

**Induktion verschiedener Aktivitätsmuster  
über differentielle Rezeptor-Rekrutierung  
von Typ I IFN**

Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich  
Biochemische, Chemische und Pharmazeutische Wissenschaften  
der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main

von  
Eva Jaks  
aus Friedrichsdorf/ Taunus

Frankfurt, 2006

Vom Fachbereich Biochemischer, Chemischer und Pharmazeutischer Wissenschaften der Johann Wolfgang Goethe-Universität als Dissertation angenommen.

Dekan:

- |               |                            |
|---------------|----------------------------|
| 1. Gutachter: | Dr. Jacob Piehler          |
| 2. Gutachter: | Prof. Dr. Walter Volknandt |

Datum der Disputation:

---

<b>I</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>6</b>
<b>II</b>	<b>Einführung .....</b>	<b>8</b>
1	Einordnung und Funktion der Typ I Interferone.....	8
1.1	Cytokine und Typ I Interferone.....	8
1.2	Biologische Bedeutung und Funktionen von Interferonen .....	9
1.2.1	Interferon vermittelte Aktivitäten .....	11
1.2.2	Pharmakologische Einsatzmöglichkeiten .....	13
1.3	Unterschiede in der Wirkung von Interferonen .....	14
2	Mechanismus der Signalübertragung über Cytokinrezeptoren.....	16
2.1	Cytokinrezeptoren.....	16
2.2	Signalübertragung über Typ II Cytokinrezeptoren .....	17
2.3	Interaktion von Interferon und Rezeptor .....	18
2.4	Zelladaption durch Interferonaktivierung .....	20
2.5	Aktivierung von Signaltransduktionskaskaden .....	21
2.5.1	Der STAT-Signalweg .....	22
2.5.2	Der Insulin-Rezeptor-Substrat / Phosphoinositol-3-kinase-Weg .....	23
2.5.3	Aktivierung der mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK).....	23
2.5.4	Differentielle Aktivierung von Signalwegen.....	24
3	Struktur und Funktion von Interferonen.....	24
3.1	Primärstruktur der Interferone .....	25
3.2	Raumstruktur der Interferone .....	27
4	Struktur-Wirkungs-Beziehung der Interferone.....	28
5	Zielsetzung .....	33
6	Strategie.....	34
6.1	Expression verschiedener humaner Interferone im heterologen System.....	34
6.1.1	Rekombinante Expression von Interferonen in <i>E. coli</i> .....	34
6.1.2	Rekombinante Expression in Insektenzellen .....	35
6.2	Mutagenese zur Untersuchung der IFN / Rezeptor-Assemblierung.....	36
6.3	Zelluläre Aktivitätsuntersuchungen .....	37
6.4	Immobilisierung von Rezeptoruntereinheiten und Detektionssysteme.....	37
6.5	Ligandenbindung in lebenden Zellen .....	41
<b>III</b>	<b>Materialien .....</b>	<b>43</b>
1	Chemikalien.....	43
2	Enzyme, Reagenzien und Vektoren für molekularbiologische Methoden.....	44
3	Zellkultur.....	45
4	Oligonucleotide.....	45
5	Chromatographiesysteme.....	47
6	Medien .....	47
7	Lösungen / Puffer .....	48

<b>IV</b>	<b>Methoden</b> .....	<b>50</b>
1	Molekularbiologische Methoden .....	50
1.1	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	50
1.2	Konstruktion der Vektoren .....	51
1.3	Transformation in kompetente TG-1-Zellen <i>Escherichia coli</i> ( <i>E. coli</i> ) .....	52
1.4	Plasmid-Isolierung aus <i>E. coli</i> -Zellen .....	53
1.5	Ortsspezifische Mutagenese der Interferone.....	53
2	Expression von Interferonen.....	54
2.1	Expression in <i>Escherichia coli</i> ( <i>E. coli</i> ).....	54
2.2	Expression von Interferonen in <i>Spodoptera frugiper</i> a ( <i>Sf9</i> ).....	55
3	Proteinbiochemische Methoden.....	56
3.1	Solubilisation der Interferone aus <i>E. coli</i> .....	56
3.2	Aufreinigung der renaturierten Interferone aus <i>E. coli</i> .....	57
3.3	Ortspezifische Markierung von Cysteinresten .....	59
4	Zellkultur und Aktivitätsuntersuchungen .....	61
4.1	Stammkultur und Cryostocks von 2fTGH- und HL116-Zellen .....	61
4.2	Aktivitätsuntersuchungen .....	61
4.3	Stammkultur und Transfektion von HeLa-Zellen .....	63
5	Biophysikalische Experimente .....	63
5.1	Durchführung der Bindungsassays mit Rlf und TIRF .....	63
6	Korrelation Affinität und Aktivität .....	67
7	Mikroskopie .....	68
<b>V</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>69</b>
1	Aufreinigung und Fluoreszenzmarkierung von Interferonen.....	69
1.1	Aufreinigung verschiedener Interferone und Mutanten.....	69
1.2	Fluoreszenzmarkierung .....	71
1.3	Biotinylierte Interferone .....	74
2	Assemblierung von Interferon und Rezeptor <i>in vitro</i> .....	75
2.1	Individuelle Interaktion der Interferone mit ifnar2-EC und ifnar1-EC.....	76
2.1.1	Unspezifische Bindung und Stöchiometrie .....	76
2.1.1.1	Unspezifische Bindung.....	76
2.1.1.2	Stöchiometrie .....	77
2.1.2	Interaktion mit ifnar2-EC.....	77
2.1.2.1	Rückbindung und schnelle Kinetik.....	79
2.1.3	Bindungsstelle auf ifnar2-EC.....	81
2.1.4	Interaktion verschiedener Mutanten mit ifnar2-EC.....	83
2.1.5	Interaktion mit ifnar1-EC.....	85
2.1.6	Bindungsstelle auf ifnar1-EC.....	88
2.1.7	Interaktion von Mutanten mit ifnar1-EC .....	89
2.2	Assemblierung ternärer Komplexe .....	92
2.2.1	Stöchiometrie .....	92
2.2.2	Stabilität der Interferonbindung im ternären Komplex.....	94
2.2.3	Stabilität verschiedener Mutanten im ternären Komplex.....	97

---

3	Zelluläre Aktivitätsassays .....	98
3.1	Aktivitätsuntersuchungen verschiedener Interferone.....	99
3.1.1	Assemblierung des ISGF3-Komplexes und antivirale Aktivität .....	99
3.1.2	Antiproliferation .....	101
3.2	Korrelation von Affinität und Aktivität.....	103
3.3	Aktivitätsuntersuchungen mit Mutanten .....	105
3.4	Korrelation von Affinität und Aktivität der Mutanten.....	107
3.5	Stabilität der Ligandenbindung im ternären Komplex und Aktivität.....	109
4	Internalisierung der Rezeptoruntereinheiten .....	113
5	Bindung der Interferone in lebenden Zellen .....	114
5.1	Affinitäts- und Aktivitätsuntersuchungen .....	114
5.1.1	Aktivität der IFN $\alpha$ 2-QDs .....	115
5.1.2	Affinität der IFN $\alpha$ 2-QDs.....	116
5.1.3	Interferonbindung auf Zellen .....	119
<b>VI</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>121</b>
1	Aufreinigung verschiedener Interferone und Mutanten .....	121
2	Charakterisierung der Interferonbindung .....	122
3	Aktivitätsuntersuchungen.....	126
4	Korrelation von Affinität und Aktivität .....	127
<b>VII</b>	<b>Ausblick .....</b>	<b>130</b>
<b>VIII</b>	<b>Abkürzungen .....</b>	<b>132</b>
<b>IX</b>	<b>Literatur .....</b>	<b>135</b>

## I Zusammenfassung

Für die grundlagenorientierte sowie für die medizinische Forschung spielt der Mechanismus der interzellulären Kommunikation über Botenstoffe, wie Cytokine, eine einflussreiche Rolle. Von Bedeutung für das angeborene Immunsystem sind dabei die Typ I Interferone (Interferone, IFN) durch ihre antivirale, immunmodulatorische, antiproliferative und antiinflammatorische Wirkung. Zudem stellen sie eine Verbindung zu der zellulären Immunantwort dar, wirken bei antionkogenen Prozessen mit und aktivieren eine Vielzahl an weiteren Funktionen in der Zelle. Bekannt sind bisher 16 verschiedene humane Interferone (13 IFN $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\epsilon$  und  $\omega$ ), die alle über einen gemeinsamen Rezeptor wirken, der sich aus den Untereinheiten ifnar1 und ifnar2 zusammensetzt. Dabei induzieren verschiedene Interferone unterschiedliche zelluläre Aktivitätsmuster. Eine differentielle Erkennung des gebundenen Interferons muss daher bereits bei der Bindung stattfinden. Bisher bekannt ist, dass das ifnar2 (IFN $\alpha$ 2:  $K_D \sim 5$  nM) die Interferone mit größerer Affinität bindet als das ifnar1 (IFN $\alpha$ 2:  $K_D \sim 5$   $\mu$ M). Ebenfalls konnte eine Interaktion zwischen den Rezeptoruntereinheiten nicht nachgewiesen werden, so dass eine Prä-Assemblierung der Rezeptoren vermutlich nicht vorliegt. Daher wird ein Zwei-Schritt-Mechanismus bei der Assemblierung eines IFN / Rezeptor-Komplexes angenommen.

Ziel dieser Arbeit war es, einen möglichen Zusammenhang zwischen der differentiellen Rezeptor-Rekrutierung verschiedener Interferone und der Induktion verschiedener Aktivitäten zu erkennen. Hierzu wurden die Bindungsaffinitäten verschiedener Interferone individuell an ifnar2, ifnar1 und im ternären Komplex *in vitro* untersucht. Zudem wurden die Stöchiometrie, die Dynamik sowie die Bindungsstelle durch Competition zu den Rezeptoruntereinheiten charakterisiert. Ebenso wurde der Einfluss der Rezeptorkonzentration auf die Stabilisierung der Interferonbindung im Komplex untersucht.

Voraussetzung hierfür war die Aufreinigung verschiedener Interferone (IFN $\alpha$ 1, IFN $\alpha$ 2, IFN $\alpha$ 8, IFN $\alpha$ 21, IFN $\omega$ ), Mutanten sowie Cystein-Mutanten zur selektiven Fluoreszenzmarkierung in ausreichender Menge und Reinheit. Um den Einfluss der Bindungsaffinität auf die Aktivität zu untersuchen, wurden Aminosäuren innerhalb der Bindungsstellen zu den Rezeptoruntereinheiten ausgetauscht. Die Änderung der Bindungsaffinität sowie deren Effekt auf die Aktivität wurden überprüft. Mit Hilfe der Cystein-Mutanten an der Position  $\alpha$ 2S136C /  $\alpha/\omega$ S137C konnte eine ortsspezifische Fluoreszenzmarkierung durchgeführt werden. Diese wurden für Untersuchungen der Bindungsstelle sowie für die Detektion der transienten schnellen Bindung an ifnar1 benötigt.

Die biophysikalischen Untersuchungen wurden mit den extrazellulären Domänen von ifnar1 (ifnar1-EC) und ifnar2 (ifnar2-EC) an Oberflächen durchgeführt, auf denen die Rezeptoruntereinheiten über einen Deka-Histidin-tag immobilisiert wurden. Diese Immobilisierungstechnik wurde mit einer markierungsfreien Detektionstechnik sowie einer Oberflächen-sensitiven Fluoreszenz-Detektion kombiniert. Es konnte nachgewiesen werden, dass die Interferone signifikante Unterschiede in den Bindungsaffinitäten an die Rezeptoruntereinheiten ifnar1 und ifnar2 aufzeigten. Ebenso war ifnar2 gegenüber ifnar1 stets die höher affine Komponente mit deutlichen Affinitätsunterschieden von bis zu  $10^3$  Größenordnungen. Als einziges Unterscheidungsmerkmal konnten daher die unterschiedlichen Bindungsaffinitäten bestimmt werden, die zwischen den Interferonen variierten und Einfluss auf die Aktivitäten nehmen konnten. Stöchiometrie, Bindungsstelle oder Konformationsänderungen durch ifnar1 zeigten keine Unterschiede zwischen den Interferonen.

Zum anderen wurden verschiedene zelluläre Aktivitäten untersucht, die durch die Interferone induziert werden. Hierzu wurden die kurzfristig induzierte Assemblierung des Interferon stimulierten Genfaktors 3 (ISGF3) sowie die antivirale Aktivität gegen vesikuläre Stomatitis Viren (VSV) überprüft. Zudem wurde die langfristig induzierte antiproliferative Aktivität untersucht. Bei den effektiven Konzentrationen ( $EC_{50}$ ) konnten hierbei große Unterschiede zwischen den Aktivitäten beobachtet werden (pM- bis nM-Bereich). Ursache ist eine mögliche Adaption der Zellen gegenüber den Interferonen, welche durch die Regulation der Rezeptoroberflächenkonzentration bewirkt wird. Zugleich variierten die  $EC_{50}$ -Werte zwischen den Interferonen, für die ein Zusammenhang zu den Bindungsaffinitäten zu ifnar1 und ifnar2 gezeigt werden konnte. So wurde für die Induktion der ISGF3-Assemblierung eine Abhängigkeit zu der ifnar2-Affinität nachgewiesen. Bei niedrigen IFN-Konzentrationen wird über die ifnar2-Affinität die Verweildauer der Interferone auf der Oberfläche beeinflusst, wodurch Einfluss auf die Anzahl an ternären Komplexen genommen wird. Die AP Aktivität wird dagegen durch die verminderte Oberflächenkonzentration der Rezeptoren beeinflusst. Um eine ausreichende Anzahl an ternären Komplex zu assemblieren, zeigte sich hierbei eine Abhängigkeit von dem Verhältnis der Bindungsaffinitäten und der Stabilisierung der Interferone im ternären Komplex. Der Einfluss der Affinität auf die Aktivität konnte durch Interferone mit spezifisch veränderten Bindungsaffinitäten bestätigt werden. So wurde durch die Modulierung der Bindungsaffinität spezifisch Einfluss auf das Aktivitätsmuster genommen. In der Medizin könnte dies für eine verbesserte therapeutische Anwendung von Bedeutung sein, da der Einsatz von Interferonen zurzeit durch eine Vielzahl an Nebenwirkungen eingeschränkt ist.

## II Einführung

### 1 Einordnung und Funktion der Typ I Interferone

#### 1.1 Cytokine und Typ I Interferone

Cytokine und Interferone sind Proteine, welche eine Schlüsselrolle im angeborenen Immunsystem durch die Regulation der Immunantwort einnehmen und eine Vielzahl an weiteren zellulären Funktionen im lymphatischen sowie blutbildenden System aufweisen [1-4]. Hierbei sind sie von besonderer Bedeutung für die Entwicklung und die Homöostase des Immunsystems. Die Cytokine werden dabei von Zellen des Immunsystems und andere Zellen exprimiert und ausgeschüttet. Diese üben daraufhin autokrin und parakrin über spezifische Cytokinrezeptoren ihre Funktion aus. Allgemein sind Cytokine beteiligt an der unspezifischen Immunabwehr sowie an der Proliferation, Differenzierung, Zellaktivierung, Gewebereparatur und Apoptose von Zellen. Zudem besitzen Cytokine eine Kontrollfunktion auf das blutbildende System. Ein besonderes Charakteristikum der Cytokine ist die pleiotrophe Wirkung, die besagt, dass die verschiedensten Aktivitäten in unterschiedlichen Zellen aktiviert werden [5, 6]. Zudem weisen verschiedene Cytokine die Fähigkeit auf dieselben Effekte in einer Zelle zu aktivieren, die dann eine akkumulierte zelluläre Antwort auslösen. Diese Fähigkeit wird unter dem Begriff „cytokiner Redundanz“ zusammengefasst.

Zu der Familie der Cytokine gehören neben den Interferonen (IFN), die Familie der Tumornekrosefaktoren (TNF), Interleukine (IL) sowie Kolonien-stimulierenden Faktoren (CSF). Basierend auf Strukturunterschieden wurde eine Einteilung in verschiedene Klassen vorgenommen. Typisch für Klasse I Cytokine und Klasse II Cytokine sind vier  $\alpha$ -Helices, die in einem 4-Helix-Bündel angeordnet sind. Die beiden Klassen werden durch eine zusätzliche fünfte Helix bei den Klasse II Cytokinen unterschieden (Abbildung 1) [7, 8]. Typische Vertreter der Klasse II Cytokine sind dabei die Typ I Interferone. Die Klasse II Cytokine wurden zusätzlich in zwei weitere Subklassen unterteilt. Zu einem in die Klasse derjenigen, die als Monomere agieren (IL-22, IFN $\alpha/\beta/\omega$ ), zum anderen die Klasse derjenigen, die als Homodimere agieren (IL-10, IFN $\gamma$ ). Daneben existieren Klasse III Cytokine, die keine helikalen Strukturen aufweisen, sondern aus mehreren  $\beta$ -Faltblättern aufgebaut sind (z.B. TNF $\alpha/\beta$ ).

Die Interferone wurden bereits 1957 zum ersten Mal von Isaac und Lindenmann [9, 10] beschrieben. Seitdem sind mehr als 15 verschiedene humane Typ I Interferone (künftig als Interferone bezeichnet) bekannt, die alle über einen gemeinsamen Rezeptor ihre Wirkung entfalten.



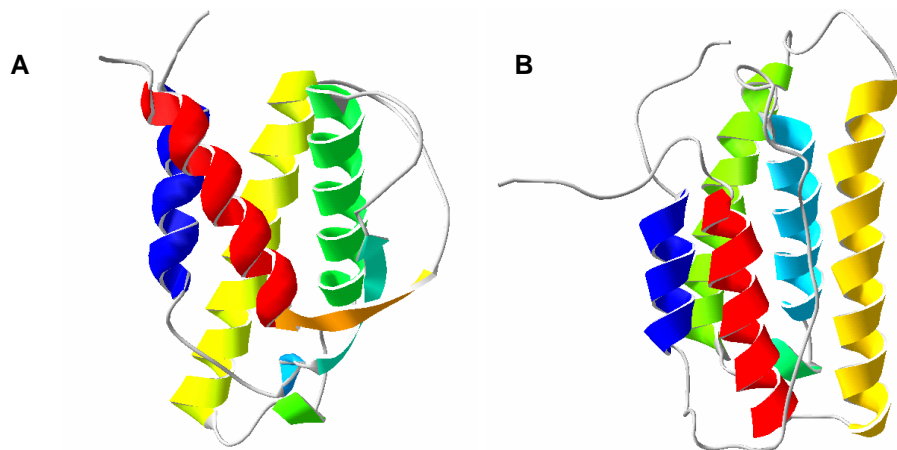


Abbildung 1 Darstellung von (A) Klasse I Cytokin: IL-4, ( B) Klasse II Cytokin: EPO.

## 1.2 Biologische Bedeutung und Funktionen von Interferonen

Die Wirkung der Interferone ( $IFN\alpha/\beta/\omega$ ) in der angeborenen Immunabwehr ist sehr vielseitig. Neben der Abwehr viraler Infektionen, für die verschiedene Signaltransduktionswege beschrieben wurden [11-14], sind Interferone durch die Modulation des Zellzyklus oder durch die Induktion von pro-apoptotischen Genen an der Regulation des Zellwachstums beteiligt [13]. Daneben konnte ein Einfluss auf antionkogenen Prozesse, wie z.B. die Modulation von T-Lymphozyten oder dendritischen Zellen, durch Interferone nachgewiesen werden [8]. Ebenso konnte eine Beteiligung am Knochenmetabolismus beobachtet werden, wie z.B. auf die Osteoklasten-Differenzierung durch das  $IFN\beta$  [15]. Bereits mehr als 300 durch Interferone stimulierte Gene (ISG) sind bisher bekannt [16, 17]. Hierunter fallen Gene / Proteine, die an der Adhäsion, Apoptose, Immunmodulation, Abwehr, Lipidmodulation, Signalweiterleitung und Translation beteiligt sind, sowie Wachstumsfaktoren, Hormone, metabolische Enzyme, Rezeptoren, Transkriptionsfaktoren und -aktivatoren [16].

Für biologische Systeme sind die schnelle Adaption sowie eine gleichzeitige Widerstandsfähigkeit gegenüber extremen Änderungen in ihrer Umgebung von besonderer Notwendigkeit. Beispiel hierfür ist die Abwehrreaktion bei einer viralen oder bakteriellen Infektion, wodurch eindringende Pathogene vernichtet werden. Dabei wird als eine erste Abwehrreaktion der angeborenen Immunabwehr die Ausschüttung von  $IFN\beta$  veranlasst (Abbildung 2). Schlüsselereignis ist die Aktivierung des interferon-regulierten Faktors 3 (IRF-3) und die Aktivierung von  $NF\kappa B$ . Potente Induktoren sind die Toll-like-Rezeptoren (TLR), die über eine Vielzahl von viralen und bakteriellen Faktoren aktiviert werden [14, 18-23]. Nach der Bindung von viralen (z.B. dsRNA  $\rightarrow$  TLR-3) oder bakteriellen (z.B. LPS  $\rightarrow$  TLR-4) Faktoren an die TLR-3 und 4, werden der konstitutiv exprimierte IRF-3 sowie  $NF\kappa B$  aktiviert und die Expression von  $IFN\beta$  induziert [21, 23-25]. Neben der Aktivierung von

IRF-3 über die TLR, kann IRF-3 auch zytoplasmatisch über die dsRNA der Viren aktiviert werden. Nach der Freisetzung von IFN $\beta$  wird über die Bindung an den Interferonrezeptor die Assemblierung des Interferon-stimulierten Genfaktors 3 (ISGF3) veranlasst. Dadurch kommt es, neben vieler anderer Proteine, zu einer drastischen Induktion von IRF-7, welches im Gegensatz zu IRF-3 nicht konstitutiv exprimiert wird. IRF-7 wird daraufhin über verschiedene Faktoren, wie z.B. über dsRNA der Viren oder den TLR-7 bis -9 aktiviert [26-29] und veranlasst dann die Induktion von IFN $\alpha$  und IFN $\beta$ . Die Induktionsstärke der verschiedenen Interferone wird daher von den TLR auf der Zelloberfläche beeinflusst. So ist von dendritischen Zellen bekannt, dass diese einen unterschiedlichen Satz an TLR besitzen [30]. Die Zusammensetzung der ausgeschütteten Interferone steht demzufolge in Abhängigkeit zu dem Zelltyp, dem Virustyp sowie dem Organismus, so dass die Aktivierung des adaptiven Immunsystems unterschiedlich ablaufen kann [31].

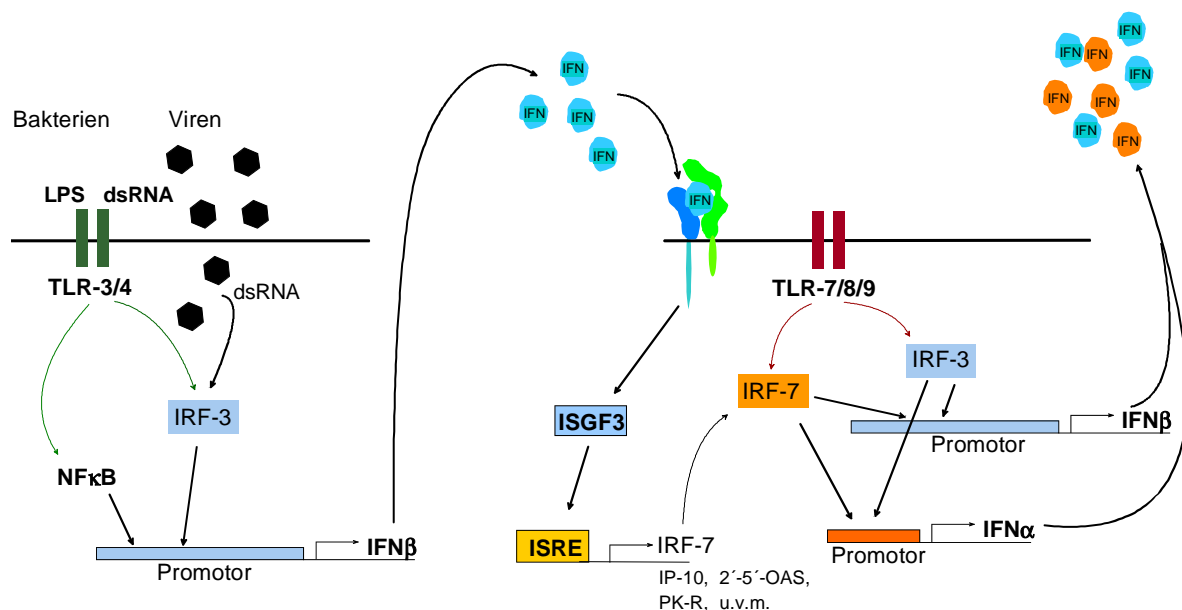


Abbildung 2 Induktion von IFN $\beta$  und IFN $\alpha$ .

In Leukozyten ist, im Gegensatz zu der IFN $\beta$ -abhängigen Induktion der IFN $\alpha$ -Subtypen in Fibroblasten, zusätzlich die Induktion der IFN $\alpha$ -Subtypen über einen IFN $\beta$ -unabhängigen Weg bekannt [32]. Dabei wird eine Induktion der IFN $\alpha$ -Transkription direkt durch eine Virusinfektion oder andere Faktoren induziert. Der genaue Mechanismus ist bisher jedoch kaum bekannt.

Ebenso wurde beobachtet, dass die IFN $\alpha$ -Subtypen und IFN $\beta$  konstitutiv in geringen Mengen durch die Zellen exprimiert werden [33, 34]. Es wird daher angenommen, dass die Interferone dadurch ihre Wirkung auf die antionkogene Aktivität und auf die

Wachstumskontrolle ausüben. Diese geringe Ausschüttung von Interferonen hält zudem die Zellen in einer „ready-to-go“-Phase um bei rapiden Veränderungen, wie einer Infektion, schneller reagieren zu können [34].

### 1.2.1 Interferon vermittelte Aktivitäten

Die bekanntesten Aktivitäten der Interferone werden nun im Folgenden kurz beschrieben (Abbildung 3). Die Interferone induzieren dabei die Expression einer Vielzahl von verschiedenen Proteinen, die an verschiedenen Aktivitäten beteiligt sind.

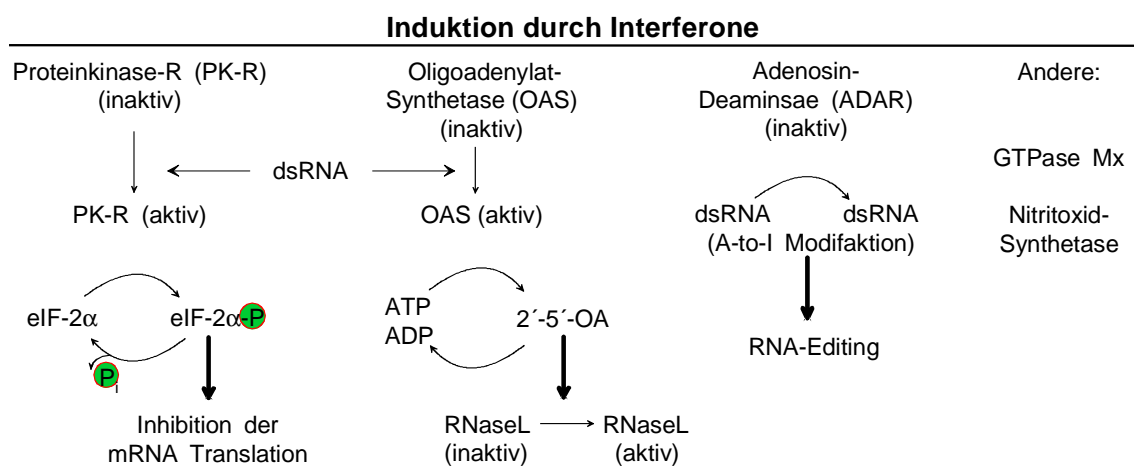


Abbildung 3 Durch Interferone induzierte antivirale Aktivitäten.

#### Proteinkinase-R

Durch die Aktivierung der Proteinkinase-R (PK-R) wird die Inhibition der Proteinsynthese (Translation) erreicht. Die PK-R ist eine Serin- / Threoninkinase mit vielfachen Funktionen in der Transkriptions- und Translationskontrolle und liegt im Normalzustand in einer inaktiven Form vor. Kommt es nach einer viralen Infektion zu einer Bindung von dsRNA an die PK-R, wird die Phosphorylierung und Aktivierung der PK-R eingeleitet [35, 36]. Die Hauptwirkung der aktiven PK-R ist dabei die Phosphorylierung des Initiationsfaktors eIF2 während des GDP-gebundenen Zustandes, was dessen Inaktivierung zur Folge hat. Eine Inhibition des Zellwachstums via PK-R konnte ebenso durch die Suppression von z.B. pRB, Cyclin-abhängigen Kinasen (cdk) und E2F beobachtet werden [11, 14]. Außerdem wird über die PK-R die Aktivierung des NFκB-Transkriptionsfaktors veranlasst, so dass die Genexpression von z.B. MHC-I, Chemokinen, Mx-Proteinen und FAS (Apoptose-Aktivator) stimuliert wird. Die Beteiligung der Interferone an der Apoptose [37, 38], der Immunmodulation, u.v.m. konnte eindeutig nachgewiesen werden.

### Oligoadenylat-(2'-5'-OA)-Synthetase

Die Aktivierung der 2'-5'-Oligoadenylat-(OA)-Synthetase ist, wie die PK-R, von der Anwesenheit dsRNA abhängig [11, 14, 39]. Durch Autophosphorylierung wird die Synthetase bei Bindung von dsRNA aktiviert und 2'-5'-Oligoadenylate werden produziert. Die Bindung der 2'-5'-OA an die 2'-5'-OA-abhängige RNA-Nuklease L (RNase-L) bewirken deren Aktivierung, so dass verschiedene weitere Funktionen, wie RNA-Degradation, im Organismus angeregt werden. Eine wichtige Funktion ist die Zerstörung viraler und zellulärer mRNA und die Verlangsamung der zellulären Proteinsynthese.

### ADAR

Die Aktivierung der RNA-spezifischen Adenosin-Deaminase ADAR1 wird ebenfalls durch Interferone induziert. Das Substrat ist die dsRNA, welche einem RNA-*Editing* unterzogen wird. Der signifikante Effekt durch ADAR1 ist die Deaminierung des Adenosins zu einem Inosin. Dadurch kommt es zu anderen Basenpaarungen, was zu veränderten Templates im Vergleich zu ihrem Transkript führt und die Stabilität der viralen RNA vermindert wird [40].

### Mx-Proteine

Die humanen Mx-Proteine (MxA und MxB) gehören zu der Familie der GTPasen. Nach der Aktivierung durch Interferone werden diese im Cytoplasma akkumuliert. Dort entfalten die Mx-Proteine ihre antivirale Aktivität, die z.B. die Inhibition der Transkription und Translation viraler Proteine beinhaltet [13, 41, 42]. Jedoch werden auch noch andere Funktionen angenommen. So wurde eine Interaktion mit dem viralen Nukleocapsid von Influenza-Viren im Cytoplasma und im Zellkern beobachtet, wodurch entweder die Translokation in den Zellkern oder die Transkription verhindert wurde [43].

Neben den antiviralen Aktivitäten besitzen alle Interferone die Fähigkeit unterschiedlich stark verschiedene regulatorische Aktivitäten zu stimulieren. Ferner werden die antiproliferative Aktivität sowie die Kontrolle der Apoptose über die oben genannten Wege beeinflusst [13]. Durch  $\text{IFN}\alpha$  und  $\text{IFN}\beta$  werden außerdem natürliche Killerzellen (NK-Zellen) und Makrophagen aktiviert, die an verschiedenen Antworten in der frühen Immunantwort bei einer viralen Infektionen beteiligt sind [44, 45]. So konnte die Induktion der NO-Synthase (iNOS) in Makrophagen und dendritischen Zellen nachgewiesen werden [14, 46]. Ein Zusammenhang konnte ebenfalls zwischen dem  $\text{IFN}\alpha/\beta$ -System und dem  $\text{IFN}\gamma$ -System gezeigt werden, da für eine optimale Aktivität von  $\text{IFN}\gamma$  eine Abhängigkeit von dem  $\text{IFN}\alpha/\beta$ -System beobachtet werden konnte [47]. Daneben bewirken die Interferone die Induktion einer Vielzahl von Proteinen, die an der Antigen-Prozessierung oder Protein-Degradierung beteiligt sind, wie z.B. die Mikroglobulin-Untereinheit  $\beta_2\text{m}$  der MHC-I Molekülen [31, 46]. Es kommt zu einer vermehrten Expression von MHC-I Molekülen und demzufolge zu einer

gesteigerten Präsentation von viralen Proteinfragmenten an der Zelloberfläche von Makrophagen. Der Anstieg an MHC-I Molekülen bei uninfizierten Zellen bietet gleichzeitig einen Schutz gegen den Angriff von NK-Zellen. Zusätzlich kommt es zu einer Aktivierung des adaptiven Immunsystems, wie z.B. einer verstärkten Aktivierung von zytotoxischen T-Lymphozyten (CD8<sup>+</sup>) [4, 48, 49] oder einer gesteigerten Proliferation und Differenzierung von B-Zellen [50].

In letzter Zeit wird weiterhin die Aktivierung des p53-Proteins durch Interferone diskutiert. Es wurde entdeckt, dass die Transkription der p53 mRNA durch IFN $\alpha$  und IFN $\beta$  bei Stress aktiviert wird [51, 52]. Die durch p53 vermittelten Zellantworten, wie Zellzyklusarrest oder Apoptose, wurden jedoch nicht durch die Zugabe von IFN $\alpha/\beta$  allein auf Zellen beobachtet. Daher wird angenommen, dass bei der Anti-Tumor-Wirkung der Interferone die p53-abhängige Apoptose involviert ist. Konkrete Beweise konnten jedoch bisher noch nicht erbracht werden.

### 1.2.2 Pharmakologische Einsatzmöglichkeiten

Interferone besitzen aufgrund ihres großen Wirkungsspektrums die Möglichkeit eines breiten medizinischen Einsatzgebietes. Rekombinante Interferone werden seit 1982 hauptsächlich in der Medizin zur Therapie verschiedener Virus- und Tumorerkrankungen genutzt. IFN $\alpha$  (Intron A®, Roferon®-A, Pegasy®) findet systemisch Anwendung bei bestimmten Tumorarten (Haarzelleukämie, chronisch myeloischer Leukämie, kutane T-Zellen-Lymphome, niedrig maligne Non-Hodgkin-Lymphome und Kaposi-Sarkom) [53-55] sowie bei chronischen Infekten mit Hepatitis-B- und Hepatitis-C-Viren [56-59]. Die Anwendung in der Lokalthherapie erfolgt bei der Behandlung der Herpeskeratitis (Berafor®) [57]. IFN $\beta$  (Fiblaferon®) ist bei sehr schweren Virusinfekten indiziert, die systemisch nicht mehr beherrschbar sind (z.B. Viruszephalitis, generalisierter Zoster, Varizellen bei immunsupprimierten Patienten). Weiterhin findet IFN $\beta$  (Avonex®, Rebif®, Betaferon®) Anwendung in der Therapie der Multiplen Sklerose (MS). Hierbei wird der antiinflammatorische Effekt und die Inaktivierung von mononukleären Phagozyten ausgenutzt [60]. Nachteile in der Therapie mit Interferonen liegen in den starken Nebenwirkungen sowie in der komplexen Pharmakokinetik und -dynamik, die insbesondere auf die makromolekulare Struktur zurückzuführen sind.

Ein Ansatzpunkt in der Zukunft ist daher die Entwicklung von genetisch manipulierten Interferonen, um gewünschte Wirkungen, Nebenwirkungen sowie Verfügbarkeit systematisch modifizieren zu können. Ein besonderes Augenmerk liegt dabei auf die Reduzierung von Nebenwirkungen.

### 1.3 Unterschiede in der Wirkung von Interferonen

Der Grund dafür, dass den Säugetieren evolutionär konserviert eine ganze Familie von Interferonen zur Verfügung steht, die alle über den gleichen Rezeptor ihre Wirkung vermitteln, ist unklar. Dabei scheint jedes Interferon ein unterschiedliches Profil an Aktivitäten aufzuweisen, welches wiederum in Abhängigkeit zum jeweiligen Zelltyp steht. Bisher konnte jedoch noch keine direkte Korrelation zwischen einem individuellen Interferon und einer spezifisch ausgelösten zellulären Aktivität nachgewiesen werden. Speziell in der Infektabwehr wird durch die verschiedenen Interferone ein vergleichbarer Satz an Genen induziert, die nur in ihrer Quantität zwischen den Interferonen und den Zelltypen variieren. Daher stellt sich die Fragen nach der Ursache dieser Vielfalt. Eine Erklärung wäre die große Bedeutung der Interferone in der Fremdkörper-Abwehr, die eine große Vielfalt und Anpassungsfähigkeit erfordert. Dieses umfassende *back-up*-System könnte daraufhin deuten, dass alle Subtypen essentiell und somit nicht austauschbar sind. Interferone, mit ähnlichen aber auch spezifischen Einzelfunktionen, könnten eine Modulation der Interaktion, Synergismus sowie Antagonismus bei der Zellantwort auf verschiedene Reize auslösen. Unterschiedliche Interferone könnten dabei helfen den Zustand der Homöostase im Körper wieder herzustellen [61].

Um signifikante Differenzen zwischen den Interferonen zu finden, wurde in den letzten Jahrzehnten eine Vielzahl an Untersuchungen im Hinblick auf die differentielle Aktivierung verschiedener Signalwege durchgeführt. Besonders ausgeprägte Unterschiede wurden dabei zwischen den IFN $\alpha$ -Subtypen und IFN $\beta$  beobachtet [61]. Dabei konnten insbesondere Unterschiede zwischen Aktivitäten gefunden werden, die nach einer kurzen und langen Inkubationszeit durch Interferone aktiviert werden. So zeigten IFN $\beta$  und IFN $\alpha$ 2 bei der kurzfristig aktivierten antiviralen Wirkung, die bereits nach einigen Stunden beendet ist, geringe Unterschiede in ihrer Effizienz. Für die langfristig aktivierte antiproliferative sowie zytotoxische Wirkung wurden dagegen auffällige Unterschiede in Wirkeintritt sowie Intensität beobachtet. Für diese Wirkung war die eine Aktivierung über Tage notwendig. In der Potenz, verschiedene Signalwege zu aktivieren, existieren demzufolge Unterschiede zwischen den IFN $\alpha$ -Subtypen und dem IFN $\beta$ .

Jedoch konnten auch innerhalb der IFN $\alpha$ -Subtypen deutliche Unterschiede gezeigt werden [62-66]. So wurde z.B. durch Untersuchungen mit IFN $\alpha$ 1, IFN $\alpha$ 2 und IFN $\alpha$ 21 an dendritischen Zellen und humanen T-Zellen gezeigt, dass ein vergleichbarer Satz an Genen induziert wird, jedoch Unterschiede in der Transkriptionsstärke zu finden sind. Außerdem konnten Abweichungen in der Tyrosin- oder Serin-Phosphorylierung verschiedener STAT-Proteine sowie in der Induktion der ISGF3-Assemblierung in Abhängigkeit von Interferon und Konzentration beobachtet werden [46]. Dies führte in der ISG-abhängigen Induktion von

Genen zu einer unterschiedlichen Effizienz. Dabei wurden z.B. Unterschiede in der Induktion der NO-Synthetase (iNOS) oder der IL-12-Rezeptortuntereinheit  $\beta 2$  gefunden, die jedoch durch die Steigerung der absoluten IFN-Konzentrationen relativiert werden konnten. Eine differentielle Geninduktion konnte dagegen für IP-10 (IFN $\gamma$ -inducible protein), ein Schlüsselchemokin bei der Rekrutierung von Th1-Zellen und NK-Zellen zu Entzündungsherden, nachgewiesen werden. Eine Induktion von IP10 wurde in T-Zellen nicht beobachtet, jedoch konnte in dendritischen Zellen eine Induktion durch IFN $\alpha 2$  und IFN $\alpha 21$  nachgewiesen werden. Die Induktion durch IFN $\alpha 1$  war dagegen nur gering und konnte auch mit ansteigender Konzentration nicht gesteigert werden. Für die Induktion von IP-10 zeigte sich folglich (I.) eine differentielle Regulation durch die IFN $\alpha$ -Subtypen sowie (II.) eine Abhängigkeit vom Zelltyp. Ebenfalls wurde (III.) ein Abhängigkeit von der MAPK p38 beobachtet [46]. Hierdurch konnte eindeutig nachgewiesen werden, dass Unterschiede in der Aktivierung verschiedener Signalwege existieren und dadurch die Induktion von Genen von dem jeweiligen Interferon und Zelltyp abhängig ist. Bei der Zusammensetzung der exprimierten IFN $\alpha$ -Subtypen wurde zudem eine Abhängigkeit von dem Virustyp beobachtet [67, 68]. Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass die Expression der IFN $\alpha$ -Subtypen durch verschiedene IRFs (*interferon response factor*) reguliert wird [46, 69]. Den größten Anteil der exprimierten IFN $\alpha$ -Subtypen stellen dabei das IFN $\alpha 1$  und das IFN $\alpha 2$  dar, die daher für eine Vermittlung unterschiedlicher Aktivitäten von besonderer Bedeutung zu sein scheinen und somit die starken Unterschiede bei der Induktion von Genen erklären würden. Bei der Isolierung von IFN $\alpha$ -Subtypen für klinische Studien wurde beobachtet, dass verschiedene Zelllinien Unterschiede in ihrer Expression der IFN $\alpha$ -Subtypen aufweisen. So wird von den Monozyten das IFN $\alpha 1$  als Hauptkomponente sezerniert, dagegen von den Lymphoblastoiden und Leukozyten das IFN $\alpha 2$  [61]. Im Hinblick auf die immunmodulatorische Funktion von Interferonen konnten ebenfalls Unterschiede in der Effizienz beobachtet werden. So scheint z.B. IFN $\alpha 1$  dazu fähig zu sein, zusätzlich eine gesteigerte Expression der MHC-II-Klasse zu induzieren [61, 70]. Teils sind auch gegensätzliche Wirkungen beobachtet worden, wie z.B. eine Suppression [71] oder eine Steigerung [72] der Antikörper-Produktion. So konnte für IFN $\beta$  und IFN $\alpha 8$  eine Induktion der B-Zell-Proliferation nachgewiesen werden. IFN $\alpha 1$  zeigte dagegen auch bei höheren Konzentrationen keinen proliferativen Effekt [50, 61].

Ferner wurden Unterschiede in der Aktivität zwischen IFN $\alpha 2$  und ovinen IFN $\tau$  (IFN $\tau$ ) in MDBK und Daudi-Zellen untersucht [73]. Bei IFN $\tau$  wurden vergleichbare biologische Eigenschaften gefunden, wie für IFN $\alpha 2$ . Dabei konnte für IFN $\tau$  eine konzentrationsabhängige antivirale und antiproliferative Aktivität beobachtet werden, jedoch wurde nur ein gering toxischer Effekt im Vergleich zu IFN $\alpha 2$  nachgewiesen. Ebenfalls wurden große Unterschiede

in der Bindungsaffinität an den Interferonrezeptor beobachtet [73]. Weiterhin wurde für IFN $\tau$  in PBL- und MDM-Zellen eine höhere Potenz gegen HIV-I gegenüber IFN $\alpha$ 2 beobachtet [74]. Dies kann von Bedeutung in Hinblick auf die verminderte Affinität von IFN $\tau$  an den Rezeptor gegenüber dem IFN $\alpha$ 2 sein.

Das Interferonsystem weist demzufolge eine enorme Komplexität auf, insbesondere im Hinblick auf die Aktivierung verschiedener Aktivitäten über einen gemeinsamen Rezeptor. Der Mechanismus der Signalübertragung ist daher von besonderer Bedeutung.

## 2 Mechanismus der Signalübertragung über Cytokinrezeptoren

### 2.1 Cytokinrezeptoren

Die Aktivierung von Signalwegen durch verschiedene Cytokine wird über die Bindung an spezifische Cytokinrezeptoren erreicht. Typisch für alle Cytokinrezeptoren ist, dass alle Untereinheiten eine Transmembrandomäne, eine N-terminale extrazelluläre und eine C-terminale intrazelluläre Domäne besitzen. Charakteristische Sequenzen, wie Fibronectin Typ III-ähnliche und Immunoglobulin-ähnliche Domänen, variieren in den verschiedenen Rezeptortypen. Dabei weist die extrazelluläre Domäne ein aus ~200 Aminosäuren (AS) zusammengesetztes Modul mit hoch konservierten Regionen auf. Dieses Modul setzt sich aus zwei  $\beta$ -Sandwichstrukturen mit einer Länge von ~100 AS zusammen, bestehend aus je sieben antiparallel angeordneten  $\beta$ -Faltblättern. Die Einteilung in Klasse I Cytokinrezeptoren (Hematopoietinrezeptoren) und Klasse II Cytokinrezeptoren (Interferonrezeptoren) wird durch die Unterscheidung spezifischer Motive in den extrazellulären Domänen vorgenommen. Hierzu gehören z.B. konserviert vorliegende Cysteinreste oder eine sog. 'WSxWS' Box im C-terminalen Bereich, die ein typisches Merkmal für die Klasse I Cytokinrezeptoren darstellt [75]. Vertreter der Klasse I Cytokinrezeptoren sind z.B. GHR, EPOR oder IL-6R $\alpha$ . Zu der Klasse II Cytokinrezeptoren gehören die Interferonrezeptoren oder der IL-10R1/2. In der Literatur gibt es zusätzlich eine Typ III Cytokin-Rezeptor Familie, zu der die TNF-Rezeptor Familie gezählt wird. Hier sind starke strukturelle Unterschiede zu den Typ I und II Cytokinrezeptoren zu finden.

