalübertragungsproteine hieran binden. Weiterhin überraschend war, daß Deletionsmutanten von gp130 im nachfolgend beschriebenen Bereich eine unerwartet deutliche Hemmung der Proliferation der Myelomzellen zeigen.

[0013] Der von den Erfindern ermittelte Bereich von 41 Aminosäuren kann durch übliche Deletionsuntersuchungen weiter eingeschränkt werden. Hierzu werden beispielsweise Rezeptormutanten hergestellt, die kleinere Deletionen im Bereich der Aminosäuren 771-811 umfassen. In einer alternativen Ausgestaltungsform werden Peptide hergestellt, die kleinere Bereiche aus dem oben beschriebenen 41 Aminosäuren umfassenden Deletionsbereich enthalten; diese kleinen Peptide mit den entsprechenden Teilsequenzen der Hck-Bindedomäne werden benutzt, um Hck zu „fischen". Auf diese Weise können solche Aminosäuren bzw. Aminosäurebereiche ermittelt werden, die für die Bindung von Hck erforderlich sind, wodurch auch das sogenannte „drug-design" beschleunigt und erleichtert wird. Insbesondere in Frage kommen innerhalb der 41 Aminosäuren umfassenden Region zwei Bereiche mit 5 bzw. 7 Aminosäuren, nämlich die Aminosäuren STQPL und SEEDPDE.

[0014] Ausgehend von dem erfindungsgemäß ermittelten Deletionsbereich, der die Aminosäuren 771-811 der Beta-Kette des IL-6 Rezeptor-Proteins umfaßt, kann der Fachmann nunmehr in zielgerichteter Weise Substanzen selektieren, die die erfindungsgemäß ermittelte Bindungsstelle auf dem gp130-Protein für die Hck-Tyrosinkinase blockieren. Weiterhin können Substanzen zielgerichtet ermittelt werden, die spezifisch die Bindungsstelle für das gp130-Protein auf der Hck-Tyrosinkinase blockieren. Bei diesen Substanzen kann es sich beispielsweise um Proteine, bevorzugt um kurze Peptide handeln, welche die Andockstelle, d. h. die Bindungstasche für das Protein, blockieren. In anderen Ausführungsformen kann es sich aber auch um anorganische oder organische Moleküle handeln, die keine Protein-Natur besitzen.

[0015] Ausgehend von der in der vorstehenden Anmeldung beschriebenen Kenntnis des Bindungsbereichs von Hck an gp130 ist es möglich, Inhibitoren zu entwickeln, beispielsweise Peptide, die genauso gut oder sogar besser in die „Bindungstasche" für Hck passen wie Hck selbst und die diese Tasche dann für Hck unzugänglich machen, d. h. die intrazelluläre Protein-Protein-Interaktion zwischen Hck und gp130, hier jeweils kurz „Bindung" genannt, verhindern oder zumindest hemmen. Dasselbe Ziel kann auch mit synthetisch hergestellten Substanzen erreicht werden, die Hck oder zumindest den Bindebereich von Hck an gp130 vortäuschen, ohne dessen Funktion, das Wachstum von Tumorzellen zu fördern, übernehmen zu können.

[0016] Auf Grundlage der vorliegenden Erfindung ist es dem Fachmann möglich, anhand bekannter Selektionstechniken solche Substanzen zu ermitteln, die spezifisch den Bindungsbereich von Hck auf der Beta-Kette des IL-6 Rezeptor-Proteins blockieren. Dies bedeutet, daß die Bindungsstelle für Hck auf gp130 so maskiert ist, daß Hck diese Bindungsregion nicht mehr erkennen kann, insbesondere nicht mehr binden kann.

[0017] In einer alternativen Ausgestaltungsform der Erfindung werden solche Substanzen selektiert, die spezifisch den Bindungsbereich für gp130 auf dem Hck-Tyrosinkinase-Protein maskieren, so daß Hck nicht mehr in der Lage ist, seine native Bindungsstelle auf gp130 zu erkennen, insbesondere nicht daran zu binden.

[0018] In einer weiteren Ausgestaltungsform der Erfindung werden Peptide erzeugt, die die Aminosäuren 771-811 von gp130 oder Teile dieses Bereichs umfassen, und die befähigt sind, an die Hck-Tyrosinkinase zu binden. Diese Peptide können in einer solchen Menge zu den Myelomzellen gegeben oder an einen Patienten verabreicht werden, daß eine kompetetive Bindung an die Hck-Tyrosinkinase stattfindet, deren natürliche Bindungsstelle an gp130 hierdurch kompetetiv blockiert wird, so daß die Zahl der Hck-Moleküle, die noch an gp130 binden können, deutlich verringert wird, zumindest soweit, daß die Proliferation von Myelomzellen gehemmt wird.

[0019] Unter dem Ausdruck „Bindung" wird erfindungsgemäß jede Form der Interaktion der Hck-Tyrosinkinase mit gp130 verstanden, die in der Lage ist, die Signalübertragung auf den IL-6 Rezeptor auszuüben. Eine derartige Interaktion zwischen Hck und gp130 wird durch die vorstehend beschriebenen Deletionsmutanten sowie die hier vorgestellten Inhibitoren vermieden.

[0020] Zu den möglichen Substanzen, die für ein Screening-Verfahren in Frage kommen, gehören anorganische und organische Moleküle, wobei es sich bei den organischen Molekülen sowohl um Proteine oder Peptide handeln kann als auch um solche Moleküle, die keine Aminosäuren enthalten.

[0021] Nachdem mit der vorliegenden Erfindung die Bindungsdomäne von Hck auf gp130 auf einen engen Bereich eingegrenzt wurde, ist es durch übliche Screeningverfahren möglich, relativ rasch und zielgerichtet Moleküle in großen Mengen zu analysieren und zu selektieren, welche die erfindungsgemäß gewünschten Eigenschaften aufweisen. Substanzen, die die gewünschten Eigenschaften aufweisen, also die spezifische Bindung von Hck an gp130 verhindern oder zumindest stark reduzieren, können zu einer pharmazeutischen Zubereitung verarbeitet werden, die, zusammen mit üblichen pharmazeutischen Träger- und Hilfsstoffen, bei Patienten mit einem Tumor, z. B. multiplen Myelom, eingesetzt werden kann. Durch eine derartige pharmazeutische Zubereitung ist es möglich, das proliferative Wachstum von Tumorzellen, z. B. Myelomzellen, deutlich zu hemmen, so daß ein therapeutischer Effekt, also zumindest eine Besserung des Krankheitsbildes, erzielt werden kann.

[0022] Es war zwar bisher bekannt, daß Hck mit gp130 interagiert. Neu ist jedoch die Identifikation der Bindedomäne und vor allem die Erkenntnis, daß eine Deletion dieser Bindungsstelle zu einer deutlichen Abnahme des Zellwachstums von Tumorzellen führt. Ausgehend von der vorliegenden Erfindung ist es nunmehr möglich, zielgerichtet und durch Anwendung an sich bekannter Verfahren solche Mittel zu entwickeln, die die Interaktion zwischen Hck und gp130 hemmen oder sogar unterbinden.

[0023] Die Kenntnis der Bindedomäne von Hck am gp130-Molekül, die für die Pathogenese einer Tumorerkrankung hochrelevant ist, ist der initiale und essentielle Schritt für die zielgerichtete Entwicklung von Medikamenten. Mit der gefundenen Proteinsequenz können nunmehr Datenbanken gescreent werden. In diesen Datenbanken können beispielsweise Naturstoffe gefunden werden, die als blockierendes Agenz in Frage kommen, oder mit Hilfe von Computerprogrammen kann, ausgehend von der Aminosäuresequenz, auf die wahrscheinliche dreidimensionale Struktur der Bindungstasche geschlossen werden. Gegen die Bindungstasche können dann synthetische Stoffe hergestellt werden, die genau in diese Tasche passen.