Der Mechanismus der Rezeptor-Assemblierung bei der Bindung eines Cytokins ist für die Aktivierung von besonderer Bedeutung und wird für den Typ II Cytokin-Rezeptor unter 2.2 näher beschrieben. Neben dem Mechanismus der Rezeptor-Assemblierung und der Signalweiterleitung lässt sich für Cytokin / Rezeptor-Komplexe eine enorme Variationsbreite in der Stöchiometrie von Ligand und den Rezeptoruntereinheiten finden. So ist von Erythropoietin (EPO) ein 2:1-Verhältnis bekannt, bei dem zwei identische Rezeptoruntereinheiten dimerisieren, sobald ein EPO über ein hoch und ein niedrig affines



Bindungsepitop gebunden hat [76]. Bei anderen Cytokinen ist eine 2:2:2-Stöchiometrie (z.B. gp130:IL-6:IL-6R, IFN $\gamma$ -Dimer) [77, 78] oder eine 1:1:1-Stöchiometrie (z.B.: IL-4) [79] bekannt.

## 2.2 Signalübertragung über Typ II Cytokinrezeptoren

Von Cytokinen ist bekannt, dass diese simultan über verschiedene Bindungsepitope an ihre Rezeptoruntereinheiten binden können. Dadurch wird die Assemblierung eines Komplexes bewirkt, der zu einer Aktivierung verschiedener Signalwege führt. Die Annäherung der intrazellulären Domänen leitet dabei eine Phosphorylierung der rezeptor-assoziierten Januskinasen (Jak) ein. Dies setzt eine Aktivierungskaskade in Gang, wodurch eine Vielzahl verschiedener Signalwege aktiviert wird. Einer der wichtigsten Signalwege ist die Aktivierung von STAT-Proteinen (*signal transducers and activators of transcription*), der später näher beschrieben wird [80].

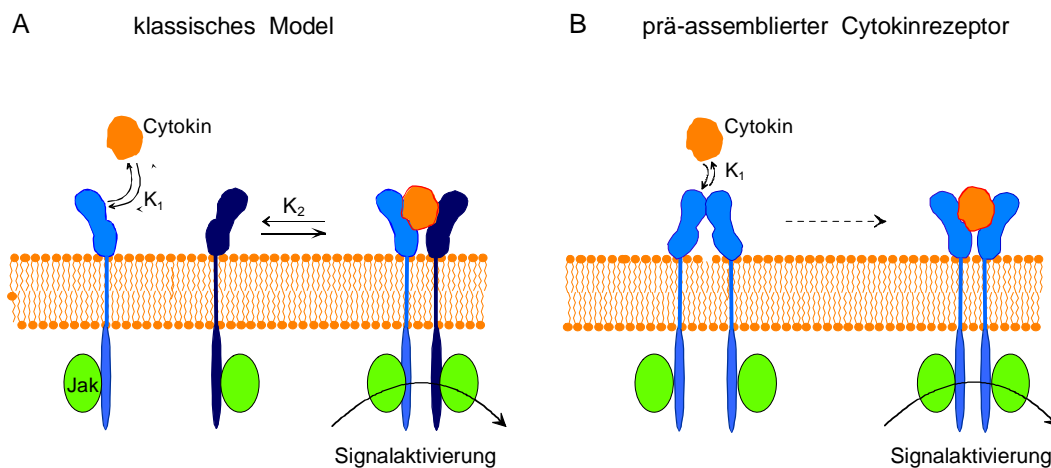


Abbildung 4 Aktivierung von Cytokinrezeptoren. (A) Klassisches Modell, (B) prä-assembliertes Rezeptormodell.

Eine Schlüsselfrage bei der über den Cytokinrezeptor vermittelten Signaltransduktion ist jedoch, wie durch eine Ligandenbindung ein Signal über die Membran intrazellulär weitergeleitet wird. Für eine Weiterleitung des Signals ist zu einem die horizontale Bewegung der intrazellulären Domänen aufeinander zu sowie die Übertragung über die Transmembrandomäne notwendig, um eine Aktivierung der prä-assozierten bzw. assoziierenden Kinasen zu ermöglichen. Da die Struktur eines vollständigen Rezeptors noch nicht bestimmt wurde, konnten bisher nur unvollständige Rückschlüsse auf strukturelle und mechanistische Änderungen vollzogen werden. Es wird angenommen, dass eine Annäherung der cytoplasmatischen Domänen und der damit verbundenen Signalausbreitung

erst durch die Bindung eines Liganden veranlasst wird [81]. Daher werden die verschiedensten Modelle bezüglich der Assemblierung von Cytokinrezeptor zu einem Komplex diskutiert [7, 82, 83]. Im klassischen Modell bindet zunächst ein Cytokin über ein hoch affines Bindungsepitop an eine Rezeptoruntereinheit. Daraufhin wird die Rekrutierung einer weiteren Rezeptoruntereinheit über ein niedrig affines Bindungsepitop hervorgerufen, so dass eine Annäherung der cytoplasmatischen Domänen und folglich eine Aktivierung verschiedener Signalkaskaden stattfindet (Abbildung 4 A). Dabei wird die Kollisionswahrscheinlichkeit mit der niedrig affinen Komponente durch die lokale erhöhte Cytokinkonzentration sowie der reduzierten Bewegungsfreiheit der Rezeptoruntereinheiten in der Zellmembran vergrößert. Die unterschiedlichen Bindungsaffinitäten an die Rezeptoruntereinheiten unterstützen einen Zwei-Schritt-Mechanismus bei der Cytokin / Rezeptor-Assemblierung [82, 84-86]. Als alternatives Modell wird ein prä-assemblierter, inaktiver Status der Rezeptoruntereinheiten für einige Cytokine diskutiert (z.B. EPO) [76]. Bindet ein Cytokin kommt es einer Annäherung und Aktivierung der cytoplasmatischen Domänen, was in einer Aktivierung resultiert (Abbildung 4 B). Eine Anzahl an weiteren Modellen wird für die verschiedensten Cytokine diskutiert, die hier jedoch nicht weiter erörtert werden. Ferner werden für einige Cytokinrezeptor-Systeme auch mehrere Modelle angenommen [82].

### 2.3 Interaktion von Interferon und Rezeptor

Von den humanen Interferonen ist bekannt, dass diese an einen gemeinsamen Rezeptor auf der Membranoberfläche binden [87-89]. Der Interferonrezeptor ist zusammengesetzt aus den Untereinheiten ifnar1 und ifnar2, die bei Bindung eines Interferons zu einem Komplex assemblieren und die Aktivierung verschiedener Signalkaskade auslösen. Für den Komplex konnte durch analytische Untersuchungen über Größenausschlußchromatographie sowie Untersuchungen *in vivo* eine 1:1:1-Stöchiometrie nachgewiesen werden [90].

Bekannt ist bisher, dass die Interferone mit sehr viel stärkerer Affinität an ifnar2 ( $K_D$ : ~5 nM für IFN $\alpha$ 2) als an ifnar1 ( $K_D$ : ~5  $\mu$ M für IFN $\alpha$ 2) binden [91, 92]. Ferner konnte gezeigt werden, dass keine Interaktion zwischen den Rezeptoruntereinheiten stattfindet und somit vermutlich kein prä-assemblierter Zustand vorliegt [93]. Für die Assemblierung des IFN / Rezeptor-Komplexes wird daher ein Zwei-Schritt-Mechanismus angenommen (Abbildung 5). Zunächst bindet das Interferon an die höher affine ifnar2-Untereinheit mit der Gleichgewichtskonstante  $K_1$  und bildet einen binären Komplex aus. Durch die Anlagerung der niedrig affinen ifnar1-Untereinheit kommt es zu der Assemblierung eines ternären Komplexes ( $K_2$ ) [93, 94]. Der Anteil an ternären Komplex wird dabei über die Gleichgewichtskonstante  $K_2 = k_{-2} / k_2$  und die Oberflächenkonzentration der ifnar1-Untereinheit bestimmt (Abbildung 5 A). Bei steigender ifnar1-Affinität ( $K_2$ ) kommt es daher zu

einer Stabilisierung der Interferonbindung im ternären Komplex. Ebenso wird diese durch eine steigende ifnar1-Konzentration beeinflusst.

Ein Einfluss auf die Stabilisierung der Interferone im ternären Komplex ist ebenso durch die Gesamtrezeptorkonzentration zu erwarten. So konnte bereits *in vitro* für steigende Rezeptorkonzentrationen von ifnar1 und ifnar2 bei einer 1:1-Stöchiometrie ein langsamere Dissoziationsratenkonstante  $k_d$  aus dem ternären Komplex nachgewiesen werden. Demzufolge konnte auf einen dynamischen Prozess bei der Assemblierung eines ternären Komplexes geschlossen werden [93]. Die nach außen hin steigende Stabilisierung der Interferonbindung im ternären Komplex kommt durch die steigende Wahrscheinlichkeit einer Re-Assemblierung eines ternären Komplexes nach der Dissoziation zustande.

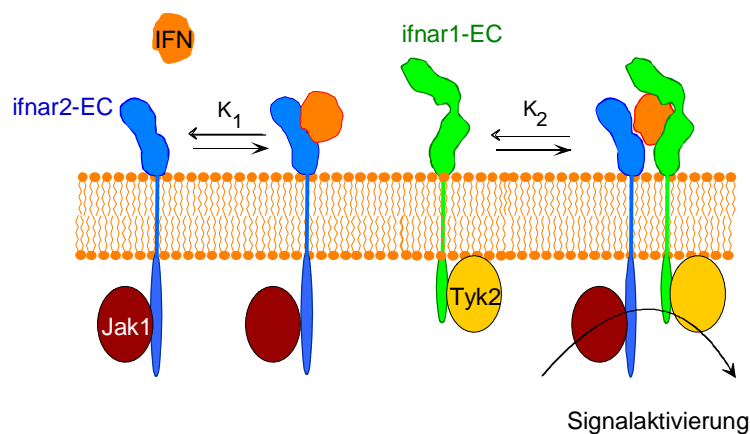


Abbildung 5 Bindung eines Interferons an seine Rezeptoruntereinheiten ifnar2 und ifnar1 unter der Assemblierung eines ternären Komplexes.

Da sich die Rezeptorkonzentration auf der Oberfläche als bedeutend für die dynamische Stabilisierung der Interferonbindung im ternären Komplexes erweist, ist die Rezeptordichte auf der Zellmembran eventuell von besonderer Bedeutung für die Aktivierung verschiedener Signalwege. Abhängig vom Zelltyp liegt die Anzahl der Interferonrezeptoren bei 500 bis mehreren 1000 pro Zelle. Dabei können die Konzentrationen der jeweiligen Rezeptoruntereinheiten ifnar1 und ifnar2 stark variieren und sind bisher, aufgrund der hohen Varianz zwischen den Zelllinien, nicht im Detail geklärt. Durch zelluläre Interaktionsassays konnte für IFN $\alpha$ 2 bei der Gegenwart von ifnar1 eine 10-20-fach höhere Bindungsaffinität gegenüber der Bindung an ifnar2 beobachtet werden [91]. Dies untermauert die Annahme, dass (I.) ein prä-assemblierter Zustand der Rezeptoruntereinheiten nicht anzunehmen ist, da hierbei eine sehr viel stärkere Verminderung der Dissoziationsgleichgewichtskonstante  $K_D$  zu erwarten wäre. Jedoch war davon auszugehen, dass (II.) die Rezeptoruntereinheiten auf der

Membran co-lokalisiert vorliegen, da einige hundert Rezeptoruntereinheiten wiederum nicht ausreichen, um ein 10-20-fach höhere Stabilität zu erreichen. So konnte bereits ein Einfluss auf die Ligandenbindung durch eine lokale Anreicherung von Rezeptoren in der Zellmembran nachgewiesen werden [95, 96]. Demzufolge sind die Bindungsaffinitäten der Interferone an die Rezeptoruntereinheiten sowie die apparente Rezeptorkonzentration von *ifnar1* und *ifnar2* limitierende Faktoren für die Stabilisierung der Interferone im ternären Komplex. Hierdurch wäre ein Einfluss auf verschiedene Aktivitäten vorstellbar.

Ferner darf ein Einfluss durch die Aktivierungsdauer und -häufigkeit auf die Signalausbreitung nicht vernachlässigt werden. Außerdem kann sich die Menge und Zusammensetzung der sezernierten Interferone im Laufe der Immunantwort ändern. Eine Veränderung der Rezeptorkonzentration auf der Zellmembran kann zudem von besonderer Bedeutung sein.

#### 2.4 Zelladaptation durch Interferonaktivierung

Eine dauerhafte Aktivierung von Zellen durch Interferone löst bei diesen eine Desensibilisierung aus. Der genaue Mechanismus dieser Desensibilisierung ist bisher jedoch nicht geklärt. Als mögliche Ursache weisen erste Untersuchungen auf eine Regulation der Rezeptor-Präsentation auf der Zellmembran oder eine Inhibition der IFN-spezifischen Gentranskription hin.

Im Hinblick auf die Kontrolle der Expression, der Präsentation auf der Zellmembran und der basalen oder ligand-induzierten Internalisierung, sind mit dem Interferonrezeptor bisher nur wenige Untersuchungen durchgeführt worden. Ebenfalls existieren kaum Kenntnisse, welche Faktoren die Internalisierung des Komplexes oder der Rezeptoruntereinheiten beeinflussen. Bislang konnte beobachtet werden, dass die Internalisierung von *ifnar1* und *ifnar2* im Komplex oder individuell von dem jeweils gebundenen Interferon abhängig ist [97]. Weitere Studien mit  $\text{IFN}\alpha 2$  an T-Zellen zeigten, dass nach der Bindung von  $\text{IFN}\alpha 2$  eine Internalisierung der IFN / Rezeptor-Komplexe stattfindet und die Rezeptoruntereinheiten anschließend nur zu einem gewissen Teil wieder auf der Zellmembran präsentiert werden [98]. Vergleichbares konnte auf Daudi-Zellen nachgewiesen werden [99]. Ein Einfluss auf die antiproliferative Wirkung von Interferonen konnte ebenfalls durch die Regulation der Rezeptorexpression nachgewiesen werden [100]. So wurde in einigen Krebszellen durch eine verringerte *ifnar2*-Rezeptorkonzentration auf der Zellmembran eine Desensibilisierung gegenüber Interferonen beobachtet. Eine Desensibilisierung gegenüber der Aktivierung durch Interferone konnte ferner durch die Reduktion der IFN-induzierten Transkription bei T-Zellen gezeigt werden [101]. Der genaue Mechanismus ist bislang nicht geklärt.

Andere Studien zeigten, dass eine ifnar1-Präsentation auf der Zellmembran von der Anwesenheit von Tyk2 abhängig war. Bei Abwesenheit von Tyk2 konnte ein Export von ifnar1 in Richtung Plasmamembran beobachtet werden, die jedoch zu einer Akkumulation in endozytotische Organellen führte [102, 103]. Bei der Gegenwart von Tyk2 wurde dagegen eine Stabilisierung von ifnar1 in der Zellmembran beobachtet, indem die Akkumulation und die Internalisierung von ifnar1 verhindert wurden. Demzufolge stellt Tyk2 einen wichtigen Faktor für die Regulation der Internalisierung dar.

## 2.5 Aktivierung von Signaltransduktionskaskaden

Die Liganden-induzierte Assemblierung des Interferonrezeptors aktiviert eine Reihe verschiedener Signaltransduktionskaskaden. Dies wird ermöglicht durch eine Vielzahl von Bindungsstellen auf der cytoplasmatischen Domänen von ifnar1 und ifnar2 (Abbildung 6). So ist ifnar1 assoziiert mit der Januskinase Tyk2 und ifnar2 assoziiert mit Jak1. Die Interferonrezeptoren selbst besitzen keine eigene Kinase-Aktivität. Beide Untereinheiten besitzen spezifische Bindungsstellen für STAT-Proteine [104, 105] sowie für das Insulin-Rezeptor-Substrat (IRS). Zusätzlich sind weitere Bindungsstellen für ERK, PK-A und STAT3 auf der cytoplasmatischen Domäne von ifnar1 vorhanden [106]. Dies lässt bereits die große Varianz an Möglichkeiten erahnen, die dem Rezeptor für die Aktivierung verschiedener Signalwege zur Verfügung stehen.

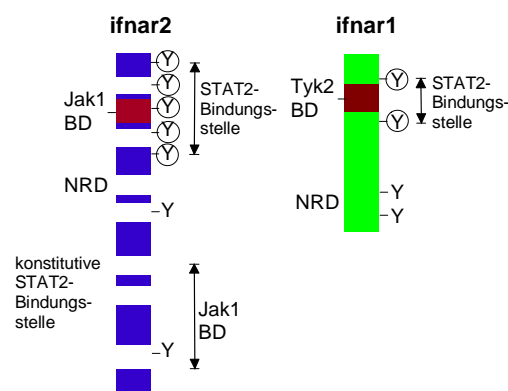


Abbildung 6 Cytoplasmatische Bindungsstellen der Rezeptoruntereinheiten ifnar2 und ifnar1. BD: Bindungsdomäne; NRD: negativ regulatorische Domäne

Der wichtigste Signalweg, der durch Interferone aktiviert wird, ist der Jak-STAT-Signalweg [11, 105, 107]. Ferner wird über die Bindung von IRS-1/2 und die Aktivierung von VAV / ERK eine Vielzahl weitere Signalwege induziert (Abbildung 7).

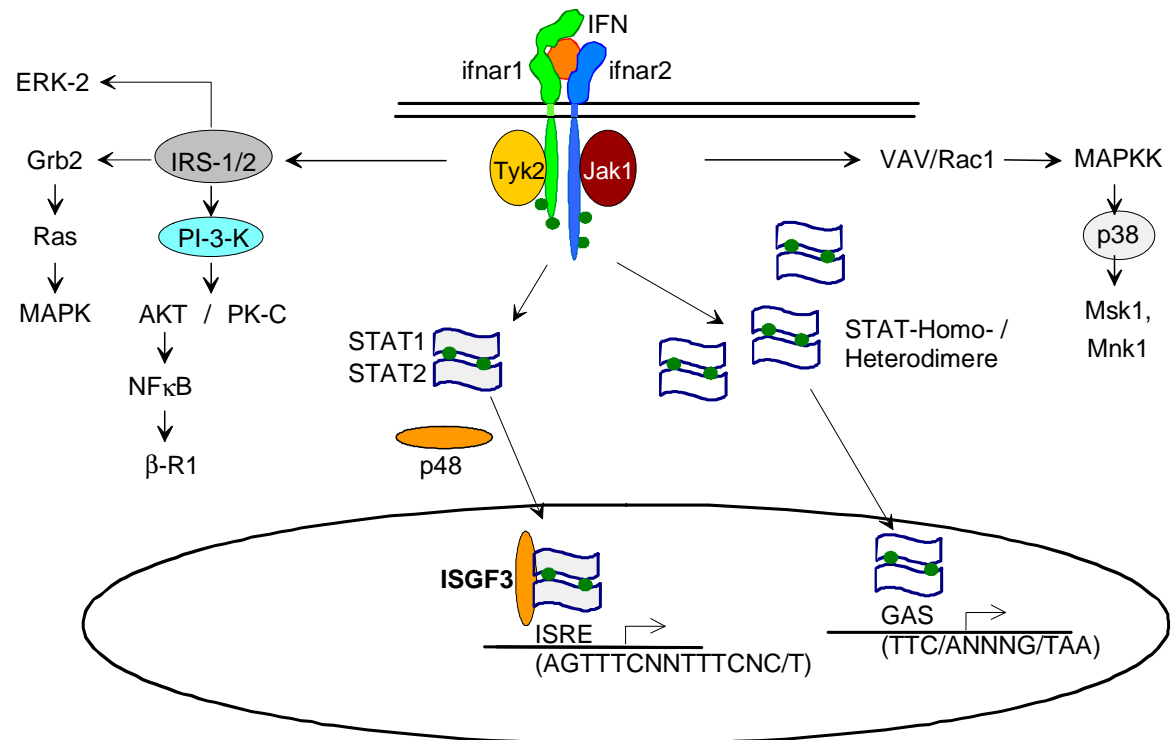


Abbildung 7 Überblick über die durch Interferone aktivierten Signaltransduktionskaskaden.

### 2.5.1 Der STAT-Signalweg

Nach der Assemblierung eines ternären Komplexes werden die konstitutiv assoziierten Tyk2- und Jak1-Kinasen aktiviert, die daraufhin Tyrosinreste der cytosolischen Rezeptordomänen phosphorylieren. Anschließend bindet STAT2 über seine SH2-Domäne und wird ebenso phosphoryliert. Die Ausbildung eines Heterodimers mit STAT1 schließt sich an und es kommt zu der Dissoziation von dem Rezeptor. Das STAT1/2-Heterodimer assoziiert dann mit dem Faktor p48 der IRF-Familie (*interferon response factor*, auch IRF9) und bildet einen Komplex, bezeichnet als Interferon-stimulierter Genfaktor 3 (ISGF3), aus. ISGF3 bindet im Zellkern an Interferon-stimulierende regulatorische Elemente (ISREs) der DNA, wodurch verschiedene Interferon-stimulierte Gene (ISG) aktiviert werden [11, 12, 106, 108]. Bisher sind nur von dem Interferonsystem (IFN $\alpha/\beta$  und IFN $\gamma$ ) die Bildung von STAT1/2-Heterodimeren und die Assemblierung von ISGF3-Komplexen bekannt, was die Bedeutung dieses Signalweges verdeutlicht.

Ebenso bilden sich STAT1-Homodimere aus, die im Zellkern an gamma-aktiviert Sequenz (GAS)-Elemente binden. GAS-Elemente sind z.B. Bestandteil der Promotoren für das IFN $\gamma$ -Gen oder der myc-Gene. Allgemein lässt sich für STAT1 eine Vielzahl von Wirkungen nachweisen, die bisher jedoch nicht im Detail geklärt sind [13]. Neben den genannten STAT1 und STAT2 sind noch weitere STAT-Proteine an der Aktivierung von Signalkaskaden

involviert. So ist z.B. von STAT3 eine Bindung an *ifnar1* nachgewiesen worden [109]. Über die Interferone aktivierte STAT-Dimere schalten im Zellkern die Transkription einer Vielzahl von ISG über GAS-Elemente an. Dabei können in den Promotoren der ISGs GAS-Elemente oder ISRE einzeln oder kombiniert vorliegen, so dass für eine optimale Transkriptionsaktivierung mancher Gene eine Kombination mehrerer STAT-Homodimere oder -Heterodimere notwendig wäre. Der Mechanismus, der diese differenzierte Aktivität und Spezifität der STAT-Proteine festlegt, konnte bislang noch nicht geklärt werden [46, 110].

Für den Jak-STAT-Signalweg ist zugleich eine negative *feedback*-Regulation über verschiedene Faktoren bekannt, wie z.B. die Tyrosin-Phosphatasen SHP-1/2, die SOCS-Familie (*suppressors of cytokine signaling*) [111], die PIAS-Familie (*protein inhibition of activated STAT-family*) [112] oder die Ubiquitin/Proteasom-vermittelte Degradation von STAT-Proteinen [113].

### 2.5.2 Der Insulin-Rezeptor-Substrat / Phosphoinositol-3-kinase-Weg

Ein durch Interferone aktivierter STAT-unabhängiger Signalweg ist der Insulin-Rezeptor-Substrat (IRS) / Phosphoinositol-3-kinase (PI-3-K)-Weg [3, 114]. Nach der Bindung von Interferon an den Rezeptor und der Aktivierung der Januskinasen kommt es zu der Bindung des IRS-1. Dieses wird durch die Januskinasen an mehreren Tyrosinresten phosphoryliert und fungiert als Bindungsstelle für Proteine mit einer SH2-Domäne, wie z.B. der PI-3-K [12]. Die aktivierte PI-3-K bewirkt in der Zelle die Aktivierung spezifischer Zielproteine, wie z.B. der Proteinkinase C (PK-C). Über die PK-C kommt es zu einer Phosphorylierung des Serinrestes S727 von STAT1, so dass dieses voll funktionsfähig bzw. eine Verstärkung der STAT-Aktivität hervorgerufen wird. Die PI-3-K aktiviert zudem AKT, welches pro-apoptotische oder pro-*survival* Signale vermitteln kann [115]. So konnte gezeigt werden, dass über AKT eine gesteigerte Aktivität von NF $\kappa$ B eingeleitet wird, so dass es zu der Induktion von  $\beta$ -R1 (SCYB11) kommt [116]. Zudem wurde beobachtet, dass durch IFN $\alpha$  und IFN $\beta$  über die PI-3-K in primären Astrozyten [117], in primären B-Zellen [118] und in neutrophilen Zellen [119] deren Überleben angeregt wurde. Eine apoptotische Wirkung durch IFN $\alpha$  wurde dagegen an Myeloma-Zellen beobachtet [120]. Vollständig aufgeklärt konnten die aktivierten Signalwege aufgrund der Komplexität bisher jedoch noch nicht werden, da in Anhängigkeit von Zelltyp und Interferon unterschiedliche Aktivitäten beobachtet wurden.

### 2.5.3 Aktivierung der mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPK)

Die Aktivierung der MAPK p38 findet, ebenso wie der IRS / PI-3-K-Signalweg, über einen STAT-unabhängigen Signalweg statt [3, 121, 122]. Über den Interferonrezeptor aktiviertes Tyk2 phosphoryliert und aktiviert VAV (GEF-Familie: *guanine-nucleotide exchange factor*). Dies hat zur Folge, dass VAV über weitere Faktoren (z.B. Rac-1; GTPase) die MAPKK

aktivieren [123, 124], Über MAPKK aktivierte MAPK p38 ist dann an der Aktivierung von *downstream*-Effektoren (z.B. Msk1: *mitogen- and stress activated kinase*; Phosphorylierung von Histon H3) beteiligt [125]. Diese Effektoren nehmen dann an der Induktion von IFN-abhängigen Genen teil (z.B. via GAS-Elementen). Weiterhin konnte die Serin-Phosphorylierung von STAT1 (S727) durch p38 nachgewiesen werden [124].

Die enorme biologische Bedeutung des MAPK-p38-Signalwegs für die antivirale Aktivität der Interferone wurde durch die Inhibition von p38 nachgewiesen [126, 127]. So wurde der Abbruch der antiviralen Abwehr gegen vesikuläre Stomatitis Viren (VSV) oder Hepatitis C Viren (HCV) bei Inhibition von p38 beobachtet [127]. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass durch p38 die IFN $\alpha$ -abhängigen Gentranskription beeinflusst wurde [122]

#### 2.5.4 Differentielle Aktivierung von Signalwegen

Zwischen den Interferonen konnten bislang nur wenige signifikante Unterschiede in der Aktivierung verschiedener Signaltransduktionswege oder in der Induktion spezifischer Gene nachgewiesen werden. Überwiegend zwischen IFN $\alpha$  und IFN $\beta$  konnte vereinzelte Unterschiede im Genexpressionsmuster gezeigt werden. So wurde  $\beta$ -R1 (alias IP-9, CXCL11, I-TAC = *IFN-induced T-cell  $\alpha$  chemoattractant*) spezifisch durch IFN $\beta$  in Astrozyten und humanen Fibrosarkomzellen induziert [128]. Die Aktivierung des erforderlichen Transkriptionsfaktor NF $\kappa$ B wurde dabei spezifisch durch IFN $\beta$  über PI-3-K / AKT hervorgerufen [115, 116]. Zudem wurde für eine IFN $\beta$ -abhängige Induktion von  $\beta$ -R1 neben NF $\kappa$ B der Transkriptionsfaktor ISGF3 benötigt. Die Aktivierung verschiedener Signalwege, wie z.B. einen Tyk2-unabhängigen Signalweg für IFN $\beta$  [129] oder eine differentielle Phosphorylierung der interzellulären Rezeptordomänen durch die Interferone, konnte ebenfalls beobachtet werden [130].

### 3 **Struktur und Funktion von Interferonen**

Von den Typ I Interferone konnten bisher 7 verschiedene Klassen nachgewiesen werden: IFN alpha ( $\alpha$ ), beta ( $\beta$ ), delta ( $\delta$ ) [131], epsilon ( $\epsilon$ ), kappa ( $\kappa$ ), omega ( $\omega$ ) und tau ( $\tau$ ). Im humanen Organismus konnten IFN $\alpha$ , IFN $\beta$ , IFN $\epsilon$ , IFN $\omega$  und IFN $\kappa$  belegt werden [11, 132, 133]. Einzig zurzeit bekanntes Typ II Interferon ist das IFN gamma ( $\gamma$ ), welches an den IFN $\gamma$ -Rezeptor bindet. Zu den Typ III Interferonen (IFN-ähnliche Cytokine) werden die IFN $\lambda$  ( $\lambda$ 1 (IL-29),  $\lambda$ 2 (IL-28A),  $\lambda$ 3 (IL-28B)) gezählt [134], die im menschlichen Organismus sowie anderen Säugetieren gefunden wurden. Ein weiteres IFN-ähnliches Cytokin namens Limitin wird ebenfalls diskutiert, welches bislang nur in Mäusen nachgewiesen wurde. Limitin kann, im Gegensatz zu den IFN $\lambda$ , ebenfalls an den humanen Interferonrezeptor binden und wird daher in der Literatur auch teilweise bei den Typ I Interferonen aufgeführt [134-136].



### 3.1 Primärstruktur der Interferone

Bei den humanen Interferonen sind 13 verschiedene IFN $\alpha$ -Subtypen und jeweils ein Mitglied von IFN $\beta$  und IFN $\omega$  bekannt [1, 11, 61, 133, 134]. Genetisch sind diese auf dem kurzen Arm des Chromosoms 9 (9p21+3) als Gencluster lokalisiert [88, 134]. Es wird deshalb angenommen, dass die unterschiedlichen Gene der Interferone durch Genduplikation zustande gekommen sind. Die humanen IFN $\alpha$ -Subtypen, IFN $\omega$  und IFN $\beta$  sind aus 165-166 Aminosäuren (AS) (ohne Signalsequenz) aufgebaut (Abbildung 8) und ihre Größen variieren zwischen 18-20 kDa. Die Synthese und Freisetzung wird über verschiedene Zelltypen erreicht. So werden die IFN $\alpha$ -Subtypen und das IFN $\omega$  von Leukozyten und das IFN $\beta$  von Fibroblasten sezerniert.

Dagegen konnten die verschiedenen IFN $\tau$ -Subklassen (Trophoblastin) nur im Organismus der Wiederkäuer nachgewiesen werden, welche jedoch an den humanen Interferonrezeptor binden können [2, 134]. Sie sind aus 172 AS aufgebaut und besitzen eine molare Masse von ~20 kDa. Die Synthese und Freisetzung der IFN $\tau$ -Subtypen wird durch Trophoektodermzellen der Gebärmutter bei einer Schwangerschaft ausgeführt [137-140]. Durch die relativ hohe antivirale Potenz gegenüber der cytotoxischen Aktivität wird in der medizinischen Forschung den IFN $\tau$ -Subtypen ein besonderes Augenmerk entgegen gebracht. Mit diesem Hintergrund wurde in dieser Arbeit das ovine IFN $\tau$ 2 (weiterhin: IFN $\tau$ 2) bei den Untersuchungen mit einbezogen.

*Tabelle 1 Vergleich von Identität / Homologie der Interferone. Angaben in Prozent (%).*

	<b>IFN<math>\alpha</math>1</b>	<b>IFN<math>\alpha</math>2</b>	<b>IFN<math>\alpha</math>8</b>	<b>IFN<math>\alpha</math>21</b>	<b>IFN<math>\beta</math></b>	<b>IFN<math>\omega</math></b>	<b>IFN<math>\tau</math>2</b>
<b>IFN<math>\alpha</math>1</b>	--	83 / 87	79 / 86	83 / 89	29 / 48	56 / 70	51 / 65
<b>IFN<math>\alpha</math>2</b>	83 / 87	--	83 / 89	83 / 88	32 / 50	60 / 72	50 / 64
<b>IFN<math>\alpha</math>8</b>	79 / 86	83 / 89	--	83 / 90	27 / 47	57 / 68	50 / 62
<b>IFN<math>\alpha</math>21</b>	83 / 89	83 / 88	83 / 90	--	29 / 46	55 / 66	50 / 66
<b>IFN<math>\beta</math></b>	29 / 48	32 / 50	27 / 47	29 / 46	--	33 / 53	30 / 47
<b>IFN<math>\omega</math></b>	56 / 70	60 / 72	57 / 68	55 / 66	33 / 53	--	56 / 72
<b>IFN<math>\tau</math>2</b>	51 / 65	50 / 64	50 / 62	50 / 66	30 / 47	56 / 72	--

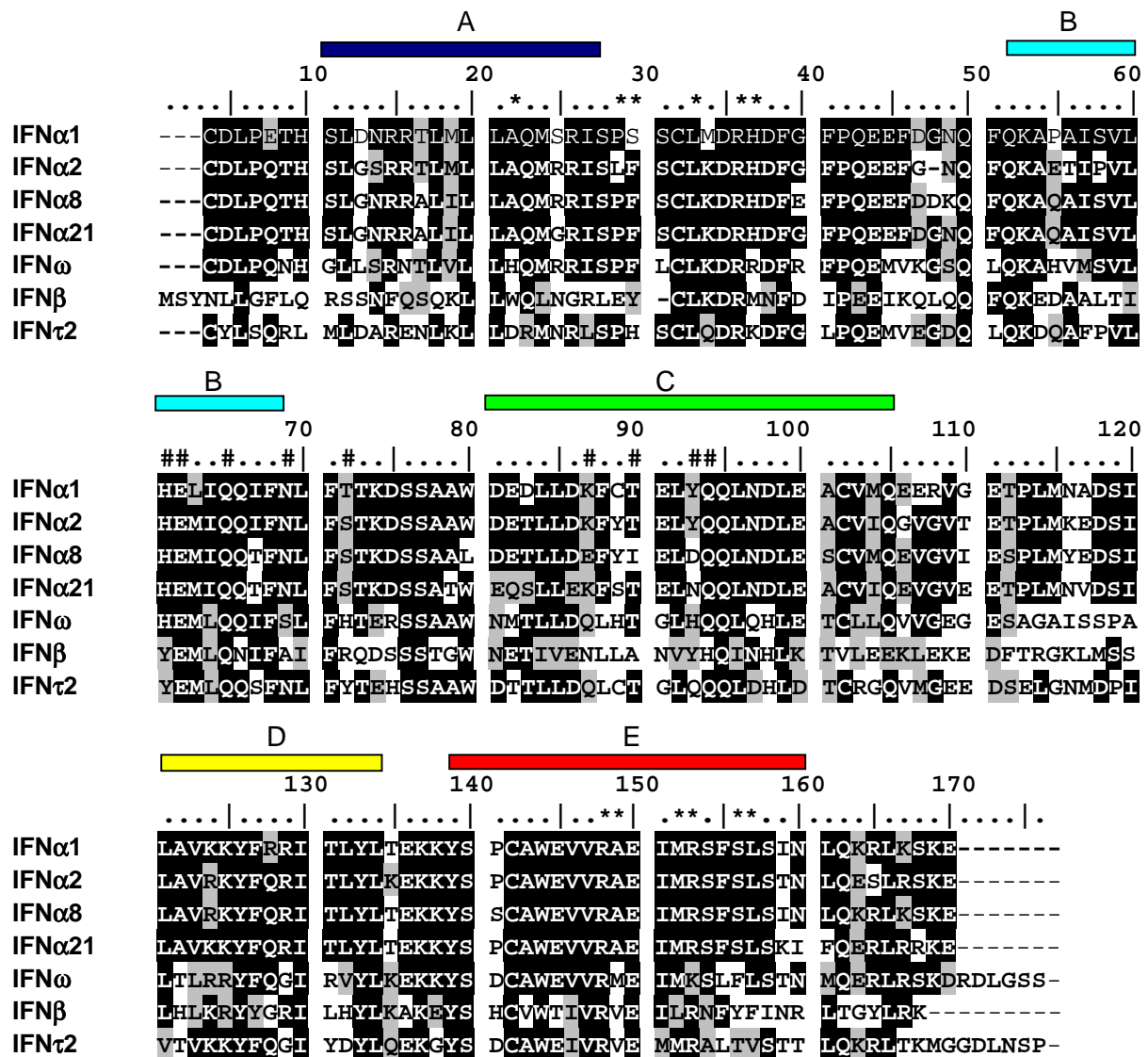


Abbildung 8 Sequenzvergleich verschiedener Interferone. Die Balken stellen die Länge der Helices dar; **dunkelblau**: A-Helix, **hellblau**: B-Helix, **grün**: C-Helix, **gelb**: D-Helix, **rot**: E-Helix; bedeutende AS für die Bindung an *ifnar2* (\*), an *ifnar1* (#).

Durch den Vergleich von Identität und Homologie (Tabelle 1) wird der hohe Verwandtschaftsgrad der Interferone untereinander deutlich. Dabei ist eine relativ große Homologie (>85 %) zwischen den IFN $\alpha$ -Subtypen festzustellen, welche ebenfalls deutlich im Sequenzvergleich der Interferone zu erkennen ist (Abbildung 8). Dagegen ist eine geringere Homologie zwischen den IFN $\alpha$ -Subtypen und den anderen Interferonen festzustellen.

Eine besondere Eigenschaft der Interferone sind die stark voneinander abweichenden isoelektrischen Punkte ( $pI$ ). Bei den IFN $\alpha$ -Subtypen und IFN $\tau$ 2 liegen die  $pI$ -Werte im sauren Bereich ( $pI$  4,8 - 6), wogegen die isoelektrischen Punkte von IFN $\beta$  und IFN $\omega$  im basischen Bereich liegen ( $pI$  9 - 9,2). Daher zeigt sich für die IFN $\alpha$ -Subtypen und das IFN $\tau$ 2 eine nach außen hin negative Oberflächenladung, für das IFN $\beta$  und das IFN $\omega$  dagegen eine positive

(Abbildung 9). Diese Unterschiede können daher die Interaktion von Interferon und Rezeptor beeinflussen, da sich die extrazelluläre Domäne (EC) von ifnar1 als Gesamtmolekül bei pH 7,5 schwach positiv geladen und ifnar2-EC im Gegensatz dazu stark negativ zeigt. Aufgrund von elektrostatischen Wechselwirkungen kann somit insbesondere die Assoziationskinetik zwischen Interferon und ifnar2 beeinflusst werden, wie bereits für IFN $\alpha$ 2 an ifnar2-EC gezeigt wurde [92].

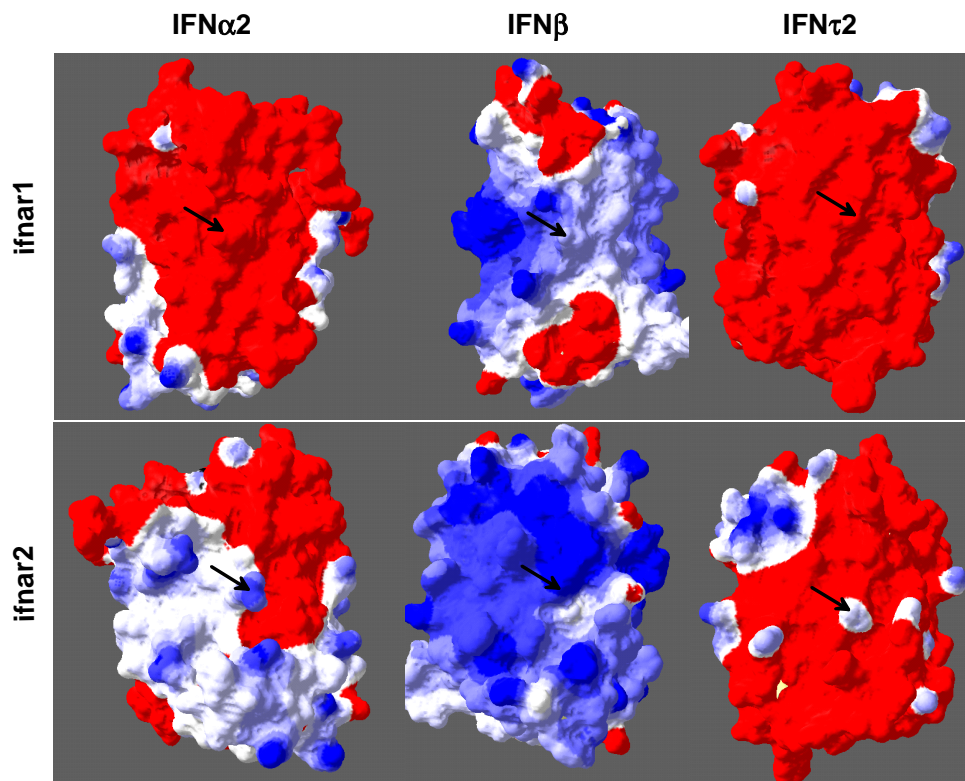


Abbildung 9 Oberflächenladung von IFN $\alpha$ 2, IFN $\beta$  und IFN $\tau$ 2. Pfeile = Überlagerungspunkte; ifnar1: IFN $\alpha$ 2 (Y89), IFN $\beta$  (Y92), IFN $\tau$ 2 (Q90); ifnar2: IFN $\alpha$ 2 (R149), IFN $\beta$  (R152), IFN $\tau$ 2 (R150). Bilder wurden mit dem SwissPdbViewer generiert [141].

### 3.2 Raumstruktur der Interferone

Nur mit der Kenntnis der Raumstruktur der einzelnen Proteine und deren Orientierung innerhalb des Gesamtkomplexes kann die Wechselwirkung der Interferone mit seinem Rezeptor aufgeklärt werden. Bisher konnte jedoch die Struktur des IFN / Rezeptor-Komplexes noch nicht gelöst werden. Bekannt sind dagegen die Strukturen von den humanen Interferonen IFN $\alpha$ 2b (Abbildung 10 A) [142] und IFN $\beta$  (Abbildung 10 B) [143] sowie von IFN $\tau$ 2 [138]. Die Interferone weisen dabei die typische Struktur eines Klasse II Cytokins auf. Die fünf  $\alpha$ -Helices (A-E) sind über kurze Schleifen von 2-4 Aminosäuren (AS) (BC-, CD- und DE-Schleife) und einem längeren Abschnitt von 30 AS (AB-Schleife) miteinander

verbunden. Das 4-Helix-Bündel wird durch die Helices A, B, C und E mit einer durchschnittlichen Länge von 13-24 AS pro Helix ausgebildet [138, 142].

Ferner wird die Interferonstruktur durch die Disulfidbrücke zwischen  $\alpha$ C29 -  $\alpha^2$ C138 /  $\alpha$ C139 (IFN $\alpha$ -Subtypen) bzw.  $\beta$ C31 -  $\beta$ C141 (IFN $\beta$ ) stabilisiert, die für die Faltung essentiell ist. Eine weitere Disulfidbrücke kommt in den IFN $\alpha$  Subtypen ( $\alpha$ C1 -  $\alpha^2$ Cys98 /  $\alpha$ Cys99) vor, die den N-Terminus mit der C-Helix verbindet. Jedoch besitzt diese für die korrekte Ausbildung der Interferonstruktur keine relevante Bedeutung. Bei IFN $\beta$ , IFN $\alpha$ 1 und IFN $\tau$ 2 existiert jeweils ein zusätzlicher freier Cysteinrest ( $\beta$ C17,  $\alpha^1/\tau^2$ C86), der an der Wechselwirkung mit dem Rezeptor jedoch nicht beteiligt ist. Ferner liegt das IFN $\beta$  über das N80 [144] sowie das IFN $\omega$  über N78 in einer glykosylierten Form vor. Die IFN $\alpha$ -Subtypen kommen dagegen, mit Ausnahme des IFN $\alpha$ 2 [145], in einer nicht-glykosylierten Form vor. Insgesamt ist die Struktur der Interferone aufgrund der fünf eng miteinander verpackten  $\alpha$ -Helices und den Disulfidbrücke(n) sehr kompakt und äußerst pH- und Temperatur-stabil.

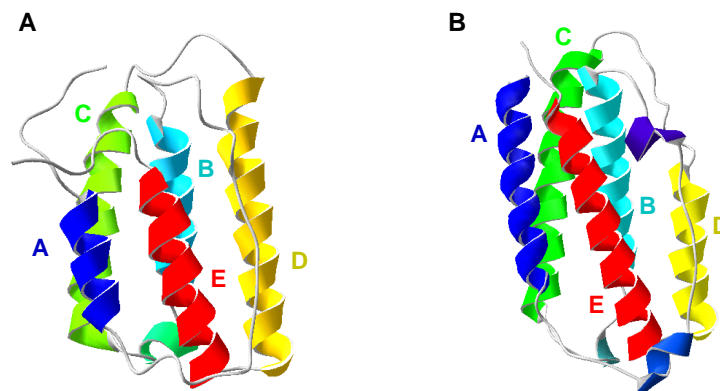


Abbildung 10 Typische Struktur der Interferone: (A) IFN $\alpha$ 2, (B) IFN $\beta$ .

#### 4 Struktur-Wirkungs-Beziehung der Interferone

Mit Hilfe von systematischen Mutagenesestudien wurde die Bindungsstelle von IFN $\alpha$ 2 und IFN $\beta$  an die Rezeptoruntereinheiten bereits näher untersucht. Die Bindung der Interferone an ifnar2 wird dabei über AS der Helices D und E und der AB- sowie DE-Schleife erreicht. [3, 89, 132, 144, 146-149]. An der Bindung zu ifnar1 sind AS der Helices B und C beteiligt [150]. Dabei konnten auf IFN $\alpha$ 2 spezifische AS identifiziert werden, die für die Bindung essentiell sind. Auf IFN $\beta$  konnten durch die Substitution von 2-8 AS in verschiedenen Abschnitten Regionen lokalisiert werden, die bei der Rezeptorbindung ebenfalls von besonderer Bedeutung sind. Dabei wurden gemeinsame Bindungsregionen auf IFN $\alpha$ 2 und IFN $\beta$  sowie auf ifnar2 identifiziert, jedoch bestehen Unterschiede bei den AS, die an der Interaktion beteiligt sein [148, 149, 151].

Für die Bindung an ifnar2 sind auf IFN $\alpha$ 2 die AS  $\alpha^2$ F27,  $\alpha^2$ L30 und  $\alpha^2$ R33 der AB-Schleife und  $\alpha^2$ R144,  $\alpha^2$ A145,  $\alpha^2$ M148,  $\alpha^2$ R149 und  $\alpha^2$ S152 der E-Helix von besonderer Bedeutung (Abbildung 11 A) [147]. Diese AS liegen innerhalb der IFN $\alpha$ -Subtypen hoch konserviert vor, sind jedoch bei IFN $\beta$  und IFN $\omega$  teilweise verändert (vgl. Abbildung 8). Ein großer Anteil an Bindungsenergie wird durch diese AS beigesteuert, so dass durch den Verlust die Interaktion instabil wird [147-149, 152]. Für die Bindung von IFN $\beta$  konnten Regionen auf der A-Helix, der AB-Schleife und der E-Helix lokalisiert werden (Abbildung 11 B). Dabei resultierten die Mutationen in einer reduzierten Bindungsaffinität zu ifnar2 und einer verminderten Aktivität um das 5-50-fache.

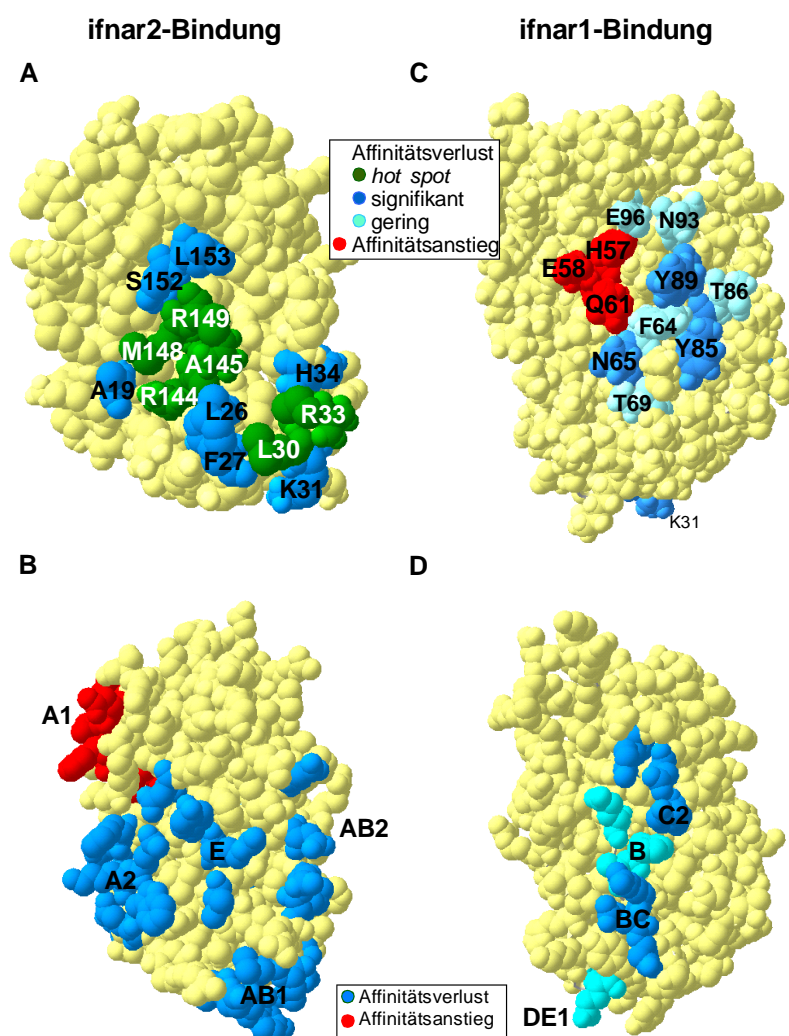


Abbildung 11 Bedeutende AS für die ifnar1- bzw. ifnar2-Bindung auf IFN $\alpha$ 2 und IFN $\beta$ . (A, C) IFN $\alpha$ 2-Bindung: Angabe spezifischer AS. (B, D) IFN $\beta$ -Bindung: Angabe spezifischer Regionen (Helices/Schleifen). (rot) Affinitätssteigerung; (grün) hot spot / Affinitätsminderung, (blau) signifikante Affinitätsminderung, (hellblau) geringer Affinitätsverlust.

Für die Bindung der Interferone an ifnar1 wurden auf IFN $\alpha$ 2 ebenfalls AS identifiziert, die von besonderer Bedeutung für die Affinität sind. So wurde durch die Alaninsubstitution der AS H57, E58 und Q61 auf der B-Helix eine Affinitätssteigerung beobachtet, dagegen für die AS N65, Y85 und Y89 in der BC-Schleife sowie auf der C-Helix eine signifikante Affinitätsminderung (Abbildung 11 C) [150]. Für die ifnar1-Bindungsstelle auf IFN $\beta$  konnten Regionen der B-, C- und D-Helix sowie der DE-Schleife ausgemacht werden (Abbildung 11 D).

Die Bindungsstelle auf ifnar2 betreffend konnte gezeigt werden, dass IFN $\alpha$ 2 und IFN $\beta$  über einen teilweise identischen Satz an AS auf ifnar2 gebunden werden, die sich jedoch in den Bindungsstärken unterscheiden [149]. So sind für die Bindung von IFN $\alpha$ 2 die AS <sup>R2</sup>I47, <sup>R2</sup>M48, <sup>R2</sup>E79 sowie <sup>R2</sup>V82 auf ifnar2 von besonderer Bedeutung (Abbildung 12 A), für die Bindung von IFN $\beta$  dagegen die AS <sup>R2</sup>I47, <sup>R2</sup>H78, <sup>R2</sup>N100 sowie <sup>R2</sup>W102 (Abbildung 12 B).

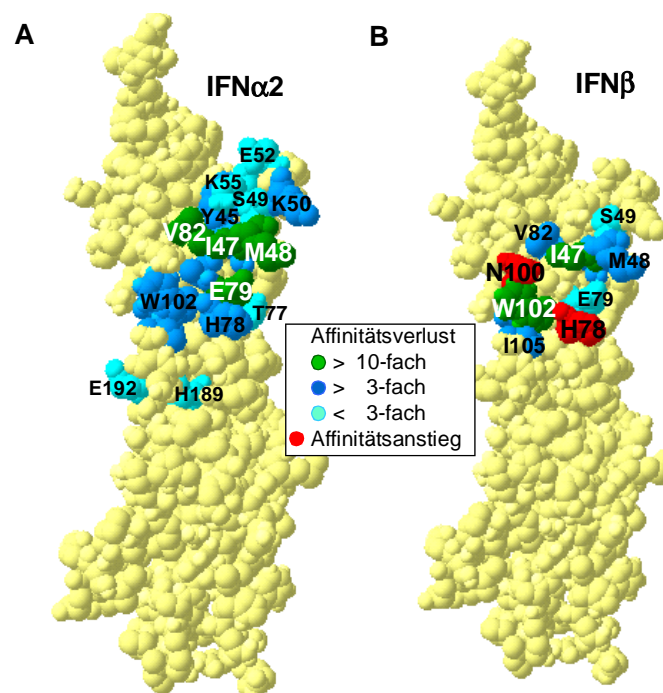


Abbildung 12 Wichtige AS auf ifnar2-EC für die Bindung von (A) IFN $\alpha$ 2 und (B) IFN $\beta$ .

Mit Hilfe der NMR konnte die 3D-Struktur der extrazellulären Domäne von ifnar2 gelöst werden [153]. Ferner wurde für die Untersuchung signifikanter Wechselwirkungen im IFN $\alpha$ 2-ifnar2-Komplex eine *double mutant cycle* Analyse durchgeführt. Hierbei konnten intermolekulare Wechselwirkungen zwischen den AS  $\alpha^2$ F27 (IFN) – <sup>R2</sup>Y45 (ifnar2),  $\alpha^2$ D35 – <sup>R2</sup>K50,  $\alpha^2$ R144 – <sup>R2</sup>M48,  $\alpha^2$ R149 – <sup>R2</sup>E79 sowie  $\alpha^2$ S152 – <sup>R2</sup>H78 nachgewiesen werden [152-154]. Basierend darauf konnte ein Modell des IFN / ifnar2-EC-Komplexes aufgestellt werden (Abbildung 13) [152].



Signifikante Unterschiede im Interaktionsepitop zwischen IFN $\beta$  und IFN $\alpha$ 2 zu ifnar2 konnten nur vereinzelt gefunden werden, so z.B. die Interaktion des  $\beta$ W22 auf IFN $\beta$  mit dem  $R^2$ W102 des ifnar2, welche für das IFN $\alpha$ 2 (hier:  $\alpha^2$ A19) nicht nachgewiesen werden konnte. Zum anderen wurde gezeigt, dass eine  $\beta$ R35A-Mutation im IFN $\beta$  eine 10-fach reduzierte Bindung, jedoch die homologe  $\alpha^2$ R33A-Mutation bei IFN $\alpha$ 2 eine 10.000-fache Reduzierung der Bindung verursacht [147, 152]

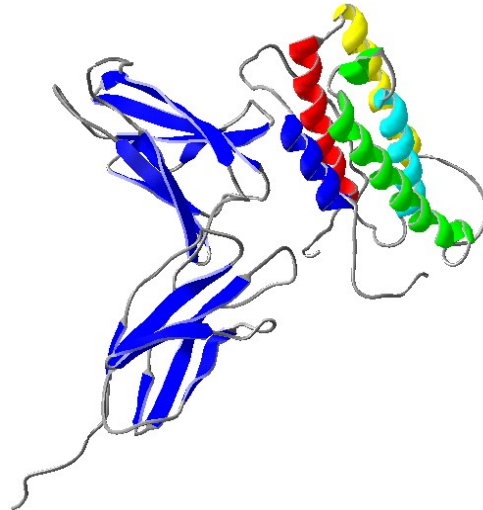


Abbildung 13 Struktur des Komplexes von IFN $\alpha$ 2 mit ifnar2-EC. Die Struktur von ifnar2-EC wurde über NMR-Analyse ermittelt [152].

Im Gegensatz zu der Interaktion mit ifnar2 wurden hinsichtlich der Bindungsfläche auf der ifnar1-Untereinheit bisher keine detaillierten Untersuchungen angestellt. Zu einem besteht das Problem in der schnellen transienten Bindung der Interferone an ifnar1 und zum anderen in der Unkenntnis der strukturellen Anordnung der extrazellulären Domäne. Bekannt ist, dass von der extrazellulären Domäne des ifnar1 die Subdomänen SD1-3 absolut kritisch für die Interferonbindung sind [155-157]. Für die SD4, welche die Verbindungsdomäne zu der Transmembrandomäne darstellt, konnte keine wesentliche Rolle für die Erkennung und Bindung der Interferone sowie für die Assemblierung eines ternären Komplexes nachgewiesen werden [94]. Jedoch scheint die SD4 für die Effizienz der Rekrutierung des IFN-ifnar2-Komplexes bedeutend zu sein. So spielt die SD4 möglicherweise eine Schlüsselrolle für die optimale Orientierung der SD123 von ifnar1 auf der Membran, um die ifnar1-Bindungsfläche mit einer erhöhten Kollisionseffizienz dem IFN-ifnar2-Komplex zu präsentieren [94]. Durch Konkurrenz konnte für IFN $\beta$  und IFN $\alpha$ 2 ein gemeinsames Interaktionsepitop auf ifnar1 identifiziert werden [94].

Außerdem konnte mit Hilfe von Hybriduntersuchungen verschiedener IFN $\alpha$ -Subtypen eine Änderung im Aktivitätsprofil im Vergleich zum jeweiligen parentalen Interferon nachgewiesen werden [63, 65, 66]. Dabei zeigte sich die N-terminale Region der Interferone als kritisch für die Interaktion mit den Rezeptoruntereinheiten. Der C-terminalen Region konnte dagegen eine bedeutende Funktion in der Aktivierung der antiproliferativen Aktivität zugeordnet werden [65]. Ebenfalls können alternative Glykosylierungs-Zustände verantwortlich sein für unterschiedliche Wirkspektren. So wurde beobachtet, dass IFN $\alpha$ 2 in Leukozyten nach einer Virus-stimulierten Expression in einer voll-glykolysierten und in einer nur teils glykolysierten Form freigesetzt wurde [61].



## 5 Zielsetzung

Die bedeutendste Eigenschaft der Interferone ist die Aktivierung verschiedener Signalwege über einen gemeinsamen Rezeptor. Wie Interferone diese differentielle Induktion von Signalkaskaden erreichen, sollte mit der vorliegenden Arbeit geklärt werden. Der Mechanismus der Komplex-Assemblierung sollte analysiert sowie ein möglicher Zusammenhang zwischen Ligand / Rezeptor-Interaktion und Aktivität hergestellt werden. Hierfür sollten die Stöchiometrie, die Bindungsaffinität und die Dynamik der IFN / Rezeptor-Interaktion individuell oder im Komplex *in vitro* untersucht werden. Ferner sollte die Bindungsstellen durch Kompetition überprüft werden. Voraussetzung für entsprechende Untersuchungen war die Aufreinigung verschiedener Interferone, Mutanten sowie Cystein-Mutanten zur selektiven Fluoreszenzmarkierung in ausreichender Menge und Reinheit

Um die individuelle Interaktion und die Assemblierung eines ternäre Komplexes *in vitro* erfassen zu können, wurden die Untersuchungen auf modifizierten Oberfläche durchgeführt werden, die kovalent gekoppelte multivalente Chelatorkopfguppen tragen. Dadurch konnte eine funktionale Immobilisierung der extrazellulären Rezeptoruntereinheiten über ein Dekahistidin-tag ermöglicht werden. Diese Immobilisierungstechnik wurde mit einer markierungsfreien Detektionstechnik sowie einer Oberflächen-sensitive Fluoreszenz-Detektion kombiniert.

Um Unterschiede im Aktivierungsmuster der Interferone zu erkennen, wurden verschiedene Aktivitäten *in vivo* untersucht. Hierzu wurden die kurzfristige aktivierte ISGF3-Assemblierung und antivirale Aktivität sowie die langfristig induzierte antiproliferative Aktivität herangezogen.

Der Einfluss der Bindungsaffinität auf die Aktivität wurde durch den Austausch spezifischer AS innerhalb des Interaktionsepitops zu den Rezeptoruntereinheiten untersucht. Die Änderung der Bindungsaffinität sowie deren Effekt auf die Aktivität wurden überprüft. So könnten durch eine verbesserte Kenntnis des Zusammenwirkens von Affinität und Aktivität Interferone entwickelt werden, die durch Modulierung der Bindung spezifische Signalwege aktivieren. Dies könnte zu einer verbesserten therapeutischen Anwendung in der Medizin führen.

## 6 Strategie

### 6.1 Expression verschiedener humaner Interferone im heterologen System

Voraussetzung für die Untersuchung der IFN / Rezeptor-Interaktion sowie der Aktivität war eine effiziente Expression möglichst verschiedener Interferone und Mutanten in ausreichenden Mengen. Aus diesen Gründen, wurden zwei heterologe Expressionsstrategien verfolgt. Mit Hilfe von *Escherichia coli* (*E. coli*) wurden verschiedene IFN $\alpha$ -Subtypen und Mutanten exprimiert. Das IFN $\omega$  und Mutanten wurde mit Hilfe von *Spodoptera frugiperda*-Insektenzellen (*Sf9*-Zellen) exprimiert. Das IFN $\beta$  wurde durch Serono GmbH und das ovine IFN $\tau$ 2 (IFN $\tau$ 2) wurde durch Jacques Martal (INRA; Jouy-en-Joses) zur Verfügung gestellt.

#### 6.1.1 Rekombinante Expression von Interferonen in *E. coli*

Bei der Expression von Interferonen im heterologen System stellen die Toxizität einiger Interferone sowie niedrige Expressionsraten ein Problem dar. So wurde z.B. für das IFN $\beta$  eine toxische Wirkung auf *E. coli* beobachtet [158, 159]. Die geringen Expressionsraten lassen sich hauptsächlich durch die hohe Anzahl an seltenen Codons innerhalb der Interferonsequenzen erklären, für die im prokaryontischen System eine veränderte Verfügbarkeit verschiedener t-RNAs gegenüber dem eukaryontischen vorliegt. So liegt in den Interferonen ein hoher Anteil an Argininresten (R) in Clustern im N-terminalen Bereich (AS 12-23) vor, die durch die seltenen Codons AGG oder AGA codiert werden. Um daher einen vorzeitigen Transkriptionsabbruch zu verhindern, wurden die AGA / AGG-Cluster im Anfangsbereich der Interferonsequenzen zu CGC / CGG verändert, für die eine höhere Verfügbarkeit von t-RNA in *E. coli* vorliegt. Weitere Probleme wurden bei der Expression von IFN $\beta$  durch die Bildung von Chimeren über den freien Cysteinrest und der intrinsischen Hydrophobizität beobachtet [160]. Die Ausbildung intermolekularer Disulfidbrücken war daher speziell bei IFN $\alpha$ 1 oder den Cystein-Mutanten für die ortsspezifische Fluoreszenzmarkierung zu erwarten, da diese ebenfalls einen frei zugänglichen Cysteinrest besitzen.

Die Expression der IFN $\alpha$ -Subtypen in *E. coli* wurde mit Hilfe des Vektors pT7T3 (pT7-Vektor) durchgeführt, mit dem bereits das IFN $\alpha$ 2 erfolgreich exprimiert wurde [92]. Der Vektor ist ein bi-cistronisches Plasmidkonstrukt, welches ein Fusionsprotein simuliert (Abbildung 14). Dadurch kann die hohe Abbruchwahrscheinlichkeit der Transkription im 5'-Bereich mancher DNA-Sequenzen verhindert werden. Direkt nach dem Promotor ist eine kurze DNA-Sequenz eingebaut, welche so optimiert ist, dass die RNA-Polymerase nicht mehr die Transkriptionsvorlage verlässt. Direkt anschließend wird die gewünschte DNA-Sequenz

eingbracht (Abbildung 14). Dadurch kann die Expressionsrate des Zielproteins erhöht werden, da eine höhere Wahrscheinlichkeit der vollständigen Transkription und Translation besteht.

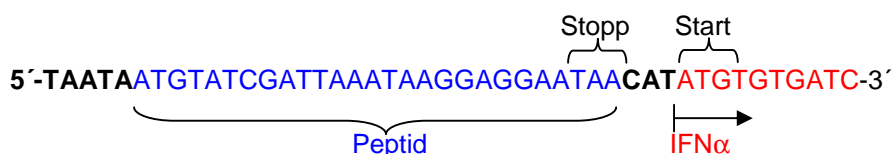


Abbildung 14 Bi-cistronischer Aufbau nach der Promotorregion des pT7-Vektors.

Die Gene der humanen IFN $\alpha$ -Subtypen wurden direkt aus der genomischen DNA amplifiziert und in den pT7-Vektor über entsprechende Schnittstellen eingefügt. Der Vektor enthält einen IPTG-induzierbaren P<sub>tac</sub>-Promotor, durch den hohe Expressionsraten erzielt werden. Mit Hilfe der Mutagenese seltener Codons in der Interferonsequenz sowie der Auswahl eines bi-cistronischen Vektors konnte eine ausreichende Expressionsrate erreicht werden. Der Nachteil einer Expression von Interferonen in *E. coli* war deren Aggregation und die Ablagerung in Einschlusskörperchen (*inclusion-bodies*). Der größte Anteil an Interferonen lag in diesen Einschlusskörperchen vor. Funktionale Interferone wurden daher durch Solubilisierung mit denaturierenden Reagenzien und anschließender Rückfaltung gewonnen. Die Abtrennung der Monomere wurde über Größenaufschlußchromatographie (GF) durchgeführt. Durch *Reversed Phase* Chromatographie (RPC) wurden die Interferone zusätzlich aufgereinigt, um z.B. unterschiedliche Markierungsgrade bei Fluoreszenz markierten Interferonen aufgrund einer unzureichenden Ausbildung der Disulfidbrücken eventuell abtrennen zu können.

### 6.1.2 Rekombinante Expression in Insektenzellen

Die Expression in *Spodoptera frugiperda*-Insektenzellen (*Sf9*-Zellen) in Kombination mit dem Baculovirus AcNPV [161] wurde für IFN $\omega$  und Mutanten als Alternative gewählt. Baculoviren (Familie: *Baculoviridae*) gehören zu der Familie der Doppelstrang (ds) DNA-Viren, die Insektenzellen als natürlichen Wirt besitzen. Die Infektion anderer Organismen durch Baculoviren findet nicht statt, was den Umgang mit Baculoviren stark vereinfacht. Während eines Infektionszyklus wird eine Vielzahl an Proteinen für die Replikation und Knospung exprimiert. Durch Insertion des gewünschten Gens in das Baculoviren-System ist eine heterologe Proteinexpression möglich.

Die Insertion des Gens wurde über homologe Rekombination durchgeführt. Linarisierte genomische Virus-DNA und ein Transfer-Vektor werden in *Sf9*-Zellen co-transfiziert, was eine Rezirkulation der Virus-DNA durch homologe Rekombination hervorruft. Da nur die zirkuläre Virus-DNA transkribiert und repliziert wurde, war die homologe Rekombination

zugleich ein Selektionsmarker. Zur Generierung der Baculoviren, welche das IFN $\omega$ -Gen tragen, wurde das Baculovirus Expressions Vektor System (Baculogold®, BD Bioscience) verwendet. Hierzu wurde zunächst das IFN $\omega$ -Gen in den Transfervektor pAc-GP67-B eingebracht. Der Transfervektor enthält einen Polyhydrin Promotor mit anschließender Polylinker-Klonierungsstelle, welcher in der späten Phase der viralen Replikation hohe Expressionsraten begünstigt. Eine N-terminale Sekretionssequenz des viralen Proteins pg67 initiiert den Sekretionsprozess, so dass eine Modifikation des Proteins erreicht werden konnte und das Protein in das umgebende Medium abgegeben wurde.

## 6.2 Mutagenese zur Untersuchung der IFN / Rezeptor-Assemblierung

Die Untersuchung von schnellen Bindungskinetiken, Bindungsstellen und ternärer Komplex-Assemblierung wurde mit Hilfe von ortsspezifischer Fluoreszenz markierten Cystein-Mutanten  $\alpha$ 2S136C ( $\alpha$ 2) bzw.  $\alpha/\omega$ S137C durchgeführt (Abbildung 15). Über den Cysteinrest konnte ein Fluorophor selektiv an die SH-Gruppe gekoppelt werden. Für die Untersuchung individueller Interaktionsstellen zwischen Interferone und den Rezeptoruntereinheiten wurden ortsspezifische Mutagenesen in der Interferonsequenz durchgeführt, die in potentiellen Bindungsregionen vorliegen. Homologe Mutagenesen wurden zudem in den verschiedenen Interferonen durchgeführt, um durch eventuelle Unterschiede in der Bindungsaffinität die Bedeutung der AS bei den Interferonen genauer zu definieren. Die ortsspezifische Mutagenese wurde mit Hilfe der LCR-(Ligase-Chain-Reaction)-Methode oder der Quick-change-Mehode durchgeführt [162, 163].

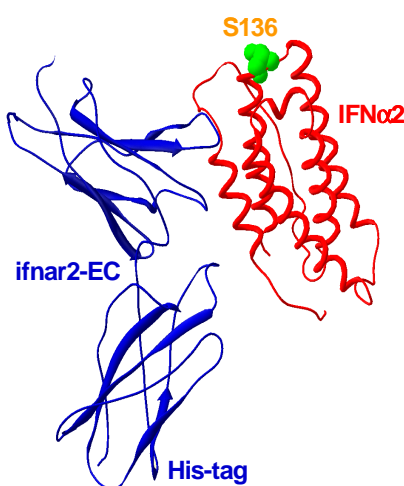


Abbildung 15 Cystein-Mutante von IFN $\alpha$ 2 in Bindung mit ifnar2.

### 6.3 Zelluläre Aktivitätsuntersuchungen

Obwohl Interferone über einen gemeinsamen Rezeptor agieren werden unterschiedliche Signalkaskaden in Zellen ausgelöst. Um eine Charakterisierung der ausgelösten Zellaktivitäten durch verschiedene Interferone durchführen zu können, wurden verschiedene Signalwege untersucht, die über eine kürzere und längere Zeitperiode aktiviert werden. Hierzu wurden die kurzfristig aktivierte ISGF3-Assemblierung und die antivirale Aktivität sowie die langfristig induzierte antiproliferative Aktivität ausgewählt. Für die Charakterisierung der verschiedenen durch Interferon induzierten Signalwege wurden die eukaryontische 2fTGH-Zelllinie für den antiviralen und antiproliferativen Assay sowie die HL116-Zelllinie für den indirekten Nachweis der ISGF3-Assemblierung verwendet. Durch die stabile Transfektion des *Luciferase*-Gens unter der Kontrolle des 6-16-Promotors wurde die HL116-Zelllinie speziell für den indirekten Nachweis der ISGF3-Assemblierung nach der Bindung von Interferonen konzipiert. Über die Überlebensrate von 2fTGH-Zellen wurde die antivirale Aktivität der Interferone nach der Infektion mit vesikulären Stomatitis Viren (VSV) bestimmt. Die antiproliferative Aktivität wurde ebenfalls über die Bestimmung der Zellzahl nach der Zugabe verschiedener Interferone detektiert.

### 6.4 Immobilisierung von Rezeptoruntereinheiten und Detektionssysteme.

Für die Untersuchung von IFN / Rezeptor-Interaktionen wurden die extrazellulären Rezeptordomänen über Deka-Histidin-tags (C-terminal) auf einer modifizierten Oberfläche mit integrierten NTA-Chelatoren (Abbildung 16 C) immobilisiert. Da Histidine Metallionen koordinieren, können His-tag modifizierte Proteine auf eine mit Metall-Ionen beladene Oberfläche geladen werden. Zur Immobilisierung der Rezeptor-Untereinheiten wurde ein multivalenter Chelator [164] verwendet.

In dieser Arbeit wurden zwei Oberflächen-Architekturen für die Immobilisierung verwendet. So wurde der Chelator kovalent an ein PEG-Polymer gekoppelt (Abbildung 16 A). Diese Chelator-Oberflächen sind sehr stabil, jedoch wird keine laterale Diffusion der Proteine ermöglicht. Eine Interaktion zwischen den immobilisierten Proteinen war dadurch nicht erreichbar. Mit kovalenten Oberflächen wurde daher die Interaktion mit den einzelnen Rezeptor-Untereinheiten untersucht. Um jedoch die Assemblierung ternärer Komplexe zu untersuchen, wurde der Bindungsprozess der Interferone an die extrazellulären Rezeptordomänen ifnar2-EC und ifnar1-EC wie auf einer Plasmamembran simuliert. Hierdurch konnte eine laterale Diffusion und eine korrekte Orientierung der Rezeptoruntereinheiten zueinander gewährleistet werden. Für diese Untersuchungen wurde daher eine multivalente Chelator-Kopfgruppe (bis-NTA) kovalent an zwei Alkylketten gekoppelt [164, 165] und in eine Festkörper-unterstützte Lipiddoppelschicht eingebunden (Abbildung 16 B).

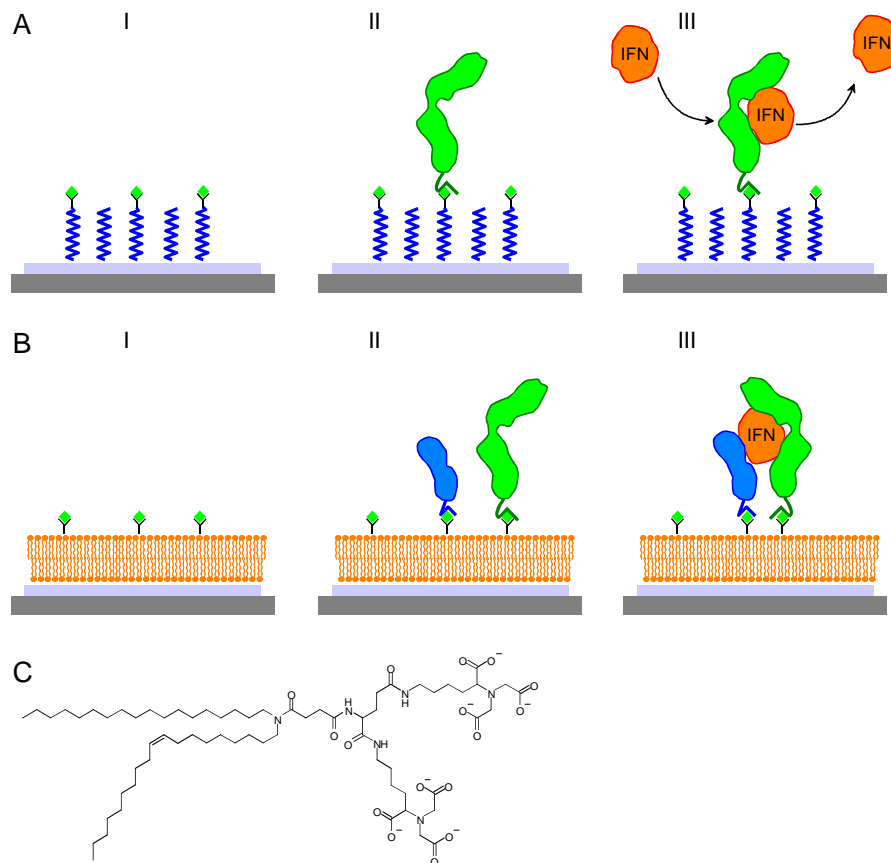


Abbildung 16 Darstellung der Interaktion zwischen Interferon und immobilisierter Rezeptoruntereinheit auf unterschiedlich modifizierten Oberflächen. Zunächst wird die (I) Oberfläche mit Ni<sup>2+</sup> beladen, (II) die Rezeptoruntereinheiten immobilisiert und (III) Interferon injiziert. (A) kovalent modifizierten Ni<sup>2+</sup>-NTA-Oberflächen (B) Rekonstruktion beider Rezeptoruntereinheiten und Bildung des ternären Komplexes auf einer Lipiddoppelschicht, welche laterale Diffusion simuliert. (C) Struktur des bis-NTA Chelator Lipid.

Mit Hilfe der Reflektometrischen Interferenz-Spektroskopie (RIf-Spektroskopie) konnte die Bindung der Interferone an die Rezeptoruntereinheiten detektiert werden. Mit Siliziumdioxid beschichtete Oberflächen dienten hier als Signalüberträger. An den Grenzflächen der SiO<sub>2</sub>-Schicht wird das eingestrahelte Licht reflektiert, wobei die reflektierten Strahlen miteinander interferieren. Das resultierende Interferenzspektrum wird durch die jeweilige Schichtdicke bestimmt. Durch die Bindung von Proteinen an die Oberfläche kommt es zu einer Änderung der Schichtdicke (Abbildung 17 A), was zu einer Verschiebung des Interferenzspektrums führt (Abbildung 17 B). Dadurch konnte sowohl die Immobilisierung von modifizierten Proteinen als auch die Interaktion eines Liganden detektiert werden.

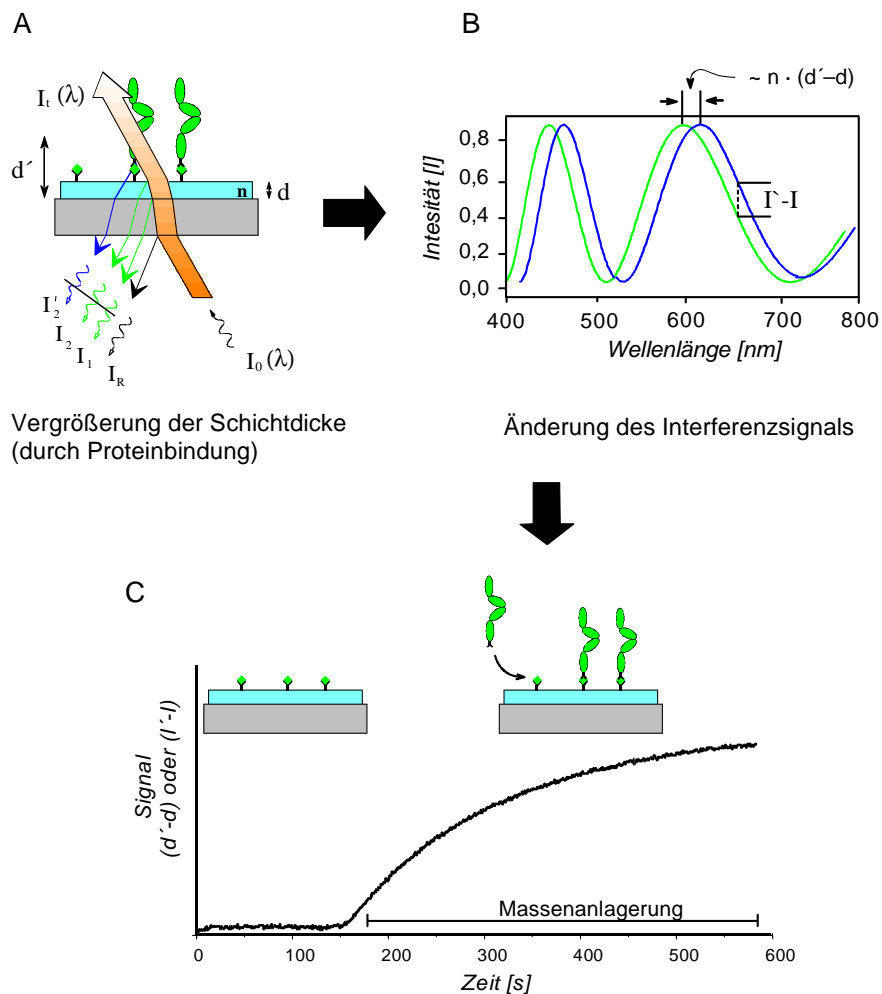


Abbildung 17 Prinzip von Rf-Spektroskopie. (A-C) Die Immobilisierung von Proteinen verursacht eine Änderung der Oberflächendichte und somit eine Änderung des Interferenzspektrums, die detektiert werden kann.

RfS-Messungen [166] bieten den Vorteil, dass Protein-Protein-Wechselwirkungen sowie Stöchiometrie der Proteine sowohl mit definierten Konzentrationen als auch auf komplexen Oberflächen analysiert werden konnten. Die Detektion war zudem markierungsfrei und zeitaufgelöst, so dass auch transiente Interaktionen verfolgt werden konnten.

Totalinterne Reflexions-Fluoreszenz Spektroskopie (TIRF-Spektroskopie) bietet die Möglichkeit, selektiv die Fluorophore anzuregen, die nah der Oberfläche gebunden sind. Totalreflexion tritt auf, wenn Licht, das in einem optisch dichten Medium, wie beispielsweise Glas propagiert, eine Grenzfläche zu einem weniger dichten Medium, wie einer wässrigen Lösung, erreicht und der Einfallswinkel größer als der Grenzwinkel ist. Am Ort der Totalreflexion wird ein evaneszentes Feld generiert, das exponentiell abfällt und in das weniger dichte Medium typischerweise etwa 100 nm weit eintritt (Abbildung 18). Aufgrund dieser geringen Eindringtiefe werden nur die oberflächen-gebundenen Fluorophore angeregt. Daraus ergibt sich eine niedrige Hintergrundfluoreszenz.

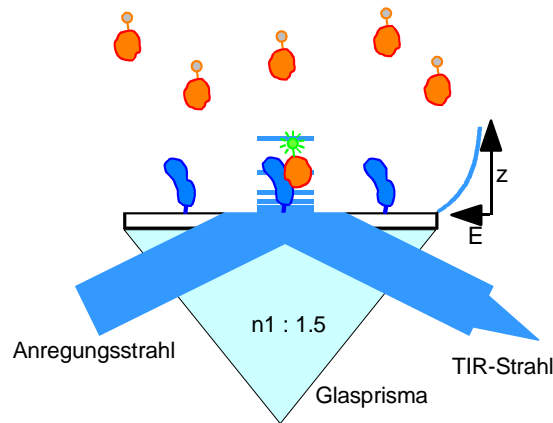


Abbildung 18 Prinzip von TIRF-Spektroskopie

Diese Methode ist wesentlich empfindlicher als die RIF-Spektroskopie. Es konnten niedrigere Rezeptorkonzentrationen verwendet werden, was die Untersuchung der ternären Komplex-Assemblierung auf einer Festkörper-unterstützten Lipiddoppelschicht bei niedrigen Oberflächenkonzentrationen ermöglicht. Wurde mit Fluoreszenz markierten Interferonen gearbeitet, konnten die Ereignisse an der Oberfläche durch die Kombination der beiden Messtechniken auf zwei unabhängigen Kanälen simultan beobachtet werden (Abbildung 19). Ferner war der Vorteil von TIRF, im Gegensatz zu RIF, die Unempfindlichkeit gegenüber unspezifischen Effekten. Dadurch konnten schnelle transiente Bindungsprozesse besser aufgelöst, spezifische IFN / Rezeptor-Interaktionen und dynamische Austauschprozesse genauer untersucht werden.

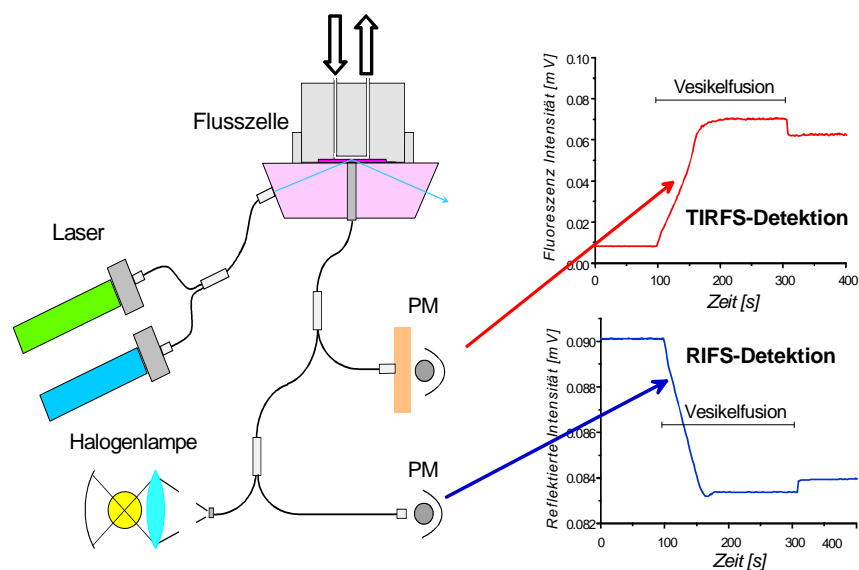


Abbildung 19 Schematische Darstellung der Kombination von TIRF-Spektroskopie und RIFs.



## 6.5 Ligandenbindung in lebenden Zellen

Um die Bindung der Interferone und die laterale Diffusion der Rezeptoruntereinheiten auf einer Zelloberfläche beobachten zu können, wurde eine Technik verwendet mit der diese Ereignisse beobachtet und aufgelöst werden konnten. Von Interesse waren ferner die Lokalisation der Rezeptoruntereinheiten sowie deren Internalisierung. Hierzu wurden die *Laser Scanning* Mikroskopie (LSM) und die TIRF-Mikroskopie ausgewählt, mit deren Hilfe es möglich ist diese Ereignisse darzustellen.

Für die Beobachtung von Einzelmolekülen waren Fluoreszenz markierte Interferone notwendig, die über einen längeren Zeitraum photostabil blieben. Bei herkömmlichen Fluorophoren, wie Oregon Green (OG) oder Alexa Fluor (AF), war dies jedoch nicht gegeben. Um jedoch die Diffusion und die Internalisierung über einen längeren Zeitraum beobachtet zu können, wurden daher Quantum Dot®-Streptavidin-Konjugate (QD) verwendet (Abbildung 20 A, B). QDs sind Halbleiter-Kristalle mit einer Größe von 10-15 nm und weisen 15-25 konjugierte Streptavidine pro QD auf. Der Vorteil der QDs lag in der hohen Photostabilität im Vergleich zu organischen Fluorophoren (Abbildung 21 A) und einer erhöhten Sensitivität aufgrund einer reduzierten Auto-Fluoreszenz. Ein weiterer Vorteil lag in der Absorption bzw. Extinktion im kurzen Wellenlängenbereich und in der fixen, symmetrischen Emission, die dadurch unabhängig von der Extinktionswellenlänge war. Durch den großen „Stokes *shift*“ konnte eine optimale Abtrennung von Extinktion und Emission erreicht werden (Abbildung 21 B).

Der Nachteil von im Handel erhältlichen QD war der hohe Anteil an konjugiertem Streptavidin. Bedingt durch 15-25 Streptavidine pro QD konnte eine entsprechende Anzahl an Interferonen pro QD binden.

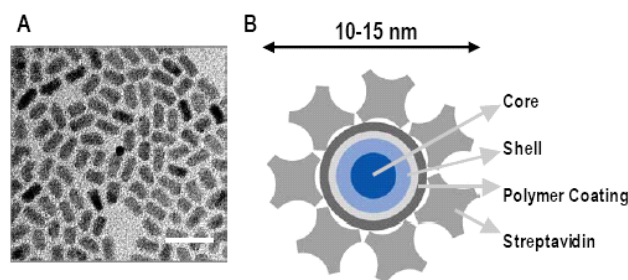


Abbildung 20 (A) Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahme von QDs im Elektronenmikroskop und (B) Darstellung des schematischen Aufbaus eines QDs.

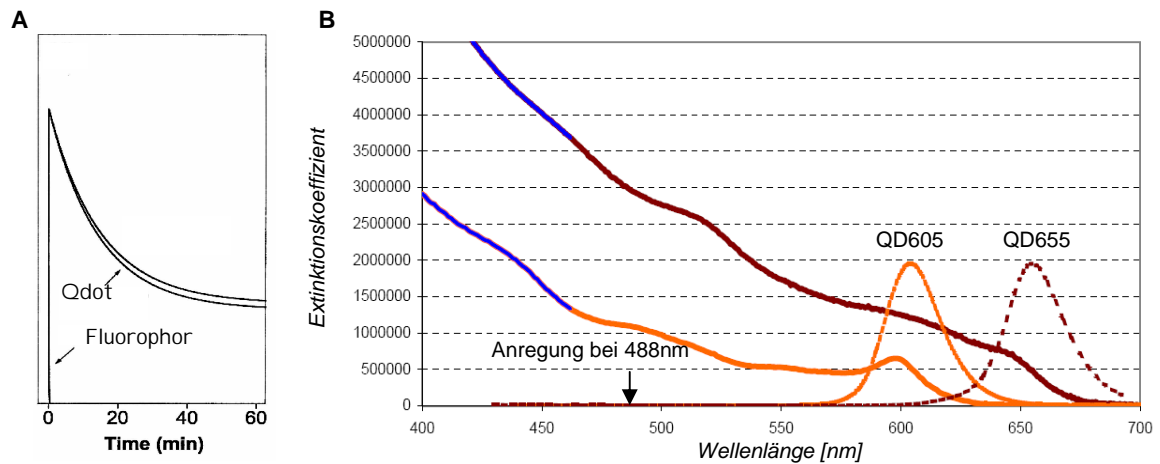


Abbildung 21 Vergleich (A) der Photostabilität zwischen Fluorophor und QD und der (B) Emissions-/ Extinktionsspektren von QD605 und QD655.

Da eukaryontische Zellen eine geringe Interferonrezeptordichte aufweisen, wurden HeLa-Zellen mit der Rezeptoruntereinheit ifnar2 transfiziert. Um die Transfektionseffizienz sowie auch Co-Lokalisation von Interferonen und Rezeptor bestimmen zu können, wurde C-terminal ein EGFP an das ifnar2 fusioniert, so dass das EGFP im Cytosol lokalisiert vorliegt. Verschiedene Cystein-Mutanten wurden zum Zweck der QD-Markierung mit einem Biotinmaleimid markiert und aufgereinigt.