[0024] Wegen der häufig anzutreffenden Redundanz in der Natur ist davon auszugehen, daß die Bindungsdomäne für Hck auch in anderen Molekülen vorkommt, mit denen Hck interagiert. Weiterhin ermöglicht die in der vorliegenden Erfindung beschriebene Aminosäuresequenz das Screening nach neuen, bisher unbekannten Bindungspartnern von Hck. Hck gehört zur Familie der Src-Kinasen. Diese Familie umfaßt nach derzeitigem Kenntnisstand 9 Kinasen mit hoher Homologie, die alle potentielle oder bereits identifizierte Proto-Oncogene darstellen, die mit hoher Wahrscheinlichkeit an der Entstehung zahlreicher Krebsarten beteiligt sind. Ausgehend von der erfindungsgemäß beschriebenen Bindungsdomäne kann nach derartig neuen, bisher nicht beschriebenen Bindungspartnern von Hck gesucht werden.

[0025] Die Erfindung wird nachfolgend anhand von Ausführungsbeispielen und von Abbildungen und Tabellen näher beschrieben. Die beiliegenden Abbildungen und Tabellen zeigen:

[0026] Tabelle 1: Schematischer Überblick über gp130-Verkürzungs- und Deletionsmutanten. Mehrere Verkürzungs- und Deletionsmutanten von gp130 wurden als chimäre Rezeptormoleküle, wie im Methodenteil beschrieben, kloniert, wobei die Ziffern für die Aminosäuren von Wildtyp-gp130 stehen. Die Stellen der Tyrosinreste und der "sauren Domänen" ist angegeben. Sämtliche Mutanten sowie Wildtyp-gp130 (Eg) tragen His- und myc-Markierungen zur Expression in Cos-7-Zellen oder His- und V5-Markierungen für Baf-B03-Zellexperimente.

[0027] Tabelle 2: Schaubild interner Deletionen im Hck-bindenden Bereich. Mehrere chimäre gp130-Mutanten mit weiteren Deletionen im Hck-bindenden Bereich (771-827) wurden wie beschrieben konstruiert. Die Zahlen stehen für die Aminosäurepositionen im Wildtyp-gp130. Die Erythropoietin-Rezeptordomäne ist schwarz, gp130 hellgrau und die STAT3-Bindungs-Region bei Tyrosin 814 dunkelgrau gekennzeichnet.

[0028] Tabelle 3: Punktmutationen von gp130. In gp130 wurden mehrere stellenspezifische Mutationen eingebracht. Die drei Tyrosinreste in nächster Nähe zum Hck-bindenden Bereich (771-811) wurden zu Phenylalanin (756, 767 und 814) punktmutiert. Zusätzlich wurde eine doppelte Punktmutante (YY759/767FF) konstruiert. Der DDM-Mutante (doppelte Punkt- und Deletionsmutante) fehlen die Tyrosine 759 und 767 sowie die Aminosäuren 771-827.

[0029] Sämtliche Mutanten sowie Wildtyp-gp130 (Eg) tragen His- und myc-Markierungen zur Expression in Cos-7-Zellen oder His- und V5-Markierungen für Baf-B03-Zellexperimente.

[0030] **Fig.** 1: Selektive Bindung von Hck an gp130. Verschiedene gp130-Mutanten wurden zusammen mit Hck-cDNA in cos-7-Zellen exprimiert. Die Expression rekombinanter Proteine wurde durch Western-Blotting mit spezifischen Antikörpern gegen His-Markierung (A) bzw. Hck (B) untersucht. Die Bin-

dung von Hck an gp130 wurde durch Immunpräzipitation mit Hck-Antikörper und anschließendes Blotten mit His-Markierungs-Antikörper zum Nachweis des copräzipitierten EPOR-gp130-Fusionsproteins untersucht (C). Aliquots der IP-Reaktionen wurden auf ein zusätzliches Gel aufgetragen und mit Hck-Antikörper geblottet, um gleiche Fällung von Hck zu zeigen (D). In Spur 1 von C und D wurde Hck durch Vorinkubieren mit einem spezifischen Blockierungspeptid abgeblockt. Die Molekulargewichtsmarker und die IgG-Banden sind wie angegeben. Der Bereich, der die Hck-bindende Domäne enthält, wurde intern deletiert (Δ771-827), und die Copräzipitation von Hck mit gp130 wurde wie zuvor untersucht (E).

[0031] Fig. 2: Die Deletion von 41 Aminosäuren hemmt die Hck-Bindung. A: Cos-7-Zellen wurden mit cDNAs für Hck und die angegebenen Rezeptormutanten transfiziert. Die Proteinexpression wurde durch Western-Blotting mit Hck und His-Markierungs-Antikörpern untersucht (linkes Feld). Für die Immunpräzipitations-Experimente (rechtes Feld) und die Mutanten beziehen sich Eg und t650 auf Tabelle 1 und **Fig.** 1B: Die interne Deletion der Aminosäuren 771 bis 827 wurde eingeengt, um die STAT3-Bindungsstelle an Tyrosinrest 814 von gp130 auszuschließen. Die Expression von Rezeptormutanten und Hck wurde mit den geeigneten Antikörpern (linkes Feld) untersucht. Als interne Kontrolle wurde ebenfalls Lysat normaler Baf-Zellen (Baf wt) auf diese Gele aufgetragen. Hck-Präzipitate wurden mit α-His-Antikörper geblottet, dann abgestreift und mit Hck-Antikörper geblottet (rechtes Feld). Zur Kontrolle der Präzipitationsexperimente wurde die Hck-Bindung durch Vorinkubieren des Antikörpers mit einem spezifischen Blockierungspeptid blockiert (rechtes Feld, Spur 1). Die Stellen von Hck und die Molekulargewichtsmarker sind wie angegeben.

[0032] Fig. 3: Die Bindung von Hck an gp130 ist von den Tyrosinresten 759, 767 und 814 unabhängig. A: Cos-7-Zellen wurden transfiziert mit cDNAs für Hck und mit cDNAs für: Vollängen-EPOR-gp130-Fusionsprotein (Eg), das punktmutierte Konstrukt Y814F, das Konstrukt mit einer Deletion der Aminosäuren 771 bis 827 (Δ771-827), und die verkürzte Mutante (t650). Die Lysate wurden auf die Expression der rekombinanten Proteine durch Blotten mit α-His- und α-Hck-Antikörper untersucht (linkes Feld). Die Präzipitate von Hck wurden mit α-His-Antikörper geblottet, dann abgestreift und mit α-Hck-Antikörper geblottet (rechtes Feld), zusätzlich wurde Hck durch Vorinkubieren mit einem spezifischen Blockierungspeptid abgeblockt (cp, Spur 1, rechtes Feld). Die Stelle von Hck und die Molekulargewichtsmarker waren wie angegeben. B: Verschiedene mutierte gp130-Moleküle wurden zusammen mit Hck-cDNAs in cos-7-Zellen transfiziert. Die Lysate wurden durch Blotten mit α-His- und α-Hck-Antikörpern (linkes Feld) auf die Expression des rekombinanten Proteins untersucht. Danach wurden Hck-Präzipitate mit α-His-Antikörper geblottet. Zur Bestimmung der Präzipitationseffizienz wurden Aliquots der Präzipitationsreaktion mit α-Hck-Antikörper geblottet (rechtes Feld). Hck wurde durch Vorinkubieren mit einem spezifischen Blockierungspeptid (cp, Spur 1, rechtes Feld) blockiert. Die Stelle von Hck und die Molekulargewichtsmarker waren wie angegeben.

[0033] Fig. 4: Erythropoietin induziert die Tyrosin-Phosphorylierung mehrerer Cytoplasma-Proteine in mit chimärem Rezeptor transfizierten Zellen. Baf-B03-Zellen wurden mit Expressionsvektoren für Hck und für Eg transfiziert. Die Lysate dieser Zellen wurden entweder mit 80E/ml EPO (+) oder nur mit Medium (–) für die angegebenen Zeiten stimuliert. Nach der Auftrennung auf 10% SDS-Page wurde die EPO-induzierte Tyrosin-Phosphorylierung durch Blotten mit Anti-Phosphotyrosin-Antikörper PY 99 untersucht (A). Die Expression von Eg (B) und Hck (C) wurde nach dem Abstreifen und erneutem Blotten mit den entsprechenden Antikörpern untersucht. Die Positionen signifikant phosphorylierter Proteine sind durch Pfeile markiert. Die Molekulargewichtsmarker sind angegeben.