### III Materialien

#### 1 Chemikalien

Allgemeine Chemikalien	Hersteller
Agar	GibcoBRL
Agarose	Sigma Chemicals Co.
Ampicillin	Sigma Chemicals Co.
APS	Sigma Chemicals Co.
ATP (Adenosin-Triphosphat)	Sigma Chemicals Co.
BSA (Bovines Serumalbumin)	New England BioLabs
Bromphenolblau	Merck KGaA
CoEnzym A Trilithiumsalz	Sigma Chemicals Co.
Coomassie Brilliant Blue	Sigma Chemicals Co.
D-Luciferin, Natriumsalz	Sigma Chemicals Co.
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Fluka Chemie GmbH
Dithiothreitol (DTT)	Sigma Chemicals Co.
EDTA, Dinatriumsalz	Carl Roth, GmbH
Essigsäure, 99% (v/v)	Riedel de Haen GmbH
Ethanol, absolut	Riedel de Haen GmbH
Ethidiumbromid	Merck KGaA
Glycerin	Carl Roth, GmbH
Glycin	Carl Roth, GmbH
Harnstoff	ICN Biomedicals, Inc.
HEPES	Sigma Chemicals Co.
Kaliumphosphat	Carl Roth, GmbH
Kaliumdihydrogenphosphat	Carl Roth, GmbH
Kristallviolett	Sigma Chemicals Co.
Magnesiumchlorid	Riedel de Haen GmbH
MES, Kaliumsalz	Sigma Chemicals Co.
Methanol	Riedel de Haen GmbH
Natriumchlorid	Riedel de Haen GmbH
Natriumhydroxid	Riedel de Haen GmbH
Polyethylenglycol (PEG)	Sigma Chemicals GmbH
Protogel® (Acrylamid/Bisacrylamid-lsg.)	Carl Roth, GmbH
Salzsäure, konz.	Merck KGaA
SDS (Natrium-Dodecylsulfat)	Carl Roth, GmbH
TEMED	Sigma Chemicals Co.
Tricin	Carl Roth, GmbH
TRIS	Fluka Chemie GmbH
Wasserstoffperoxid, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , 30%	Merck KGaA

## 2 Enzyme, Reagenzien und Vektoren für molekularbiologische Methoden

Enzyme	Hersteller
<i>Bam</i> HI	MBI Fermentas
CIAP (Alkaline Phosphatase)	New England BioLabs
<i>Dpn</i> I	MBI Fermentas
<i>Eco</i> RI	MBI Fermentas
Lysozym	Sigma Chemicals Co.
<i>Pwo</i> -DNA-Polymerase	PeqLab
RNAseA	Qiagen
<i>Sal</i> I	New England BioLabs
T4-DNA-Ligase	MBI Fermentas
T4-Polynukleotid-Kinase	MBI Fermentas
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase	PeqLab
<i>Xba</i> I	MBI Fermentas
<i>Xmn</i> I	New England BioLabs
Reagenzien / DNA-Leiter	
1 kb DNA-Leiter	New England BioLabs
100 bp DNA-Leiter	New England BioLabs
Ampicillin	Sigma Chemicals Co.
dNTP-Mix	Roche Diagnostics GmbH
G-Puffer (10-fach)	MBI Fermentas
Hefe-Extrakt	Carl Roth, GmbH
IPTG	PeqLab Laboratories
Magnesiumchlorid-lösung für PCR	PeqLab Laboratories
Magnesiumsulfat-lösung für PCR	PeqLab Laboratories
NEBuffer für <i>Sal</i> I (10-fach)	New England BioLabs
Nucleo Spin® Plasmid- <i>Kit</i> (Mini)	Macherey-Nagel (MN)
QIAEX II® Gel-Extraction- <i>Kit</i>	QIAGEN
QIAGEN® Plasmid Midi <i>Kit</i> (Midi)	QIAGEN
QIAquick® PCR Purification Kit	QIAGEN
Pepton/Trypton von Casein	Carl Roth, GmbH
PNK-Buffer A	MBI Fermentas
Puffer (10-fach) für <i>Pwo</i> mit/ohne MgSO <sub>4</sub>	PeqLab Laboratories
<i>Pwo</i> -Buffer	PeqLab Laboratories
Y-Tango <sup>+</sup> -Buffer (10-fach)	MBI Fermentas
Vektoren	
pT7T3-18U (pT7T3)	
pAc-GP67-B	BD Bioscience Pharmingen
pMal-c2X	

### 3 Zellkultur

Reagenzien	Hersteller
Baculogold linearized baculoviral DNA	BD Bioscience Pharmingen
Cellstar® Gewebekulturschale, 35/10 mm	Greiner Labortechnik
Cellstar® 24-well-Platte	Greiner Labortechnik
Cellstar® 96-well-Platte	Greiner Labortechnik
Cellstar® T25-Flasche	Greiner Labortechnik
Cellstar® T75-Flasche	Greiner Labortechnik
DMEM	PAA laboratories GmbH
DMSO, steril	Sigma Chemical Co
Earles's MEM	PAA laboratories GmbH
FCS (10x)	Biochrom AG
Glutamin (100x)	Biochrom AG
HAT-supplement (50x)	Biochrom AG
HygromycinB, 50 mg/ml, 20 ml	PAA laboratories GmbH
NEAA (100x)	PAA laboratories GmbH
PBS (1x)	PAA laboratories GmbH
Penicillin/Streptomycin (100x)	PAA laboratories GmbH
Pluronic® F68, 10 %	Invitrogen
Pyruvat	PAA laboratories GmbH
SF900-II Insektenzellmedium	Invitrogen
Transfektionspuffer A + B	BD Bioscience Pharmingen
Trypsin-EDTA (1x)	PAA laboratories GmbH

Alle Reagenzien sind steril, nicht pyrogen, DNase-/ RNase-frei

### 4 Oligonucleotide

Oligonucleotide	Sequenz (5' → 3')
<b>IFN<math>\alpha</math>1</b>	
$\alpha$ 1_for	<b>CATATG</b> TGTGATCTCCCTGAGACCCACAGCCTGGATAACCGCCGCA
$\alpha$ 1/8-SalI_back	CTGCAG <b>GTCGACT</b> CATTCCTTACTCTTCAATCTTTTTTGCAAGTTGAT TG
$\alpha$ 1-R145A_for	GCCTGGGAGGTTGT <b>GCAG</b> CAGAAATCATGAGATCCT
$\alpha$ 1-R150A_for	= $\alpha$ 8-R150A_for
<b>IFN<math>\alpha</math>2</b>	
$\alpha$ 2-E58A_for	TCCCTGTCCTGCAT <b>GCG</b> ATGATCCAGCAG
$\alpha$ 2-N65A_for	CAGCAGATCTT <b>GCT</b> CTCTTCAGCACA
$\alpha$ 2-L80A_for	TGGGATGAGACCCT <b>GCAG</b> ACAAATTCTAG
$\alpha$ 2-S136C_for	TCTGAAAGAGAAGAAATACT <b>GCC</b> CTTGTG
$\alpha$ 2-R144A_for	GCCTGGGAGGTTGT <b>GCAG</b> CAGAAATCATG
$\alpha$ 2-R149A_for	AGAGCAGAAATCAT <b>GGC</b> ATCTTTTTCTTTG

**IFN $\alpha$ 8**

$\alpha$ 8-NdeI\_for **CATATG**TGTGATCTGCCTCAGACCCACAGCCTGGGTAAT**CGCCGCG**  
CC

$\alpha$ 8-SaI\_back =  $\alpha$ 1-SaI\_back

$\alpha$ 8-S137C\_for GAGAAGAAATACT**GCC**CTTGTGCCTGG

$\alpha$ 8-S137C\_back CCAGGCACAAGAG**GCAG**TATTTCTTCTC

$\alpha$ 8-R150A\_for GTTGT CAGAGCAGAAATCAT**GCAT**CCTT

**IFN $\alpha$ 21**

$\alpha$ 21\_for =  $\alpha$ 8-NdeI\_for

$\alpha$ 21\_back CTGCAG**GTCGACT**CATTCCCTT**GCG**TAATCTTTCTTG

$\alpha$ 21-S137C\_for GAGAAGAAATACT**GCC**CTTGTGCCTGG

$\alpha$ 21-S137C\_back CCAGGCACAAG**GCAG**TATTTCTTCTC

$\alpha$ 21-R150A\_for =  $\alpha$ 8-R150A\_for

**IFN $\omega$** 

$\omega$ -pAC\_for **CATATG** TGTGATCTGCCTCAGAACCATGGCCT

$\omega$ -pAC\_back CTGCAG**GTCGACT**CAAGATGAGCCCAGGTCTCTATCTT

$\omega$ -Arg\_for GTCCTTGAGACACAAGAAAGGGGAGAT**GCGGCGC**ATTTG

$\omega$ -Arg\_back TCCCCTTTCTTGTGTCTCAAGGAC**CGCCGCG**ACTTCAGG

$\omega$ -S137C\_for AAGAAATACT**GCG**ACTGTGCCTGG

$\omega$ -S137C\_back CCAGGCACAGT**CGC**AGTATTTCTT

$\omega$ -R150A\_for ATGGAAATCAT**GCAT**CCTTGTTCTTATCAACA

**Sequenzierung**

pT7T3\_for CTATAGGGAATTCGAGCTCGG

pT7T3\_back ACGACGTTGTAAAACGACGG

pMAL-Seq\_for AGACTAATTCGAGCTCGAACAACAACAACA

pMAL-Seq\_back CGCCAGGGTTTTCCAGTCACGACGTTGTA

pAc\_for GCGCTATTGTTTTATATGTGCTTTTGGCGG

pAc\_back CATTACGGATTTCTTGAAGAGAGTGAGTT

*Kursiv* unterlegt: Schnittstellen

**Fett** unterlegt: Mutationssequenz

## 5 Chromatographiesysteme

### Säulen

Cephasil C8 RP	RPC	Amersham Bioscience
Superdex 200 PC (3.2/30)	GF	Amersham Bioscience
Superdex 200 HR (10/30)	GF	Amersham Bioscience
HiLoad Superdex 75 (16/60)	GF	Amersham Bioscience
HiLoad Superdex 75 (26/60)	GF	Amersham Bioscience
HiTrap Q HP Sepharose (1 ml)	IAC / Anionen	Amersham Bioscience
HiTrap SP HP Sepharose (1 ml)	IAC / Kationen	Amersham Bioscience
Q-Sepharose™ Fast Flow ( <i>batch</i> )	IAC / Anionen	Amersham Bioscience

### Chromatographie-System

Åkta Explorer	Amersham Bioscience
Åkta Prime	Amersham Bioscience
SMART	Amersham Bioscience

## 6 Medien

### Mikrobiologie

#### LB-Medium

- 10 g Trypton
- 5 g Hefe-Extrakt
- 10 g NaCl
- pH 7,0

#### Agar-Platten

- 15 g Agar in 1 L LB-Medium
- evtl. Zugabe eines entsprechenden Antibiotikums:
- Ampicillin: 100mg/ml

#### MgCl<sub>2</sub>-Kompetenz-Lösung

- 10 % PEG 6000
- 5 % DMSO
- 100 mM MgCl<sub>2</sub>
- in LB-Medium

### Zellkultur

#### Medium für HL116-Zellen

- 5 ml Glutamin (100-fach)
- 2,5 ml P/S (200-fach)
- 50 ml inaktiviertes FCS\* (10-fach)
- 10 ml HAT (50-fach)
- 2,5 ml HEPES (1 M, steril)
- 500 ml DMEM

#### Medium für 2fTHG-Zellen

- 5 ml Glutamin (100-fach)
- 2,5 ml P/S (200-fach)
- 50 ml inaktiviertes FCS\* (10-fach)
- 2 ml Hygromycin (Konz.: 200 mg/ml)
- 2,5 ml HEPES (1 M, steril)
- 500 ml DMEM

#### Cryostock-Lösung

- 10 % DMSO, steril
- 10 % inaktiviertes FCS\*
- ad 50 ml DMEM

Medium für Sf9-Zellen

5 ml Glutamin (100-fach)  
 2,5 ml P/S (200-fach)  
 50 ml inaktiviertes FCS\* (10-fach)  
 500 ml SF9-II-Medium

\* Inaktivierung bei 65°C für 45 Min.

Medium für HeLa-Zellen

5 ml Glutamin (100-fach)  
 5 ml NEAA (100-fach)  
 50 ml inaktiviertes FCS\* (10-fach)  
 5 ml Pyruvat (100-fach)  
 500ml ml Earle's MEM  
 evtl. Zugabe von P/S

**7 Lösungen / Puffer****Agarose-Elektrophorese**1x TAE (Lauf- / Gelpuffer)

20 mM TRIS / Acetat pH 8,0  
 1 mM EDTA

DNA-Ladepuffer (10 ml)

20 mM TRIS-HCl; pH 8,0  
 2 mM EDTA  
 80 % Saccharose  
 25 mg Bromphenolblau

**SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese**Sammelgelpuffer

0,5 M TRIS-HCl; pH 6,8  
 0,4 % SDS

Trenngelpuffer

1,5 M TRIS-HCl; pH 8,8  
 0,4 % SDS

Protein-Ladepuffer

100 mM TRIS-HCl; pH 6,5  
 4,0 % SDS  
 0,2 % Bromphenolblau  
 20 % Glycerin

Laufpuffer

25 mM TRIS-HCl; pH 8,8  
 200 mM Glycin  
 0,1 % SDS

Gel-Färbelösung

0,25 % (w/v) Coomassie-Blue  
 in Entfärber-Lösung

Entfärber-Lösung

1 Teil Essigsäure, 99 %  
 4 Teile Methanol  
 5 Teile Wasser

**Lösungen für die Aufreinigung und Affinitätsuntersuchung**Lyse-Puffer für *E. coli*

50 mM TRIS-HCl, pH 8,0  
 100 mM NaCl  
 5 mM EDTA

GF-Laufpuffer

25 mM TRIS-HCl, pH 7,5  
 400 mM NaCl



IAC-Puffer

bei ungelabelten Interferonen

A 25 mM TRIS-HCl, pH 8,0

B 1 M NaCl in Puffer A

bei Fluoreszenz markierten Interferonen

25 mM MES, pH 6,5

1 M NaCl in Puffer A

RPC-Puffer

A 0,01 % TFA in MilliQ-Wasser

B 0,01 % TFA in Acetonitril

RfS-Puffer

20 mM HEPES, pH 7,5

150 mM NaCl

0,1 % Triton X-100 (optional)

**Lösungen für Zellkultur-Aktivitätsuntersuchungen**Kaliumphosphat-Stocklösung pH 8,00,5 M Di-Kaliumhydrogenphosphat  
adjustiert mit

0,5 M Kaliumdihydrogenphosphat

Kristallviolett-Lösung

0,5 % Kristallviolett

30 % Essigsäure

20 mM NaCl

Lyse-Puffer für HL116-Zellen

100 mM Phosphat-Puffer pH 8,0

0,1 % Triton X-100

1 mM DTT

Luciferin-Puffer für *Luciferase*-Assay

20 mM Tricin

1,07 mM MgCO<sub>3</sub>2,64 mM MgSO<sub>4</sub>

0,1 mM EDTA

270 µM CoEnzym A

470 µM Luciferin

530 µM ATP

## IV Methoden

### 1 Molekularbiologische Methoden

Für die Expression verschiedener humaner Interferone und Mutanten in *E. coli* bzw. *Sf9*-Zellen, wurden die Gene aus der humanen genomischen DNA amplifiziert. Für die heterologe Expression in *E. coli* wurde die Interferonsequenz über entsprechende Restriktionsstellen in den pT7-Vektor transferiert. Der Transfervektor pAc-GP67-B-Vektor wurde für die Expression in *Sf9*-Zellen verwendet.

#### 1.1 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

##### Amplifikation von Interferonen aus der genomischen humanen DNA

Die Sequenzen der humanen Interferone IFN $\alpha$ 1, IFN $\alpha$ 8, IFN $\alpha$ 21 und IFN $\omega$  wurden aus der genomischen humanen DNA ohne Signalsequenz amplifiziert. Die Interferone wurden über entsprechend konstruierte Primer in den pT7-Vektor (IFN $\alpha$ 1, IFN $\alpha$ 8, IFN $\alpha$ 21) bzw. in den pAc-GP67-B-Vektor (IFN $\omega$ ) transferiert. Bei den IFN $\alpha$ -Subtypen wurde zugleich das AGG / AGG-Cluster (R) an den Positionen 12 und 13 zu CGC (R) modifiziert (Ausnahme: IFN $\omega$ ). Das IFN $\beta$  (C17S) (Rebif®, 22  $\mu$ g und 44  $\mu$ g) wurde von Serono GmbH Unterschleißheim/Deutschland zur Verfügung gestellt. Das IFN $\alpha$ 2 wurde als pT7T3-Konstrukt von Dr. Jacob Piehler sowie das ovine IFN $\tau$ 2 von Jaques Martal (INRA; Jouy-en-Joses) zur Verfügung gestellt.

PCR-Ansatz		Amplifikation	
5,0 $\mu$ l	PCR-Puffer für <i>Pwo</i> -Pol (10x)	<u>Vorlauf</u>	95°C, 1 Min.
1,25 $\mu$ M	Magnesiumsulfat	<u>30 Zyklen</u>	
2 U	<i>Pwo</i> -Polymerase	Denaturierung	95°C, 1 Min.
1 $\mu$ g	genomische humane DNA	<i>Annealing</i>	58-58°C, 1 Min.
1 nM	<i>Forward</i> -Primer	Elongation	72°C, 1 Min.
1 nM	<i>Backward</i> -Primer	<u>Nachlauf</u>	72°C, 10 Min.
0,2 nM	dNTP		
ad 50,0 $\mu$ l	mit Aqua bidest		dann bei 4°C

##### PCR der Baculovirus-DNA

Mit der PCR wurde der korrekte Einbau des IFN $\omega$ -Gens in die rekombinante Baculoviren-DNA kontrolliert. Die Virus-DNA wurde aus dem *Sf9*-Überstand mit dem Mini-Kit von Macherey & Nagel (MN) aufgereinigt.

PCR-Ansatz		Amplifikation	
5,0 µl	PCR-Puffer für <i>Taq</i> -Pol (10x)	<u>Vorlauf</u>	95°C, 5 Min.
1,25 µM	Magnesiumsulfat	<u>30 Zyklen</u>	
1 U	<i>Taq</i> -Polymerase	Denaturierung	95°C, 1 Min.
2,5 µl	Baculovirus DNA aus Mini	<i>Annealing</i>	52°C, 1 Min.
1 nM	pAc_for- bzw. ω-pAC_for Primer	Elongation	72°C, 2 Min.
1 nM	ω-pAC_back bzw. pAc_back- Primer	<u>Nachlauf</u>	72°C, 10 Min.
0,2 nM	dNTP	dann bei 4°C	
1,0 µl	DMSO		
ad 50,0 µl	mit Aqua bidest		

## 1.2 Konstruktion der Vektoren

### Restriktionsverdau

Die verschiedenen humanen IFN $\alpha$ -Subtypen wurden über die Restriktionsstellen *SalI* (5'-Ende) und *NdeI* (3'-Ende) in den pT7-Vektor eingebaut. Das humane IFN $\omega$  wurde in den rekombinanten Transfervektor pAc-GP67-B-Vektor über die Schnittstellen *BamHI* und *EcoRI* eingefügt. Nach der Linearisierung der Vektoren durch die Restriktionsenzyme wurde diese mit alkalischer Phosphatase (CIP) dephosphoryliert (speziell 5'-Ende), um eine Rezirkularisierung zu verhindern. Eine Phosphorylierung der Interferon-Inserts mit der T4-Polynukleotid-kinase (PNK) sollte die Ligationseffizienz verbessern.

Restriktion mit <i>SalI</i> / <i>NdeI</i>	Restriktion mit <i>BamHI</i> / <i>EcoRI</i>
~2 µg pT7-Vektor oder IFN $\alpha$ -Inserts	~2 µg pAc-GP67-B / IFN $\omega$ -Insert
3,0 µl Puffer (10x)	6 µl Y <sup>+</sup> -Tango-Puffer (10x)
20 U <i>SalI</i>	20 U <i>BamHI</i>
20 U <i>NdeI</i>	20 U <i>EcoRI</i>
ad 30,0 µl Aqua bidest	ad 30,0 µl Aqua bidest

### Phosphorylierung der Insert-DNA

verdautes Insert
2,0 µl Buffer für PNK-A (10x)
1,5 mM ATP
5 U T4 Polynucleotid-Kinase
ad 20 µl Aqua bidest

Der Verdau wurde für 3 Stunden (Std.) bei 37°C durchgeführt. Nach 2½ Std. wurde bei dem Vektorverdau alkaline Phosphatase (CIP) direkt hinzugefügt. Die Aufreinigung der DNA fand mit dem PCR-Purification-Kit von QIAGEN® statt. Der Ansatz mit dem geschnittenen Insert wurde daraufhin mit der PNK für 1½ Std. bei 37°C phosphoryliert. Die Kinase wurde anschließend bei 65°C für 10 Min. inaktiviert.

### DNA-Aufreinigung

Die Aufreinigung von DNA wurden durch entweder durch Agarose-Gelelektrophorese und Extraktion mit QIAEX-II®-Kits von QIAGEN oder mit dem QIAquick PCR Purification Kit von QIAGEN. Die DNA wurde in MilliQ-Wasser eluiert und bei -20°C gelagert.

### Ligation

Die restriktiv geschnittenen, phosphorylierten Interferone wurden in den entsprechend restriktiv geschnittenen, dephosphorylierten Vektor ligiert. Die Ligation wurde bei 16°C für 24 Std. oder bei 22°C für 3 Std. durchgeführt.

### **Ligation**

---

0,5 µl	Vektor (linearisiert, dephosphoryliert)
1-2 µl	Insert (geschnitten, phosphoryliert)
1,5 µl	T4-Ligase Buffer (10x)
1 U	T4-Ligase
ad 15 µl	Aqua bidest

---

### 1.3 Transformation in kompetente TG-1-Zellen *Escherichia coli* (*E. coli*)

Die Aufnahme freier DNA durch Bakterienzellen ist unter normalen Umständen ineffizient. Um die Aufnahmebereitschaft der Zellen für DNA zu erhöhen, wurde das Enterobakterium *E. coli* durch die MgCl<sub>2</sub>-Methode kompetent gemacht.

#### Kompetente Zellen nach der Magnesiumchlorid-Methode

100 µl TG-1-Zellen wurden in 200 ml LB-Medium bei 37°C unter Schütteln bis zu einer OD600 von 0,6 bis 0,8 wachsen gelassen. Die Zellen wurden zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 20 ml 10 % PEG 6000, 5 % DMSO und 100 mM MgCl<sub>2</sub> in LB-Medium (gefiltert: 0,22 µm, 4°C) resuspendiert. Die kompetenten Zellen wurden aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

#### Transformation in *E. coli* / TG1-Zellen

Für die Transformation wurden 15 µl Ligationsansatz mit 100 µl kompetenten Zellen vereinigt und für eine ½ Std. bei 4°C inkubiert. Der Ansatz wurde auf Agar-Amp.-Platten ausplattiert und über Nacht bei 37°C in den Brutschrank gestellt. Waren Klone angewachsen, wurden diese auf Rasterplatten (Agar + Amp.) ausgestrichen und jeweils Kulturen über Nacht bei 37°C inkubiert.

#### 1.4 Plasmid-Isolierung aus *E. coli*-Zellen

Die Aufreinigung kleinerer Mengen (<20 µg) an Plasmid-DNA wurde mit dem NucleoSpin® Plasmid-Kit von Macherey & Nagel (MN) entsprechend dem Protokoll durchgeführt. Größere Mengen (>100 µg) an Plasmid-DNA wurden mit der Midi-Prep von QIAGEN aufgereinigt. Die Plasmide wurden in Aqua bidest eluiert und bei -20°C gelagert.

#### 1.5 Ortsspezifische Mutagenese der Interferone

Die ortsspezifische Mutagenese wurde mit Hilfe der zwei folgenden Methoden durchgeführt:

##### QuickChange-Methode

Mit der QuickChange-Methode von Stratagene® wurden verschiedene AGA / AGG-Cluster in der Interferonsequenz (z.B. bei IFN $\omega$ : R22, R23, R33 und R34) durch CGC modifiziert. Das Arginin-Cluster im Anfangsbereich der IFN $\alpha$ -Sequenz (R12 + R13) wurde bereits mit Hilfe der Primer durchgeführt, die für die Amplifikation der Interferone aus der genomischen DNA verwendet wurden.

<b>Quick-Change</b>	<b>Amplifikation</b>
5,0 µl PCR-Puffer für <i>Pwo</i> -Pol (10x)	<u>Vorlauf</u> 94°C, 3 Min.
3,75 µM Magnesiumsulfat	
2 U <i>Pwo</i> -Polymerase	<u>25 Zyklen</u>
~50 ng Vektor mit Interferon-Insert	Denaturierung: 94°C; 1 Min.
1 pM <i>Forward</i> -Primer	<i>Annealing</i> 58°C; 1 Min.
1 pM <i>Backward</i> -Primer	Elongation 72°C; 10 Min.
0,2 pM dNTP	
ad 50,0 µl Aqua bidest	<u>Nachlauf</u> 72°C; 10 Min.
	dann bei 4°C

##### LCR (ligase-chain-reaction)

Der größte Teil der ortsspezifischen Mutagenesen wurde mit Hilfe der LCR durchgeführt. Vorteil dieser Methode war der Einsatz nur eines Primers, anstelle von zwei komplementären Primern (vgl. Quick-Change-Methode). Simultan konnten mit Hilfe der LCR mehrere Mutationen in einem Ansatz gleichzeitig durchgeführt werden. Nachteil war, dass die Primerlänge auf max. 35 Nukleotiden beschränkt war. Mit Hilfe der LCR wurden bei IFN $\alpha$ 1, IFN $\alpha$ 2, IFN $\alpha$ 8, IFN $\alpha$ 21 und IFN $\omega$  verschiedene Substitutionen durchgeführt, wie z.B. die Einführung eines Cysteinrestes (AS-Position  $\alpha^2$ S136C /  $\alpha/\omega$ S137C) zur selektiven Kopplung einer fluoreszierenden Gruppe an eine SH-Gruppe oder der Austausch spezifischer Aminosäuren, die an der Interaktion mit dem Interferonrezeptor beteiligt sind.

**Primer-Phosphorylierung**


---

100 pM	Primer
2,0 µl	Buffer für PNK-A (10x)
1,5 mM	ATP
5 U	T4 Polynucleotid-Kinase
ad 20 µl	Aqua bidest

---

**LCR**


---

2,5 µl	PCR-Puffer für <i>Pwo</i> -Pol (10x)
1,6 µM	Magnesiumsulfat
1 U	<i>Pwo</i> -Polymerase
~100 ng	Vektor mit Interferon-Insert
0,5 pM	<i>Forward</i> -Primer (phosphoryliert)
0,2 pM	dNTP
250 pM	NAD <sup>+</sup>
5 U	<i>Ampligase</i>
ad 25,0 µl	Aqua bidest

---

**Amplifikation**


---

<u>Vorlauf</u>	94°C, 3 Min.
<u>25 Zyklen</u>	
Denaturierung	94°C; 1 Min.
<i>Annealing</i>	58°C; 1 Min.
Elongation	72°C; 10 Min.
<u>Nachlauf</u>	72°C; 20 Min.
dann bei 4°C	

---

Restriktion der parentalen Vektoren mit *DpnI*

*DpnI* ist ein Restriktionsenzym, welches nur methylierte DNA verdaut. Durch diesen Schritt wurde die parentale, methylierte Plasmid-DNA verdaut. Die unmethylierte, durch PCR amplifizierte Plasmid-DNA blieb erhalten. Der Ansatz wurde bei 37°C für 3 Std. verdaut und in *E. coli*-Zellen ohne Inaktivierung des *DpnI* für ½ Std. bei 16°C in TG1-Zellen transformiert.

***DpnI*-Verdau**


---

20 µl	PCR-Produkt
3 µl	Y-Tango
1-2 U	<i>DpnI</i>
ad 30,0 µl	Aqua bidest

---

**2 Expression von Interferonen****2.1 Expression in *Escherichia coli* (*E. coli*)**

Die Expression der IFN $\alpha$ -Wildtypen und Mutanten wurde mit Hilfe des pT7-Vektors in *E. coli* durchgeführt, welcher als ein bi-cistronisches Plasmid konstruiert wurde. Durch die Simulation eines Fusionsproteins (s. Einleitung, Abbildung 14 ) konnte die Expressionsrate des Zielproteins aufgrund der erhöhten Wahrscheinlichkeit der Transkription und Translation gesteigert werden.

Nach der Transformation des gewünschten pT7-IFN-Konstruktes in *E. coli*, wurde eine 50 ml-Kultur über Nacht angesetzt und diese bei 30°C unter Schütteln inkubiert. Die Kultur

wurde in 1-2 L LB-Amp-Medium überführt, bei 37°C unter schütteln inkubiert und 2 ‰ T7M13-Phagen bei einer Zelldichte von  $OD_{600} \sim 0,2$  zugesetzt. Nach der Zugabe von 300  $\mu$ M IPTG bei einer  $OD_{600}$  von etwa 0,7 bis 0,9, wurde die Expression der Interferone induziert. Die Kultur wurde hierfür für 5 Std. bei 37°C geschüttelt. Die Zellen wurde durch Zentrifugation geerntet, der Überstand verworfen und die Zellen in 30 ml Lysepuffer mit 10 mg Lysozym resuspendiert (Lagerung bei -20°C).

#### Herstellung T7M13-Phagen:

Zu 500 ml TG1-Zellen in LB-Medium wurden 0,02 ‰ T7M13-Phagen bei einer  $OD_{600}$  von  $\sim 0,2$  zugesetzt und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden zentrifugiert und der Überstand, welcher die Phagen enthält, bei 60°C für 5 Std. zur Inaktivierung bakterieller Verunreinigungen inkubiert. Die Lagerung findet bei 4°C statt.

## 2.2 Expression von Interferonen in *Spodoptera frugiper* (Sf9)

Das IFN $\omega$  und dessen Mutanten wurden mit dem *Baculovirus Expression Vektor System* (BEVS) von Pharmingen exprimiert, welches eines der stärksten Expressionssysteme im eukaryontischen System darstellt. Die Baculoviren (Familie: *Baculoviridae*) gehören zu der Familie der Doppelstrang-DNA-Viren und sind hoch Spezies-spezifisch (Insektenzellen).

In dem Expressionssystem wurden nicht-essentielle Gene des Baculovirus durch heterologe Gene ersetzt. Der Transfervektor (hier: pAc-GP67-B-Vektor) mit enthaltener DNA-Sequenz des Zielproteins wird mit linearisierter BaculoGold™ DNA co-transfiziert. Nach homologer Rekombination werden rekombinante Viren produziert und das gewünschte Protein exprimiert. Eine sekundäre Infektion findet durch Infektion weitere Insektenzellen mit dem rekombinanten Virus statt. Der pAc-GP67-B-Vektor enthält die gp67 Sekretionssignalsequenz mit angeschlossener Signalpeptidase-Schnittstelle und eine Polylinkerstelle. Durch die Sekretionssignalsequenz wurde das Protein in das Außenmedium transportiert und konnte direkt aus dem Medienüberstand aufgereinigt werden.

#### Rekombinante Baculoviren durch Co-Transfektion

Zunächst erforderte die Expression des IFN $\omega$  in Sf9-Zellen die Herstellung von rekombinanten Baculoviren. Hierzu wurden  $\sim 0,5$  ml  $2 \times 10^6$  Sf9-Zellen in zwei Lochungen einer sterilen 12-Loch Platte gegeben, so dass die Zelldichte zu 50-70 % konfluent war. Zur Zellanheftung wurde die Platte 5-10 Min. bei 27°C stehen gelassen. Das Konstrukt pAc-GP67-B-IFN $\omega$  wurde vor der Verwendung bei 60°C für 15 Min. erhitzt, um aktive Proteine (speziell DNAsen) zu zerstören. Die Co-Transfektion wurde gemäß dem Protokoll von Pharmingen® durchgeführt. Nach der Transfektion wurden die Platten für 4 Std. bei 27°C

inkubiert, der Überstand abgenommen, mit Sf9-Medium zweimal gewaschen und 1 ml Sf9-Medium aufgetragen. Die Platten wurden für 4-7 Tagen bei 27°C inkubiert. Während diesem Zeitraum wurden die Zellen auf Veränderungen des Phänotyps beobachtet, die auf eine positiv verlaufende Co-Transfektion und die Produktion rekombinanter Baculoviren hinweist. Nach Ablauf von ~7 Tagen wurde der Medienüberstand abgenommen, zentrifugiert und erneut auf Sf9-Zellen gegeben, um eine Vermehrung des Virus zu erreichen. Als Kontrolle wurde ein nicht infizierter, nur mit Transfektions Buffer A + B behandelter Ansatz angesetzt. Der Einbau des heterologen Gens in das Baculovirus wurde durch eine PCR der Baculoviren-DNA kontrolliert (0). Die Viren wurden bei 4°C oder bei -20°C gelagert.

#### Expression rekombinanter Interferone in Sf9-Zellen

Die Expressionsrate der rekombinanten Proteine kann zwischen 0,1 % bis 50 % der totalen Expression von Insektenzellproteinen einnehmen. Die Expression wurde in Schüttelkulturen durchgeführt. Hierzu wurden  $2 \times 10^6$  Sf9-Zellen in 50-200 ml mit 2,5-10 ml Virus-Überstand infiziert, abhängig von der Höhe des Virus-Titers. Die Zellen wurden für 3-4 Tagen bei 27°C inkubiert und zentrifugiert.

### **3 Proteinbiochemische Methoden**

Die proteinbiochemischen Methoden beinhalten die Rückfaltung und Aufreinigung der humanen Interferone aus verschiedenen Organismen.

#### 3.1 Solubilisation der Interferone aus *E. coli*

Verschiedene humane IFN $\alpha$ -Subtypen und deren Mutanten, in *E. coli* exprimiert, wurden in Einschlusskörperchen (*inclusion bodies*) abgelagert und aus diesen rückgefaltet. Für die Cystein-Mutanten und einzelnen Mutanten, wie z.B. IFN $\alpha$ 2-HEQ wurden einige Modifikationen des Rückfaltungs- und Aufreinigungsprotokolls durchgeführt.

#### Aufschluss von *E. coli* mit Ultraschall

Der Aufschluss der Zellen wurde mit Hilfe von Ultraschall-Wellen erreicht. Hierzu wurde die Zellsuspension aus 1L Expressionsansatz für 3 x 5 Minuten mit 80 % Stärke und 80 % Zyklus beschallt. Zwischen den einzelnen Beschallungen wurde die Suspension für mindestens 10 Min. bei 4°C wieder gekühlt. Die *inclusion bodies* wurden bei 16.000 rpm für 20 Min. bei 4°C durch Zentrifugation (Rotor: SS34) von dem Zellysate abgetrennt konnte bei -20°C für einige Wochen gelagert werden.



### Denaturierung der IFN $\alpha$ -Subtypen aus *inclusion bodies* / *E. coli*

Die *inclusion bodies* aus einer 500 ml-Expression wurde in 10 M Urea mit 20 mM TRIS pH 9,0 resuspendiert. Zusätzlich wurde kristalliner Harnstoff über den gesamten Denaturierungszeitraum hinzugefügt, solange dieser sich löste. Die Denaturierung wurde für mindestens 2 Std. bei  $\sim 35^{\circ}\text{C}$  durchgeführt (Endvolumen: 120-150 ml) und konnte über Nacht bei  $-20^{\circ}\text{C}$  eingefroren werden. Daraufhin wurden die Disulfidbrücken in den Interferonen durch die Zugabe von 5 mM DTT reduziert. Erneut wurde diese Lösung unter völligem Luftabschluss für 45 Min. bei RT unter Rühren inkubiert. Bei Cystein-Mutanten wurde die Reduktion der Disulfidbrücken unter 10 mM DTT durchgeführt.

### Rückfaltung der Interferone aus *inclusion bodies*

Mit Hilfe der Rückfaltung wurde das Interferon wieder in seine native Struktur gebracht und die entsprechenden Disulfidbrücken sollten wieder ausgebildet werden. Hierzu wurden der Harnstoff und das DTT möglichst vollständig entfernt, um ein oxidierendes Umfeld zu schaffen und somit den Proteinen ein Milieu für eine ideale Rückfaltung zu bieten.

Die gelösten *inclusion bodies* wurde zunächst 1:8 mit 20 mM Glycin pH 10,6 verdünnt. Um die Interferone optimal rückzufalten und dabei den Harnstoff und das DTT möglichst vollständig zu entfernen, wurde gegen 15 L 20 mM TRIS pH 9,0 für 2 Std. bei Raumtemperatur und darauf gegen 15 L 20 mM TRIS pH 8,0 über Nacht bei  $4^{\circ}\text{C}$  dialysiert. Eine Zentrifugation konnte nach der Dialyse eingefügt werden, um Aggregate oder sonstige Zellbestandteile, welche im Pellet der *inclusion bodies* beinhaltet waren, zu entfernen.

Bei verschiedenen Interferonen oder Mutanten, z.B. IFN $\alpha$ 1 oder IFN $\alpha$ 2-HEQ, wurde die Rückfaltung modifiziert und die Dialyse wurde einmalig über Nacht gegen 20 mM TRIS pH 8,0 bei  $4^{\circ}\text{C}$  durchgeführt. Hiermit konnte die Ausbeute vergrößert werden. Bei den Cystein-Mutanten musste die Rückfaltung möglichst zügig erfolgen, um die starke Neigung zur Ausbildung von intermolekularen Disulfidbrücken und Aggregation zwischen den Interferonen zu verhindern. Hier wurde einmalig über 3 Std. bei RT dialysiert. Dies garantierte, dass noch eine geringe DTT-Konzentration vorhanden war und somit die Ausbildung von Disulfidbrücken zwischen den Interferonen verhindert wurde.

## 3.2 Aufreinigung der renaturierten Interferone aus *E. coli*

Die mit Hilfe von *E. coli* hergestellten Interferone besitzen einen isoelektrischen Punkt (pI) von 5 bis 6. Daher bestand die Möglichkeit, die Interferone mit einem Anionenaustauscher anzukonzentrieren und aufzureinigen.

### Einengung durch Ionenaustausch-Chromatographie (IAC)

Um zunächst die Interferone einzuengen, da diese in einem großen Volumen von bis zu 1 L vorlagen, wurde ein starker Anionenaustauscher (Q-Sepharose, Amersham bioscience) verwendet. Aufgrund des großen Volumens wurde ein *batch*-Ionenaustausch durchgeführt. Die Ionenaustausch-Chromatographie fand bei einem pH von 8,0 statt, welcher deutlich über dem pI der in *E. coli* hergestellten Interferone (~pH 6) lag.

Das Dialysat mit den Interferonen wurde mit 30 ml in Puffer äquilibriertem Iosem Ionenaustauschmaterial für 10 bis max. 15 Min. inkubiert. Daraufhin wurde das Säulenmaterial mit 100 ml Puffer A gewaschen und die Interferone mit 35 ml (3 x 11-12 ml) 100 % Puffer B eluiert.

### Aufreinigung durch Größenausschlusschromatographie

Die Ausschlusschromatographie (*size-exclusion-chromatographie*, Gelfiltration, GF) basiert auf der Auftrennung von löslichen Molekülen nach ihrer Größe. Die Permeation der Probenmoleküle nach ihrer Größe durch ein poröses Trägermaterial ist dabei abhängig von dessen Porengröße. Das Verhältnis von Porengröße und Molekülgröße ist dabei entscheidend für das Auftrennungsverhalten.

Die Aufreinigung wurde mit der HiLoad Superdex 75 (26/60) Säule (IFN $\alpha$ -Subtypen) oder der HiLoad Superdex 75 (16/60) Säule (IFN $\omega$ ) von Amersham Bioscience durchgeführt. Ebenfalls wurde für analytische Untersuchungen mit der Superdex 200 HR (10/30) (Aekta Prime, Amersham Bioscience) oder der Superdex 200 PC (3.2/30) (SMART-System, Amersham Bioscience) gearbeitet.

<b>Säule</b>	<b>Flussrate</b>	<b>max. Druck</b>	<b>Auftragsvolumen</b>	<b>Bettvolumen</b>
HiLoad Superdex 75 (26/60)	4 ml/Min.	0,5 MPa	10,0 - 15,0 ml	~320 ml
HiLoad Superdex 75 (16/60)	2 ml/Min.	0,5 MPa	5,0 ml	~122 ml
Superdex 200 HR (10/30)	0,5 ml/Min.	1,5 MPa	500 $\mu$ l	~21 ml
Superdex 200 PC (3.2/30)	0,1 ml/Min.	1,5 MPa	50 $\mu$ l	~2,4 ml

### Aufreinigung und Einengung über Ionenaustausch-Chromatographie

Zur Endaufreinigung und Ankonzentrierung wurde erneut ein Anionenaustauscher (HiTrap Q Sepharose HP) mit einem Säulenvolumen von 1 ml verwendet. Bei den mit Oregon Green 488 (OG488) markierten Cystein-Mutanten wurde der Ionenaustausch bei pH 6,0 vorgenommen, um unmarkierte Interferone, OG488 markierten Interferonen sowie freies OG488 voneinander abzutrennen.

Säule	Flussrate	max. Druck	Auftragsvolumen	Bettvolumen
HiTrap Q Sepharose HP	3 ml/Min.	0,5 MPa	-	~1 ml

Die Fraktionen von der GF wurden vereinigt, für  $\geq 2$  Std. bei  $4^{\circ}\text{C}$  gegen 20 mM TRIS pH 8,0 dialysiert und gefiltert ( $0,22\ \mu\text{m}$ ). Die Lösung mit den Interferonen wurde mit einem Fluss von 2 ml/Min. auf die äquilibrierte Säule aufgetragen und erneut mit Puffer A gewaschen. Die Interferone wurden daraufhin mit einem linearen Gradienten bis 50 % Puffer B (Endkonzentration 500 mM) über 8 ml eluiert. Mit 100 % Puffer B wurden alle an die Säule gebundenen Moleküle entfernt. Gesammelte Fraktionen wurden mit Hilfe der SDS-PAGE auf Reinheit und Konzentration überprüft. Die Konzentration wurde über die Quantifizierung der Coomassie-gefärbten Banden im SDS-PAGE mit Hilfe der LUMI-Imager-Software (Roche) und dem Auftrag eines standartisierten Interferons bestimmt.

#### Aufreinigung der Interferone und Mutanten aus Sf9-Zellen

In Sf9-Zellen wurden das humane IFN $\omega$  und Mutanten exprimiert. Die Aufreinigung verlief vergleichbar zu der Aufreinigung aus *E. coli*. Als Ionenaustauscher wurde ein Kationenaustauscher (HiTrap SP Sepharose HP-Säule, 1 ml) verwendet, da das IFN $\omega$  einen pI von  $\sim 9,2$  besitzt. Die Aufreinigung wurde bei einem pH von 7,5 vorgenommen. Die Ausschlusschromatographie wurde mit der HiLoad 16/60 Superdex 75 Säule durchgeführt, wie unter 0. beschrieben.

### 3.3 Ortspezifische Markierung von Cysteinresten

In den Interferonen vorliegende, exponierte freie Thiolgruppen (SH) von Cysteinresten können mit thiolreaktiven Maleinimid-gekoppelten Fluorophoren oder Biotinmaleimid reagieren. Diese Reaktion fand bei einem pH von 6,5 bis 7,5 statt, da in diesem pH-Bereich eine selektive Markierung der Cysteinreste möglich war.

#### Selektive Fluoreszenzmarkierung von Cystein-Mutanten

Die Maleinimid-funktionalisierten Fluorophore Oregon Green 488 (OG488) und Alexa Fluor 568 (AF568) wurden zur Fluoreszenzmarkierung verwendet. Die gereinigten Cystein-Mutanten der IFN $\alpha$ -Subtypen und des IFN $\omega$  wurden nach folgendem Protokoll markiert:

Die über die GF isolierten Cystein-Mutanten wurden gegen Dialysepuffer (20 mM TRIS, pH 7,5) für 2 Std. bei  $4^{\circ}\text{C}$  dialysiert. Die Proteinkonzentration wurde über das Absorptionsspektrum bestimmt ( $\epsilon_{\text{IFN}\alpha 2 (280)} = 18500\ \text{M}^{-1}$ ), um den Einsatz des Fluorophors zu bestimmen. Das Maleinimid-funktionalisierte Fluorophor wurde in einem

molaren Konzentrations-Verhältnis von 3:1 zur Proteinlösung zugeben und über Nacht bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Darauf wurde die Abtrennung des Fluorophor (nur OG488) und die Ankonzentrierung des OG488 markierten Interferons mit Hilfe eines Anionenaustauschs ( $^{OG488}IFN\alpha$ ) oder Kationenaustauschs ( $^{OG488}IFN\omega$ ) durchgeführt. Andere Fluorophore konnten mit der IAC nicht abgetrennt werden, so dass eine Abtrennung mit Hilfe der *Reversed Phase* Chromatographie, einer analytischen GF oder einer Entsalzungs-Säule erreicht wurde.

#### Abtrennung freier Fluorophore

Da das Fluorophor AF568 nicht durch einen Anionenaustauscher abgetrennt werden konnten, wurde mit Hilfe einer Entsalzungssäule das Fluoreszenz markierte Interferon von dem freiem Fluorophor abgetrennt. Die Entsalzung funktioniert nach dem Prinzip einer GF. Der wesentliche Unterschied liegt in dem geringeren Volumen des Säulenmaterials und dem damit verbundenen geringeren zeitlichen und apparativen Aufwand. Die Aekta Prime wurde verwendet, um die Entsalzung mit einer 5 ml HiTrap Desalting-Säule bei einer Flussrate von 3 ml/Min. durchzuführen.

#### Selektive Biotinylierung von Cystein-Mutanten

Für die Biotinylierung der Cystein-Mutanten wurde Maleinimid-funktionalisierte Biotin verwendet. Die über GF aufgereinigten IFN $\alpha/\omega$ -Cystein-Mutanten wurden wie unter 0 vorbehandelt, das Maleinimid-funktionalisierte Biotin im molaren Konzentrations-Verhältnis von 15:1 zur Proteinlösung zugeben und der Ansatz über Nacht bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Daraufhin wurde die Abtrennung des freien Biotins und Konzentrierung des markierten Interferons über einen Anionenaustausch durchgeführt (0).

#### Reversed Phase Chromatographie

Die *Reversed Phase* Chromatographie (RPC) wurde zur Abtrennung von verschieden markierten Spezies verwendet. Das Trennprinzip der RPC beruht auf hydrophoben Wechselwirkungen.

<b>Säule</b>	<b>Flussrate</b>	<b>max. Druck</b>	<b>Auftragsvolumen</b>	<b>Bettvolumen</b>
Sephasil C8 SC 2.1/10	200 $\mu$ l/min	15 MPa	500 $\mu$ l	~1 ml

Nach dem Probenauftrag einer IAC-Fraktion wurde eine Gradientenstufe zu 40 % RPC-Puffer B durchgeführt. Diese diente als Ausgangspunkt für einen linearen 1 ml Gradienten von 40 auf 60 % RPC-Puffer B, welcher am Ende des linearen Gradienten auf 100 % B gesetzt wurde.

### Bestimmung von Markierungsgraden

Der Markierungsgrad beschreibt das Verhältnis von Fluorophor zu Protein. Die Konzentration des Fluorophors wurde über den Extinktionskoeffizienten des Absorptionsmaximums bestimmt unter der Annahme, dass keine Veränderung des Extinktionskoeffizienten durch die Bindung des Fluorophors an das Protein verursacht wurde.