[0034] Fig. 5: Die aktivierende Phosphorylierung von STAT3 wird durch Mutation des Tyrosinrestes 814 oder Deletion der Aminosäuren 771 bis 811 nicht gehemmt. Baf-B03-Zellen wurden mit cDNAs für Hck und Eg, Y814F bzw. Δ771-811 transfiziert. Die Lysate dieser Zellen wurden entweder normal belassen (–) oder mit 8 E/ml EPO stimuliert (+). Die Lysate wurden zum Nachweis der endogenen STAT3-Expression durch Blotten mit α-STAT3-Antikörper (A), zum Nachweis der Rezeptorkonstrukte (B) mit V5-Antikörper und zum Nachweis von Hck mit α-Hck-Antikörper (C) untersucht. Anschließend wurden Lysate für Präzipitationsexperimente mit α-STAT3-Antikörper verwendet (rechtes Feld). Für die Kontrolle der STAT3-Präzipitation wurden Aliquote der IP-Reaktionen mit α-STAT3-Antikörper inkubiert (D), die Spezifität des STAT3-Antiserums wurde durch Vorinkubation von α-STAT3 mit einem spezifischen Blockierungspeptid untersucht (D, Spur 7). Zur Überprüfung der STAT3-Phosphorylierung wurde die Membran E mit dem Anti-Phosphotyrosin-Antikörper PY 99 geblottet, dann abgestreift und mit einem Antikörper gegen Serin (727)-phosphoryliertes STAT3 geblottet (F).

[0035] Fig. 6: Die Deletion der Hck-Bindungsstelle führt zu einem erheblichen Verlust der EPO-induzierten Proliferation. Klonal hergeleitete Baf-B03-Zellen wurden für Proliferationstests verwendet. Zellen, die Eg (♦), d771-811 (∎) oder die Expressionsvektoren allein (▲) exprimieren, wurden in 96-Loch-Platten gezüchtet. 3×10^5 Zellen pro Loch wurden mit den angegebenen Konzentrationen von EPO (A) bzw. IL-3 (B) 48 Std. stimuliert. Für die letzten sechs Std. wurden Dreifach-Proben mit ^{3}H-Thymidin markiert. Nach

osmotischer Zell-Lyse wurde die eingebaute Radioaktivität mit einem β-Szintillationszählgerät bestimmt. Die Mittelwerte der relativen Zählimpulse von drei unterschiedlichen Klonen wurden verwendet, wobei die Standard-Abweichung wie angegeben ist.

[0036] **Fig.** 7: Inhibierung der IL-6 Signaltransduktion

[0037] **Fig.** 8: Sequenz der in gp130 deletierten Sequenz

[0038] Zur Identifizierung der gp130-bindenden Domäne für Hck wurden mehrere gp130-Mutanten konstruiert. Diese Mutanten beruhten auf einem chimären Rezeptor, der den extrazellulären Teil des Erythropoietin-Rezeptors (EPOR) und den intrazellulären Teil des menschlichen gp130 umfasste [Hemmann U., 1996]. Diese EPOR/gp130-Chimären ermöglichten die Untersuchung der Aktivierung von gp130 durch Erythropoietin (EPO) nach der Transfektion eines einzelnen Moleküls. Durch genetische Modifikation dieser chimären Rezeptor-Konstrukte identifizierten wir einen 41 Aminosäuren langen Bereich (AS 771-811), der sich C-terminal des Box3-Motivs von gp130 befand und für die Hck-Bindung notwendig war. Der Bereich enthält viele negativ geladene Aminosäuren und wurde daher als "saure Domäne" bezeichnet. Die interne Deletion dieser sauren Domäne reduziert unerwarteterweise erheblich die gp130-induzierte Proliferation. Die Ergebnisse zeigen erstmals, dass die Aktivierung einer Src-Kinase, Hck, durch eine saure gp130-Domäne vermittelt wird, die für die Weiterleitung der Proliferationssignale wichtig ist.

MATERIALIEN UND METHODEN

Reagentien

[0039] Gereinigtes rekombinantes Maus-Erythropoietin (rmEPO) wurde von Boehringer (Mannheim, Deutschland) bezogen, und gereinigtes Maus-Interleukin-3 (rm IL-3) wurde von Biosource International (Nivelles, Belgien) erhalten. Sämtliche Reagenzien für Zell-Lyse, Protein-Extraktion, Nadriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) und Immunoblotting wurden von Sigma (München, Deutschland) oder Bio-Rad (München, Deutschland) bezogen. Protein-A-Sepharose wurde von Pharmacia Biotech (Freiburg, Deutschland) erhalten. Die gereinigten monoklonalen Antikörper aus Maus, anti-His (C-term.) und anti-V5 wurden von Invitrogen (Leek, Niederlande) bezogen. Der polyklonale Kaninchen-Antikörper N-30 (anti-Hck), der Antikörper C-20 (anti-STAT3), der Antiphosphotyrosin-Antikörper PY99 und das spezifische Blockierungspeptid, das die Aminosäuren 8-37 von Hck darstellt, wurden von Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA) erhalten. Der spezifische Antikörper gegen serinphosphoryliertes STAT3 wurde von NEW England Biolabs (Schwalbach, Deutschland) bezogen. ^{3}H-Thymidin wurde von Amersham (Braunschweig, Deutschland) bezogen. Die Zellkulturmedien und Seren wurden von BioWitthaker (Verviers, Belgien) und Gibco (Paisley, GB) erhalten. Das Wildtyp-Erythropoietin-Rezeptor-gp130-(Eg)-Fusionsprotein wurde uns freundlicherweise von Friedemann Horn (Universität Leipzig, Deutschland) zur Verfügung gestellt. Sämtliche Enzyme für die Klonierungsverfahren und das liposomale Transfektionsreagens DOTAP wurden von Boehringer (Boehringer Mannheim, Deutschland) bezogen. Die Säugetier-Expressionsvektoren pcDNA3, pcDNA3.1(–)/myc-His, pcDNA6/V5-His und das Selektionsreagens Blasticidin wurden von Invitrogen (Leek, Niederlande) bezogen. Der Expressionsvektor pApuro wurde von Seth Corey (Pittsburgh, PA) zur Verfügung gestellt. Das Selektionsreagens Puromycin wurde von Sigma (München, Deutschland) zur Verfügung gestellt.

Klonierung von Eg und Mutanten

Klonierung von Eg

[0040] Der chimäre Rezeptor (Eg) wurde durch Klonieren der extrazellulären Domäne des Maus-Erythropoietinrezeptors an die cytoplasmatische Domäne des menschlichen gp130 unter Verwendung einer eingebrachten EcoRI-Stelle, wie an anderer Stelle beschrieben [Hemmann U., 1996], konstruiert. Dieses Konstrukt wurde dann in pcDNA3.1/myc-His unter Verwendung eingebrachter XbaI- und BamHI-Stellen und Standard PCR-Verfahren kloniert.