## **4 Zellkultur und Aktivitätsuntersuchungen**

Es wurden Untersuchungen durchgeführt, die Unterschiede im Aktivitätsprofil der Interferone über unterschiedliche Zeitintervalle zeigen sollten. Hierzu wurden die eukaryontischen 2fTGH- und HL116-Zellen verwendet, welche beide von der Zelllinie HT1080 (humane Fibrosarkoma-Zellen) abstammen. Dadurch konnte gewährleistet werden, dass die untersuchten Aktivitäten vergleichbar waren.

### **4.1 Stammkultur und Cryostocks von 2fTGH- und HL116-Zellen**

Die Zellen wurden entweder in einer T25 oder T75-Kulturflasche gehalten. Zum Ablösen der adhären Zellen am Boden wurde diese zunächst trypsiniert, in 10 ml HBS (steril) aufgenommen, zentrifugiert und in Medium resuspendiert. Die Zellen wurden dann mit einer Zelldichte von  $\sim 5 \times 10^5$  Zellen/ml in einer Kulturflasche ausgesät. Diese wurde dann bei 37°C kultiviert, bis eine dichte Monolayer-Schicht gewachsen war.

Für die Herstellung von Cryostocks wurde eine dichte Monolayer-Kultur, wie oben beschrieben, trypsiniert, mit sterilen HBS gewaschen und in Cryostock-Lösung resuspendiert. Die Cryostock wurden bei längerer Lagerzeit in flüssigem Stickstoff bei -165°C gelagert. Das Auftauen der Cryostocks wurde zügig bei 37°C durchgeführt. Diese wurden zentrifugiert, in 5 ml Medium für 2fTGH- oder HL116-Zellen resuspendiert und in einer T25-Flasche bei 37°C / 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert.

### **4.2 Aktivitätsuntersuchungen**

Die Induktion der ISGF3-Assemblierung wurde mit Hilfe der HL116-Zelllinie durchgeführt. Die HL116-Zelllinie beinhaltet ein stabil transfiziertes *Luciferase*-Gen unter der Kontrolle des 6-16-Promotors. Die Synthese der *Luciferase* war daher von der ISGF3-Assemblierung und somit von der Induktion durch Interferone abhängig. Die antivirale und antiproliferative Wirkung von Interferonen wurde an 2fTGH-Zellen untersucht.

### Induktion der ISGF3-Assemblierung

Für die Untersuchung der ISGF3-Assemblierung wurden je 200 µl HL116 Zellen in 96-well Platten mit einer hohen Zelldichte ( $2 \times 10^6$ ) ausgesät und für 24 Std. bei 37°C / 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Die Zellen wurden dann mit absteigenden Konzentrationen verschiedener Interferone für 6 Std. bei 37°C / 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach Ablauf der Zeit wurde der Überstand abgenommen und die Zellen mit 50 µl Lysepuffer für 10 Min. bei RT inkubiert. Daraufhin wurden 30 µl des Zelllysats in eine neue 96-well platte überführt und 20 µl Luciferin-Puffer hinzugefügt. Das Luminescence-Signal wurde im Lumi-Imager (Roche) über 10 Min. detektiert und die EC<sub>50</sub>-Wert kalkuliert. Der EC<sub>50</sub>-Wert wurde definiert als die effektive Konzentration bei der 50 % Luciferase-Aktivität detektiert wurde. 0 % Luciferase-Aktivität wurde ohne Anwesenheit von Interferonen bestimmt, 100 % Luciferase-Aktivität wurde durch einen hohen Überschuss (2 nM) an IFN $\alpha$ 2 bestimmt. Alle Experimente wurden in dreifacher Ausführung je Interferon und Platte durchgeführt.

### Antivirale Aktivität

Die antivirale Aktivität wurde mit Hilfe von vesikulären Stomatitis Viren (VSV) an 2fTGH-Zellen untersucht. Hierzu wurden 2fTGH-Zellen in einer 96-well Platte ausgesät und verschiedene Interferone in einer Verdünnungsreihe über Nacht bei 37°C inkubiert. Daraufhin wurden VSV hinzugefügt. Die Auswertung wurde vorgenommen, sobald die Zellen einer nur mit VSV behandelte Kontrolle zu 100% zerstört waren. Die Anzahl der überlebten Zellen wurde bestimmt, indem die lebenden Zellen mit Kristallviolett angefärbt wurden.

### Antiproliferative Aktivität

Die Untersuchung der antiproliferativen Aktivität von verschiedenen Interferonen wurde an 2fTGH-Zellen durchgeführt. Diese wurden hierfür in eine 96-well Platte mit einer Zelldichte von  $2-4 \times 10^5$  Zellen/ml ausgesät, für 24 Std. bei 37°C / 5 % CO<sub>2</sub> kultiviert und daraufhin mit Interferonen in absteigender Konzentration über 7 Tage bei 37°C / 5 %CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach Ablauf der Zeit wurde die Anzahl an lebenden Zellen mit Hilfe von Kristallviolett bestimmt. Nach Solubilisation der gefärbten Zellen in 30 % (V/V) Essigsäure, wurde die Färbung der Lösung im ELISA (*enzyme-linked immunosorbent assay reader*) bei einer Wellenlänge von 590 nm ausgewertet. Der EC<sub>50</sub>-Wert wurde bestimmt und definiert als die effektive Konzentration, die dazu benötigt wurde um 50 % der Zellen am Wachstum zu hindern. 0 % antiproliferative Aktivität wurde ohne Zugabe von Interferonen bestimmt. Alle Experimente wurde je Platte in dreifacher Ausführung durchgeführt.

### 4.3 Stammkultur und Transfektion von HeLa-Zellen

HeLa-Zellen wurden für die stabile Transfektion von ifnar2-EGFP verwendet. Die Stammkultur wurde entsprechend den HL116- oder 2fTGH-Zellen behandelt und in MEM mit entsprechenden Zusätzen kultiviert. Zur Transfektion wurden  $1 \times 10^6$  Zellen / ml in einer 35 mm Gewebekulturschale ausgesät und für 24 Std. bei 37°C kultiviert. Die Zellen wurden mit PBS gewaschen und 2 ml Medium hinzugefügt. Für den Transfektionsansatz wurden 97 µl serumfreies Medium vorgelegt, 3 µl FuGene6-Reagenz und 1-2 µg pcDNA3.1-ifnar2-EGFP (zur Verfügung gestellt von Dirk Schaible) hinzugefügt und für 25 Min. bei RT inkubiert. Der Transfektionsansatz wurde dann unter schwenken auf die HeLa-Zellen langsam aufgetropft und für 48-72 Std. inkubiert. Die Transfektionseffizienz wurde im LSM oder TIRF-Mikroskop bestimmt.

## 5 Biophysikalische Experimente

### 5.1 Durchführung der Bindungsassays mit Rlf und TIRF

Um die extrazellulären Domänen der Rezeptoruntereinheiten ifnar1 und ifnar2 auf einer modifizierten Oberfläche immobilisieren zu können, wurden diese mit einem Deka-Histidintag (*His-tag*) versehen. Für die Immobilisierung wurde eine NTA-modifizierte Oberfläche oder eine Lipiddoppelschicht verwendet. Die Immobilisierung der Rezeptoruntereinheiten über seinen *His-tag* sowie die Interaktion der Interferone mit dem Rezeptor konnte Markierungsfrei mit der Rlf-Spektroskopie detektiert werden. Mit der TIRF-Spektroskopie wurden Fluoreszenz markierte Interferone detektiert, wodurch eine höhere Spezifität erreicht wurde.

#### Bindungsuntersuchungen an kovalenten Oberflächen

Für die Immobilisierung der Rezeptoruntereinheiten wurden zunächst Oberflächen mit kovalent gebundenen NTA-Gruppen verwendet. Ifnar2-EC oder ifnar1-EC wurden über die Wechselwirkung zwischen den  $\text{Ni}^{2+}$ -Chelator-Komplexen auf der Oberfläche und dem *His-tag* an den Rezeptormolekülen immobilisiert. Detektiert wurde die spektrale Verschiebung des Interferenzmusters. Aufgrund ihrer unterschiedlichen Affinität wurden die Interferone in unterschiedlichen Konzentrationen eingesetzt. Tabelle 2 fasst sowohl die Konzentrationen, als auch die Injektions- und Waschzeiten für die Bindungsstudien zusammen.

Tabelle 2 *typischer Injektionsablauf*

Volumen	Dauer	Probe
300 $\mu$ l	200 s	10 mM HCl
300 $\mu$ l	100 s	200 mM Imidazol
300 $\mu$ l	100 s	100 mM EDTA, pH 8
300 $\mu$ l	100 s	15 mM NiCl <sub>2</sub>
500 $\mu$ l	100 s	300 nM ifnar2-EC oder ifnar1-EC
200 - 300 $\mu$ l	100-200 s	nM - $\mu$ M Interferon
300 $\mu$ l	100 s	200 mM Imidazol

Die NTA-modifizierte Oberflächen wurden zur Reinigung mit 10 mM Salzsäure gewaschen, mit Imidazol und EDTA vorbehandelt und anschließend mit Ni<sup>2+</sup>-Ionen beladen. Auf den präparierten Chips wurde ifnar2-EC oder ifnar1-EC immobilisiert und die entsprechenden Bindungsstudien mit den Interferonen durchgeführt.

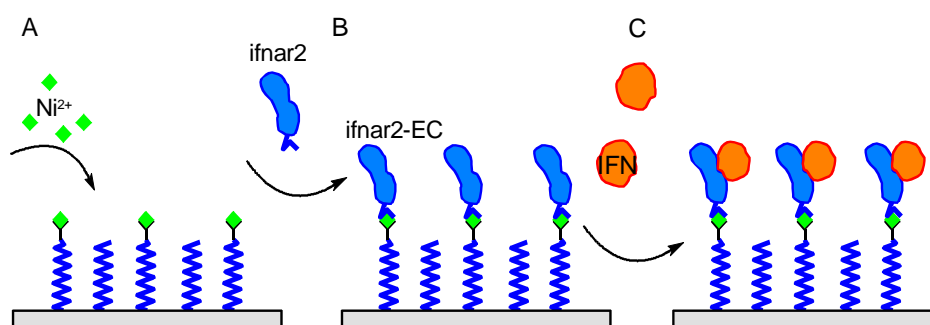


Abbildung 22 *Schematische Darstellung der Vorgehensweise zur Immobilisierung von ifnar2-EC auf NTA-modifizierten Oberflächen. (A) Aufgabe der Ni<sup>2+</sup>. (B) Immobilisierung von ifnar2-EC nach Spülen mit Imidazol. (C) Bindungsassay.*

Jeder Injektion folgte ein Waschschrift mit RfS-Puffer. Die Interferone dissoziierten durch das Waschen mit Puffer von den Rezeptormolekülen. Um die Rezeptoren von der Oberfläche zu entfernen wurden 200  $\mu$ l 200 mM Imidazol injiziert.

#### Vesikel Präparation und Fusion einer Lipiddoppelschicht

SOPC (Stearoyl-Oeylel-Phosphatidylcholin) in Chloroform wurde mit 1-5 mol% der bis-NTA Chelatorlipids (SOA-bis-NTA) vermischt und das Lösungsmittel mit Hilfe einer Vakuumpumpe unter Erwärmung für 20 Min. entzogen. Die Lipide wurden in dem gewünschten Puffer (HBS) für mindestens 15 Min. bei RT unter Rühren resuspendiert und bei -20°C gelagert. Zur Herstellung kleiner unilaminarer Vesikel (SUV) wurden die Lipide für 15 Min. beschallt bis eine klare Lösung entstanden ist.

Die Glasoberflächen wurde für mind. 15 Min. in einer frisch angesetzten Lösung aus einem Teil 30 % (V/V) Wasserstoffperoxid und zwei Teilen konzentrierter Schwefelsäure inkubiert und daraufhin gründlich mit gereinigtem Wasser gespült. Ein unter N<sub>2</sub>-Strom getrockneter



Glaschip wurde in die Flusszelle eingesetzt und mit Puffer gespült. Die Fusion der Vesikel unter Ausbildung einer Lipiddoppelschicht wurde durch Injektion von 250  $\mu\text{l}$  der sonifizierten Lipide erreicht. Daraufhin wurde die Lipiddoppelschicht mit 200-500 mM Imidazol pH 8,0, 200 mM EDTA pH 8,0 und 10 mM  $\text{Ni}^{2+}$  (in HBS) konditioniert. Die Ausbildung einer korrekten Lipiddoppelschicht wurde mit dem RfS-Detektionssystem überprüft.

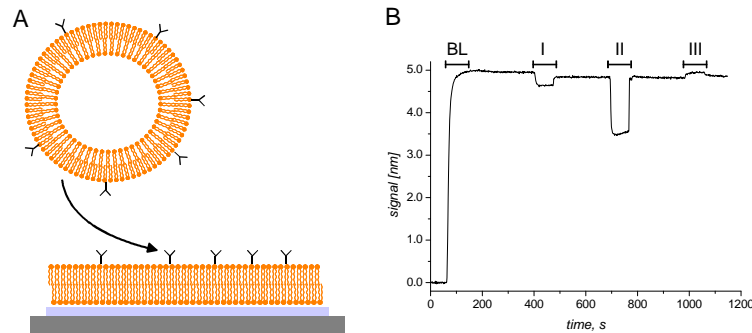


Abbildung 23 (A) Schematische Darstellung der Vesikelfusion auf Glasoberflächen. (B) Detektion der Assemblierung einer Lipiddoppelschicht und folgenden Injektionen von (I) Imidazol, (II) EDTA (III) und  $\text{Ni}^{2+}$  durch Rf-Spektroskopie.

### Bindungsuntersuchungen an einer Lipiddoppelschicht

Vergleichbar mit den kovalent an die Oberfläche gebundenen NTA-Gruppen diente das an SOA-gebundene bis-NTA der Immobilisierung von ifnar1-EC und ifnar2-EC über deren Histags. Die Immobilisierung auf einer Lipiddoppelschicht ermöglicht die laterale Diffusion der Rezeptoruntereinheiten innerhalb der Ebene. Nach der Immobilisierung der Rezeptoruntereinheiten wurde der jeweilige Bindungsassay (Tabelle 3) durchgeführt.

Tabelle 3 typischer Injektionsablauf

<b>Volumen</b>	<b>Dauer</b>	<b>Probe</b>
300 $\mu\text{l}$	200 s	Lipide
200 $\mu\text{l}$	40 s	200 mM Imidazol
200 $\mu\text{l}$	40 s	100 mM EDTA, pH 8
200 $\mu\text{l}$	40 s	15 mM $\text{NiCl}_2$
300 $\mu\text{l}$	100 s	ifnar2-EC
optional		ifnar1-EC
200 - 300 $\mu\text{l}$	100-200 s	Interferon
300 $\mu\text{l}$	40 s	200 mM Imidazol

Die Konzentrationen der immobilisierten oder injizierten Proteine, die Anzahl der aufeinander folgenden Injektionen der Interferone sowie die Dauer der Waschschrte zwischen den Injektionen wurden dem jeweiligen Experiment angepasst. Nach einem Bindungsassay konnte, wenn die Lipiddoppelschicht noch intakt war, mit Imidazol gewaschen werden und eine erneute Immobilisierung durchgeführt werden.

### Untersuchung binärer und ternärer Komplexe

Für die Untersuchung binärer Komplexe wurde ifnar2-EC oder ifnar1-EC auf einer der Oberfläche immobilisiert. Anschließend wurden, je nach Affinität, die unmarkierten oder mit Fluoreszenz markierten Interferone oder Mutanten mit entsprechender Konzentration injiziert und die Dissoziation durch Waschen mit Puffer beobachtet. Die Dauer des Waschens wurde der jeweiligen Dissoziationskinetik angepasst.

Der ternäre Komplex wurde durch Co-immobilisierung der Rezeptoreinheiten untersucht. Stets wurde das ifnar2-EC zuerst aufgegeben, da er aufgrund der negativen Ladung ineffizienter als ifnar1-EC an die negativ geladenen Chelatorgruppen bindet. Daraufhin wurde ifnar1-EC injiziert bis das Mengenverhältnis bei mindestens 1:1 lag. Das Mengenverhältnis der immobilisierten Rezeptoruntereinheiten konnte anhand der Rlf-Detektion quantifiziert werden.

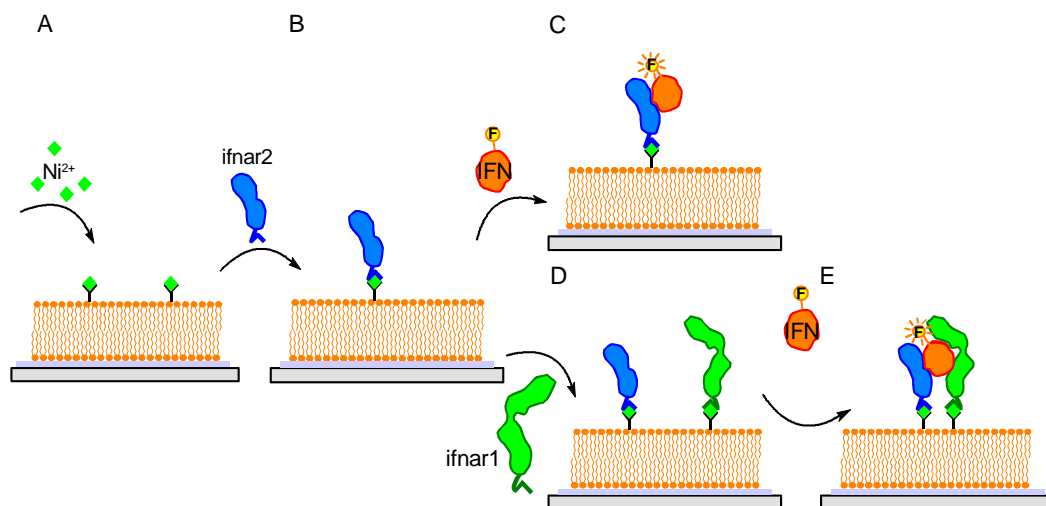


Abbildung 24 Schematische Darstellung eines Bindungsassays. (A-C) Untersuchung binärer Komplexe mit ifnar2-EC. (A, B, D, E) Untersuchung ternärer Komplexe.

### Auswertung der Bindungsaffinität

Die Höhe des zeitaufgelösten detektierten Signals beider Methoden ist direkt proportional zur veränderten Oberflächenbeladung. Daher lassen sich die Assoziationsratenkonstanten  $k_a$ , Dissoziationsratenkonstanten  $k_d$  und die Dissoziationsgleichgewichtskonstanten  $K_D$  bestimmen. Zum anderen konnte aus der Höhe des Rlf-Signals die Konzentration der gebundenen Rezeptoruntereinheiten bestimmt werden.

- 1 nm ifnar2-EC / RlfS = 1 ng/mm<sup>2</sup> = ~40 fmol/mm<sup>2</sup>
- 1 nm ifnar1-EC / RlfS = 0,42 ng/mm<sup>2</sup> = ~17 fmol/mm<sup>2</sup>

### à Kinetische Auswertung

Mit dem verwendeten Aufbau können Ratenkonstanten von bis zu  $0,1 - 0,2 \text{ s}^{-1}$  aufgelöst werden. In diesen Fällen wurden einfache Bindungsmodelle unter Annahme einer Kinetik pseudo-erster Ordnung angepasst (BIAevaluation-Software).  $K_D$ -Werte wurden als Quotient von Dissoziations- ( $k_d$ ) und Assoziationsratenkonstante ( $k_a$ ) berechnet.

### à Thermodynamische Auswertung

Die  $K_D$  wurde über die Gleichgewichtsbeladung bei verschiedenen Ligandkonzentrationen bestimmt. Hierfür wurden die Gleichgewichtssignale ( $R_D$ ) gegen die Konzentration ( $C$ ) des Liganden bzw. des Rezeptors aufgetragen und mittels Kurvenanpassung durch die Origin Software auf der Basis des Massenwirkungsgesetzes der  $K_D$ -Wert bestimmt. Der  $K_D$ -Wert konnte so auch bei schnellen, transienten Aktionen, deren Kinetik nicht auswertbar war, ermittelt werden.

$$\text{Gleichung 1} \quad R_D = R_{\max} + \frac{C}{C + K_D}$$

## 6 Korrelation Affinität und Aktivität

Um einen möglichen Zusammenhang zwischen den Bindungsaffinitäten und den Aktivitäten der Interferone herzustellen, wurden hierzu die relativen Werte berechnet. Das IFN $\alpha$ 2 wurden hierfür als Standard definiert, indem den Kehrwerten aus den  $K_D$  sowie den  $EC_{50}$ -Daten der Wert 1 zugeordnet wurde. Die Kehrwerte aus der Aktivität sowie Bindungsaffinität der anderen Interferone wurden daraufhin gegen das IFN $\alpha$ 2 relativiert (Gleichung 2, Gleichung 3).

$$\text{Gleichung 2} \quad \left[ \frac{1}{K_D^{\text{ifnar}}} \right] / \left[ \frac{1}{\text{IFN}\alpha 2 K_D^{\text{ifnar}}} \right] \quad (\text{rel. Affinität})$$

$$\text{Gleichung 3} \quad \left[ \frac{1}{EC_{50}} \right] / \left[ \frac{1}{\text{IFN}\alpha 2 EC_{50}} \right] \quad (\text{rel. Aktivität})$$

Ferner wurde die relative antiproliferative Aktivität gegen die relative ISGF3-Aktivierung relativiert (Gleichung 4). Diese wurde im Folgenden als differentielle AP Aktivität ( $\Delta AP$ ) bezeichnet und beschreibt die relative Potenz eine AP Aktivität gegenüber der ISGF3-Assemblierung zu induzieren. Zudem wurde das Verhältnis der Bindungsaffinität zu den Rezeptoruntereinheiten ifnar1 und ifnar2 nach der Gleichung 5 berechnet ( $= \rho R1/R2$ ). Je größer der Wert für  $\rho R1/R2$ , umso stärker näherten sich die Bindungsaffinitäten an. Ferner wurde die Änderung der apparenten Bindungsaffinität der Ligandenbindung im ternären Komplex gegenüber ifnar2-EC berechnet (Gleichung 6).

Gleichung 4  $rel.EC_{50}^{AP} / rel.EC_{50}^{ISGF3}$  (differentielle AP Aktivität,  $\Delta$  AP)

Gleichung 5  $\sqrt{rel.K_D^{ifnar1} / rel.K_D^{ifnar2}}$  (relative ifnar1 / ifnar2-Affinität,  $\rho$  R1/R2)

Gleichung 6  $k_d^{ternär} / k_d^{ifnar2-EC}$

## 7 Mikroskopie

Um den genauen Mechanismus der Interaktion zwischen Interferon und Interferonrezeptor an der Zelloberfläche näher zu studieren wurden Untersuchungen mit Einzelmolekülen vorgenommen.

Die Aufnahmen wurden mit der TIRF-Mikroskopie durchgeführt mit entsprechendem Aufbau, wie bei der TIRF-Spektroskopie. Die HeLa-Zellen wurden wie unter 4.3 beschrieben transfiziert. Die positive Transfektion und Expression von ifnar2 auf der Zelloberfläche wurde in der TIRF-Mikroskopie kontrolliert. Im TIRF-Modus bei der TIRF-Mikroskopie wurde der Einbau von ifnar2-EGFP in der Zellmembran überprüft, da im TIRF-Modus nur exprimierte Proteine in einer begrenzten Schicht detektiert werden können. Im so genannten Epifluoreszenz-Modus, bei dem der Laser mit einem Einfallswinkel von  $90^\circ$  durch die Zelle unreflektiert dringt, werden alle exprimierten ifnar2-EGFP-Proteine angeregt, die im gesamten Zellkörper vorkommen (z.B. endoplasmatisches Retikulum, Golgi-Apparat, Zellmembran). Daraufhin wurden Interferone an langlebige Quantum Dots (QD) über ein konjugiertes Biotinmaleimid kovalent gebunden. Dabei wurden biotinylierte Interferone (IFN $\alpha$ 2-S136C) in einem Konzentrationsverhältnis von max. 1:1 mit den QD655 vermengt und für einige Minuten bei  $4^\circ\text{C}$  inkubiert. In HeLa-Medium (+ FCS) verdünnt, wurden entsprechende Konzentrationen der Interferone im pM- bis nM-Bereich auf die HeLa-Zellen aufgetragen und für mindestens 15 Min. bei RT inkubiert. Daraufhin wurden die Zellen mindestens 2x mit Medium gewaschen und in der TIRF-Mikroskopie die Bindung der IFN-QD untersucht. Die Anregung wurde mit einem Argon-Laser durchgeführt. Für die spezifische Detektion von EGFP und den QD655 wurden die Emissionsfilter HQ 532/70 (EGFP) und D655/40 (QD655) von Chroma Tech. verwendet.

## V Ergebnisse

### 1 Aufreinigung und Fluoreszenzmarkierung von Interferonen

Um ausreichende Mengen verschiedener Interferone mit einem hohen Reinheitsgrad zu isolieren, wurden diese in *E. coli* heterolog exprimiert und anschließend aus den *inclusion bodies* rückgefaltet und aufgereinigt. Die Alaninsubstitution verschiedener Aminosäuren sowie die Einführung von Cysteinresten für eine ortsspezifische Fluoreszenzmarkierung konnte dadurch ebenso durchgeführt werden. Als Alternative zu der Expression in *E. coli* wurden die Interferone in *Sf9*-Insektenzellen exprimiert.

Bei der heterologen Expression von Interferonen in *E. coli* war zu berücksichtigen, dass (I.) das reduzierende Milieu im bakteriellen Cytoplasma eine korrekte Ausbildung der Disulfidbrücken in den Interferonen behindert sowie (II.) die Interferone in *inclusion bodies* abgelagert wurden. Für die korrekte Struktur der Interferone ist jedoch die Disulfidbrücke zwischen  $^{\alpha}C29$  und  $^{\alpha}C138 / ^{\alpha}C138$  essentiell. Die zweite Disulfidbrücke ( $^{\alpha}C1 - ^{\alpha}C98 / ^{\alpha}C99$ ) in den IFN $\alpha$ -Subtypen ist hingegen nicht wesentlich für die Struktur, führte jedoch bei einer ortsspezifischen Markierung mit Fluorophoren zu einer Mehrfachmarkierung, sobald reduzierte Cysteinreste vorlagen. Durch die Ablagerung der Interferone in *inclusion bodies* war daher unerlässlich, eine korrekte Rückfaltung der Interferone sowie die Abtrennung von einfach- und mehrfach Fluoreszenz markierten Interferonen zu erreichen.

#### 1.1 Aufreinigung verschiedener Interferone und Mutanten

##### IFN $\alpha$ -Subtypen

IFN $\alpha$ 1, IFN $\alpha$ 2, IFN $\alpha$ 8, IFN $\alpha$ 21 und Mutanten wurden in *E. coli* exprimiert und durch Renaturierung aus *inclusion bodies* gewonnen. Entsprechend ihres isoelektrischen Punktes (pI) bei ~5 wurden die renaturierten Interferone über einen Anionenaustauscher ankonzentriert und grob aufgereinigt. Im nächsten Schritt wurden die monomeren Interferone mit Hilfe der Größenausschlusschromatographie (Gelfiltration, GF) von Aggregaten und anderen Verunreinigungen getrennt. Die Monomere wurden dialysiert und erneut über Ionenaustausch-Chromatographie (IAC) konzentriert. Die Cystein-Mutanten für die ortsspezifische Fluoreszenz-Markierung wurden nach der Dialyse mit gewünschtem Fluorophor über Nacht inkubiert und ebenfalls über IAC aufgereinigt und konzentriert.

Die GF für IFN $\alpha$ 8 in Abbildung 25 A zeigt, dass die Rückfaltung der Interferone aus den *inclusion bodies* nicht vollständig möglich war. Nur 10 - 30 % der Gesamtproteinmenge konnten zu Monomeren rückgefaltet werden. Die Effizienz der Rückfaltung war dabei

abhängig von dem jeweiligen Interferon. So konnten IFN $\alpha$ 1 und die Mutante IFN $\alpha$ 2-HEQ nur durch die Modifizierung der Rückfaltungsprozedur in ausreichenden Mengen isoliert werden. Bei dem IFN $\alpha$ 1 lag die Ursache vermutlich in dem zusätzlichen Cysteinrest an der Position  $\alpha^1$ C86. Dadurch konnten intermolekulare Disulfidbrücken ausgebildet werden, so dass es zu einer verstärkten Aggregation kam. Die schlechte Effizienz der Rückfaltung von IFN $\alpha$ 2-HEQ ließ sich nicht nachvollziehen. Möglich wären Veränderungen in der Interferonstruktur, die zu einer Instabilität führen. Von der Reinheit der *inclusion bodies* war ferner der Grad der Verunreinigung abhängig.

Bei der Aufreinigung der IFN $\alpha$ -Subtypen waren nach der IAC im SDS-PAGE Doppelbanden bei ~18 kDa zu erkennen (Abbildung 26 B, C). Durch weitere Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass beide Banden dem Interferon entsprechen. Ursache für die Doppelbanden war vermutlich, dass während der Renaturierung aus den *inclusion bodies* die beiden Disulfidbrücken nicht bei allen Interferonen korrekt ausgebildet wurden. So entsprach die „untere“ Bande Interferonen, mit zwei korrekt ausgebildeten Disulfidbrücken. Die „obere“ Bande stimmte mit Interferonen überein, bei denen vermutlich eine oder beide Disulfidbrücke(n) nicht korrekt ausgebildet wurde(n) und daher mehrere Cysteinreste in einer reduzierten Form vorlagen. Im Gel war jedoch bereits eine partielle Abtrennung der verschiedenen Spezies über den Ionenaustauscher zu erkennen. Ferner war eine zusätzlich Bande im Bereich von 35 kDa zu festzustellen, die mit Dimeren korrespondierte. Letztendlich konnten verschiedene IFN $\alpha$ -Subtypen und Mutanten, trotz einer teils geringen Rückfaltungseffizienz, in ausreichenden Mengen von 0,3 bis 5 mg aufgereinigt werden.

### IFN $\omega$

Die Expression von IFN $\omega$  und dessen Mutanten wurde in *Sf9*-Insektenzellen durchgeführt. Dabei wurde das IFN $\omega$  in das Nährmedium mit Hilfe einer N-terminalen Sekretionssequenz sezerniert und konnte entsprechend dem basischen pI von ~9 über einen Kationenaustauscher direkt aus dem *Sf9*-Überstand isoliert werden. Die weitere Aufreinigung wurde über eine GF und einer anschließenden IAC durchgeführt (Abbildung 25 D-F).

Nur geringe Mengen an Protein aus dem *Sf9*-Nährmedium entsprachen dem monomeren IFN $\omega$ . Ein großer Teil der Proteine, die über den Kationenaustauscher aufgereinigt wurden, beinhaltete dagegen Proteine, die aus dem Nährmedium selbst stammten und an den Ionenaustauscher binden konnten. Nach dem Kationenaustausch wurden in dem zugehörige Gel (Abbildung 25 F) der IFN $\omega$ -Aufreinigung, im Gegensatz zu den IFN $\alpha$ -Aufreinigungen aus *inclusion bodies*, keine Doppelbanden beobachtet. Ursache hierfür war die Expression von IFN $\omega$  in einem eukaryontischen System, wodurch eine korrekte Faltung der Proteine sowie Kontrolle (ER / Golgi-Apparat) gewährleistet war.

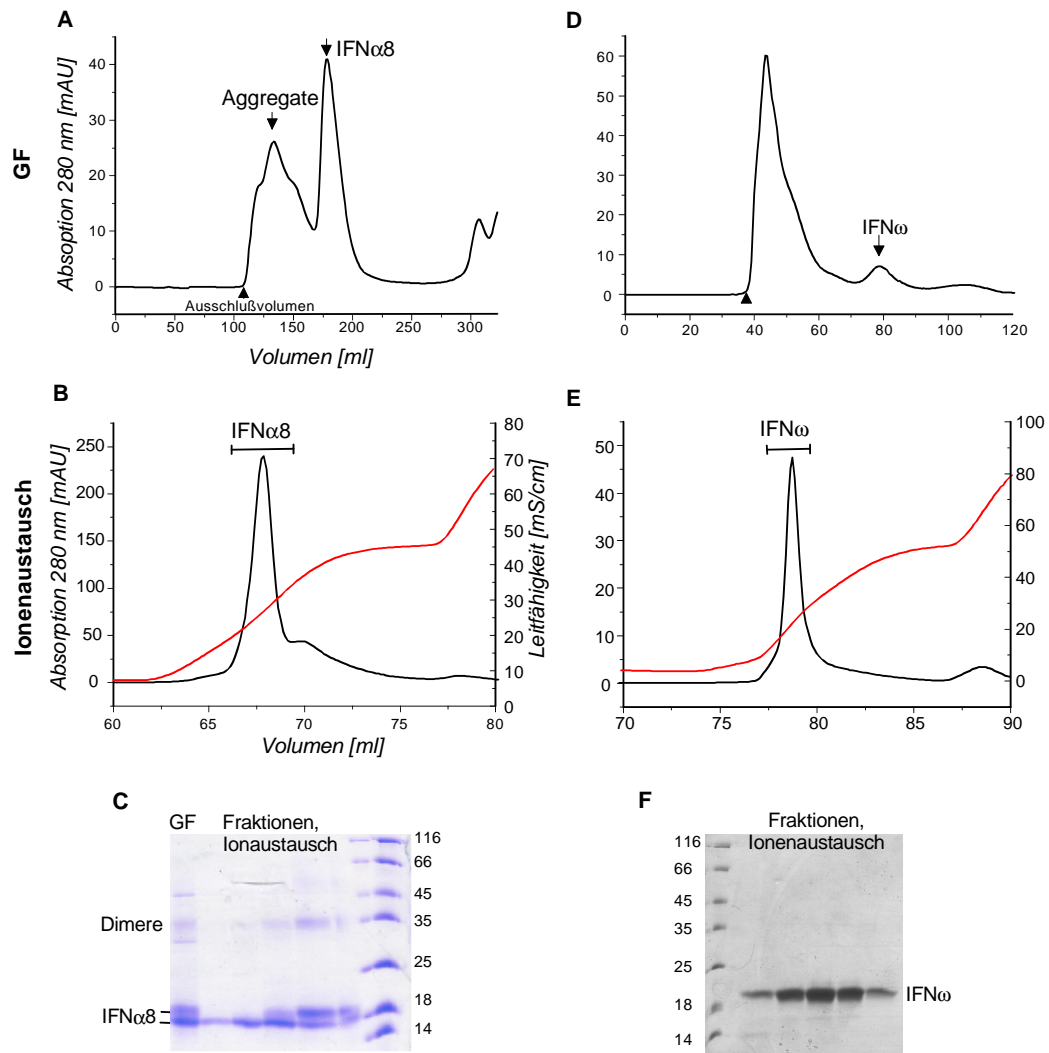


Abbildung 25 Aufreinigung von IFN $\alpha$ 8 und IFN $\omega$ . (A, B) GF und Anionenaustausch von IFN $\alpha$ 8. (D, E) GF und Kationenaustausch von IFN $\omega$ . (C, F) SDS-PAGE der zugehörigen Peakfraktionen aus den Ionenaustauschern.

## 1.2 Fluoreszenzmarkierung

Für eine ortsspezifische Fluoreszenzmarkierung wurde jeweils ein Cysteinrest an der Position  $\alpha^2$ S136 bzw.  $\omega^{\omega}$ S137 eingeführt, welcher an der Moleküloberfläche exponiert vorliegt (s. Einleitung, Abbildung 15). Folglich konnte es bei der Rückfaltung zu einer verstärkten Ausbildung von intermolekularen Disulfidbrücken kommen, welches zu einer Aggregation führte. Gleichzeitig war es notwendig, dass die Interferone während dem Renaturierungsschritt die Möglichkeit bekamen ihre intramolekularen Disulfidbrücken auszubilden, um eine Mehrfachmarkierung durch Fluorophore möglichst gering zu halten. Bei der Markierungsprozedur konnte es daher neben der selektiven Markierung des Cysteinrestes an der Position  $\alpha^2$ S136 bzw.  $\omega^{\omega}$ S137 zu einer Markierung zusätzlich reduziert vorliegender Cysteinreste kommen. Um eine hohe Ausbeute an monomeren Proteinen zu

erhalten und gleichzeitig eine optimale Fluoreszenzmarkierung zu erreichen, wurde der Rückfaltungsprozess modifiziert.

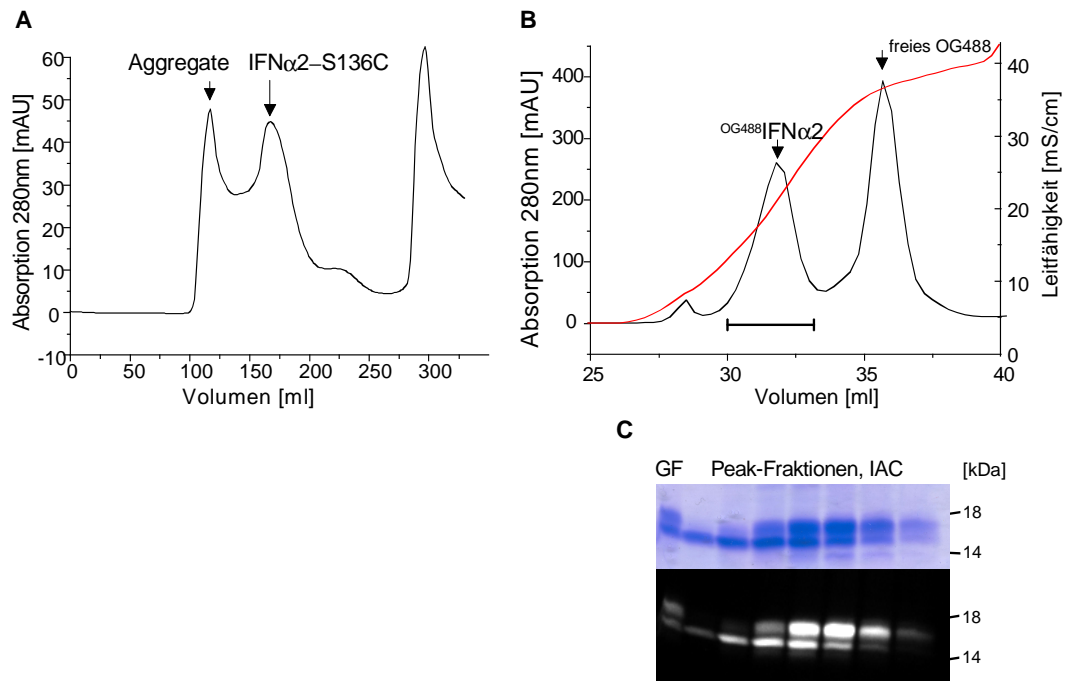
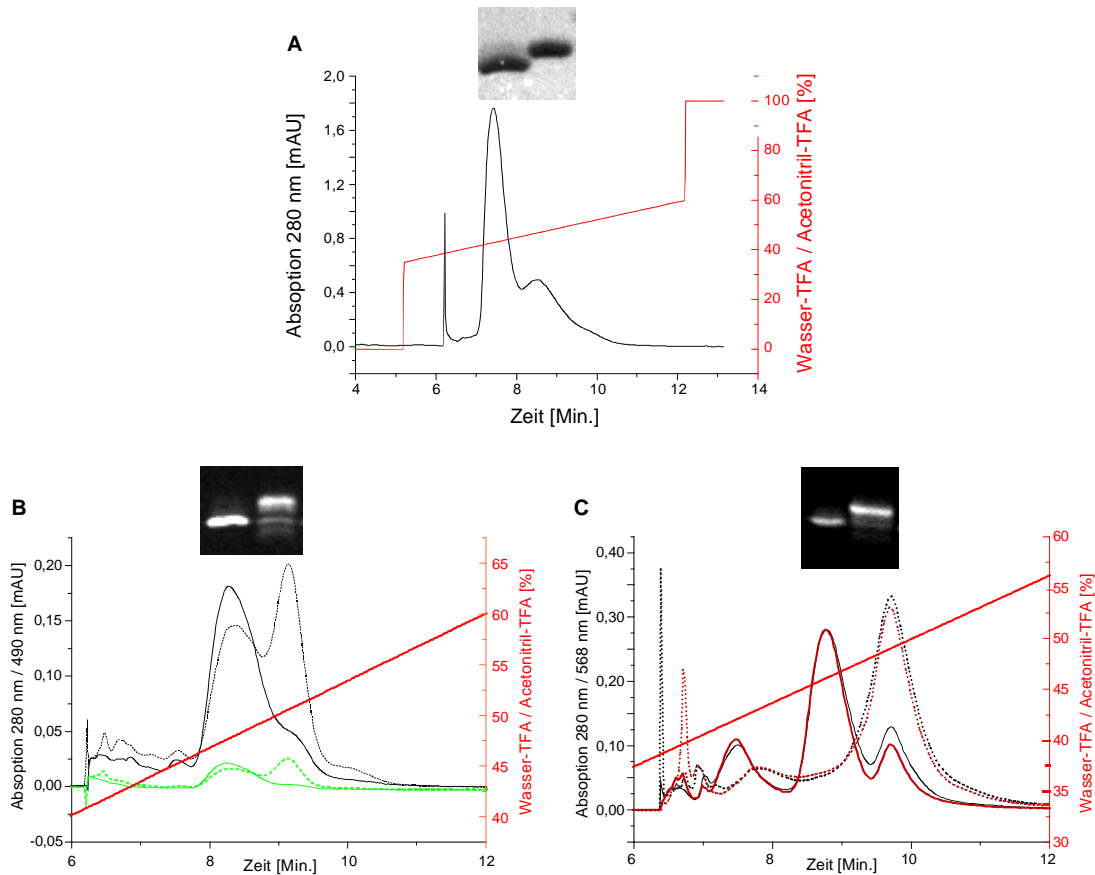


Abbildung 26 Aufreinigung von  $^{OG488}$ IFN $\alpha$ 2. (A) GF, (B) IAC und (C) SDS-PAGE sowie Fluoreszenzaufnahme (Anregung: 480 nm, 1 ms) der Elutionsfraktionen aus der IAC (30-33 ml).

Bei der Rückfaltung und Aufreinigung der Cystein-Mutanten (hier: IFN $\alpha$ 2-S136C) lag ein deutlich höherer Anteil als bei den IFN $\alpha$ -Subtypen aggregiert vor (Abbildung 26 A), so dass die Ausbeute an monomer vorliegenden Interferonen reduziert war. Um eine weitere Aggregation zu verhindern, war eine zügige Markierung mit Fluorophor notwendig. In der IAC von mit Oregon Green (OG488) markiertem IFN $\alpha$ 2-S136C ( $^{OG488}$ IFN $\alpha$ 2) waren zwei Peaks zu beobachten (Abbildung 26 B). Dabei eluierte bei einer erwarteten Leitfähigkeit von ~22 mS/cm das Fluoreszenz markierte  $^{OG488}$ IFN $\alpha$ 2. Bei der höheren Leitfähigkeit von ~35 mS/cm eluierte das freie Fluorophor OG488, welches negativ geladen vorliegt. In dem Gel und der zugehörigen Fluoreszenzaufnahme mit Proben aus dem Peakbereich bei ~22 mS/cm waren deutliche Doppelbanden zu erkennen (Abbildung 26 C). Demnach lag, trotz einer sorgfältigen Rückfaltung, eine relativ hohe Konzentration an Interferonen vor, welche nicht beide Disulfidbrücken ausgebildet hatten. Die Ursache der Peakbreite beruhte daher auf unterschiedliche Spezies mit unterschiedlichen Markierungsgraden. Diese eluierten mit minimalen Unterschieden von der IAC, so dass eine Auftrennung der verschiedenen Spezies bereits hier zu erkennen war. Ferner konnte über die IAC das freie Fluorophor OG488 abgetrennt werden.



Um jedoch eine deutlichere Abtrennung der verschiedenen markierten Spezies zu erreichen, wurden die Fraktionen des Ionenaustauschers über *reversed Phase Chromatographie* (RPC) aufgereinigt. Die Abtrennung der Spezies wurde zunächst an unmarkierten IFN $\alpha$ 2 untersucht (Abbildung 27 A).



**Abbildung 27** Aufreinigung von Interferonen über RPC. (A) Typisches Chromatogramm einer RPC von IFN $\alpha$ 2. (B)  $^{OG488}$ IFN $\alpha$ 2-E58A, (—) 280 nm (—) 490 nm. (C)  $^{AF568}$ IFN $\alpha$ 2, (—) 280 nm (—) 568 nm. Darstellung der RPC mit Fraktionen aus dem (—) vorderen und dem (---) hinteren Peakbereich des Ionenaustauschers. Fluoreszenzaufnahmen  $^{OG488}$ : Anregung bei 480 nm für 10 ms,  $^{AF568}$ : Anregung bei 600 nm für 50 ms.

In der RPC mit IFN $\alpha$ 2 sind zwei Peaks bei ~45 % und ~48 % Acetonitril / TFA zu erkennen (Abbildung 27 A). Die jeweilige Hauptfraktion wurde auf ein Gel aufgetragen, in dem eine deutliche Abtrennung der Doppelbanden zu erkennen war. Der Peak bei ~45 % Acetonitril / TFA enthielt die korrekt gefalteten Interferone mit ausgebildeten Disulfidbrücken, der Peak bei ~48 % Acetonitril / TFA enthielt Interferone mit nur einer oder keiner ausgebildeten Disulfidbrücke. Eine vergleichbare Abtrennung konnte mit  $^{OG488}$ IFN $\alpha$ 2-E58A und mit AF568 markierten IFN $\alpha$ 2-S136C ( $^{AF568}$ IFN $\alpha$ 2) erreicht werden (Abbildung 27 B, C), wie in den Fluoreszenzaufnahmen deutlich wird. Der Peak bei ~45 % Acetonitril / TFA enthielt demzufolge die einfach Fluoreszenz markierten Interferone und der Peak bei ~48 %

Acetonitril / TFA die mehrfach markierten Interferone. Demnach konnte eine vollständige Trennung der verschiedenen Spezies über die RPC erreicht werden (Abbildung 27 B, C). Dies hatte besondere Bedeutung im Hinblick auf mögliche veränderte Bindungseigenschaften der mehrfach markierten Interferone an die Rezeptoruntereinheiten, da dies zu einer Verfälschung der Bindungskonstanten führen könnte. Ein weiterer Vorteil der RPC war die Abtrennung noch vorhandener Verunreinigungen sowie freier Fluorophore.

### 1.3 Biotinylierte Interferone

Um Interferone mit QD655 markieren zu können, wurde das IFN $\alpha$ 2-S136C nach der Aufreinigung über IAC / GF mit einem Biotinmaleimid markiert. Gleichzeitig konnte hiermit der Markierungsgrad der Interferone untersucht werden. Über die Bindung von Streptavidin mit Hilfe einer analytischen GF nach der IAC und der RPC wurde dies überprüft.

Nach der Aufreinigung von biotinyliertem IFN $\alpha$ 2-S136C über die IAC sind im SDS-PAGE erneut Doppelbanden für die Interferone zu erkennen, die einfach- und mehrfach biotinylierten Interferonen entsprachen (Abbildung 28 A). Die IAC-Fractionen wurden daraufhin auf das Bindungsverhalten von Streptavidin untersucht, was über den Markierungsgrad Aufschluss geben konnte. Mit einem Überschuss an Streptavidin inkubiert, wurde das Elutionsverhalten über eine analytische GF beobachtet (Abbildung 29 B). Zunächst wurden die biotinylierten Interferone und Streptavidin separat aufgetragen. Dabei eluierten die biotinylierten Interferone bei einem erwarteten Elutionsvolumen von 1,75 ml, Streptavidin bei 1,55 ml. Wurden biotinylierte Interferone mit Streptavidin inkubiert trat in der GF ein deutlicher Peak bei 1,4 ml auf, welcher mit einfach biotinylierten Interferonen mit einem gebundenen Streptavidin korrespondierte. Jedoch waren im niedrigeren Elutionsvolumen viele weitere ineinander verlaufende Peaks zu erkennen. Diese enthielten mehrfach biotinylierte Interferone mit einer unterschiedlichen Anzahl an gebundenen Streptavidin, die zudem zur Aggregation neigten. Jedoch bestand nur mit einfach biotinylierten Interferonen die Möglichkeit ein QD pro Interferon zu binden. Daher wurde die Trennung der einfach und mehrfach biotinylierten Interferone mit Hilfe der RPC durchgeführt (Abbildung 29 C). Über die RPC traten zwei Peaks auf, die ein identisches Elutionsverhalten, wie das IFN $\alpha$ 2 über die RPC zeigten (1.2). Proben aus den jeweiligen Peaks wurden daraufhin auf die Bindung von Streptavidin über eine analytische GF untersucht (Abbildung 29 D). Einfach biotinylierte Interferone aus dem RPC-Peak bei ~45 % zusammen mit Streptavidin eluierten bei einem Retentionsvolumen von 1,4 ml und es traten keine weiteren Peaks im vorderen Elutionsbereich auf. Dagegen eluierten die biotinylierten Interferone aus dem RPC-Peak bei ~48 % zusammen mit Streptavidin nahe dem Ausschlußvolumen von 0,9 ml als Aggregate. Die einfach biotinylierten Interferone aus der RPC wurden für die weiteren Aktivitäts- und Affinitätsuntersuchungen verwendet.

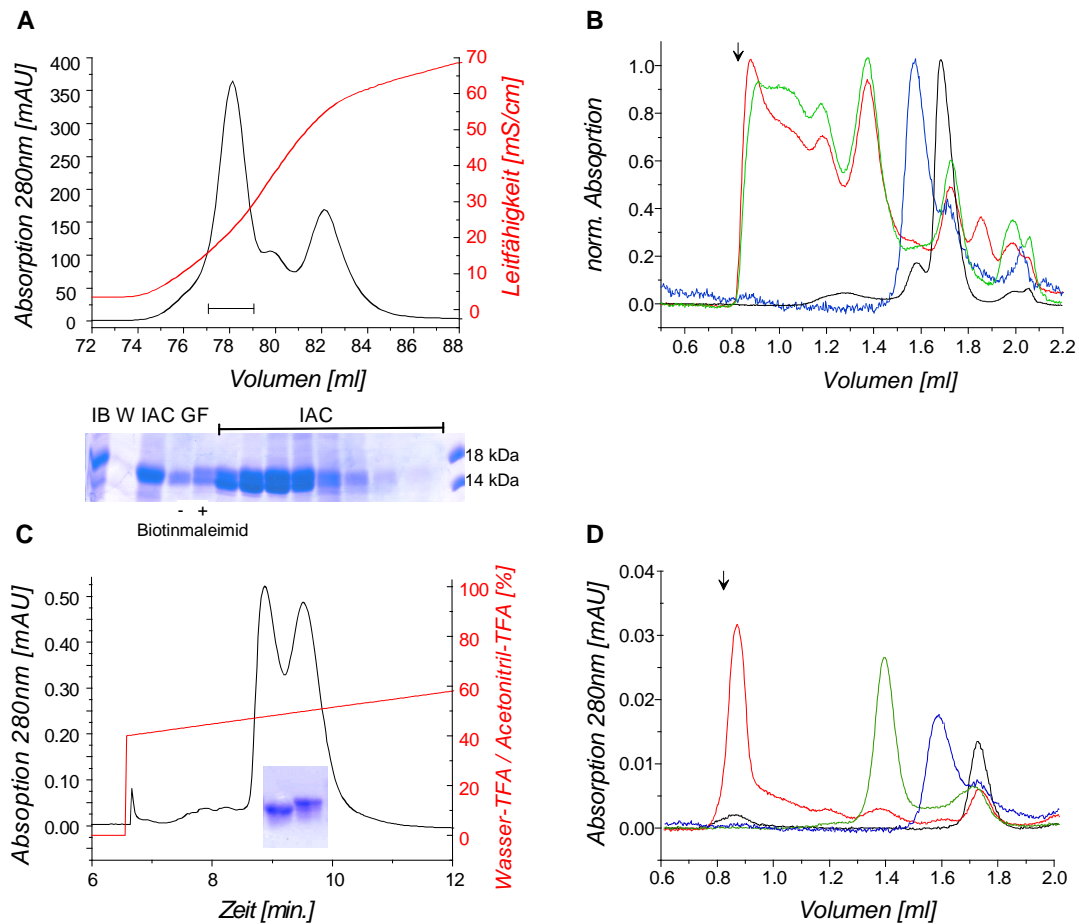


Abbildung 28 Aufreinigung einfach biotinylierter Interferone. (A) IAC der biotinylierten Interferone und zugehöriger SDS-PAGE. (B) Bindung von Streptavidin an biotinyliertes Interferonen aus der IAC. Proben aus dem Peakbereich (—) 77-78 ml, (—) 78-79 ml, (—) Streptavidin, (—) biotinyliertes IFN $\alpha$ 2-S136C, (↓) Ausschlussvolumen. (C) Separation über RPC. (D) Bindung von Streptavidin an biotinyliertes IFN $\alpha$ 2-S136C aus der RPC. (—) Probe aus 1.<sup>ten</sup> Peak, (—) Probe aus 2.<sup>ten</sup> Peak.

## 2 Assemblierung von Interferon und Rezeptor *in vitro*

Um qualitative und quantitative Unterschiede in den individuellen Bindungsaffinitäten verschiedener Interferone zu ifnar2 und ifnar1 nachzuweisen und den Einfluss auf die Assemblierung ternärer Komplexe bzw. der Signaltransduktion zu entschlüsseln, wurde mit Hilfe unmarkierter sowie Fluoreszenz markierter Interferone die Bindung an ifnar1 und ifnar2 untersucht. Hierzu wurden die Stöchiometrie, die Bindungsaffinität und die Kinetik experimentell bestimmt. Ebenso wurde durch Kompetition die Bindungsstelle zwischen den Interferonen und den Rezeptoruntereinheiten untersucht.

Die Immobilisierung der Rezeptoruntereinheiten und die Interferonbindung wurde mit Hilfe der reflektrometrischen Interferenz-Technik (Rlf) sowie der totalen internen Reflektions-Interferenz-Spektroskopie (TIRF-Spektroskopie) detektiert. Der Vorteil von Rlf war die

markierungsfreie Detektion der Rezeptor-Immobilisierung sowie der Interferonbindung, so dass die Stöchiometrie sowie die Bindungsaffinitäten hiermit untersucht werden konnten. Um Studien über die Bindungsstelle, Bindungskinetik und Komplexassemblierung bei niedrigen Oberflächenkonzentrationen der Rezeptoren durchführen zu können, wurden selektiv Fluoreszenz markierte Interferone und TIRF-Spektroskopie verwendet. Der Vorteil der TIRF-Spektroskopie gegenüber Rlf lag in einer verbesserten Spezifität und Selektivität. Durch eine höhere und verbesserte Signalauflösung konnte ein besseres Signal-Rausch-Verhältnis erzielt werden.

Bindungsstudien mit Interferonen wurden an den extrazellulären Domänen (EC) der Rezeptoruntereinheiten ifnar2-EC und ifnar1-EC durchgeführt, die mit einem Deka-Histidin-*tag* (His-*tag*) versehen waren und in gerichteter Orientierung auf eine modifizierte Oberfläche immobilisiert wurden. Um die individuelle Interaktion verschiedener Interferone zu ifnar2-EC oder ifnar1-EC zu untersuchen, wurden die Rezeptoruntereinheiten auf einem PEG-Polymer immobilisiert, welche multivalente NTA-Chelator-Kopfgruppen tragen (Chelator-PEG-Oberfläche).

## 2.1 Individuelle Interaktion der Interferone mit ifnar2-EC und ifnar1-EC

### 2.1.1 Unspezifische Bindung und Stöchiometrie

#### 2.1.1.1 *Unspezifische Bindung*

Um eine unspezifische Bindung der Interferone an die kovalent modifizierte Chelator-NTA-Oberfläche auszuschließen, wurde zunächst die Bindung der Interferone an eine unblockierte, mit Ni<sup>2+</sup>-Ionen beladene Chelator-NTA-Oberfläche überprüft. Dabei zeigten die IFN $\alpha$ -Subtypen keine unspezifischen Bindungseigenschaften an die Oberfläche (nicht dargestellt). Jedoch konnte für IFN $\beta$  und IFN $\omega$  eine unspezifische Bindung an nicht blockierte Oberflächen detektiert werden.

Daher wurde die Oberfläche mit einem Maltose-Binde-Protein (MBP-H10), welches einen Deka-Histidin-*tag* trägt, blockiert und erneut die Bindung der Interferone untersucht (Abbildung 29 A). Dabei konnte nach der Beladung der Ni<sup>2+</sup>-NTA-Chelatoren mit MBP-H10 keine unspezifische Bindung von IFN $\omega$  und von IFN $\beta$  auf der Oberfläche beobachtet werden. Ursache sind vermutlich vorhandenen Bindungsstellen für den Ni<sup>2+</sup>-NTA-Chelator. So liegen mögliche kovalente Bindungsstelle bei IFN $\beta$  über die Histidinreste an den Positionen H93 und H97 und bei IFN $\omega$  an den Positionen H86, H90 und H95 vor.

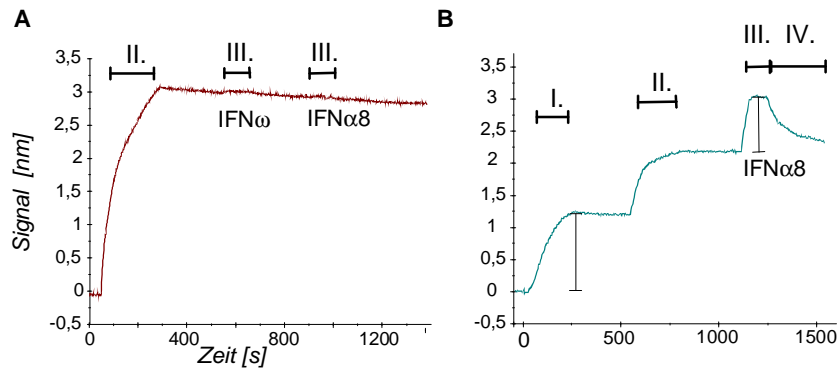


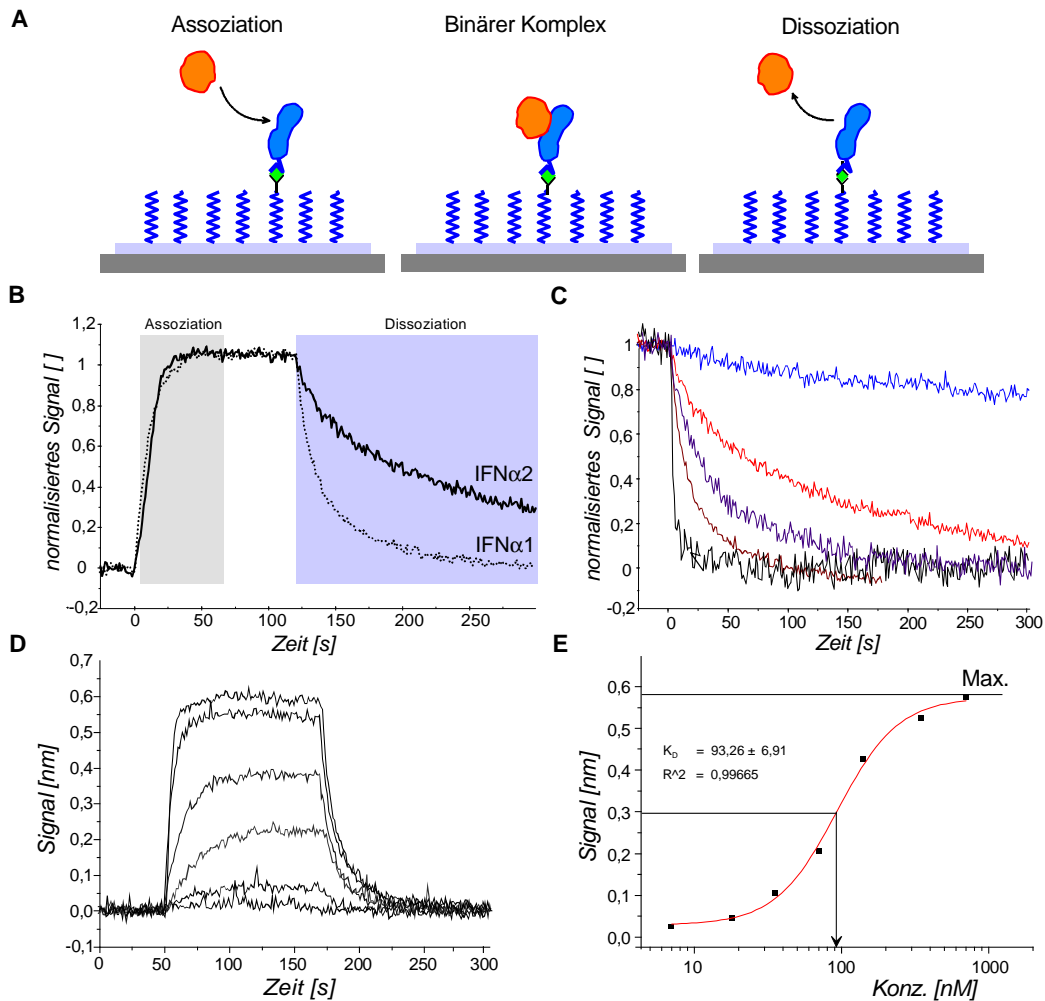
Abbildung 29 (A) Untersuchung der unspezifischen Bindung von Interferonen an die kovalent modifizierte Chelator-PEG-Oberfläche, blockiert mit MBP-H10. An die Injektion von (II.) MBP-H10 schließt sich (III.) die Injektion von Interferonen an. (B) Spezifische Bindung eines Interferons an ifnar2-EC. Immobilisierung von ifnar2-EC (I.) und MBP-H10 (II.) und anschließende Injektion von IFNα8 (III.).

### 2.1.1.2 Stöchiometrie

Um Erkenntnisse im Hinblick auf die Komplex-Assemblierung zu bekommen, war zunächst die Stöchiometrie bei der Einzelinteraktion zwischen Interferon und ifnar1 bzw. ifnar2 von Bedeutung. In Abbildung 29 B ist ein typischer Verlauf einer Bindung an eine extrazelluläre Rezeptoruntereinheit dargestellt, die mit Hilfe der Rif-Spektroskopie (RfS) detektiert wurde. Auf einer Chelator-PEG-Oberfläche wurde zunächst (I.) das ifnar2-EC über seinen His-tag immobilisiert, (II.) die freien  $\text{Ni}^{2+}$ -NTA-Chelatorköpfe mit MBP-H10 blockiert, (III.) ein Interferon injiziert und (IV.) durch Waschen mit Puffer die Dissoziation des Interferons eingeleitet. Gemessen an den relativen Amplituden, konnte für die Bindung der Interferone (~20 kDa) an ifnar2-EC (~25 kDa) eine 1:1-Stöchiometrie beobachtet werden. Diese 1:1-Stöchiometrie wurde für alle Interferone mit ifnar2-EC sowie mit ifnar1-EC gemessen (nicht dargestellt).

### 2.1.2 Interaktion mit ifnar2-EC

Neben dem stöchiometrischen Verhältnis von Interferon und Rezeptoruntereinheit, wurde die individuelle Interaktion von IFNα2, IFNα8, IFNα21, IFNβ, IFNω und IFNτ2 an ifnar2 untersucht. Hierzu wurde zunächst ifnar2-EC auf eine PEG-Polymer-Oberfläche immobilisiert und verschiedene Konzentrationen an Interferon injiziert (Abbildung 30). Mit Hilfe von Rif wurden die Bindungskinetiken der Interferone aufgenommen und daraus die Assoziationsratenkonstante  $k_a$ , Dissoziationsratenkonstante  $k_d$  und Dissoziationsgleichgewichtskonstante  $K_D$  bestimmt.



**Abbildung 30** *Interaktion verschiedener Interferone mit ifnar2-EC, immobilisiert auf einer kovalent modifizierten Chelator-PEG-Oberfläche. (A) Schematische Darstellung der Bindung an ifnar2-EC. (B) Bindung von IFNα1 und IFNα2. (C) Dissoziation verschiedener Interferone: (—) IFNβ, (—) IFNα2, (—) IFNα21, (—) IFNα1, (—) IFNτ2. (D) Titration von IFNα1 in ansteigenden Konzentrationen (20, 40, 60, 120, 250 und 500 nM). (E) Signal des Gleichgewichtszustands der IFNα1-Bindung gegen die Konzentration (Konz.) aufgetragen,  $K_D$  berechnet nach Langmuir.*

Ein typischer Ablauf einer Interaktion von Interferon mit ifnar2-EC ist in Abbildung 30 A dargestellt. Ein Interferon bindet an ifnar2-EC, bildet einen binären Komplex aus und dissoziiert, in Abbildung 30 B für IFNα1 und IFNα2 gezeigt. Für die Bestimmung der Ratenkonstanten an ifnar2-EC wurden Konzentrationen verwendet, die eine maximale Beladung von ifnar2-EC garantierten. Dabei zeigten sich deutliche Unterschiede in der Dissoziationskinetik zwischen den verschiedenen Interferonen (Abbildung 30 C). So wurde für IFNβ die langsamste und für das IFNτ2 die schnellste Dissoziation von ifnar2-EC beobachtet. Weitere deutliche Dissoziationsunterschiede waren bei den IFNα-Subtypen zu erkennen. Ebenfalls konnten Unterschiede in der Assoziationskinetik festgestellt werden (Tabelle 4). Um die Dissoziationsgleichgewichtskonstanten  $K_D$  für die Interferone bestimmen

zu können, wurden die Interferone mit ansteigenden Konzentrationen von 5 nM bis 1  $\mu$ M injiziert (Ausnahme IFN $\tau$ 2: 10 nM bis 10  $\mu$ M) (Abbildung 30 D) und aus den Signalen der Gleichgewichtszustände mit Hilfe eines Langmuir-Plots der  $K_D$  berechnet (Abbildung 30 E). Die  $K_D$ -Werte wurden zusätzlich aus den Ratenkonstanten  $k_a$  und  $k_d$  berechnet ( $K_D = k_d / k_a$ ).

### 2.1.2.1 Rückbindung und schnelle Kinetik

Um eine Verfälschung der Ratenkonstanten und Dissoziationsgleichgewichtskonstanten durch Rückbindungseffekte auszuschließen, wurden Untersuchungen durchgeführt, die den Einfluss der Rückbindung an die Rezeptoren klären sollten. Mit Hilfe der TIRF-Spektroskopie, spezifisch Fluoreszenz markierter Interferone und der Zugabe eines Überschusses unmarkierter Interferone, *tagless ifnar2-EC* (*ifnar2-tgl*) beim Waschen oder durch die Änderung der Rezeptoroberflächenkonzentration wurde der Rückbindungseffekt untersucht (Abbildung 31). Dabei wird der Rückbindungseffekt der Interferone an *ifnar2-EC* von der Assoziationsratenkonstante  $k_a$  beeinflusst, wie bereits für IFN $\alpha$ 2 und IFN $\beta$  nachgewiesen werden konnte.

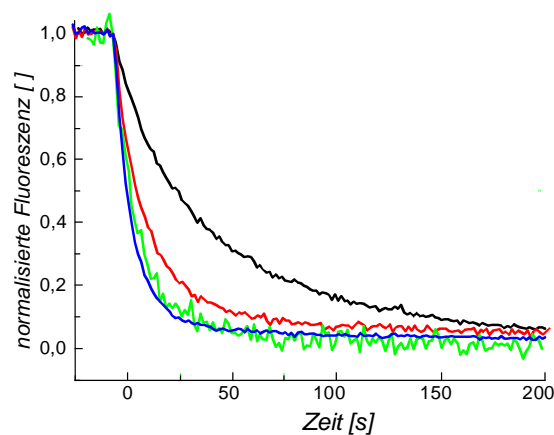


Abbildung 31 Untersuchung von Rückbindungseffekten. (—) Dissoziation von  $^{OG488}$ IFN $\alpha$ 21 bei hoher *ifnar2*-Oberflächenkonzentration, (—) Dissoziation von  $^{OG488}$ IFN $\alpha$ 21 bei niedriger *ifnar2*-Oberflächenkonzentration, (—) Dissoziation von  $^{OG488}$ IFN $\alpha$ 21 bei hoher *ifnar2*-Oberflächenkonzentration und Zugabe von 1  $\mu$ M *ifnar2-tgl*, (—) Dissoziation von  $^{OG488}$ IFN $\alpha$ 21 bei hoher *ifnar2*-Oberflächenkonzentration und Zugabe von 3  $\mu$ M unmarkiertem IFN $\alpha$ 21.

Zu erkennen ist, dass die Dissoziation von  $^{OG488}$ IFN $\alpha$ 21 aus *ifnar2-EC* bei einer verringerten Rezeptoroberflächenkonzentration (—) gesteigert wurde (Abbildung 31). Ebenso wurde durch die Zugabe von *ifnar2-tgl* (—) oder einer hohen Konzentration an unmarkierten Interferonen (—) eine schnellere Dissoziation erreicht, die sich jeweils um einen vergleichbaren Faktor veränderte. Dies lässt darauf schließen, dass eine Rückbindung der

Interferone an ifnar2-EC verhindert werden konnte. Unter den IFN $\alpha$ -Subtypen wurde für das IFN $\alpha$ 8 aufgrund der höheren Assoziationsratenkonstante ( $k_a$ :  $6,5 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) der stärkste Rückbindungseffekt nachgewiesen. Die Rückbindungseffekte an ifnar2-EC waren für die Interferone unterschiedlich stark ausgeprägt und wurden bei den aufgeführten Konstanten in der Tabelle 4 berücksichtigt.

Ferner wurde für das IFN $\tau$ 2 eine schnelle Bindungskinetik beobachtet, so dass die Ratenkonstanten mit Hilfe von OG488 markiertem IFN $\tau$ 2 und der TIRF-Spektroskopie bestimmt wurden. Hierzu wurde IFN $\tau$ 2 über den zusätzlichen Cysteinrest an der Position  $\tau^2$ C86 Fluoreszenz markiert.

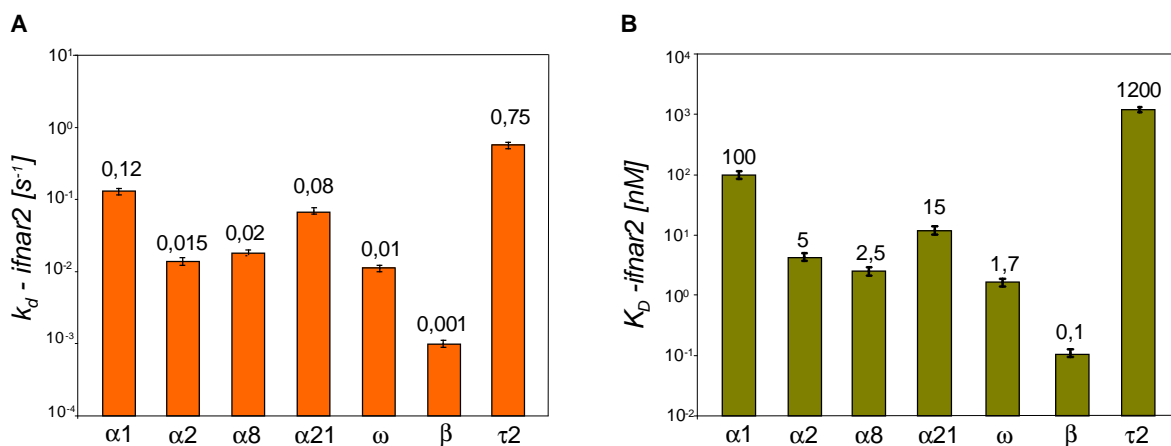


Abbildung 32 (A) Dissoziationsratenkonstanten ( $k_d$ ). (B) Dissoziationsgleichgewichtskonstanten ( $K_D$ ) verschiedener Interferone an ifnar2-EC.

Tabelle 4 Raten- und Gleichgewichtskonstanten verschiedener Interferone an ifnar2-EC.

Interferon	$k_a$ [ $\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ]	$k_d$ [ $\text{s}^{-1}$ ]	$K_D$ [nM]	$K_D$ ( $k_d / k_a$ ) [nM]
IFN $\alpha$ 1	$1,5 \times 10^6$	0,12	100	80
IFN $\alpha$ 2	$3 \times 10^6$	0,015	5	5
IFN $\alpha$ 8	$5 \times 10^6$	0,02	2,5	4
IFN $\alpha$ 21	$3 \times 10^6$	0,08	15	20
IFN $\omega$	$\sim 6 \times 10^6$	0,01	1,7	1,4
IFN $\beta$	$\sim 1 \times 10^7$	0,001	0,1	0,1
IFN $\tau$ 2	$5 \times 10^5$	0,75	1200	1500
Fehler [%]	5-10	5-10	10-20	10-20



Für die Interferone wurden  $k_a$ -Werte zwischen  $5 \times 10^5 - 1 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  ermittelt (Tabelle 4). Dabei konnte für das IFN $\beta$  die höchste Assoziationsratenkonstante ( $k_a: 1 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) und für das IFN $\tau 2$  eine fast 100-fach niedrigere  $k_a$  ( $5 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ) bestimmt werden. Die IFN $\alpha$ -Subtypen und das IFN $\omega$  zeigten nur geringe Unterschiede im Bereich von  $1,5 - 6 \times 10^6 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ . Dabei wurde für das IFN $\alpha 8$  die höchste und für das IFN $\alpha 1$  die niedrigste  $k_a$  bei den IFN $\alpha$ -Subtypen beobachtet.

Bei den Dissoziationsratenkonstanten wurde für das IFN $\beta$  die langsamste Dissoziation ( $k_d: 0,001 \text{ s}^{-1}$ ) und für das IFN $\tau 2$  eine fast 1000-fach schnellere Dissoziation ( $k_d: 0,75 \text{ s}^{-1}$ ) von ifnar2-EC detektiert (Abbildung 32 A, Tabelle 4). Im Vergleich zu der Assoziation konnten bei den IFN $\alpha$ -Subtypen stärkere Unterschiede in der Dissoziation beobachtet werden. Insbesondere für das IFN $\alpha 1$  wurde eine fast 10-fach schnellere Dissoziationsratenkonstante  $k_d$  von  $0,12 \text{ s}^{-1}$  im Vergleich zu IFN $\alpha 2$  ( $0,015 \text{ s}^{-1}$ ) aufgezeichnet. Für das IFN $\alpha 21$  wurde ebenfalls eine siebenfach schnellere Dissoziation ( $k_d: 0,08 \text{ s}^{-1}$ ) detektiert. Insgesamt wurden bei den  $k_d$ -Werten starke Unterschiede zwischen den Interferonen beobachtet, die über fast drei Größenordnungen variierten.

Bei den Dissoziationsgleichgewichtskonstanten wurde für das IFN $\beta$  die geringste  $K_D$  von  $0,1 \text{ nM}$  und das IFN $\tau 2$  die höchste  $K_D$  von  $1500 \text{ nM}$  detektiert (Abbildung 32 B). Unterschiede konnten zwischen den IFN $\alpha$ -Subtypen festgestellt werden. So lag der  $K_D$  für IFN $\alpha 1$  bei  $100 \text{ nM}$  und demzufolge um das 20-fache höher als für IFN $\alpha 2$  ( $5 \text{ nM}$ ). Für IFN $\alpha 21$  wurde eine vierfach höhere Dissoziationsgleichgewichtskonstante ( $K_D: \sim 20 \text{ nM}$ ) ermittelt. Der Vergleich der  $K_D$ -Werte, berechnet aus den Gleichgewichtszuständen oder den  $k_a$ - und  $k_d$ -Werten, zeigte dabei eine relativ gute Übereinstimmung (Tabelle 4). Wie für die Dissoziationsratenkonstanten wurden gewaltige Unterschiede für die  $K_D$ -Werte ermittelt, die über  $10^4$  Größenordnungen variierten.

### 2.1.3 Bindungsstelle auf ifnar2-EC

Ferner wurde die Bindungsstelle zwischen den Interferonen und ifnar2 genauer charakterisiert. Hierzu wurden markierte Interferone zusammen mit unmarkierten Interferonen auf ifnar2-EC injiziert und das Bindungsverhalten sowie die Konkurrenz der Fluoreszenz markierten Interferone an die Rezeptoruntereinheit beobachtet (Abbildung 33 A).

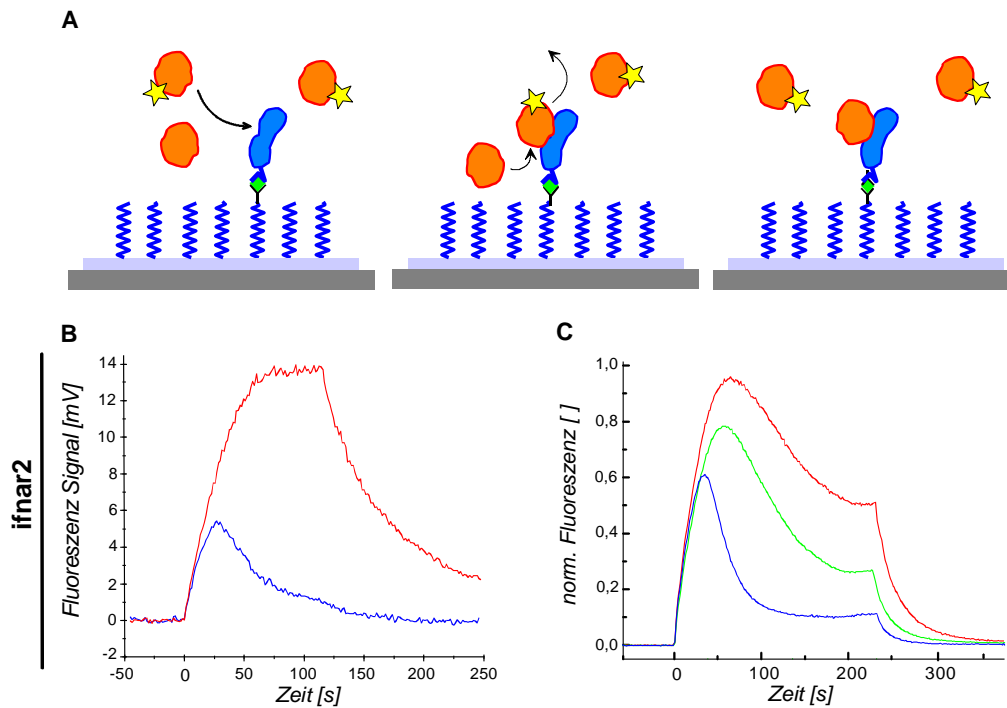


Abbildung 33 *Kompetition von Interferonen aus ifnar2-EC (A) Schematische Darstellung der Konkurrenz. (B) Verdrängung von <sup>AF488</sup>IFN $\alpha$ 2 durch IFN $\omega$ : (—) <sup>AF488</sup>IFN $\alpha$ 2, 100 nM; (—) <sup>AF488</sup>IFN $\alpha$ 2, 100 nM + IFN $\omega$ , 50 nM. (C) Verdrängung von <sup>OG488</sup>IFN $\alpha$ 21 durch IFN $\alpha$ 2: (—) <sup>OG488</sup>IFN $\alpha$ 21, 400 nM + IFN $\alpha$ 2, 50 nM, (—) + IFN $\alpha$ 2, 100 nM, (—) + IFN $\alpha$ 2, 200 nM.*

Bei einer gleichzeitigen Injektion von IFN $\omega$  und <sup>AF488</sup>IFN $\alpha$ 2 (—) war zunächst ein Anstieg im Fluoreszenzsignal zu erkennen, das jedoch maximal 40 % der Vergleichsinjektion ohne IFN $\omega$  (—) entsprach (Abbildung 33 B). Daraufhin nahm das Signal bis auf 10 % ab. Daraus war zu schließen, dass das <sup>AF488</sup>IFN $\alpha$ 2 bereits bei der Assoziation durch das IFN $\omega$  von ifnar2-EC verdrängt wurde, da von <sup>AF488</sup>IFN $\alpha$ 2 nur eine gering höhere Konzentration gegenüber IFN $\omega$  vorlag und das IFN $\omega$  zudem eine höhere Assoziationsratenkonstante aufweist. Die höhere Bindungsaffinität des IFN $\omega$  bewirkte daraufhin eine fast vollständige Verdrängung von <sup>AF488</sup>IFN $\alpha$ 2 aus der ifnar2-Bindungstasche.

Für die IFN $\alpha$ -Subtypen war ebenfalls eine gegenseitige Verdrängung aus der Bindung zu erkennen, in Abbildung 33 C für <sup>OG488</sup>IFN $\alpha$ 21 und IFN $\alpha$ 2 dargestellt. Wurde das Fluoreszenzsignal gegen die ifnar2-Oberflächenkonzentration und dem maximalen Fluoreszenzsignal von markierten Interferon normalisiert, war bei steigender Konzentration des kompetitierenden IFN $\alpha$ 2 eine verstärkte Verdrängung des <sup>OG488</sup>IFN $\alpha$ 21 aus der Bindung zu erkennen. Eine Verdrängung der IFN $\alpha$ -Subtypen und des IFN $\omega$  aus der Bindung konnte ebenfalls mit IFN $\beta$  beobachtet werden. Daraus konnte geschlossen werden, dass die Interferone über ein identisches Bindungsepitop auf ifnar2-EC binden und um die Bindung

konkurrieren. Der Grad der Competition ist dabei Abhängigkeit von den jeweiligen Assoziations- und Dissoziationsratenkonstanten sowie der Konzentration der Interferone.

#### 2.1.4 Interaktion verschiedener Mutanten mit ifnar2-EC

Bisher wurden für die Interferone unterschiedliche Bindungsaffinitäten, jedoch ein gemeinsames Bindungsepitop auf ifnar2-EC bestimmt. Mögliche Ursache für die unterschiedlichen Affinitäten können daher unterschiedliche Wechselwirkungen im gemeinsamen Interaktionsepitop sein. Ebenso ist bisher nicht genau geklärt, in wie weit ein gemeinsames Interaktionsepitop auf beiden Interaktionspartnern vorliegt. Bisher konnte nur gezeigt werden, dass eine gegenseitige Verdrängung der Interferone aus der ifnar2-Bindung stattfindet und demzufolge eine gemeinsame Bindungsstelle auf ifnar2 vorliegt.

Um die Wechselwirkungen und deren Auswirkung auf die Bindungsaffinität zu ifnar2-EC näher zu untersuchen, wurden zunächst die Mutationen R144A ( $^{\alpha 2}$ R144A) und R149A ( $^{\alpha 2}$ R149A) in IFN $\alpha$ 2 ausgewählt, die von besonderer Bedeutung für die Bindung an ifnar2 sind (Abbildung 34). An entsprechender AS-Position wurden homologe Alaninsubstitutionen in IFN $\alpha$ 1, IFN $\alpha$ 8, IFN $\alpha$ 21 (hier:  $^{\alpha 1}$ R145A,  $^{\alpha}$ R150A) und IFN $\omega$  ( $^{\omega}$ K150A) durchgeführt, um den Einfluss der Argininreste bzw. des Lysinrestes auf die Bindung bei den verschiedenen Interferonen zu klären.

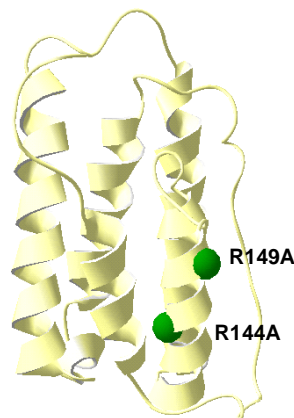


Abbildung 34 Substitutionen auf der E-Helix des IFN $\alpha$ 2, welche die ifnar2-Affinität beeinflussen.

Für die Mutation an Position  $\alpha^2$ R144A konnte eine dreifach ( $k_d$ :  $0,045 \text{ s}^{-1}$ ) schnellere Dissoziationsratenkonstante und eine 30-fach höhere  $K_D$  von 150 nM im Vergleich zu IFN $\alpha$ 2 beobachtet werden (Abbildung 35 A, Tabelle 5). Ursache für die verminderte Bindungsaffinität von IFN $\alpha$ 2-R144A war eine 10-fach niedrigere Assoziationsratenkonstante  $k_a$ . Eine Reduktion der Bindungsaffinität wurde ebenfalls für IFN $\alpha$ 1-R145A beobachtet. Bei der homologen Alaninsubstitution an der Position  $\alpha^2$ R149A,  $\alpha$ R150A bzw.  $^{\omega}$ K150A war ausnahmslos eine verringerte Affinität an ifnar2-EC festzustellen, jedoch mit unterschiedlich starken Auswirkungen. Bei den IFN $\alpha$ -Subtypen konnte der geringste Effekt für IFN $\alpha$ 8-R150A ( $K_D$  ~300 nM) im Vergleich zu ihrem jeweiligen Wildtyp beobachtet werden. Für IFN $\alpha$ 2-R150A ( $K_D$  550 nM) war dagegen die stärkste Reduktion der Bindungsaffinität zu erkennen. Da sich jedoch insgesamt eine Minderung der Bindungsaffinitäten zeigte, scheint der Argininrest bei allen IFN $\alpha$ -Subtypen an der Interaktion mit ifnar2 beteiligt zu sein. Da für die IFN $\alpha$ -Subtypen bereits unterschiedliche  $K_D$ -Werte beobachtet wurden, kann der Verlust des Argininrestes im Interaktionsepitop unterschiedlich starke Auswirkungen auf die verbleibenden Interaktionspartner hervorrufen und somit auf die gesamte Bindungsaffinität. Dagegen wurde für die Alaninsubstitution des Lysinrestes  $^{\omega}$ K150 im IFN $\omega$  ein geringerer Einfluss auf die Affinität zu ifnar2 beobachtet.

Um die Bedeutung des Argininrestes für die Interaktion mit ifnar2 detaillierter aufzuklären, wurden weitere Untersuchungen mit der ifnar2-EC Mutante  $R^2$ E79A durchgeführt. Von dem Argininrest  $\alpha^2$ R149 in IFN $\alpha$ 2 ist bekannt, dass dieser eine intermolekulare Wechselwirkung über den Glutamatrest  $R^2$ E79 in ifnar2 eingeht [149] und daher keine weitere Affinitätsminderung detektiert werden kann. Für alle Mutanten konnte ebenso keine weitere Änderung in der Bindungsaffinität beobachtet werden. Demzufolge wird möglicherweise bei allen IFN $\alpha$ -Subtypen über den Argininrest eine Salzbrücke mit  $R^2$ E79 ausgebildet.

Um zu garantieren, dass die Mutationen nur die Bindung an ifnar2 beeinflussen, wurde die ifnar1-Affinität ebenfalls untersucht. Hierbei wurden keine Änderungen detektiert, am Beispiel von IFN $\alpha$ 2-R144A an ifnar1 in Abbildung 35 B gezeigt.

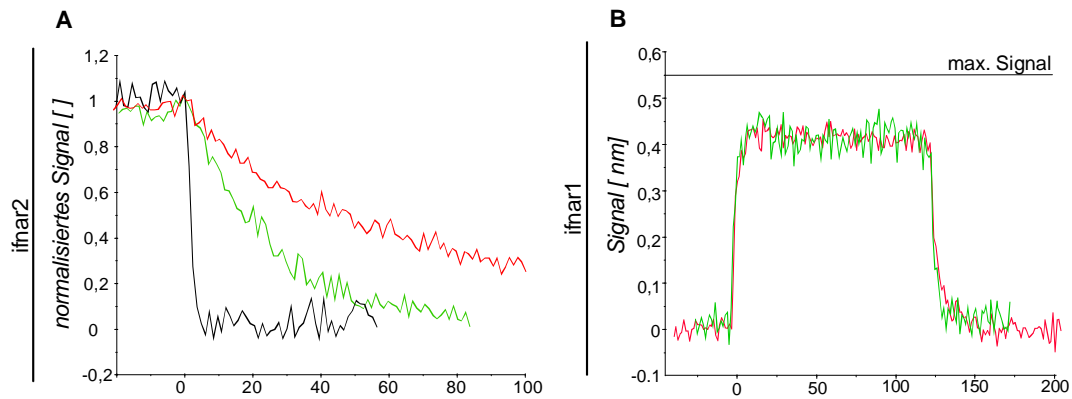


Abbildung 35 Interaktion verschiedener Mutanten mit ifnar2-EC, immobilisiert auf einer kovalent modifizierten Chelator-PEG-Oberfläche. (A) Interaktion mit ifnar2-EC: (—) IFN $\alpha$ 2, (—) IFN $\alpha$ 2-R144A, (—) IFN $\alpha$ 2-R149A. (B) Interaktion mit ifnar1-EC: (—) IFN $\alpha$ 2, 20  $\mu$ M, (—) IFN $\alpha$ 2-R144A, 20  $\mu$ M.

Tabelle 5 Dissoziationsratenkonstanten ( $k_d$ ) und Dissoziationsgleichgewichtskonstanten ( $K_D$ ) verschiedener Mutanten.

Mutante	ifnar2-EC		wt
	$k_d$ [ $s^{-1}$ ]	$K_D$ [nM]	$K_D$ [nM]
IFN $\alpha$ 1-R145A	-	>4000	100
IFN $\alpha$ 2-R144A	0,045	150	5
IFN $\alpha$ 1-R150A	-	>10000	100
IFN $\alpha$ 2-R149A	~2	550	5
IFN $\alpha$ 8-R150A	-	~300	2,5
IFN $\alpha$ 21-R150A	-	~4000	20
IFN $\omega$ -K150A	0,02	~50	1,5
Fehler [%]	10-20	10-20	10-20

### 2.1.5 Interaktion mit ifnar1-EC

Für die Charakterisierung der Interaktion von IFN $\alpha$ 2, IFN $\alpha$ 8, IFN $\alpha$ 21, IFN $\beta$ , IFN $\omega$  und IFN $\tau$ 2 mit ifnar1, wurde ifnar1-EC ebenfalls auf eine PEG-Polymer-Oberfläche über den His-tag immobilisiert und die Bindungskinetik der Interferone beobachtet (Abbildung 36 A). Eine typische Bindungskurve ist für IFN $\omega$  und IFN $\alpha$ 8 in Abbildung 36 B gezeigt. Für das IFN $\alpha$ 8 konnte dabei eine geringere Signalthöhe, trotz einer vierfach höheren Konzentration, sowie eine schnellere Dissoziation gegenüber IFN $\omega$  beobachtet werden. Eine Bindung an ifnar1-EC konnte dabei für alle IFN $\alpha$ -Subtypen erst bei höheren nM-Konzentrationen beobachtet werden. Nur für IFN $\beta$  und IFN $\omega$  war eine Bindung bereits im niedrigen nM-Bereich detektierbar. Da die Interferone eine schnelle transiente Dissoziation von ifnar1-EC aufwiesen, wurde die Bestimmung der Dissoziationsratenkonstanten  $k_d$  mit Hilfe von

Fluoreszenz markierten Interferonen und der TIRF-Spektroskopie durchgeführt. Dabei waren deutliche Unterschiede in der Dissoziation für die verschiedenen Interferone von ifnar1-EC zu erkennen (Abbildung 36 C). Um die Dissoziationsgleichgewichtskonstanten  $K_D$  für die Interferone zu bestimmen, wurden Konzentrationen von 100 nM bis 50  $\mu$ M auf ifnar1-EC titriert (Abbildung 36 D). Aus den Gleichgewichtszuständen der Titrationskurven wurden die  $K_D$ -Werte nach Langmuir berechnet (Abbildung 36 E).