Verkürzungsmutationen

[0041] Die C-terminalen Verkürzungsmutanten t828, t770, t722, t702, t685 und t650 (die Zahlen stehen für die Aminosäurepositionen des menschlichen Wildtyp-gp130) wurden durch Verwendung des Vollängen-Fusionsproteins (Eg), das in pcDNA3.1/myc-His kloniert war, als Matrize in einem Einschritt-PCR-Protokoll konstruiert. Ein universeller Sense-Primer, der eine integrierte XbaI-Stelle und eine Kozak-Signalsequenz (5'-gggccctctagaccagccatggacaaactc-3') enthielt, und die nachstehenden verkürzungsspezifischen Antisense-Primer, die eine integrierte BamHI-Stelle enthielten, wurden verwendet: t828a: atctggggatccttcatgctgactgcagttctg, t770a: gacttggactgaggatccttggtgtctgta, t722a: actgctggatccttcagtattaatttttc, t702a: ttctggggatccctttttgtcatttgcttctat, t685a: ggcaatatgactggatccaggatctggaac, t650a: atctggaacattaggggatccgtgtttttttaattag,

Deletionsmutanten

[0042] Die Deletionsmutanten Δ681-721, Δ771-827, Δ771-811, Δ820-827, Δ812-827, und Δ812-819 wurden mit Eg als Matrize in einem Zwei-

schritt-PCR-Protokoll hergestellt. Im ersten Schritt wurden die Deletionen durch interne, partiell komplementäre Primer (Δ681-721s: cacaattttaattcaaaaggacacagcagtggtatt, Δ681-721a: aataccactgctgtgtccttttgaattaaaattgtg, Δ771-827s: agtggctacagacaccaaatttcacattttgaaagg, Δ771-827a: cctttcaaaatgtgaaatttggtgtctgtagccact, Δ771-811s: agtggctacagacaccaacaacagtacttcaaacag, Δ771-811a: ctgtttgaagtactgttgttggtgtctgtagccact, Δ820-827s: tacttcaaacagaactgcatttcacattttgaaagg, Δ820-827a: cctttcaaaatgtgaaatgcagttctgtttgaagta, Δ812-827s: gatggtattttgcccaggagtcagcatgaatccagt, Δ812-827a: actggattcatgctgactcctgggcaaaataccatc, Δ812-819s: gatggtattttgcccaggagtcagcatgaatccagt, Δ812-819a: actggattcatgctgactcctgggcaaaataccatc) und zwei endständigen Primern, die 5' (Ecosfp: ctgaccgctagcgaattcacttttactacc) und 3' von gp130 binden (Bamafp: ggtaccgagctcggatccctgaggcatgtagcc) vervollständigt. Die beiden entsprechenden PCR-Produkte wurden im zweiten Schritt durch Verwendung von Ecosfp und Bamafp zur Vervollständigung der internen deletierten EcoRI-BamHI-Fragmente hybridisiert. Diese Fragmente wurden an EcoRI-BamHI-geschnittenes Eg, welches in pcDNA3.1(–)/myc-His insertert war, ligiert.

Punktmutationen

[0043] Die Punktmutationen Y759F, Y767F, Y814F, Y905F, und Y915F wurden durch ein Zweischritt-PCR-Protokoll wie vorstehend beschrieben konstruiert, wobei spezifische interne Oligonukleotide, die die gewünschte Mutation enthalten, verwendet wurden. Die YY759/767FF-Mutante wurde mit Y767F als Matrize in einer PCR-Reaktion mit Primern, die die Y759F-Mutation enthielten, kloniert. Die DDM-Mutante wurde durch Verwendung der YY759/767FF-Mutante als Matrize in einer PCR mit Δ771-827s and Δ771-827a-Primern hergestellt.

Vektoren für die stabile Transfektion in Baf-B03 Zellen

[0044] Für die stabile Transfektion von Rezeptormutanten in Baf-B03-Zellen wurden diese DNAs unter Verwendung der Restriktionsenzyme XbaI und ApaI in den DNA6/V5-His-Vektor kloniert.

Konstruktion von pDpuro-Hck

[0045] Der Transfektionsvektor pDpuro wurde durch Fusion des Promotorbereichs und der Mehrfach-Klonierungsstelle von pcDNA3 in das pApuro-Gerüst konstruiert. Dies erfolgte gemäß einem Zweischritt-Ligationsprotokoll durch Verwendung der NcoI- und PvuI-Restriktionsstellen. Hck-cDNA wurde von der ATCC erhalten und in diesen Vektor in die EcoRI-Stelle kloniert.

Zellen, Zellkultur und Transfektion

[0046] Cos-7-Zellen wurden von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkultur (DSM, Braunschweig, Deutschland) erhalten. Die IL-3-abhängige pro-B-Zell-Linie aus Maus, Baf-B03, wurde freundlicherweise von Dr. Mark Showers (Dana Faber Krebsinstitut) zur Verfügung gestellt. Cos-7-Zellen wurden routinemäßig in Dulbeccos modifiziertem Eagles-Medium (DMEM), das mit 10% FCS und L-Glutamin angereichert war, gezüchtet. Baf-B03-Zellen wurden in RPMI-1640, das mit 10% FCS und 10% WEHI-3B-Zellen-konditioniertem Medium als Quelle für Maus-IL-3 angereichert war, gezüchtet.

[0047] Cos-7-Zellen wurden transient transfiziert, indem das liposomale Transfektionsmittel DOTAP gemäß dem Hersteller-Protokoll und wie beschrieben [Warmuth M., 1997 #22] verwendet wurde. Für transiente Cotransfektion wurden 50 µg Fusionsrezeptor-DNA und 25 µg Hck-DNA (kloniert in pcDNA3-Expressionsvektor) verwendet. Baf-B03-Zellen wurden durch Elektroporation stabil transfiziert, wobei 1×10^7 Zellen und 20 µg DNA der Rezeptorkonstrukte verwendet wurden. Die Zellen wurden in 800 µl PBS ohne Calcium und Magnesium (BioWitthaker, Verviers, Belgien) resuspendiert, und mit einem Impuls von 350V und 950 µF elektroporiert. Die Selektion der transfizierten Zellen wurde 48 Std. später begonnen, indem 8 µg/ml Blasticidin verwendet wurde. Nach 10 Tagen wurden Einzelklone positiv transfizierter Zellen durch limitierte Verdünnung erhalten. Hochexprimierende Einzelklone wurden mit Hck-cDNA (kloniert in pDpuro-Hck-Expressionsvektor) wie vorstehend beschrieben elektroporiert. Die Selektion doppelt transfizierter Zellen wurde 48 Std. später durch 5 µg/ml Puromycin und 8 µg/ml Blasticidin begonnen. Die Zellen wurden gewöhnlich bis zu drei Tagen vor der Stimulation und Lyse unter Selektion gezüchtet. Mindestens drei ähnliche exprimierende Klone pro Mutante wurden für die Experimente gezüchtet.

Herstellung der Zell-Lysate

[0048] Vor allen Experimenten wurden die Zellen durch Serummangel 16 bis 20 Std. gehungert. Cos-7-Zellen und Baf-B03-Zellen wurden mit einem Lysepuffer, der 0,5% NP40, 1 mM EDTA, 150 mM NaCl, 1mM NaF, 50 mM Tris, pH-Wert 7,4, 10% Glycerin, 1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid, 10 µg/ml Leupeptin, 10 µg/ml Aprotinin und 2 mM Natriumorthovanadat enthielt, lysiert. Kurz gesagt wurden pelletierte Baf-B03-Zellen aus einer 150-ml-Suspension (etwa 7×10^7 Zellen) zweimal mit PBS gewaschen. Das Pellet wurde zur Stimulation in 10 ml PBS resuspendiert und mit 8 E/ml EPO unter leichtem Schütteln 10 min bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 40 ml eiskaltem Lyse-PBS gestoppt.

Nach einem zusätzlichen Waschschritt wurde das Pellet mit 1,5 ml eiskaltem Lysepuffer resuspendiert. Die Cos-7-Zellen wurden nach dem Hungern vom Boden der konfluenten 175 cm^2-Gewebekolben abgeschabt, einmal mit PBS gewaschen und in 1,2 ml eiskaltem Lysepuffer resuspendiert.

[0049] Nach 25minütiger Rotation in einem Überkopfrotor bei 4°C wurden die Lysate bei 14000 U/min und 4°C für 15 min sedimentiert, um unlösliches Material zu beseitigen. Die Gesamtproteinkonzentration wurde durch Verwendung eines Bradford-Protein-Assays (BioRad) gemessen. Die Lysate wurden bei –20°C aufbewahrt oder sofort für Experimente verwendet.

Immunpräzipitation und Western-Blot

[0050] Für die Immunpräzipitation (IP) wurden 500 µg cos-7-Zell-Lysat oder 800 µg Baf-B03-Zell-Lysat mit 2 µg der geeigneten Antikörper 2 bis 18 Std. bei 4°C auf einem Rotationsschüttler inkubiert. 100 µl Protein-A-Perlen wurden zweimal in IP-Waschpuffer (0,1 % NP40, 1 mM EDTA, 150 mM NaCl, 1 mM NaF, 50 mM Tris, pH-Wert 7,4) gewaschen und dann in 50 µl IP-Waschpuffer resuspendiert. 100 µl dieses Gemisches wurden zu jeder IP-Reaktion gegeben. Nach einer zusätzlichen Inkubation für 2 Std. bei 4°C wurden die Präzipitate viermal in 500 µl IP-Waschpuffer gewaschen. Nach dem Kochen in 4x-Probenpuffer, wurden die Präzipitate sedimentiert, und die Überstände wurden auf 10%ige SDS-Gele geladen. Die Peptid-Blockierungsexperimente für Hck-Kinase und STAT3 wurden mit den spezifischen Blockierungspeptiden (Santa Cruz) gemäß dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Für normale Expressionskontrollen rekombinanter Proteine wurde Lysat, das 100 µg Proteine enthielt, einer Elektrophorese unterworfen.

[0051] Nach dem Übertragen der Proteine auf Hybond-ECL-Nitrocellulosemembranen (Amersham, Braunschweig) wurden die Membranen 2 Std. in TBST (trisgepufferter Salzlösung mit 0,05% Tween 20), die 2% Magermilch (Merck, Darmstadt, Deutschland) enthielt, blockiert. Nach einem einminütigen Waschschritt in TBST wurden die in TBST/1% BSA verdünnten (1:1000) Primärantikörper 2 Std. über Nacht inkubiert. Die Membranen wurden viermal mit TBST gewaschen, und dann wurde der geeignete peroxidasegebundene Sekundärantikörper, (1:3000) in TBST/1% BSA verdünnt, 35 min inkubiert. Nach einem endgültigen Waschschritt wurden die Proteine durch Verwendung des ECL-Systems oder ECL-Plus-Systems von Amersham gemäß den Hersteller-Angaben nachgewiesen.

Proliferationstests

[0052] Die Proliferationstests wurden in 96-Lochplatten mit 5×10^3 Baf-B03-Zellen pro Loch durchgeführt. Für sämtliche Experimente wurden die Zellen zweimal mit PBS gewaschen und in RPMI-Medium, angereichert nur mit 10% FCS, resuspendiert. Dreifach-Aliquots der monoklonalen Zellen, die rekombinante Proteine exprimieren, wurden mit den angegebenen Konzentrationen an EPO oder IL-3 stimuliert. Anschließend wurden die Platten 48 Std. bei 37°C inkubiert und mit 0,5 µCi ^{3}H-Thymidin pro Loch für 6 Std. gepulst. Nach Einfrieren für mindestens 2 Std. bei –20°C wurden die Zellen geerntet, und der ^{3}H-Thymidin-Einbau wurde mit einem automatischen β-Zählgerät (Wallac Turku, Finnland) gemessen.

Ergebnisse

Selektive Bindung von Hck an gp130

[0053] Kinasen der Src-Familie, Fyn, Lyn und Hck, sind in MM- und embryonalen Stamm-(ES)-Zellen physikalisch mit gp130 verbunden [Hallek M., 1997; Ernst M., 1994]. Die Strukturanforderungen für diese Komplexbildung blieben jedoch unklar. Erfindungsgemäß wurde die mögliche Bindung von Hck an gp130 untersucht. Zur Identifizierung der gp130-bindenden Domäne für Hck erzeugten wir mehrere Verkürzungs- und Deletionsmutanten von gp130 (Tabelle 1). Für diesen Zweck verwendeten wir einen chimären Rezeptor, der die extrazelluläre Domäne des Erythropoietinrezeptors (EPOR) und die transmembranen und intrazellulären Teile von gp130 (Eg) umfasste. Diese Strategie erlaubte uns, nur ein einzelnes chimäres Rezeptormolekül zu transfizieren, da der EPOR als Homodimer funktionell ist. Wenn EPOR-negative Zellen verwendet wurden, konnten die Auswirkungen endogen exprimierter IL-6R-Komponenten ausgeschlossen werden, da die Aktivierung des chimären Rezeptors durch Stimulation mit EPO erzielt wird. Zur Erleichterung des Nachweises des chimären Rezeptors wurden sämtliche Rezeptormutanten mit Poly-His-Peptid markiert, was den Nachweis durch den Anti-Histidin-Antikörper, anti-His-C-term., ermöglichte. Diese Mutanten wurden zusammen mit einem Wildtyp-Hck-Expressionsplasmid, pcDNA3-Hck, in cos-7-Zellen, die EpoR endogen nicht exprimieren, transfiziert. Eine ähnlich Proteinexpression der verschiedenen Rezeptormutanten und von Hck wurde erhalten (**Fig.** 1A und B, linkes Feld). Die Doppel- oder Dreifachbanden der unterschiedlichen Rezeptormutanten (**Fig.** 1A) konnten am ehesten durch unterschiedliche Glycosylierung erklärt werden; jedoch schien nur eine dieser Formen mit Hck cozupräzipitieren (**Fig.** 1C). Lysate doppelt transfizierter Cos-7-Zellen wurden dann für Copräzipitationsexperimente verwendet, in denen anti-Hck-Präzipitate durch SDS-PAGE aufgelöst und dann mit anti-His-Antikörper einem Immunblotting unterzogen wurden, um Komplexe von Rezeptormutanten mit Hck nachzuweisen (**Fig.** 1C). Aliquots der IP-Reaktionen wurden auf ein zusätzliches Gel auf-

getragen und mit dem Hck-Antikörper (N-30) geblottet, um zu verifizieren, dass ähnliche Mengen Hck präzipitiert wurden (**Fig.** 1D). Zur Bestimmung der Spezifität des präzipitierenden anti-Hck-Antikörpers, wurden ebenfalls Blockierungsexperimente mit einem spezifischen Blockierungspeptid (siehe Methoden) durchgeführt, die zeigen, dass die Präzipitierung von Hck vollständig durch das Peptid blockiert war (**Fig.** 1C, D, Spuren 1). Die C-terminale Verkürzung an Aminosäure 770 (Mutante t770) bewirkte einen erheblichen Verlust an Hck-Bindung (**Fig.** 1C, Spur 5). Die Hck-Bindung blieb dagegen unbeeinflußt, wenn weitere C-terminale Verkürzungen von gp130 verwendet wurden (Mutante t828; **Fig.** 1C, Spur 4). Dies ließ vermuten, dass sich eine mutmaßliche Hck-Bindungsdomäne zwischen den Aminosäuren 770 und 828 von gp130 befand. Wenn das Experiment in der entgegengesetzten Richtung durchgeführt wurde, d.h. mit anti-His-IP, gefolgt von anti-Hck-Immunblotting, band eine Hck-Fraktion dauerhaft unspezifisch an die Protein-A-Perlen, so dass eine quantitative Analyse unmöglich war.