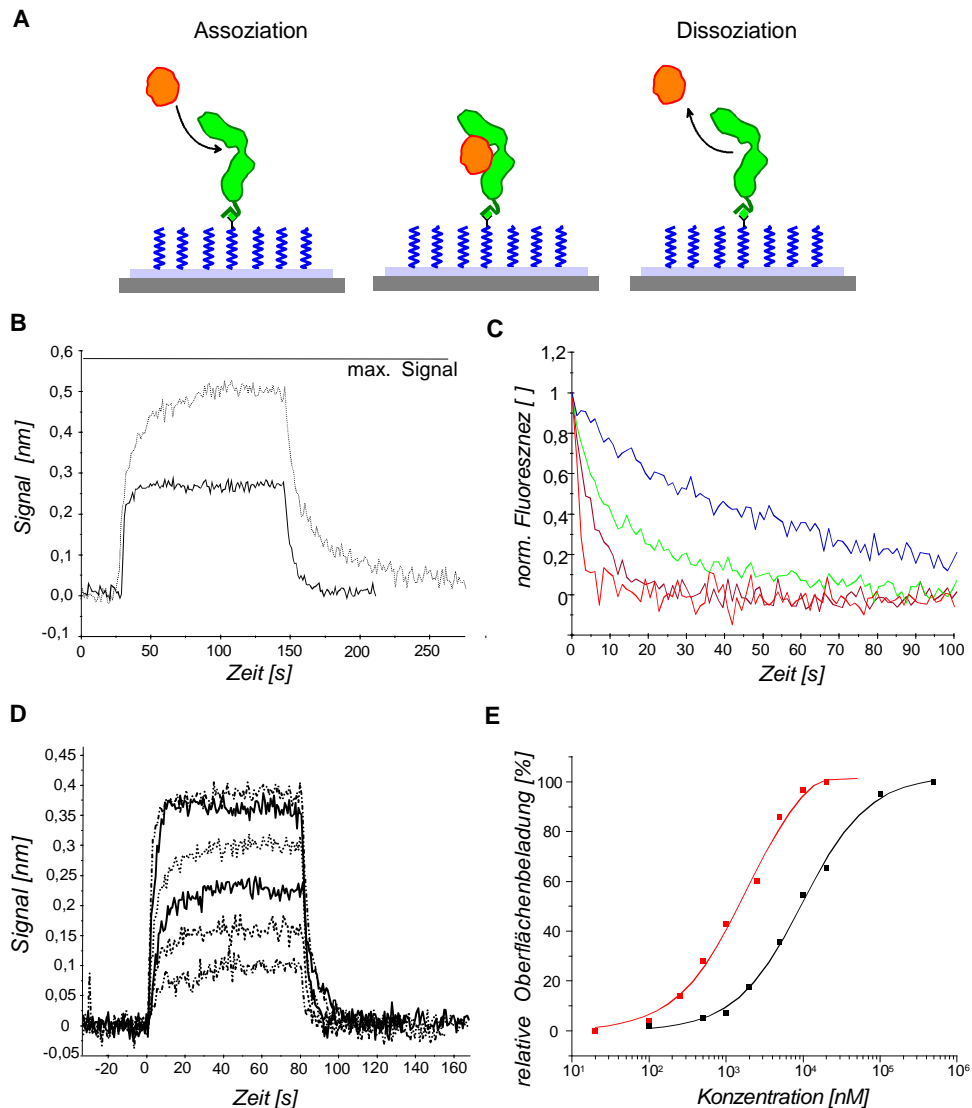


Abbildung 36

Interaktion verschiedener Interferone mit ifnar1-EC, immobilisiert auf einer kovalent modifizierten Chelator-PEG-Oberfläche. (A) Schematische Darstellung der Bindung an ifnar1-EC. (B) Bindung von (---) IFN $\omega$ , 500 nM und (—) IFN $\alpha$ 8, 2000 nM. (C) Bindung verschiedener Interferone: (—) IFN $\beta$ , (—) IFN $\omega$ , (—) IFN $\alpha$ 1, (—) IFN $\alpha$ 2. (D) Bindung von IFN $\alpha$ 1 in aufsteigenden Konzentrationen (2,5; 5; 10; 20; 40 und 80  $\mu$ M). (E) rel. Oberflächenbeladung des Gleichgewichtszustands bei Bindung des Interferons (hier: (—) IFN $\alpha$ 1 und (—) IFN $\tau$ 2) gegen die Konzentration aufgetragen.

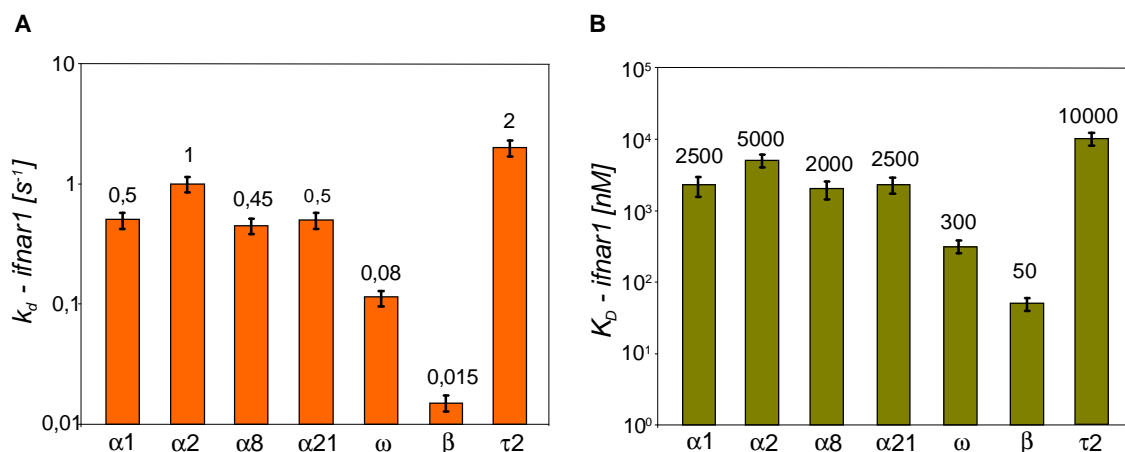


Abbildung 37 (A)  $k_d$ - und (B)  $K_D$ -Wert der Bindungsaffinitäten für verschiedene Interferone an ifnar1-EC.

Tabelle 6 Raten- und Gleichgewichtskonstanten verschiedener Interferone an ifnar1-EC.

Interferon	$k_a$ [M <sup>-1</sup> s <sup>-1</sup> ]	$k_d$ [s <sup>-1</sup> ]	$KD_D$ [nM]	$KD_D$ ( $k_d/k_a$ ) [nM]
IFN $\alpha 1$	$\sim 2 \times 10^5$	0,5	2500	2500
IFN $\alpha 2$	$\sim 2 \times 10^5$	$\sim 1$	5000	5000
IFN $\alpha 8$	$\sim 2 \times 10^5$	0,45	2000	2250
IFN $\alpha 21$	$\sim 2 \times 10^5$	0,5	2500	2500
IFN $\omega$	$\sim 2 \times 10^5$	0,08	300	400
IFN $\beta$	$\sim 2 \times 10^5$	0,015	50	75
IFN $\tau 2$	$\sim 2 \times 10^5$	$\sim 2$	10000	10000
+/- Fehler [%]		30-40	20-30	20-30

Für alle Interferone wurden vergleichbare Assoziationsratenkonstanten  $k_a$  von  $2 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$  ermittelt (Abbildung 37, Tabelle 6). Bei den Dissoziationsratenkonstanten  $k_d$  waren dagegen große Unterschiede zu erkennen. Dabei wurde für IFN $\beta$  die langsamste Dissoziationsratenkonstante  $k_d$  von  $0,015 \text{ s}^{-1}$  und für IFN $\tau 2$  eine mehr als 100-fach schnellere  $k_d$  von  $2 \text{ s}^{-1}$  beobachtet. Bei den IFN $\alpha$ -Subtypen wurden  $k_d$ -Werte im Bereich von  $0,5 - 1 \text{ s}^{-1}$  detektiert. Dabei konnte für IFN $\alpha 1$ , IFN $\alpha 8$  und IFN $\alpha 21$  eine  $k_d$  von  $0,5 \text{ s}^{-1}$  und für das IFN $\alpha 2$  eine zweifach schnellere  $k_d$  von  $1 \text{ s}^{-1}$  beobachtet werden. Bei IFN $\omega$  wurde dagegen eine relativ langsame Dissoziation von  $0,08 \text{ s}^{-1}$  im Vergleich zu den IFN $\alpha$ -Subtypen detektiert. Bei den Dissoziationsgleichgewichtskonstanten  $K_D$ , bestimmt über die Gleichgewichtszustände, wurden vergleichbare Unterschiede beobachtet. Für das IFN $\beta$  wurde die niedrigste  $K_D$  von 75 nM und für IFN $\tau 2$  eine 130-fach höhere  $K_D$  von 10  $\mu\text{M}$  an ifnar1-EC bestimmt. Ebenfalls konnte für IFN $\omega$  eine relativ hohe Affinität zu ifnar1-EC erfasst werden. Dagegen wurde für die IFN $\alpha$ -Subtypen eine bis zu 50-fach niedrigere Bindungsaffinität gegenüber dem IFN $\beta$  detektiert. Dabei wurde für das IFN $\alpha 2$  eine zweifach

höhere  $K_D$  von 5  $\mu\text{M}$  im Vergleich zu  $\text{IFN}\alpha_1$ ,  $\text{IFN}\alpha_8$  und  $\text{IFN}\alpha_{21}$  ( $K_D$ :  $\sim 2,5 \mu\text{M}$ ) beobachtet. Ferner konnte eine gute Übereinstimmung zu den Dissoziationsgleichgewichtskonstanten  $K_D$  vorgefunden werden, die aus den  $k_d$ - und  $k_a$ -Werten berechnet wurden. Insgesamt sind bei den  $K_D$ -Werten Unterschiede über mehr als zwei Größenordnungen zu erkennen. Für die  $\text{ifnar1}$ -Affinität konnte bei den Interferonen eine 1000-fach niedrigere Affinität im Vergleich zu  $\text{ifnar2-EC}$  beobachtet werden.

### 2.1.6 Bindungsstelle auf $\text{ifnar1-EC}$

Die Bindungsstelle zwischen den Interferonen und  $\text{ifnar1-EC}$  wurde ebenso wie für  $\text{ifnar2-EC}$  untersucht. Markierte Interferone wurden zusammen mit unmarkierten Interferonen auf  $\text{ifnar1-EC}$  injiziert und das Bindungsverhalten der markierten Probe an die Rezeptoruntereinheiten beobachtet (Abbildung 38 A).

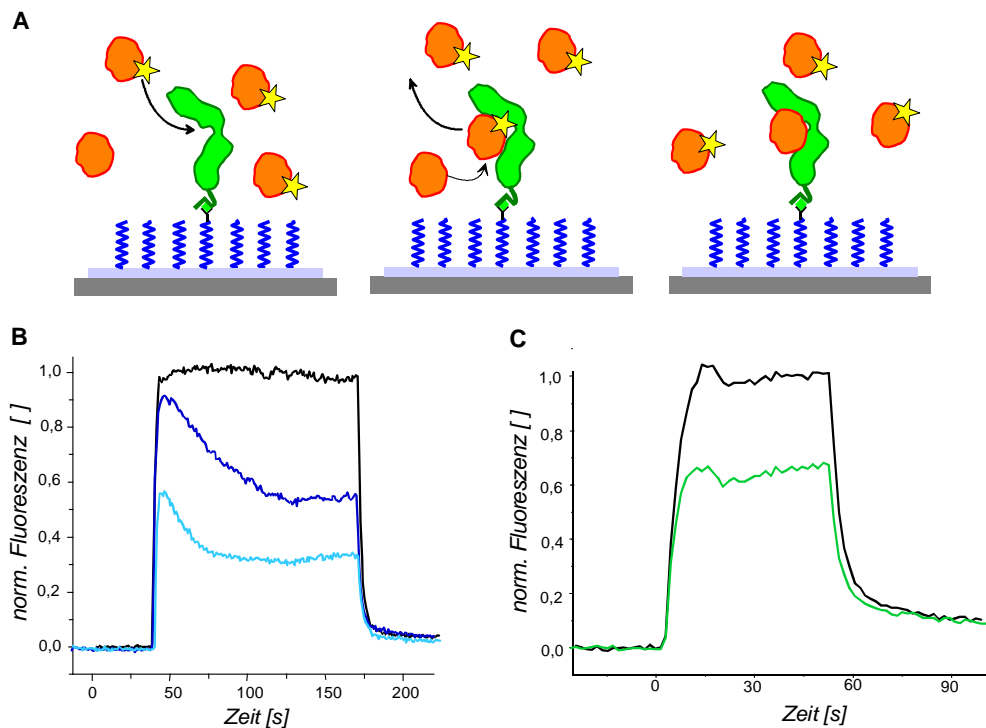


Abbildung 38

Kompetition von Interferonen aus  $\text{ifnar1-EC}$ . (A) Schematische Darstellung der Konkurrenz. (B) Verdrängung von  $^{OG488}\text{IFN}\alpha_8$  durch  $\text{IFN}\beta$ : (—)  $^{OG488}\text{IFN}\alpha_8$ , 1000 nM; (—)  $^{OG488}\text{IFN}\alpha_8$ , 1000 nM +  $\text{IFN}\beta$ , 100 nM; (—)  $^{OG488}\text{IFN}\alpha_8$ , 1000 nM +  $\text{IFN}\beta$ , 200 nM. (C) Verdrängung von  $^{AF488}\text{IFN}\alpha_2$  durch  $\text{IFN}\omega$ : (—)  $^{AF488}\text{IFN}\alpha_2$ , 1000 nM; (—)  $^{AF488}\text{IFN}\alpha_2$ , 1000 nM +  $\text{IFN}\omega$ , 200 nM.



Die Bindung von markiertem  $^{OG488}$ IFN $\alpha$ 8 an ifnar1-EC (—) wies eine schnelle, transiente Bindung auf (Abbildung 38 B), wie sie auch für unmarkierte Interferone beobachtet wurde. Wurde  $^{OG488}$ IFN $\alpha$ 8 zusammen mit IFN $\beta$  injiziert (— / —), war zunächst ein vergleichbarer schneller Anstieg der Fluoreszenz zu erkennen. Das Fluoreszenzsignal erreichte jedoch nicht die Fluoreszenzintensität, wie in der Vergleichsinjektion ohne IFN $\beta$ . Daraufhin konnte ein Abfall des Signals mit einem anschließenden niedrigeren Gleichgewichtszustand beobachtet werden. Zunächst konnte demzufolge das  $^{OG488}$ IFN $\alpha$ 8 durch seine höhere Konzentration bei einer vergleichbaren Assoziationsratenkonstante zu IFN $\beta$  schneller an ifnar1-EC binden. Daraufhin wurde das  $^{OG488}$ IFN $\alpha$ 8 jedoch gegen das IFN $\beta$  ausgetauscht, welches mit einer höheren Stabilität an ifnar1-EC bindet. Stieg die Konzentration von IFN $\beta$  an, konkurrierten die Interferone bereits bei der Assoziation verstärkt um die Bindung und ein schnellerer Austausch von  $^{OG488}$ IFN $\alpha$ 8 gegen IFN $\beta$  fand statt (—). Vergleichbares konnten bei einer Injektion von  $^{AF488}$ IFN $\alpha$ 2 zusammen mit IFN $\omega$  beobachtet werden (Abbildung 38 C). Dies deutete darauf hin, dass das  $^{AF488}$ IFN $\alpha$ 2 ebenfalls durch IFN $\omega$  aus der Bindung verdrängt wurde. Eine Verdrängung konnte ebenso zwischen den IFN $\alpha$ -Subtypen beobachtet werden. Insgesamt zeigte sich, dass alle Interferone an ein gemeinsames Interaktionsepitop auf ifnar1-EC binden

Ferner wurde mit dem ifnar1-EC-Fragment ifnar1-EC-SD1-3 Kompetitionsuntersuchungen durchgeführt. Dieses Fragment setzt sich aus den Subdomänen SD1-3 der extrazellulären Domänen von ifnar1 zusammen [94]. Es zeigte sich für alle Interferone eine vergleichbare Konkurrenz aus der Bindung, wie für ifnar1-EC.

### 2.1.7 Interaktion von Mutanten mit ifnar1-EC

Da für die Bindung an ifnar1 ebenfalls unterschiedliche Bindungsaffinitäten, jedoch eine gemeinsame Bindungsstelle zu finden war, wurden Interaktionsstudien mit Hilfe von Alaninsubstitutionen an der möglichen ifnar1-Bindungsstelle auf IFN $\alpha$ 2 durchgeführt (Abbildung 39). Diese wurden von Gideon Schreiber, Weizmann-Institut, Israel, zur Verfügung gestellt.

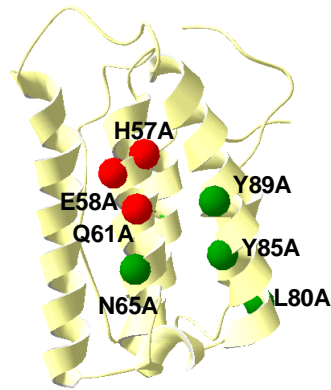


Abbildung 39 Substitutionen verschiedener AS in dem möglichen *ifnar1*-Bindungssepitop auf IFNα2 (*rot*: Affinitätssteigerung, *grün*: Affinitätsminderung).

Der Einfluss der Einzel- und Mehrfachmutationen auf die *ifnar1*-Affinität ist in Abbildung 40 dargestellt. Für die Mutanten IFNα2-E58A und IFNα2-HEQ konnte eine deutlich langsamere Dissoziation von *ifnar1*-EC als für IFNα2 beobachtet werden (Abbildung 40 A). So konnte für die E58A-Mutante eine 10-fach höhere Affinität an *ifnar1*-EC detektiert werden (Tabelle 7). Für die Mehrfachmutante IFNα2-HEQ wurde ein noch stärkerer Einfluss auf die Affinität zu *ifnar1*-EC beobachtet ( $k_d$  0,05 s<sup>-1</sup>,  $K_D$  200 nM).

Für die Mutanten, die eine niedrigere *ifnar1*-Bindungsaffinität aufweisen, wurde bei gleicher Konzentration eine geringere Signalthöhe als für IFNα2 beobachtet (Abbildung 40 B). Daraus konnte auf eine niedrigere Bindungsaffinität geschlossen werden. Dabei zeigte sich bei den Einzelmutationen an den AS-Positionen N65A, L80A, Y85A und Y89A maximal eine zweifache Affinitätsminderung an *ifnar1*. Wurden die Mutationen jedoch kombiniert (IFNα2-LYY und IFNα2-NLYY), konnte eine auffällige Reduktion in der Affinität an *ifnar1*-EC gegenüber dem IFNα2 detektiert werden.

Um den Einfluss auf die *ifnar2*-Affinität zu kontrollieren, wurde diese ebenfalls untersucht. Hierbei wurde keine Änderung in der Affinität detektiert, am Beispiel von IFNα2-E58A und IFNα2-NLYY an *ifnar2* in Abbildung 40 C dargestellt.

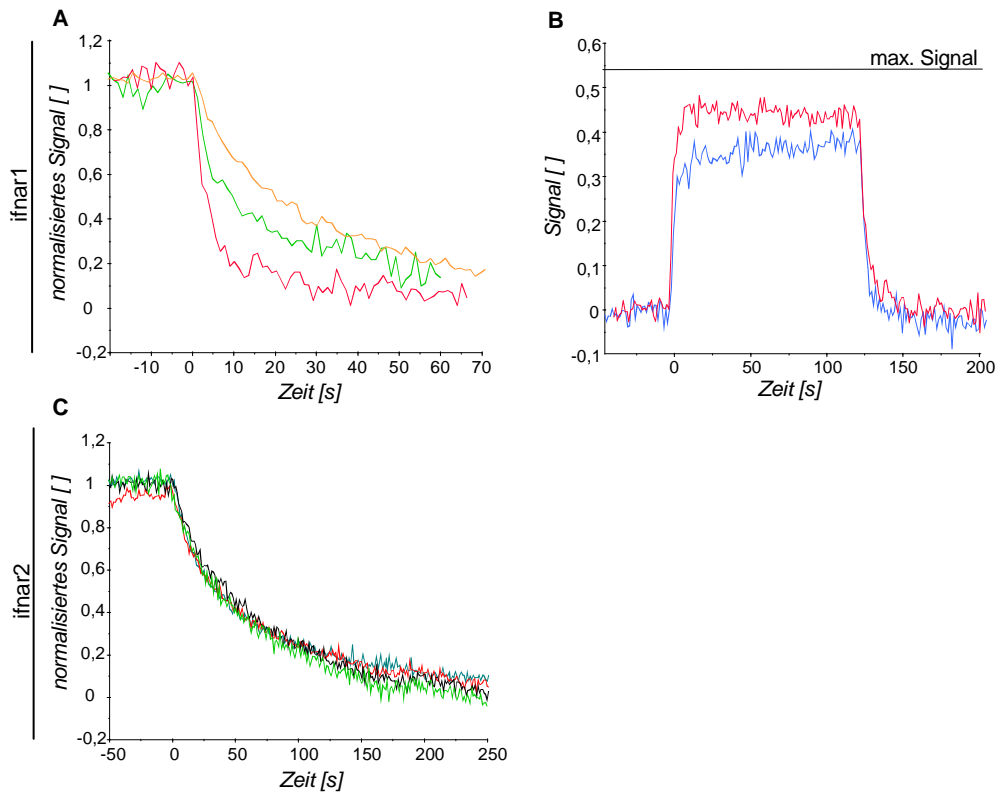


Abbildung 40 Interaktion verschiedener Mutanten mit *ifnar1*-EC, immobilisiert auf einer Chelator-PEG-Oberfläche. Interaktion mit *ifnar1*-EC: (A) (—)  $IFN\alpha 2$ , (—)  $IFN\alpha 2$ -E58A, (—)  $IFN\alpha 2$ -HEQ. (B) (—)  $IFN\alpha 2$ ,  $20\ \mu M$ , (—)  $IFN\alpha 2$ -L80A,  $20\ \mu M$ . (C) Interaktion mit *ifnar2*-EC: (—)  $IFN\alpha 2$ , (—)  $IFN\alpha 2$ -E58A, (—)  $IFN\alpha 2$ -N65A, (—)  $IFN\alpha 2$ -NLYY.

Tabelle 7 Dissoziationsratenkonstanten ( $k_d$ ) und Dissoziationsgleichgewichtskonstanten ( $K_D$ ) verschiedener Mutanten, welche die *ifnar1*-Affinität beeinflussen. Der Fehler liegt bei  $\sim 30\%$ .

Mutante	$k_d$ [ $s^{-1}$ ]	$K_D$ [nM]
$IFN\alpha 2$ -E58A	0,1	500
$IFN\alpha 2$ -N65A	$\sim 2$	7500
$IFN\alpha 2$ -L80A	-	6000
$IFN\alpha 2$ -Y85A	-	7500
$IFN\alpha 2$ -Y89A	-	$\sim 10000$
$IFN\alpha 2$ -HEQ	0,05	200
$IFN\alpha 2$ -LYY	-	$\sim 25000$
$IFN\alpha 2$ -NLYY	-	$> 50000$
$IFN\alpha 2$	1	5000
Fehler [%]	20-30	20-30

## 2.2 Assemblierung ternärer Komplexe

Um Unterschiede in der Assemblierung des ternären Komplexes sowie den Einfluss der individuellen Bindungskinetiken untersuchen zu können, wurde für den ternären Komplex (I.) das stöchiometrische Verhältnis von Interferon, ifnar1 und ifnar2, (II.) die Stabilisierung der Ligandenbindung für verschiedene Interferone im ternären Komplex sowie (III.) die Dynamik des ternären Komplexes bei unterschiedlichen Konzentrationen der Rezeptoruntereinheiten untersucht.

Die laterale Mobilität einer Plasmamembran wurde durch eine Lipiddoppelschicht mit modifizierten Chelatorkopf-Lipiden imitiert (bezeichnet als *fluid support*), so dass eine optimale Assemblierung eines ternären Komplexes ermöglicht wurde. Die korrekte Ausbildung der Lipiddoppelschicht wurde mit Hilfe der Rif-Spektroskopie kontrolliert. Nach der Fusion der Lipiddoppelschicht auf eine Glasoberfläche und die Konditionierung mit Imidazol, Ni<sup>2+</sup> und eventuell EDTA wurden ifnar2-EC und ifnar1-EC über ihren jeweiligen His-tag immobilisiert. Mit Hilfe des Rif-Signals konnten die absoluten und relativen Oberflächenkonzentrationen der Rezeptoruntereinheiten bestimmt werden. Nach der Co-Immobilisierung wurde die Assemblierung des ternären Komplexes durch Injektion von Interferonen induziert.

Bevor die Assemblierung eines ternären Komplexes für verschiedene Interferone untersucht wurde, war der Einfluss der Rezeptormobilität durch die Lipiddoppelschicht auf die individuelle Interaktion der Interferone an ifnar2-EC bzw. ifnar1-EC zu überprüfen. Dabei wurden für alle Interferone identische Bindungskonstanten analog zu der Chelator-PEG-Oberfläche detektiert (nicht dargestellt). Ebenfalls konnten keine homodimeren Komplexe, wie z.B. die Interaktion binärer IFN / Rezeptor-Komplexe, beobachtet werden. Die laterale Diffusion der Rezeptoren bewirkte demzufolge keine Änderung in der Bindungsaffinität. Ebenso konnte die 1:1-Stöchiometrie der IFN / Rezeptor-Interaktion bestätigt werden.

### 2.2.1 Stöchiometrie

Um die Stöchiometrie im ternären Komplex zu klären, wurden ifnar2-EC und ifnar1-EC in einer 1:1-Stöchiometrie immobilisiert und Interferon injiziert (Abbildung 41 A). Wurden die Amplituden der Rif-Signale gegen die jeweiligen Masse der Moleküle relativiert, konnte eine deutliche 1:1:1-Stöchiometrie von ifnar1, ifnar2 und Interferon für den ternären Komplex bestimmt werden. Um diese 1:1:1-Stöchiometrie zu erhärten, wurde die Dissoziation der Interferone aus dem ternären Komplex bei einem Überschuss an ifnar2-EC (Abbildung 41 B) oder ifnar1-EC (Abbildung 41 C) untersucht. Bei einem Überschuss an ifnar2-EC konnte beim Waschen mit Puffer ein Abfall des Signals (I.) beobachtet werden, welches sich anschließend stabilisierte (II.). Folglich dissoziierte das Interferon (hier: IFN $\alpha$ 8) zunächst von

dem Überschuss an ifnar2-EC mit entsprechender Dissoziationsratenkonstante. Die folgende Stabilisierung des Signals ließ auf die Assemblierung eines ternären Komplexes in einer 1:1:1-Stöchiometrie schließen, wie in Abbildung 41 A. Ein vergleichbares Verhalten in der Dissoziation wurde bei einem Überschuss an ifnar1-EC beobachtet (Abbildung 41 C). Zunächst war eine schnelle Dissoziation des Interferons (hier: IFN $\alpha$ 21) von der Oberfläche zu erkennen, die der transienten Bindungsaffinität an ifnar1-EC entsprach. Die anschließende Stabilisierung des Signals deutete erneut auf die Assemblierung eines ternären Komplexes hin.

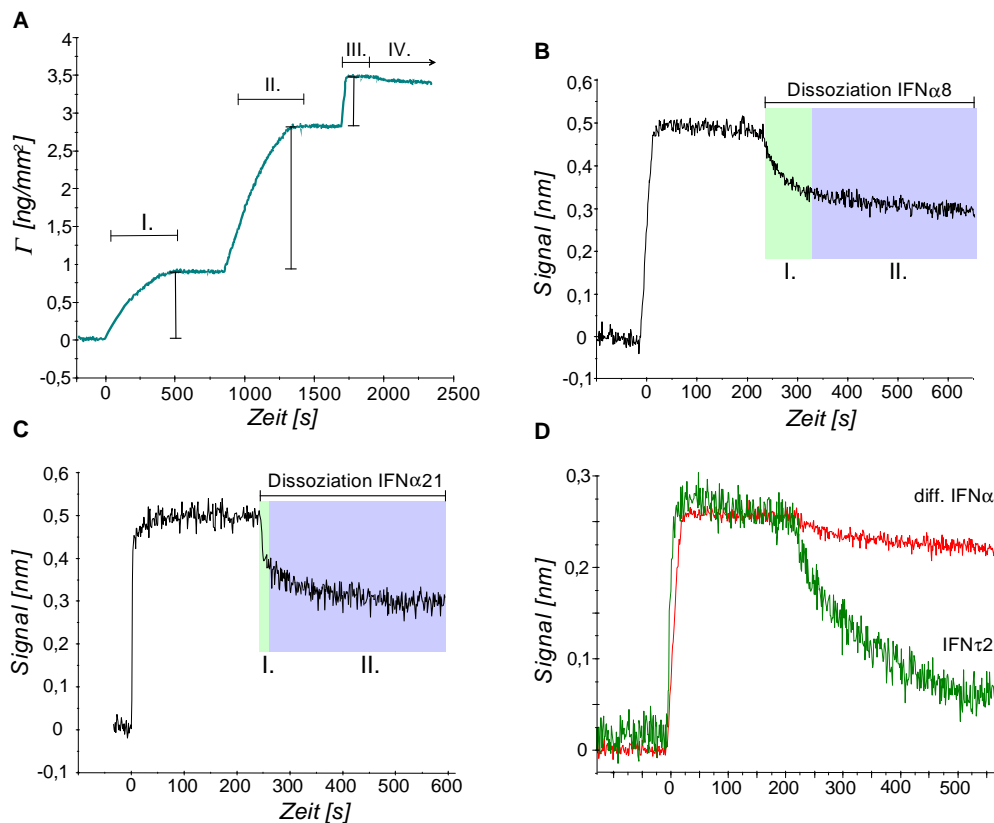


Abbildung 41

Assemblierung eines ternären Komplexes bei hoher Oberflächenkonzentration von ifnar2-EC und ifnar1-EC in einer 1:1-Stöchiometrie. (A) Assemblierung eines ternären Komplexes mit IFN $\alpha$ 21. Der Immobilisierung von (I.) ifnar2-EC und (II.) ifnar1-EC folgt (III.) die Injektion eines Interferons und (IV.) das Waschen mit Puffer. Einfluss auf die Stabilisierung der Ligandenbindung im ternären Komplex bei (B) einem Überschuss an ifnar2-EC gegenüber ifnar1-EC und (C) einem Überschuss von ifnar1-EC gegenüber ifnar2-EC. (I.) Dissoziation von dem Überschuss an ifnar2 bzw. ifnar1, (II.) Stabilisierung der Bindung der Interferonbindung im ternären Komplex. (D) Stabilisierung von IFN $\alpha$ 21 und IFN $\tau$ 2 im ternären Komplex bei hohen Rezeptoroberflächenkonzentrationen in einer 1:1:1 Stöchiometrie.

### 2.2.2 Stabilität der Interferonbindung im ternären Komplex

In wie weit die Stabilisierung der Interferonbindung im ternären Komplex durch unterschiedliche Rezeptorkonzentrationen und den Bindungsaffinitäten an die Rezeptoruntereinheiten beeinflusst wird, wurde bisher nur für das IFN $\alpha$ 2 und IFN $\beta$  ansatzweise untersucht. Um daher zunächst den Einfluss der Rezeptordichte auf die Dynamik einer Ligandenbindung im ternären Komplex zu klären, wurde der Einfluss hoher ( $\geq 40$  fmol/mm<sup>2</sup> je Untereinheit) und niedriger ( $<10$  fmol/mm<sup>2</sup> je Untereinheit) Rezeptorkonzentrationen in einer 1:1-Stöchiometrie überprüft. Dramatische Veränderungen in der Bindungskinetik konnten dabei für die IFN $\alpha$ -Subtypen, IFN $\omega$  und IFN $\beta$  bei hoher Rezeptordichte beobachtet werden (Abbildung 41 A). So wurde keine signifikante Dissoziation der Interferone über mehrere Minuten observiert. Eine Dissoziation konnte nur für das IFN $\tau$ 2 festgestellt werden (Abbildung 41 D).

Die Stabilisierung der Ligandenbindung im ternären Komplex bei niedrigen Oberflächenkonzentrationen wurde nachfolgend untersucht (Abbildung 42). Für <sup>OG488</sup>IFN $\tau$ 2 und <sup>OG488</sup>IFN $\alpha$ 1 konnte eine deutliche Dissoziation aus dem ternären Komplex beobachtet werden, welche bei hohen Rezeptorkonzentrationen eine hohe Stabilität der Ligandenbindung aufgezeigt hatten (Abbildung 42 A). Insgesamt konnten deutliche Unterschiede für alle Interferone bei der Dissoziation aus dem ternären Komplex beobachtet werden (Abbildung 42 B). Demzufolge ist die Stabilisierung der Ligandenbindung im ternären Komplex von der Rezeptoroberflächendichte abhängig und stellt einen dynamischen Prozess dar. Mit sinkender Rezeptordichte wurde ein Anstieg in der Dissoziationsgeschwindigkeit beobachtet werden, was auf eine Dissoziation und Re-Assoziation der ternären Komplex schließen lässt. Ferner konnten bei den Interferonen Unterschiede in den apparenten Bindungsaffinitäten detektiert werden (Abbildung 42 B).

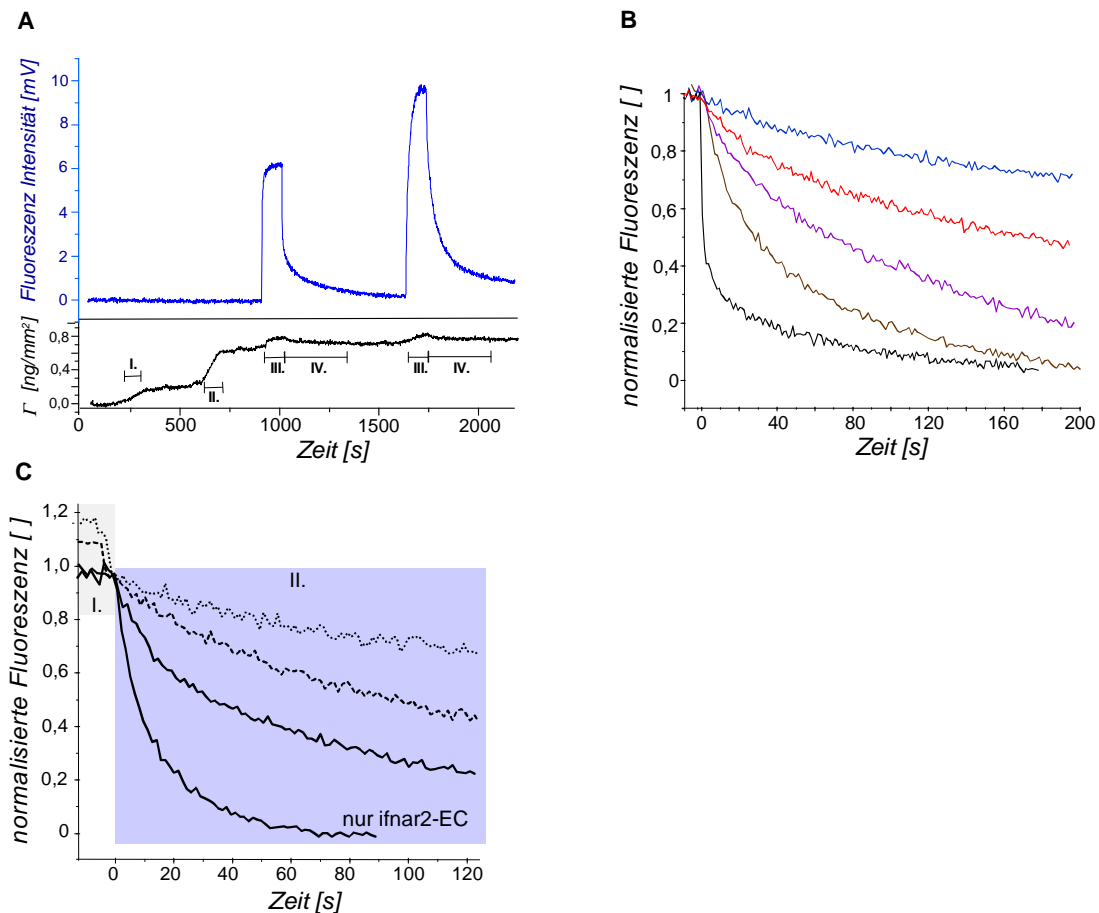


Abbildung 42 Assemblierung ternärer Komplexe (A) mit <sup>OG488</sup>IFN $\tau$ 2 und <sup>OG488</sup>IFN $\alpha$ 1 bei niedrigen Oberflächenkonzentrationen von ifnar1-EC und ifnar2-EC in einer 1:1-Stöchiometrie. (B) Dissoziation der Interferone aus dem ternären Komplexes bei einer 1:1-Stöchiometrie der Rezeptoruntereinheiten: (—) IFN $\beta$ , (—) IFN $\alpha$ 2, (—) IFN $\alpha$ 21, (—) IFN $\alpha$ 1, (—) IFN $\tau$ 2. (C) Dissoziation von IFN $\alpha$ 21 aus dem ternären Komplex in Abhängigkeit von ifnar1-EC. Immobilisierung einer steigenden ifnar1-EC-Konzentration bei konstanter ifnar2-EC-Konzentration (8 fmol/mm<sup>2</sup>): (—) 8, (---) 16, (····) 20 fmol/mm<sup>2</sup>. Injektion von <sup>OG488</sup>IFN $\alpha$ 21.

Bisher wurde nur die Stabilisierung der Ligandenbindung im ternären Komplex bei einer 1:1-Stöchiometrie der Rezeptoruntereinheiten untersucht. Jedoch kann das Verhältnis der absoluten Rezeptorkonzentrationen auf der Oberfläche ebenfalls eine Änderung in der Bindungsaffinität bewirken. Daher wurde die Änderung der apparenten Bindungsaffinität des ternären Komplexes bei steigender ifnar1-EC Konzentration und konstanter ifnar2-EC Konzentration untersucht (Abbildung 42 C). Wurde die ifnar1-EC Konzentration gegenüber der ifnar2-EC Konzentration erhöht, war zunächst eine schnelle Dissoziation (I.) zu erkennen an die sich eine langsame Dissoziation (II.) anschloss. Dabei wurde eine Reduktion in der Dissoziationsgeschwindigkeit bei steigender ifnar1-Konzentration gegenüber der ifnar2-Konzentration beobachtet. Die transiente, schnelle Dissoziation am Beginn war auf die Dissoziation der Interferone von dem Überschuss an ifnar1-EC zurückzuführen.

Die langsamer werdende Dissoziation in Abhängigkeit von der steigenden ifnar1-Konzentration, deutete auf die Stabilisierung der Ligandenbindung im ternären Komplex durch ifnar1-EC hin. Demzufolge wird allein durch den Anstieg der niedrig affinen ifnar1-Untereinheit eine Stabilisierung um ein Vielfaches erreicht.

Die Dissoziationsratenkonstanten für verschiedene Interferone aus dem ternären Komplex bei niedrigen Rezeptoroberflächenkonzentrationen in einer 1:1-Stöchiometrie sind in der Tabelle 8 aufgeführt. Eine deutliche langsamere Dissoziation der Interferone aus dem ternären Komplex wurde im Vergleich zu der Dissoziation aus dem höher affinen ifnar2-EC beobachtet.

Tabelle 8 *Dissoziationsratenkonstanten ( $k_d$ ) verschiedener Interferone aus dem ternären Komplex bei niedrigen Oberflächenkonzentrationen.*

	ternär $k_d$ [ $s^{-1}$ ]	ifnar2-EC $k_d$ [ $s^{-1}$ ]	Stabilisierung der Ligandenbindung
IFN $\alpha$ 1	~0,025	0,12	4,8
IFN $\alpha$ 2	0,006	0,015	2,5
IFN $\omega$	<0,004	0,01	>2,5
IFN $\beta$	<0,0005	0,001	>2
IFN $\tau$ 2	~0,2	0,75	3,75
IFN $\alpha$ 8	~0,006	0,02	3,3
IFN $\alpha$ 21	0,012	0,08	6,7
Fehler [%]	10-20	5-10	

Für das IFN $\alpha$ 2 und IFN $\alpha$ 8 zeigten sich vergleichbare Dissoziationsratenkonstanten aus dem ternären Komplex von  $0,006 s^{-1}$ . Für IFN $\alpha$ 21 und IFN $\alpha$ 1 wurde eine  $k_d$  von  $0,012 s^{-1}$  und  $0,025 s^{-1}$  detektiert. Eine stärkere Stabilisierung der Ligandenbindung im ternären Komplex konnte dabei für IFN $\alpha$ 1 und IFN $\alpha$ 21 gegenüber IFN $\alpha$ 2 und IFN $\alpha$ 8 beobachtet werden. Mögliche Ursache für die fünf- bis siebenfache Stabilisierung ist die höhere ifnar1-Affinität gegenüber einer niedrigeren ifnar2-Affinität. Für das IFN $\omega$  und IFN $\beta$  konnten, aufgrund von Schwierigkeiten bei der Markierungseffizienz, keine ausreichenden Daten für die Stabilisierung der Ligandenbindung ermitteln werden. Jedoch zeigte sich eine relativ hohe Bindungsaffinität auch bei niedrigen Rezeptoroberflächenkonzentrationen. Ursache hierfür sind die hohen Affinitäten an ifnar2-EC sowie ifnar1-EC von IFN $\beta$  und IFN $\omega$  gegenüber den IFN $\alpha$ -Subtypen.

Insgesamt konnte für alle Interferone eine Stabilisierung ( $^{ifnar2}k_d / ^{tern}k_d$ ) der Bindung im ternären Komplex gegenüber ifnar2-EC beobachtet werden (Tabelle 5). Die Stabilisierung der Ligandenbindung im ternären Komplexes und dessen Dynamik ist demzufolge abhängig (I.) von den Bindungsaffinitäten an ifnar2 und ifnar1, (II.) von der Konzentration der



Rezeptoren auf der Oberfläche und (III.) von dem apparenten Konzentrationsverhältnis beider Rezeptoruntereinheiten zueinander. Ferner beeinflusst möglicherweise das Verhältnis der Bindungsaffinitäten an ifnar1 und ifnar2 entscheidend die Stabilisierung des Liganden im ternären Komplex.

### 2.2.3 Stabilität verschiedener Mutanten im ternären Komplex

Dass die Stabilisierung der Interferone im ternären Komplex von den individuellen Bindungsaffinitäten abhängig war, konnte bereits gezeigt werden. Um jedoch den charakteristischen Einfluss der ifnar1- und ifnar2-Affinität auf die Stabilisierung der Interferonbindung im ternären Komplex genauer zu entschlüsseln, wurde die Assemblierung ternärer Komplexe ebenfalls mit Mutanten durchgeführt. Diese wurden bei einer hohen Rezeptordichte untersucht, für die eine Stabilisierung der Interferonbindung im ternären Komplex über mehrere Minuten beobachtet wurde und sich eine Dissoziationsratenkonstante  $k_d$  von  $\sim 0,0001 \text{ s}^{-1}$ , mit Ausnahme des IFN $\alpha 2$ , zeigte.

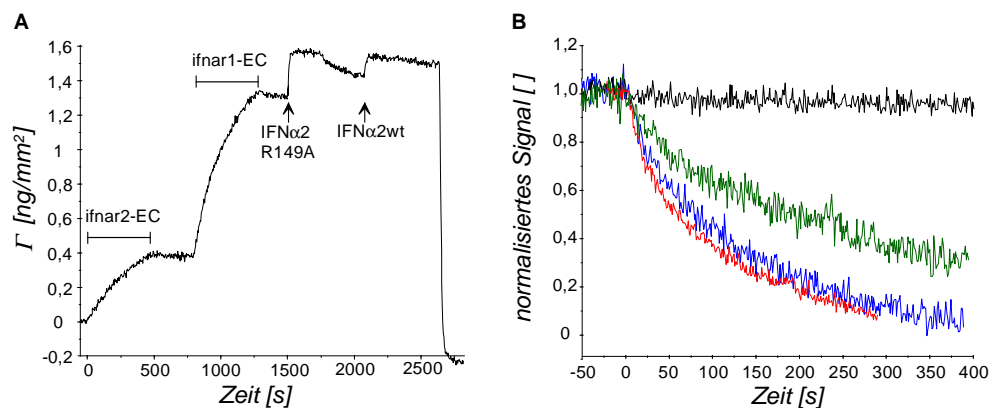


Abbildung 43 Stabilisierung verschiedener Mutanten im ternären Komplex. (A) Assemblierung eines ternären Komplexes für IFN $\alpha 2$ -R149A und IFN $\alpha 2$  auf einer Lipiddoppelschicht. (B) Dissoziation verschiedener Mutanten aus dem ternären Komplex: (—) IFN $\alpha 2$ , (—) IFN $\alpha 2$ -LYY, (—) IFN $\alpha 2$ -NLYY, (—) IFN $\alpha 2$  von ifnar2-EC allein.