Ein C-terminaler Bereich von gp130 ist zur Hck-Bindung notwendig

[0054] Der durch die vorstehenden Experimente vermutete Bindungsbereich für Hck enthielt unerwarteterweise keine der Homologie-Boxen (Tabelle 1), die bei mehreren verschiedenen Wachstumsfaktorrezeptoren vorkommen und von denen gezeigt wurde, dass sie wichtige Andockbereiche für Signalübertragungsproteine sind [Lai C. F., 1995] [Narazaki M., 1994; Murakami M., 1991; Tanner J. W., 1995; Adachi T., 1999; Rao P., 1995]. Ein auffälliges Merkmal des gp130-Bereichs von Aminosäure 770 bis 828 war ein bemerkenswert hoher Gehalt an negativ geladenen Aminosäuren. Der Hck-bindende Bereich 770 bis 828 von gp130 wurde deshalb als "saure Domäne" bezeichnet. Schließlich durchmusterten wir zur Auffindung weiterer potentieller Hck-Bindungsmotive andere Bereiche mit einem hohen Anteil an negativ geladenen Aminosäuren innerhalb des Bereichs von Aminosäure 770 bis 828. Es wurden zwei solcher Domänen entdeckt, eine war der Bereich zwischen den Aminosäuren 771 und 827; die andere war zwischen den Aminosäuren 681 und 721 lokalisiert. Zur Bestimmung, welche Rolle diese beiden "sauren Domänen" für die Hck-Bindung spielen, wurden ebenfalls zusätzliche Eg-Mutanten mit internen Deletionen in diesen Bereichen konstruiert (Tabelle 1). Bei Verwendung dieser Mutanten zur Bestimmung der Bindung von Hck an gp130 beobachteten wir, dass die Hck/gp130-Bindung durch die interne Deletion der Aminosäuren 681 bis 721 (Δ681-721) (**Fig.** 1C, Spur 3) nicht verändert wurde, wohingegen die interne Deletion der Reste 771 bis 827 (Δ771-827) eine >90%ige Abnahme der Hck-Copräzipitierung mit gp130 in Cos-7-Zellen (**Fig.** 2A, Spur 3, oberes rechtes Feld) ergab. Wiederum zeigten die Kontrollen eine ähnliche Expression der Rezeptormutanten und von Hck (linkes Feld), sowie eine ähnlich Präzipitation von Hck aus Lysaten von doppelt transfizierten Cos-7-Zellen (unteres rechtes Feld). Als negative Kontrolle für die Hck-Bindung wurde ebenfalls die Mutante t650, die nur 8 Aminosäuren der intrazellulären Domäne von gp130 trug, verwendet, und zeigte keine Bindung an Hck (**Fig.** 1C, Spur 9; 2A, oberes rechtes Feld).

Hck bindet gp130 über eine saure Domäne von 41 Aminosäuren und unabhängig von den Tyrosinresten 759, 767 und 814

[0055] Zur genaueren Bestimmung der Hck-Bindungsdomäne konstruierten wir Mutanten mit kleineren Deletionen (Tabelle 2). Wir waren vor allem daran interessiert, dass zwei gut charakterisierte Protein-Bindungsmotive, die Tyrosinreste 814 und 767 (Y814 und Y767), die in der mutmaßlichen Hck-bindenden Domäne oder daneben lagen und von denen gezeigt wurde, dass sie die Andockstellen für STAT3 sind [Gerhartz C., 1996; Hemmann U., 1996], die Hck-Bindung störten. Die Deletionen umfassten entweder Y814 (Δ812-827, und Δ812-819) oder waren entweder N-terminal (Δ771-811) oder C-terminal (Δ820-827) davon lokalisiert. Die Konstrukte wurden wiederum zusammen mit einem Hck-Expressionsplasmid (pDpuroHck) in Cos-7-Zellen (**Fig.** 2B, linkes Feld) exprimiert. Die Kontrollen wurden wie angegeben durchgeführt. Die Lysate nicht-transfizierter Cos-7-Zellen wurden zudem aufgetragen (linkes Feld, Spur 1), um die Expression von transfizierter Hck- und mutierten Rezeptor-cDNAs zu überwachen. Aus diesen Zell-Lysaten wurden anti-Hck-Präzipitate zum Nachweisen von gp130-Hck-Komplexen mit Anti-His-Antikörper geblottet. Wie in **Fig.** 2B (oberes rechtes Feld, Spur 3) gezeigt, ergab die interne Deletion der Aminosäuren 771-827 (Δ771-827) einen 90%igen Verlust an mit Hck copräzipitierendem gp130, und eine vollständige Disruption der Hck-Bindung an gp130 erfolgte mit der Mutante Δ771-811 (**Fig.** 2B, Spur 4). Im deutlichen Gegensatz dazu war die Hck-Bindung an die Mutanten Δ812-827 und Δ812-819 ähnlich zum Wildtyp-gp130 (Spuren 6 and 7). Diese Ergebnisse legten nahe, dass die Bildung des Hck-gp130-Komplexes unabhängig von der STAT3-Bindung an Y814 erfolgte und dass Hck an einer sauren Domäne an gp130 bindet.

[0056] Diese Domäne befindet sich zwischen dem Box-3-Motiv, das die Andockstellen für SHP-2 (Y^{759}XXV) [Stahl N., 1995 #83] und STAT3 (Y^{767}XXQ, sowie ein weiteres STAT3-Bindungsmotiv, Y^{814}XXQ, enthält. Um auszuschließen, dass diese Bindungsstellen an der Wechselwirkung des gp130 mit Hck teilnehmen, führten wir spezifische Tyrosin-zu-Phenylalaninmutationen in diese Tyrosinreste ein. Wiederum wurden verschiedene Mutanten (Tabelle 3) in Cos-7-Zellen transfiziert und in Coimmunpräzipitati-

onsexperimenten verwendet, die wie vorstehend durchgeführt wurden. Die Mutation von Y814 in Phenylalanin ergab keine signifikante Änderung bei der Hck-gp130-Komplexbildung gegenüber dem Wildtyp-gp130 (**Fig.** 3A, oberes rechtes Feld, Spuren 2 und 3). Dieses Ergebnis bestätigte die Schlussfolgerung, dass die Hck-Bindung unabhängig von Y814 und der STAT3-Bindung an diesen Rest war. Die **Fig.** 3A zeigt Ergebnisse mit einzelnen Punktmutationen bei essentiellen Resten (Y759F, Y767F), einer doppelten Punktmutation (YY759/767FF) und einer dreifachen Mutante, die Y759F, Y767F und Δ771-827 (DDM) enthielt. Weder die einzelnen noch die doppelten Punktmutationen ergaben ein anderes Copräzipitationsmuster gegenüber Wildtyp-gp130 (oberes rechtes Feld, Spuren 2-5). Die DDM-Mutante (Spur 7) zeigte zudem die gleiche Reduktion der Hck-Bindung an gp130 (>90%) wie die einzelne Δ771-827-Mutante (Spur 6). Diese Ergebnisse zeigen zusammengefasst, dass die Wechselwirkung von Hck mit gp130 nicht über die bekannten STAT3- oder SHP2-Andockstellen (Y759, Y767 oder Y814) vermittelt wurde.

Die Eg-Stimulation induziert die Tyrosin-Phosphorylierung verschiedener Cytoplasmaproteine in der wachstumsfaktorabhängigen Zell-Linie Baf-B03

[0057] Zur Untersuchung der funktionellen Effekte der Bindung von Hck an gp130 etablierten wir stabile Transfektanten von gp130-Mutanten mit der wachstumsfaktorabhängigen pro-B-Zell-Linie Baf-B03 (siehe Methoden). Die Funktionalität des Eg-Rezeptors in diesen Zellen wurde durch Untersuchen der Tyrosin-Phosphorylierung cytosolischer Proteine in Reaktion auf die EPO-Stimulation getestet. Zu diesem Zweck wurden Baf-B03-Zellen entweder mit 80E/ml EPO oder mit Medium stimuliert und anschließend mit anti-Phosphotyrosin-Antikörper PY-99 geblottet, um tyrosinphosphorylierte Proteine nachzuweisen. Wie in **Fig.** 4A gezeigt, induzierte EPO einen Anstieg der Tyrosin-Phosphorylierung verschiedener cytosolischer Proteine in Eg/Hck-transfizierten Baf-B03-Zellen. Die apparenten Molekulargewichte für die am stärksten tyrosinphosphorylierten Proteine waren: 130 kD, 120 kD, 90 kD, 75 kD, 60 kD, 58 kD, and 50 kD. Dieses Ergebnis zeigte, dass der chimäre EPO/gp130-Rezeptor bei der Aktivierung von Tyrosinkinasen über gp130 in Reaktion auf EPO funktionell war.

Die Gesamt-Serin- und Tyrosin-Phosphoylierung von STATt3 wird durch Mutation von Y814 oder Deletion der Aminosäuren 771 bis 817 von gp130 nicht reduziert.

[0058] Da die Aminosäuren 771-811, die mutmaßliche Hck-bindende Domäne, in direkter Nachbarschaft zu den Tyrosinresten 767 und 814, die die STAT3-Andockstellen sind, liegen, wollten wir untersuchen, ob ihre Deletion zu einer Veränderung der STAT3-Aktivierung führte. Es wurde früher gezeigt, dass eine vollständige Aktivierung von STAT3 die Phosphorylierung am Tyrosinrest 705 und am Serinrest 727 erfordert [Wen Z., 1995; Zhang X., 1995]. Zur Untersuchung des Phosphorylierungsstatus von STAT3 in gp130-stimulierten Zellen verwendeten wir die vorstehend erwähnten Baf-B03-Transfektanten, die durch EPO stimuliert wurden. Endogenes STAT3 wurde aus normalen und EPO-stimulierten transfizierten Zell-Linien gefällt (**Fig.** 6E). Anschließend wurden die Immunpräzipitate mit dem Anti-Phosphotyrosin-Antikörper PY99 und dem Antikörper, der spezifisch für an Serin 727 phosphoryliertes STAT3 ist, geblottet. Die **Fig.** 5A, B und C zeigen, dass die Baf-B03-Transfektanten endogenes STAT3 (A) sowie die transfizierten Rezeptormutanten (B) und Hck in ähnlichen Mengen exprimierten. Wie in den **Fig.** 5D und 5E gezeigt, führten weder die Deletion der Reste 771 bis 811 (Spuren 3 und 4) noch die Punktmutation von Tyrosin 814 (Spuren 5 und 6) zu signifikanten Änderungen bei der STAT3-Tyrosin- oder Serin-Phosphorylierung gegenüber Zellen, die mit Wildtyp-Eg und Hck transfiziert waren (Spuren 1 und 2). Diese Ergebnisse legten nahe, dass die Deletion der Hck-bindenden Domäne die Gesamt-Aktivierung von STAT3 nicht störte. Die bei der Punktmutante Y814F beobachtete beibehaltene STAT3-Phosphorylierung wurde durch die vorige Beobachtung erklärt, dass STAT3 spezifisch an vier phosphorylierte Tyrosinreste von gp130, nämlich 767, 814, 905 und 915, bindet: Es schien daher wahrscheinlich, dass die restlichen Andockmotive die mutierte 814-Stelle kompensieren konnten. Die Ergebnisse legten zudem nahe, dass die STAT3-Aktivierung unabhängig von der Bindung von Hck an gp130 erfolgte, da die Transfektion der Mutante Δ771-811 keine signifikanten Änderungen der EPO-induzierten STAT3-Phosphorylierung bewirkte.

Die Deletion der Hck-Bindungs-Domäne beeinträchtigt die gp-130-vermittelte Zellproliferation

[0059] Zur Untersuchung der funktionellen Folgen der Hck-gp-130-Bindung verwendeten wir verschiedene Baf-B03-Transfektanten, um Zellproliferationstests durchzuführen. Da die Baf-B03-Zellen für das Zellwachstum von IL-3 abhängen, wurden die Zellen ebenfalls mit diesem Cytokin als Kontrolle stimuliert. Für die Proliferationstests wurden die Baf-B03-Zellen in IL-3-freiem Medium resuspendiert und in 96-Loch-Platten plattiert. Nach zwei Tagen Stimulation mit den angegebenen Mengen EPO oder IL-3 wurde der Einbau von [^{3}H]-markiertem Thymidin gemessen. Wie in **Fig.** 6A gezeigt, führte die Deletion der Hck-bindenden Domäne (Δ771-811) zu einer drei- bis vierfachen Reduktion der EPO-induzierten Proliferation gegenüber den Wildtyp-gp130-transfizierten Zellen. Die Zellen, die gp130/Δ771-811 exprimierten, zeigten jedoch noch einen zweifachen An-

stieg der Zellproliferation in Reaktion auf EPO, was sich durch die Aktivierung der von Hck-Kinase verschiedenen Signalisierungszwischenprodukte erklären lässt. Baf-B03-Zellen, die mit den entsprechenden Expressionsvektoren allein cotransfiziert wurden, proliferierten nicht bei Stimulation mit EPO, was zeigt, dass die Expressionsplasmide keine Auswirkung auf die Zellproliferation hatten. Sämtliche Transfektanten reagierten dagegen auf die IL-3-Stimulation ähnlich (**Fig.** 6B), wodurch die Wahrscheinlichkeit verringert wurde, dass die Evolution spezifischer Zellklone mit einer veränderten Reaktion auf Wachstumsfaktoren die Ergebnisse erklären könnte. Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass die Deletion der Hck-Bindungsdomäne von gp130 die Stärke der Proliferationssignale von gp130 erheblich reduzierte.

LITERATUR

1. Hibi M., Murakami M., Saito M., Hirano T., Taga T., und Kishimoto T.: Molecular Cloning and Expression of an IL-6-Signal Transducer, gp130; CELL, Vol. 63, 1149–1157, December 21, 1990

2. Klein B., Zhang X. G., Lu Z. Y., R. B: Interleukin-6 in human multiple myeloma. Blood 85:863, 1995

3. Hallek M., Leif Bergsagel P, Anderson KC: Multiple myeloma: increasing evidence for a multistep transformation process. Blood 91:3, 1998

4. Klein B., Bataille R.: Cytokine network in human multiple myeloma. Hematol Oncol Clin North Am 6:273, 1992

5. Klein B.: Cytokine, Cytokine Receptors, Transduction Signals, and Oncogenes in Human Multiple Myeloma. Sem. Hem. 32:4, 1995

6. Kawano M., Hirano T., Matsuda T., Taga T., Horii Y., Iwato K., Asaoku H., Tang B., Tanabe O., Tanaka H., et al.: Autocrine generation and requirement of BSF-2/IL-6 for human multiple myelomas. Nature 332:83, 1988

7. Zhang X.G., Klein B., R. B: Interleukin-6 is a Potent Myeloma-Cell Growth Factor in Patients With Agressive Multiple Myeloma. Blood 74:11, 1989

8. Simpson R. J., Hammacher A., Smith D. K., Matthews J. M., D. WL: Interleukin-6: structure-function relationships. Protein Sci 6:929, 1997

9. Somers W., Stahl M., Seehra J. S.: 1.9 A crystal structure of interleukin 6: implications for a novel mode of receptor dimerization and signaling. Embo J 16:989, 1997

10. Ward L. D., Hammacher A., Howlett G. J., Matthews J. M., Fabri L., Moritz R. L., Nice E. C., Weinstock J., Simpson R. J.: Influence of interleukin-6 (IL-6) dimerization on formation of the high affinity hexameric IL-6 receptor complex. J Biol Chem 271:20138, 1996

11. Neumann C., Zehentmaier G., Danhauser-Riedl S., Emmerich B., M. H: Interleukin-6 induces Tyrosine Phosphorylation of the Ras Activating Protein Shc and its Complex Formation with Grb2 in the Human Multiple Myeloma Cell Line LP-1. Eur. J. Immunol. 26:379, 1996

12. Ogata A., Chauhan D., Teoh G., Treon S. P., Urashima M., Schlossman R. L., C. AK: IL-6 triggers cell growth via the Ras-dependent mitogen-activated protein kinase cascade. J Immunol 159:2212, 1997

13. Takahashi-Tezuka M., Yoshida Y., Fukada T., Ohtani T, Yamanaka Y, Nishida K., Nakajima K., Hibi M., T. H: Gabl acts as an adapter molecule linking the cytokine receptor gp130 to ERK mitogen-activated protein kinase. Mol Cell Biol 18:4109, 1998

14. Shi Z. Q., Lu W., Feng G. S.: The Shp-2 tyrosine phosphatase has opposite effects in mediating the activation of extracellular signal-regulated and c-Jun NH2-terminal mitogen-activated protein kinases. J Biol Chem 273:4904, 1998

15. Boulton T. G., Stahl N., D. YG: Ciliary neurotrophic factor/leukemia inhibitory factor/interleukin 6/oncostatin M family of cytokines induces tyrosine phosphorylation of a common set of proteins overlapping those induced by other cytokines and growth factors. J Biol Chem 269:11648, 1994

16. Berger L. C., Hawley T. S., Lust J. A., Goldman S. J., G. HR: Tyrosine phosphorylation of JAK-TYK kinases in malignant plasma cell lines growth-stimulated by interleukins 6 and 11. Biochem Biophys Res Commun 202:596, 1994

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

18. Stahl N., Farugella T.J., Boulton T.G., Ip N.Y., Davis S., Witthuhn B. A., Quelle F.W., Silvennoinen O., Barberi G., Pellegrini S., Ihle J. N., G.D. Y: Association and activation of Jak-Tyk kinases by CNTF-LIF-OSM-IL-6 β receptor components. Science 263, 1994

19. Gerhartz C., Heesel B., Sasse J., Hemmann U., Landgraf C., Schneider-Mergener J., Horn F., Heinrich P.C., L. G: Differential activation of Acute Phase Response Factor/STAT3 and STAT1 via the cytoplasmic domain of the interleukin-6 signal transducer gp130. J. Biol. Chem. 271:12991, 1996

20. Hallek M., Neumann C., Schäffer M., Danhauser-Riedl S., von Bubnoff N., de Vos G., Druker B. J., Yasukawa K., Griffin J. D., Emmerich B: Signal transduction of interleukin-6 involves tyrosine phosphorylation of multiple cytosolic proteins and activation of Src-family kinases Fyn, Hck, and Lyn in multiple myeloma cell lines. Exp Hematol 25:1367, 1997

21. Hemmann U., Gerhartz., Heesel B., Sasse J., Kurapkat G., Grötzinger J., Wollmer A., Zhong Z., Darnell Jr. J.E., Graeve L., Heinrich P.C., F. H: Differential activation of Acute Phase Response Factor/STAT3 and STAT1 via the cytoplasmic domain of the interleukin-6 signal transducer gp130. J. Biol. Chem. 271:12999, 1996

22. Warmuth M., Bergmann M., Prieß A., Häuslmann K., Emmerich B., M. H: The Src Kinase HCK Interacts with Bcr-Abl by a Kinase-independent Mechanism

and Phosphorylates the Grb2-binding Site of Bcr. J. Biol. Chem 272:33260, 1997
23. Ernst M. GDP, and DunnA.R.: Functional and Biochemical Association of Hck with the LIF/IL-6 Receptor Signal Transducing Subunit gp130 in Embryonic Stem Cells. EMBO 13:1574, 1994
24. Lai C. F., Ripperger J., Morella K. K., Wang Y., Gearing D. P., Fey G. H., H. B: Separate signaling mechanisms are involved in the control of STAT protein activation and gene regulation via the interleukin 6 response element by the box 3 motif of gp130. J Biol Chem 270:14847, 1995
25. Narazaki M., Witthuhn B. A., Yoshida K., Silvennoinen O., Yasukawa K., Ihle J. N., Kishimoto T., Taga T.: Activation of JAK2 kinase mediated by the interleukin 6 signal transducer gp130. Proc Natl Acad Sci USA 91:2285, 1994
26. Murakami M., Narazaki M., Hibi M., Yawata H., Yasukawa K., Hamaguchi M., Taga T., T. K: Critical cytoplasmic region of the interleukin 6 signal transducer gp130 is conserved in the cytokine receptor family. Proc Natl Acad Sci USA 88:11349, 1991
27. Tanner J. W., Chen W., Young R. L., Longmore G. D., Shaw A. S.: The conserved box 1 motif of cytokine receptors is required for association with JAK kinases. J Biol Chem 270:6523, 1995
28. Adachi T., Pazdrak K., Stafford S., Alam R.: The mapping of the Lyn kinase binding site of the common beta subunit of IL-3/granulocyte-macrophage colony-stimulating factor/IL-5 receptor. J Immunol 162:1496, 1999
29. Rao P., A. MR: A membrane proximal domain of the human interleukin-3 receptor beta c subunit that signals DNA synthesis in NIH 3T3 cells specifically binds a complex of Src and Janus family tyrosine kinases and phosphatidylinositol 3-kinase. J Biol Chem 270:6886, 1995
30. Stahl N., Farugella T.J., Boulton T.G., Zhong Z., Darnell Jr. J.E., Yancopoulos G.D.: Choice of STATs and other substrates specyfied by modular tyrosine-based motifs in cytokine receptors. Science 267:1349, 1995
31. Wen Z., Thong Z., J.E. DJ: Maximal activation of transcription by Stat1 and Stat3 requires both tyrosine and serine phosphorylation. Cell 82:241, 1995
32. Zhang X., Blenis J., Li H. C., Schindler C., Chen-Kiang S.: Requirement of serine phosphorylation for formation of STAT-promoter complexes. Science 267:1990, 1995

Patentansprüche

1. IL-6 Rezeptor-Protein, welches im Bereich der Beta-Kette eine Deletion des Bereichs der Aminosäuren 771-811 oder von Teilen dieses Bereichs aufweist, so dass die spezifische Bindung der Hck-Tyrosinkinase an gp130 unterbunden wird.

2. Beta-Kette (gp130) des IL-6 Rezeptor-Proteins, welche eine Deletion des Bereichs der Aminosäuren 771-811 oder von Teilen dieses Bereichs aufweist, so dass die spezifische Bindung der Hck-Tyrosinkinase an gp130 unterbunden wird.

3. DNA, kodierend für das IL-6 Rezeptor-Protein nach Anspruch 1 oder die Beta-Kette des IL-6 Rezeptor-Proteins nach Anspruch 2.

4. RNA, erhalten durch Transkription der DNA nach Anspruch 3.

5. Peptid mit den Aminosäuren 771-811 oder Teilen oder Derivaten hiervon ist, die spezifisch die Bindungsstelle von Hck an gp130 blockieren.

6. Peptid nach Anspruch 5 mit der Sequenz STQPL oder SEERPED.

7. Verwendung eines IL-6 Rezeptorproteins nach Anspruch 1, der Beta-Kette des IL-6 Rezeptorproteins nach Anspruch 2 und eines Peptids nach Anspruch 5 oder 6 zur spezifischen Hemmung der Bindung der Hck-Tyrosinkinase an gp130.

8. Verwendung nach Anspruch 7 zur spezifischen Hemmung von IL-6.

9. Verwendung nach Anspruch 7 oder 8 zur Behandlung von Erkrankungen, bei denen die genannte spezifische Hemmung notwendig ist, insbesondere zur Behandlung des multiplen Myeloms.

10. Verwendung eines IL-6 Rezeptorproteins nach Anspruch 1, eines gp130-Proteins nach Anspruch 2, einer DNA nach Anspruch 3, einer RNA nach Anspruch 4 oder eines Peptids nach Anspruch 5 oder 6 zur Herstellung eines Mittels zur spezifischen Hemmung von IL-6, zur Hemmung des proliferativen Wachstums von durch IL-6 in ihrem Wachstum stimulierten Zellen, zur spezifischen Hemmung der Bindung von Hck an gp130 und zur Entwicklung eines Medikaments zur Behandlung des Multiplen Myeloms.

11. Verwendung nach Anspruch 10, wobei als Zellen die Zellen des Multiplen Myeloms gehemmt werden.

12. Verwendung nach Anspruch 10, wobei die Herstellung des Mittels den Einsatz von Screening-Programmen zur Selektion von Molekülen umfasst, die spezifisch die Bindung von Hck an gp130 im Bereich der Aminosäuren 771-811 blockieren.

Es folgt kein Blatt Zeichnungen