Die Assemblierung eines ternären Komplexes bei hoher Oberflächenrezeptorkonzentration in einer 1:1-Stöchiometrie ist in Abbildung 43 A für IFN $\alpha 2$ -R149A mit einer anschließenden IFN $\alpha 2$ -Injektion dargestellt. Für das IFN $\alpha 2$ -R149A war eine Dissoziation aus dem ternären Komplex zu beobachten. Die anschließende Kontrollinjektion von IFN $\alpha 2$  zeigte eine stabile Bindung, wie bei einer hohen Rezeptorkonzentration zu erwarten war. Für das IFN $\alpha 2$ -R149A konnte eine  ${}^{\text{tern}}k_d$  von  $0,025 \text{ s}^{-1}$  beobachtet werden, welche jedoch deutlich über der Dissoziationsratenkonstante von  ${}^{\text{ifnar2}}k_d: 2 \text{ s}^{-1}$  für ifnar2-EC allein lag. Demzufolge wurde die Stabilisierung der Interferonbindung im ternären Komplex durch die geringere ifnar2-Affinität

( $^{ifnar2}K_D$ : 550 nM) gegenüber IFN $\alpha$ 2 drastisch beeinflusst. Vergleichbare Effekte waren für IFN $\alpha$ 8-R150A und IFN $\alpha$ 21-R150A zu erkennen (Tabelle 9). Die Auswirkung der  $\alpha^2$ R144A-Mutation auf die Stabilisierung war gegenüber der  $\alpha^2$ R149A-Mutation geringer ausgeprägt, da diese eine geringer verminderte ifnar2-Affinität aufweist ( $^{ifnar2}K_D$ : 150 nM).

Bei den Mutanten, welche die ifnar1-Affinität beeinflussen, wurde für IFN $\alpha$ 2-NLYY der stärkste Effekt beobachtet (Abbildung 43 B, Tabelle 9). Die Dissoziationsratenkonstante  $^{tern}k_d$  von  $0,012 \text{ s}^{-1}$  war nur unwesentlich gegenüber der individuellen Dissoziation von ifnar2-EC ( $^{ifnar2}k_d$ :  $0,015 \text{ s}^{-1}$ ) verringert.

*Tabelle 9 Dissoziationsratenkonstanten  $k_d$  verschiedener Mutanten aus dem ternären Komplex bei hoher Rezeptordichte.*

Mutante	$^{tern}k_d [\text{s}^{-1}]$	$^{ifnar2-EC}k_d [\text{s}^{-1}]$	Stabilisierung der Ligandenbindung
IFN $\alpha$ 2-Y89A	0,004	0,015	3,75
IFN $\alpha$ 2-LYY	0,008	0,015	1,9
IFN $\alpha$ 2-NLYY	0,012	0,015	1,25
IFN $\alpha$ 2-L30A	0,06	-	-
IFN $\alpha$ 2-R144A	0,010	0,045	4,5
IFN $\alpha$ 2-R149A	~0,025	~2	~80
IFN $\alpha$ 8-R150A	~0,02	-	-
IFN $\alpha$ 21-R150A	~0,04	-	-
IFN $\alpha$ 2	~0,0001	0,015	150
Fehler [%]	~20	10-20	

Bei der dynamischen Stabilisierung der Ligandenbindung im ternären Komplex ist zu berücksichtigen, dass diese sich (I.) aus der statischen Stabilität eines ternären Komplexes und (II.) aus der dynamischen Stabilisierung der Interferone durch Dissoziation und Re-Assemblierung im ternären Komplex zusammensetzt. Eine Differenzierung ist hier nicht möglich, können jedoch für weitere Untersuchungen relevant sein.

### 3 Zelluläre Aktivitätsassays

Für die Untersuchung der differentiellen Signalaktivierung durch die verschiedenen Interferone wurden verschiedene Aktivitäten ausgewählt, die kurz- und langfristig durch Interferone aktiviert werden. Zum einem wurde die Induktion der ISGF3-Assemblierung untersucht, welche bereits nach wenigen Stunden induziert wird. Hierzu wurde das *Luciferase*-Gen nach dem ISGF3-spezifisch induzierbaren 6-16-Promotor in die HT1080-Zelllinie eingeschleust. Diese wurde in die HL116-Zelllinie umbenannt. Die durch Interferone

induzierte Expression der *Luciferase* konnte daraufhin über den Umsatz von Luciferin bestimmt werden. Die antivirale (AV) Aktivität der Interferone wurde mit vesikulären Stomatitis Viren (VSV) in Kooperation mit Gillés Uze und José van Heyden, Montpellier untersucht. Zum anderen wurde die langfristig induzierte antiproliferative (AP) Aktivität überprüft, die in Abhängigkeit vom Zelltyp erst nach einem bis mehreren Tagen induziert wird. Beide Aktivitätsassays wurden in der 2fTGH-Zelllinie durchgeführt.

### 3.1 Aktivitätsuntersuchungen verschiedener Interferone

#### 3.1.1 Assemblierung des ISGF3-Komplexes und antivirale Aktivität

Die Unterschiede in der Assemblierung von ISGF3-Komplexen durch Interferone konnte über die Expression der *Luciferase* erfasst werden. Je stärker ein Interferon die Assemblierung von ISGF3 aktivierte und somit dessen Konzentration erhöhte, desto stärker wurde die Translation und Transkription des *Luciferase*-Gens induziert. Die effektive Konzentration bei 50 % *Luciferase*-Aktivität ( $^{ISGF3}EC_{50}$ ) wurde in Abhängigkeit von der Interferonkonzentration ermittelt.

Die  $EC_{50}$ -Werte ( $^{AV}EC_{50}$ ) für die antivirale Aktivität der Interferone wurde nach der Infektion von 2fTGH-Zellen mit vesikulären Stomatitis Viren (VSV) über die Zellzahl bestimmt. Der  $^{AV}EC_{50}$ -Wert gibt die Konzentration an, die benötigt wurde, damit 50 % der Zellen überlebten. Eine antivirale Aktivität wurde in Abhängigkeit von Interferon bei entsprechenden Konzentrationen initiiert.

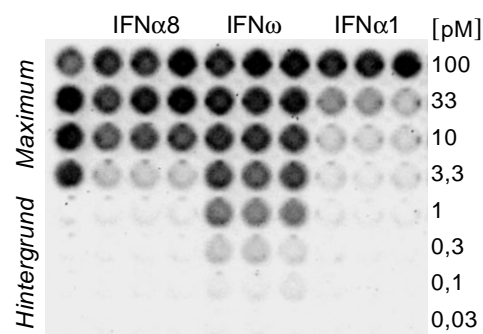


Abbildung 44 Detektion des Luciferin-Umsatzes durch Luciferase in Abhängigkeit von der IFN-Konzentration (Dunkel  $\rightarrow$  Hell: sinkender Luciferin-Umsatz), Hintergrund: ohne Interferon, Maximum: 2 nM IFN $\alpha$ 2.

Ein typischer Assay für die Bestimmung der ISGF3-Assemblierung ist in Abbildung 44 abgebildet. Absteigende Konzentrationen an IFN $\alpha$ 8, IFN $\omega$  und IFN $\alpha$ 1 wurden in dreifacher Ausführung von oben nach unten aufgetragen. Nach Lyse der Zellen und Zugabe des

Luciferin-Puffers, konnte in Abhängigkeit von der IFN-Konzentration ein unterschiedlich hoher Umsatz an Luciferin durch die *Luciferase* detektiert werden.

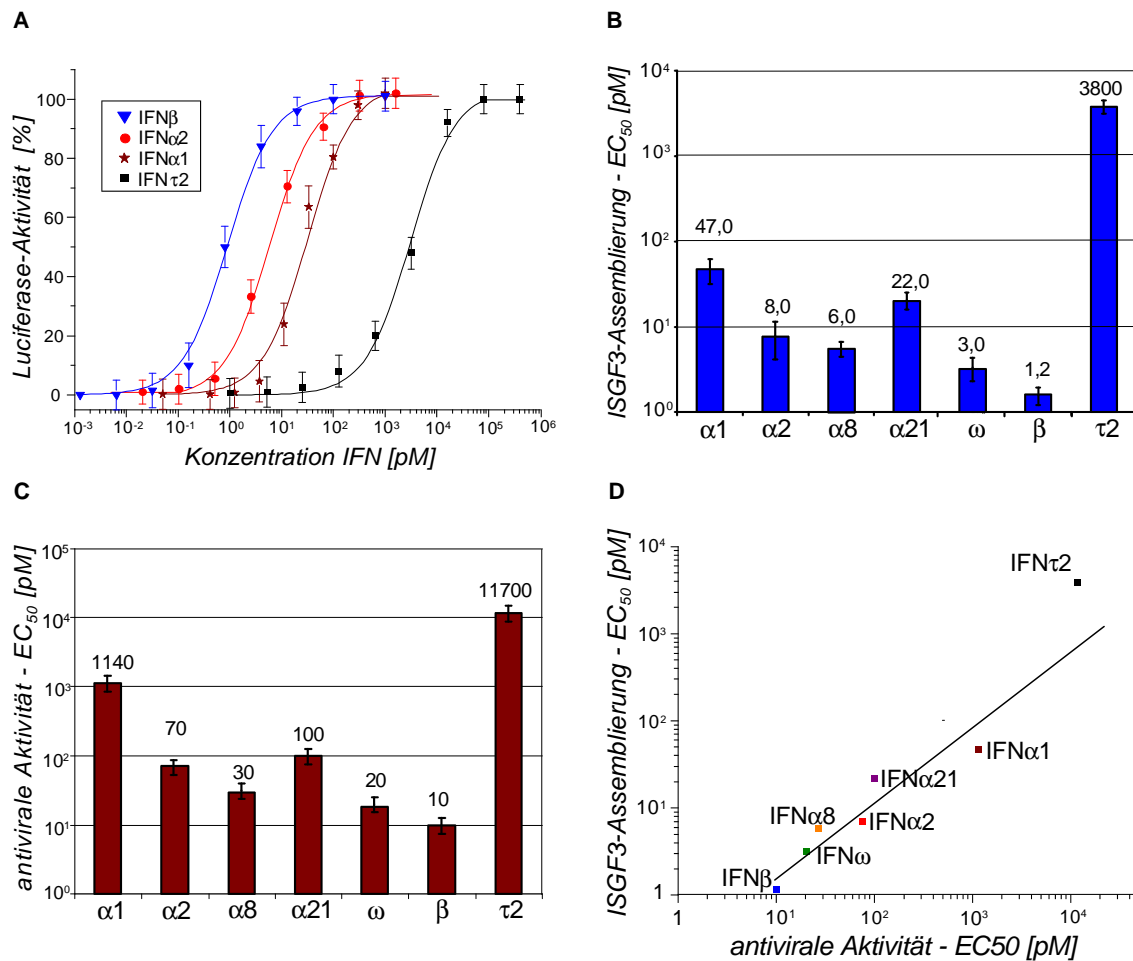


Abbildung 45 Induktion der ISGF3-Assemblierung und der antiviralen (AV) Aktivität verschiedener Interferone. (A) Dosis-Wirkungs-Beziehung der Luciferase-Aktivität [%] für IFNβ, IFNα2, IFNα1 und IFNτ2. (B) <sup>ISGF3</sup>EC<sub>50</sub>-Werte der ISGF3-Assemblierung im Vergleich. (C) <sup>AV</sup>EC<sub>50</sub>-Werte der AV Aktivität im Vergleich. (D) Vergleich der ISGF3-Assemblierung und der AV Aktivität.

Dabei konnten deutliche Unterschiede zwischen IFNβ, IFNω, den IFNα-Subtypen und IFNτ2 beobachtet werden (Abbildung 45 A, B). So bewirkte IFNβ bereits bei einer Konzentration von ~1 pM eine halbmaximale *Luciferase*-Aktivität, von IFNτ2 wurde dagegen eine Konzentration von ~3800 pM benötigt. Für die IFNα-Subtypen wurden <sup>ISGF3</sup>EC<sub>50</sub>-Werte im Bereich von 6 bis 47 pM detektiert. Dabei präsentierte das IFNα8, mit einem <sup>ISGF3</sup>EC<sub>50</sub>-Wert von 6 pM, die höchste Aktivierungseffizienz und das IFNα1, mit einem fast 10-fach höheren <sup>ISGF3</sup>EC<sub>50</sub>-Wert von 47 pM, die niedrigste Aktivierungseffizienz bei den IFNα-Subtypen.

Um eine halbmaximale AV Aktivität ( $^{AV}EC_{50}$ ) zu induzieren, wurden deutlich höhere Konzentrationen als für die ISGF3-Assemblierung benötigt (Abbildung 45 C). Für das IFN $\beta$  war, wie für die Assemblierung der ISGF3-Komplexe, die stärkste AV Aktivität mit einem  $^{AV}EC_{50}$ -Wert von 10 pM zu erkennen. Bei den IFN $\alpha$ -Subtypen konnte für das IFN $\alpha 8$  die stärkste ( $^{AV}EC_{50}$  30 pM) und für das IFN $\alpha 1$  eine mehr als 15-fach geringere ( $^{AV}EC_{50}$  1100 pM) AV Aktivität detektiert werden. Das IFN $\tau 2$  zeigte sogar eine 170-fach geringere AV Aktivität ( $^{AV}EC_{50}$  11700 pM) im Vergleich zu IFN $\alpha 2$  (70 pM) auf. Wurden die jeweilige  $EC_{50}$ -Werte für die ISGF3-Assemblierung und für die AV Aktivität gegenübergestellt, konnte eine lineare Abhängigkeit festgestellt werden (Abbildung 45 D)

### 3.1.2 Antiproliferation

Die AP Aktivität verschiedener Interferone wurde über die Zellzahl nach 5-7 Tagen Inkubation mit verschiedenen Interferonen bestimmt. Zu berücksichtigen war bei der AP Aktivität, dass unterschiedliche Signalkaskaden induziert werden, die jedoch bei dieser Untersuchung nicht differenziert werden können.

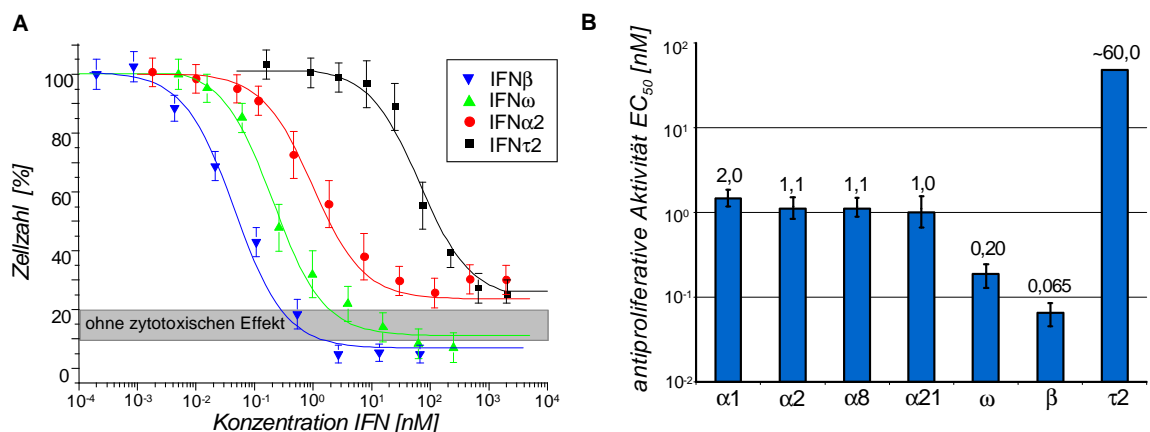


Abbildung 46 Induktion der antiproliferativen (AP) Aktivität verschiedener Interferone. (A) Dosis-Wirkungs-Beziehung der AP Aktivität [%] für IFN $\beta$ , IFN $\alpha 2$ , IFN $\omega$  und IFN $\tau 2$ . 100% = Zellzahl nach der Inkubationszeit ohne Interferone; 10-20% = Zellzahl bei Einsaat, 0% = Hintergrund ohne Zellen. (B)  $^{AP}EC_{50}$ -Werte der AP Aktivität im Vergleich.

Bei der Inkubation von Zellen mit Interferonen wurde mit ansteigender Konzentration eine Abnahme der Zellzahl beobachtet (Abbildung 46 A). Dabei konnten deutliche Unterschiede zwischen den Interferonen detektiert werden (Abbildung 46 B). Neben dem AP Effekt wurde bei einigen Interferonen zusätzlich ein zytotoxischer Effekt beobachtet. Dieser äußerte sich in einer geringeren Zellzahl im Vergleich zu der Einsaat nach der Inkubation mit Interferonen und konnte bei IFN $\beta$  und IFN $\omega$  bereits im nM-Bereich detektiert werden. Für die IFN $\alpha$ -

Subtypen wurde der zytotoxische Effekt erst bei Konzentrationen im höheren  $\mu\text{M}$ -Bereich beobachtet. Wie bei den vorhergehenden Aktivitätsuntersuchungen, konnte für das  $\text{IFN}\beta$  die höchste Aktivität bei der AP detektiert werden, gefolgt von  $\text{IFN}\omega$  (Abbildung 46 B). Bei den  $\text{IFN}\alpha$ -Subtypen konnten in der AP Aktivität nur geringe Unterschiede beobachtet werden, die bei  $^{\text{AP}}\text{EC}_{50}$ -Werten um 1-2 nM lagen. Diese Beobachtung steht im Gegensatz zu den Unterschieden bei der ISGF3-Assemblierung und der AV Aktivität. Insbesondere für das  $\text{IFN}\alpha 1$  ( $^{\text{AP}}\text{EC}_{50}$  2 nM) konnte eine annähernde Wirkung in der AP Aktivität wie für das  $\text{IFN}\alpha 2$  ( $^{\text{AP}}\text{EC}_{50}$  1,1 nM) detektiert werden. Die geringste AP Aktivität wurde für das  $\text{IFN}\tau 2$  beobachtet, die im Vergleich zu den  $\text{IFN}\alpha$ -Subtypen um ein 60-faches niedriger lag. Im Vergleich zu  $\text{IFN}\alpha 2$  wiesen die meisten Interferone eine höhere Potenz in der AP Aktivität als in der Aktivierung der ISGF3-Assemblierung auf.

Bisher wurden nur wenige Untersuchungen zu der AP Aktivität verschiedener Interferone durchgeführt. Jedoch wurden, insbesondere für das  $\text{IFN}\alpha 1$ , unterschiedlich starke AP Aktivitäten in Abhängigkeit vom jeweiligen Zelltyp beobachtet. Ursache für die Wahl von 2fTGH-Zellen für die AP Aktivität war die nahe Verwandtschaft zu den HL116-Zellen, die für die Aktivierung der ISGF3-Assemblierung verwendet wurden. Zu bedenken war hierbei, dass die 2fTGH-Zellen über ihre Sensibilität gegenüber Interferonen selektiert wurden und daher aufgrund eventueller Anpassungseffekte eine veränderte Aktivität aufweisen könnten. Um auszuschließen, dass die vergleichbaren AP Aktivitäten der  $\text{IFN}\alpha$ -Subtypen ein 2fTGH-spezifischer Effekt war, wurde die AP Aktivität zusätzlich in HL116- und HeLa-Zellen untersucht.

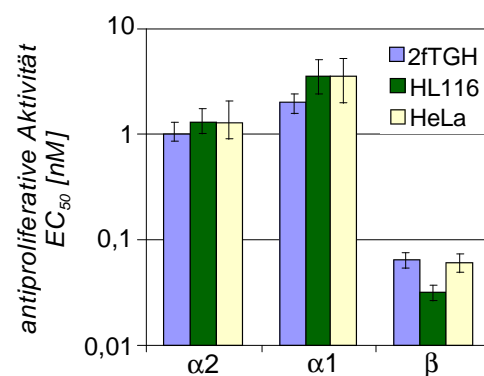


Abbildung 47 Vergleich der AP Aktivität von  $\text{IFN}\alpha 2$ ,  $\text{IFN}\alpha 1$  und  $\text{IFN}\beta$  in verschiedenen Zelllinien.

Für das  $\text{IFN}\alpha 2$  wurde in den HL116-Zellen und den HeLa-Zellen ein gering höhere  $^{\text{AP}}\text{EC}_{50}$ -Werte von ~1,5 nM für AP Aktivität detektiert (Abbildung 47). Dagegen wurde für  $\text{IFN}\beta$  in den HL116-Zellen eine stärkere AP Aktivität, in den HeLa-Zellen eine vergleichbare AP Aktivität

beobachtet. Für das IFN $\alpha$ 1 wurde ebenfalls ein leicht verminderte AP Aktivität ( $^{AP}EC_{50} \sim 3,5$  nM) in den HL116- sowie HeLa-Zellen beobachtet. Insgesamt konnte jedoch für die Interferone in den verschiedenen Zelllinien eine vergleichbare AP Aktivität beobachtet werden.

### 3.2 Korrelation von Affinität und Aktivität

Um einen möglichen Zusammenhang zwischen den Bindungsaffinitäten und den Aktivitäten herzustellen, wurden die relativen Werte für die verschiedenen Interferone herangezogen und korreliert.

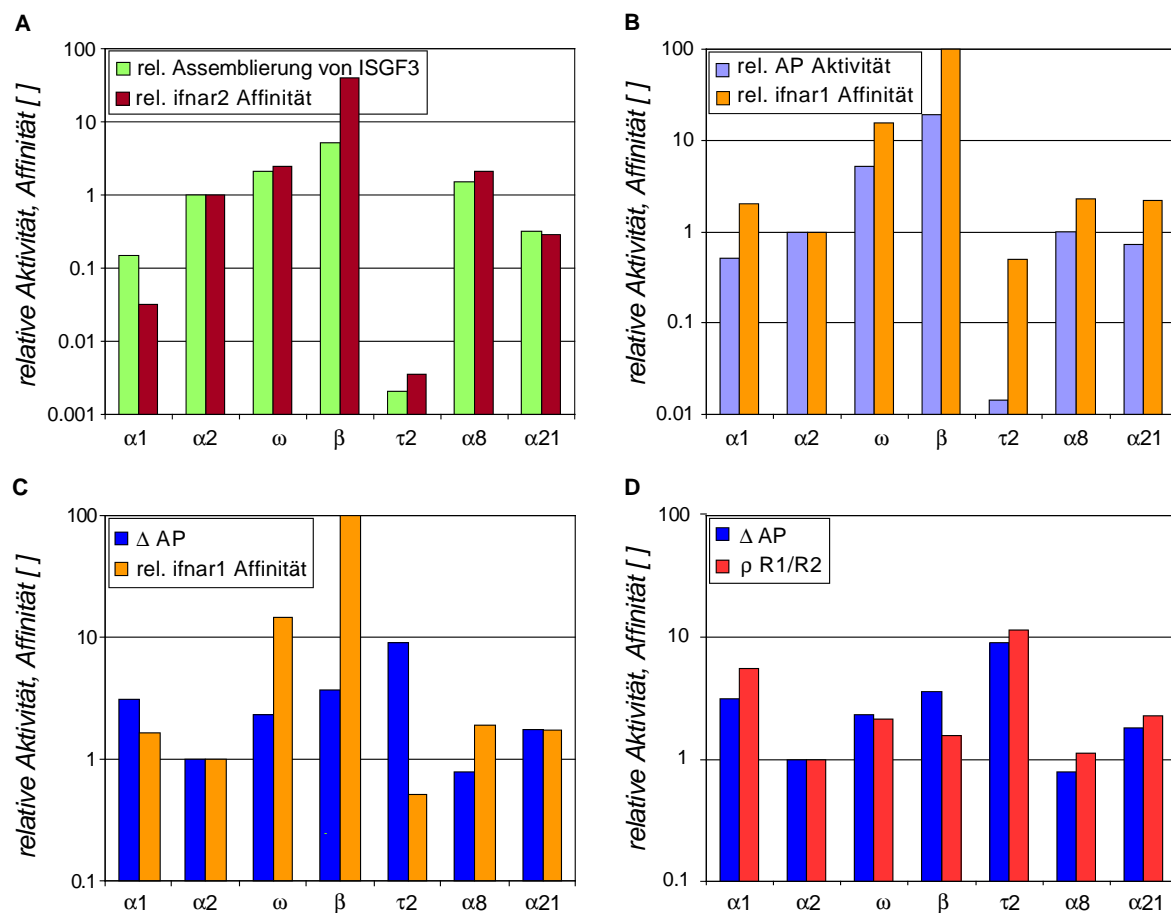


Abbildung 48 Korrelation von Bindungsaffinität und Aktivität. (A) relative Induktion der ISGF3-Assemblierung gegen relative ifnar2-Bindung, (B) relative AP-Aktivität gegen relative ifnar1-Bindung, (C)  $\Delta$  AP gegen relative ifnar1 Affinität und (D)  $\Delta$  AP Aktivität gegen  $\rho$  R1/R2.

Bei der Korrelation der relativen ISGF3-Assemblierung mit der relativen Bindungsaffinität an ifnar2-EC konnte bei einer Abnahme bzw. einem Anstieg der ifnar2-Affinität ein analoger Abfall oder Anstieg in der ISGF3-Assemblierung beobachtet werden (Abbildung 48 A). Erst bei einer hohen ifnar2-Bindungsaffinität war keine entsprechende Steigerung in der Aktivität

zu erkennen (z.B. IFN $\beta$ ). Ferner konnte bei der Korrelation der relativen AP Aktivität mit der relativen Bindungsaffinität an ifnar1-EC ebenso ein Anstieg in der AP Aktivität bei steigender ifnar1-Affinität beobachtet werden (Abbildung 48 B). Bei einer relativ hohen ifnar1-Affinität war diese Steigerung in der AP Aktivität ebenfalls nicht weiter festzustellen (z.B. IFN $\beta$ , IFN $\omega$ ). Auch bei einer stark reduzierten ifnar1-Affinität war eine stärkere Reduzierung in der AP Aktivität zu erkennen, als erwartet (z.B. IFN $\tau$ 2).

Bei den Korrelationen war zu bedenken, dass bisher nur der Einfluss einer Rezeptoruntereinheit mit einbezogen wurde. Die Aktivierung von Signalkaskaden ist jedoch nur über die Assemblierung eines ternären Komplexes möglich, so dass die Bindungsaffinität zu ifnar2 und zu ifnar1 berücksichtigt werden musste. Hierzu wurde zunächst die relative Potenz der AP Aktivität gegenüber der ISGF3-Assemblierung berechnet, die im Folgenden als differentielle AP Aktivität ( $\Delta$  AP) bezeichnet wurde. Dieser Wert gab zu einem Auskunft über die Potenz eines Interferons die AP Aktivität im Vergleich zu der ISGF3-Assemblierung zu aktivieren. Dabei wurde für die größte Anzahl an Interferonen ein höherer Wert für die  $\Delta$  AP gegenüber IFN $\alpha$ 2 beobachtet werden, was auf eine höhere Potenz in der AP Aktivität hindeutete. Insbesondere IFN $\alpha$ 1, IFN $\alpha$ 21 und IFN $\tau$ 2 zeigten eine höhere Potenz in der Aktivierung der AP Aktivität als in der Assemblierung von ISGF3-Komplexen. Indirekt konnte hierdurch der Einfluss der ifnar2-Bindungsaffinität auf die AP Aktivität ausgeschlossen werden. Daher wurde die  $\Delta$  AP erneut mit der relativen ifnar1-Affinität korreliert (Abbildung 48 C). Ein deutlicher Zusammenhang konnte jedoch zwischen der  $\Delta$  AP und der relativen ifnar1-Affinität, insbesondere für IFN $\beta$ , IFN $\omega$  und IFN $\tau$ 2, nicht beobachtet werden. Auch für die IFN $\alpha$ -Subtypen zeigte sich, wie zuvor, kein deutlicher Zusammenhang.

Eine mögliche Abhängigkeit von dem relativen Verhältnis der ifnar1- und ifnar2-Bindungsaffinität konnte bereits für die Stabilisierung der Ligandenbindung im ternären Komplex gezeigt werden (s. 2.2), die im Folgenden als  $\rho$  R1/R2 bezeichnet wurde. Daher war anzunehmen, dass diese sich möglicherweise unterschiedlich auf die Induktion verschiedener Aktivitäten auswirken könnte. Je größer folglich der Wert für  $\rho$  R1/R2 war, desto kleiner war die Differenz zwischen der ifnar1- und der ifnar2-Affinität. Bei der Korrelation von  $\rho$  R1/R2 mit der  $\Delta$  AP konnte bei steigendem  $\rho$  R1/R2 ein vergleichbarer Anstieg für die  $\Delta$  AP beobachtet werden (Abbildung 48 D). Der Einfluss durch  $\rho$  R1/R2 auf die  $\Delta$  AP war insbesondere für IFN $\beta$ , IFN $\omega$  und IFN $\tau$ 2 zu erkennen, für die zuvor kein eindeutiger Zusammenhang gezeigt werden konnte.

Auffällig war ferner, dass für die ISGF3-Assemblierung und der AP Aktivität kein weiterer Anstieg in der Aktivität bei steigenden Bindungsaffinitäten beobachtet wurde. So zeigte sich für das IFN $\beta$  in der ISGF3-Assemblierung und in der AP Aktivität nur jeweils eine um das



sechs- bis achtfach höhere Aktivität, trotz einer 50-fach höheren ifnar2-Affinität bzw. einer 100-fach höheren ifnar1-Affinität im Vergleich zu IFN $\alpha$ 2.

### 3.3 Aktivitätsuntersuchungen mit Mutanten

Um den Einfluss der Bindungsaffinität auf die Signaltransduktion näher zu untersuchen, wurden Aktivitätsuntersuchungen mit Mutanten durchgeführt, die eine veränderte Bindungsaffinität zu einer Rezeptoruntereinheit aufwiesen. Die absoluten EC<sub>50</sub>-Werte für die ISGF3-Assemblierung (A) und der AP Aktivität (B) für verschiedene Mutanten sind in der Abbildung 49 aufgeführt.

#### ISGF3-Assemblierung

Für die Mutationen, welche eine verminderte ifnar2-Affinität aufweisen, konnte eine massive Abnahme in der ISGF3-Assemblierung detektiert werden. Dabei bewirkte die  $\alpha^2$ R149A Mutation eine stärkere Minderung als die  $\alpha^2$ R144A-Mutation, was mit dem unterschiedlichen Einfluss auf die ifnar2-Affinität korreliert (2.1.4). Insgesamt war bei den IFN $\alpha$ -Subtypen mit der homologen Mutation  $\alpha^2$ R149A bzw.  $\alpha$ R150A eine starke Reduktion in der Aktivität zu erkennen. Nur für IFN $\alpha$ 8-R150A konnte ein geringerer Einfluss beobachtet werden, welche bereits bei der ifnar2-Affinität eine geringere Affinitätsminderung aufwies (s. 2.1.7). Bei IFN $\omega$ -K150A zeigte sich nur ein geringfügiger Einfluss auf die ISGF3-Assemblierung gegenüber dem Wildtyp. Dies korrelierte ebenfalls mit der Beobachtung, dass der Lysinrest (K) des IFN $\omega$ s gegenüber dem Argininrest (R) der IFN $\alpha$ -Subtypen eine geringere Abnahme der Bindungsaffinität zu ifnar2-EC erreichte. Der Verlust der Bindungsaffinität verglichen zu der ISGF3-Assemblierung war jedoch um ein Vielfaches größer.

Für die Mutanten IFN $\alpha$ 2-E58A und IFN $\alpha$ 2-HEQ, welche eine höhere Affinität zu ifnar1-aufweisen, wurde eine verstärkte Induktion der ISGF3-Assemblierung beobachtet. Einzelmutanten, mit verminderter ifnar1-Affinität, zeigten dagegen nur eine geringfügige Änderung. Jedoch beeinflussten diese Mutanten nur gering die ifnar1-Affinität. Bei der Kombination der Einzelmutanten konnte dagegen für IFN $\alpha$ 2-LYY eine stark verminderte Induktion der ISGF3-Assemblierung bestimmt werden, die sich bei IFN $\alpha$ 2-NLYY nochmals verstärkte.

#### AP Aktivität

Für die AP Aktivität konnte für IFN $\alpha$ 2-R144A eine 10-fache Minderung gegenüber IFN $\alpha$ 2 festgestellt werden. Eine starke Abnahme der AP Aktivität war ebenfalls für die homologen Mutationen an Position  $\alpha^2$ R149A /  $\alpha$ R150A zu erkennen. Ausnahme war erneut IFN $\alpha$ 8-R150A, welches gegenüber den anderen IFN $\alpha$ -Subtypen ( $\geq 50$  nM) eine stärkerer AP Aktivität ( $^{AP}EC_{50} \sim 20$  nM) zeigte. Dagegen war für die Mutanten IFN $\alpha$ 2-E58A und

IFN $\alpha$ 2-HEQ eine bis zu 10-fach stärkere AP Aktivität zu erkennen. Für eine gering verminderte ifnar1-Affinität wurde dagegen kaum ein Einfluss auf die AP Aktivität detektiert. Für IFN $\alpha$ 2-NL YY konnte nur noch bei sehr hohen Konzentrationen ( $^{AP}EC_{50} > 100$  nM) eine AP Aktivität festgestellt werden, die jedoch auch durch andere Effekte hervorgerufen werden könnte.

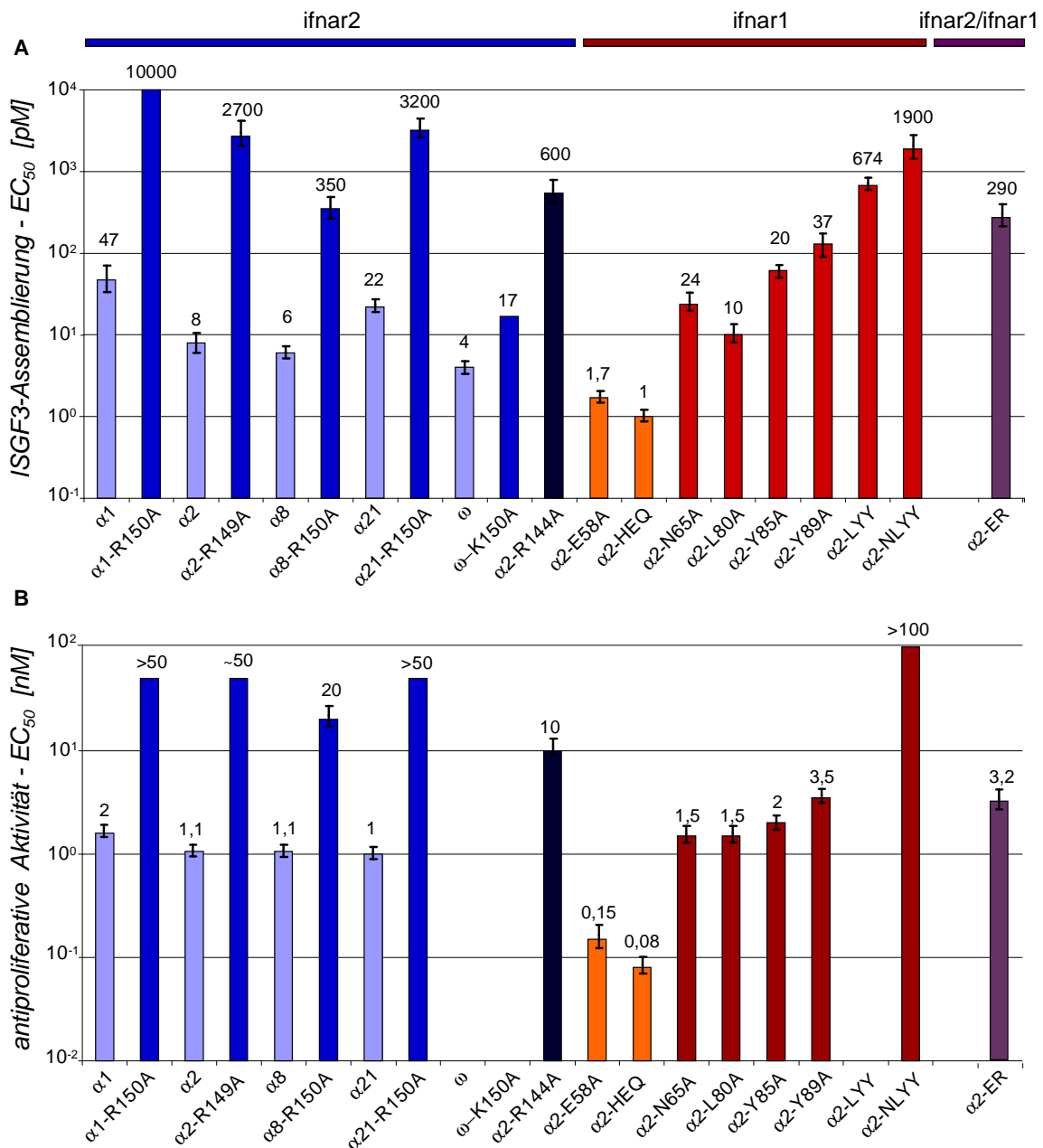


Abbildung 49 (A) Induktion der ISGF3-Assemblierung, (B) antiproliferative Aktivität von Mutanten. Beeinflussung der: (dunkelblau) reduzierte ifnar2-Bindung,  $\alpha 2$ R144A; (blau) reduzierte ifnar2-Bindung, homologe Mutation an Position  $\alpha 2$ R149A,  $\alpha 2$ R150A,  $\omega$ K150A; (orange) gesteigerte ifnar1-Bindung (rot) reduzierte ifnar1-Affinität; (violett) ifnar1- und ifnar2-Affinität; (hellblau) Wildtypen.

### 3.4 Korrelation von Affinität und Aktivität der Mutanten

Zuvor konnte bei den Interferonen ein unterschiedlicher Einfluss der ifnar1- und ifnar2-Bindungsaffinität auf die Aktivität gezeigt werden. Um die beobachteten Korrelationen zu untermauern und den Effekt einer spezifisch veränderten Affinität auf verschiedene Aktivitäten zu untersuchen, wurden diese ebenfalls für ausgewählte Mutanten durchgeführt.

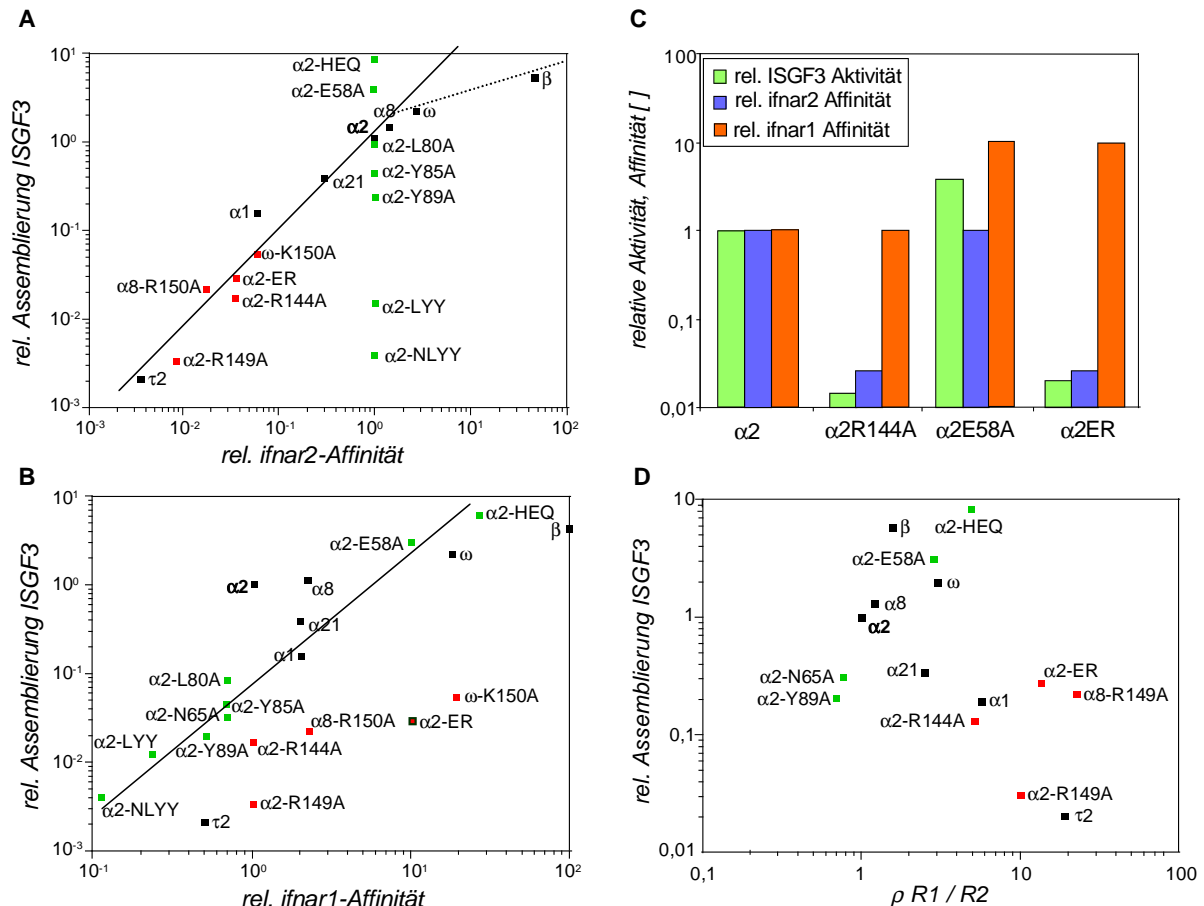


Abbildung 50 (A) Korrelation der relative ifnar2-Affinität gegen die relative ISGF3-Assemblierung für verschiedene Interferone und Mutanten. (B) Korrelation der relativen ISGF3-Assemblierung gegen die relative ifnar1-Affinität. (C) Direkter Vergleich ausgewählter Mutanten. (D) Korrelation der relativen ISGF3-Assemblierung gegen  $\rho R1/R2$ . (■) Interferone. (■) Mutanten, welche die ifnar2-Affinität beeinflussen. (■) Mutanten, welche die ifnar1-Affinität beeinflussen.

#### ISGF3-Assemblierung

Wurde die relative ISGF3-Assemblierung gegen die relative ifnar2-Affinität für verschiedene Mutanten korreliert (Abbildung 50 A), konnte bei abnehmender ifnar2-Affinität ebenfalls eine Minderung in der Induktion der ISGF3-Komplexe beobachtet werden (■). Für die Mutanten, welche die ifnar1-Affinität beeinflussen, war jedoch ebenso ein Einfluss auf die Assemblierung der ISGF3-Komplexe zu erkennen (■). Verminderte bzw. erhöhte sich die

ifnar1-Affinität, war eine entsprechende Reaktion bei der Induktion der ISGF3-Assemblierung zu beobachten. Insbesondere bei den IFN $\alpha$ 2-LYY und IFN $\alpha$ 2-NLYY konnte eine starke Minderung in der Induktion einer ISGF3-Assemblierung detektiert werden. Um eine mögliche Wechselbeziehung nicht auszuschließen wurde daher die relative ISGF3-Assemblierung gegen die relative ifnar1-Affinität korreliert (Abbildung 50 B). Eine Abhängigkeit konnte für die Interferone (■) nicht erkannt werden. Wurden jedoch die Mutanten hinzugezogen, welche die ifnar1-Affinität beeinflussen, war eine denkbare Abhängigkeit festzustellen. Ursache könnte in der Stabilisierung der Interferone im ternären Komplex zu finden sein, welche bei sehr niedriger Bindungsaffinität zu ifnar1 kaum noch möglich ist, wie für den ternären Komplex gezeigt (2.2.3). Um daher den Zusammenhang zwischen der Affinität und der Aktivität hervorzuheben, wurden verschiedene Mutanten ausgewählt und in einem Balkendiagramm dargestellt (Abbildung 50 C). Dabei war für eine abnehmende ifnar2-Affinität (IFN $\alpha$ 2-R144A) eine starke Reduktion in der Induktion von ISGF3-Komplexen zu erkennen. Stieg die ifnar1-Affinität an (IFN $\alpha$ 2-E58A), war ebenfalls ein Anstieg in der Aktivität zu beobachten. Diese Zunahme war jedoch geringer ausgeprägt, als der Anstieg der ifnar1-Affinität. Bei der kombinierten Mutante (IFN $\alpha$ 2-ER), welche eine verminderte ifnar2-Affinität und im Gegenzug eine erhöhte ifnar1-Affinität besitzt, war der Einfluss durch ifnar2 auf die Assemblierung der ISGF3-Komplexe deutlich höher als der Einfluss durch ifnar1.

Ein Zusammenhang zu  $\rho$  R1/R2 wurde ebenfalls überprüft (Abbildung 50 D), welcher jedoch kein eindeutiger Zusammenhang zeigte. Ein bedeutender Einfluss durch  $\rho$  R1/R2 für die Induktion der ISGF3-Assemblierung kann daher vermutlich ausgeschlossen werden.

#### AP Aktivität

Bei der Induktion der ISGF3-Assemblierung (●/●) und der AP Aktivität (■/■) für IFN $\alpha$ 2 (—) und IFN $\alpha$ 2-ER (—) konnten deutliche Unterschiede in Aktivierungseffizienz beobachtet werden (Abbildung 51 A). So konnte für die Mutante IFN $\alpha$ 2-ER, welche eine 10-fach höhere ifnar1-Affinität und eine 30-fach niedrigere ifnar2-Affinität besitzt, eine deutlich höhere Potenz in der AP Aktivität als in der Induktion der ISGF3-Assemblierung (=  $\Delta$  AP) nachgewiesen werden. Bei der Korrelation der  $\Delta$  AP und  $\rho$  R1/R2 konnte mit verschiedenen Mutanten eine Abhängigkeit bestätigt werden (Abbildung 51 B, C). Deutlich wurde dieser Zusammenhang bei Mutanten, welche eine verminderte ifnar2-Affinität oder eine gesteigerte ifnar1-Affinität gegenüber IFN $\alpha$ 2 besitzen (z.B. IFN $\alpha$ 2-R144A, IFN $\alpha$ 2-E58A). Für beide Mutanten wurde ein steigender Wert für  $\rho$  R1/R2 bestimmt, der in einem Anstieg der  $\Delta$  AP resultierte.

Demzufolge konnte die Abhängigkeit (I.) zwischen der Induktion der ISGF3-Komplexe und der *ifnar2*-Affinität sowie (II.) der AP Aktivität und der *ifnar1*-Affinität mit Hilfe der Mutanten bestätigt werden. Zum anderen konnte (III.) ein Einfluss von  $\rho R1/R2$  auf die differentielle AP Aktivität ( $\Delta AP$ ) zusätzlich belegt werden.

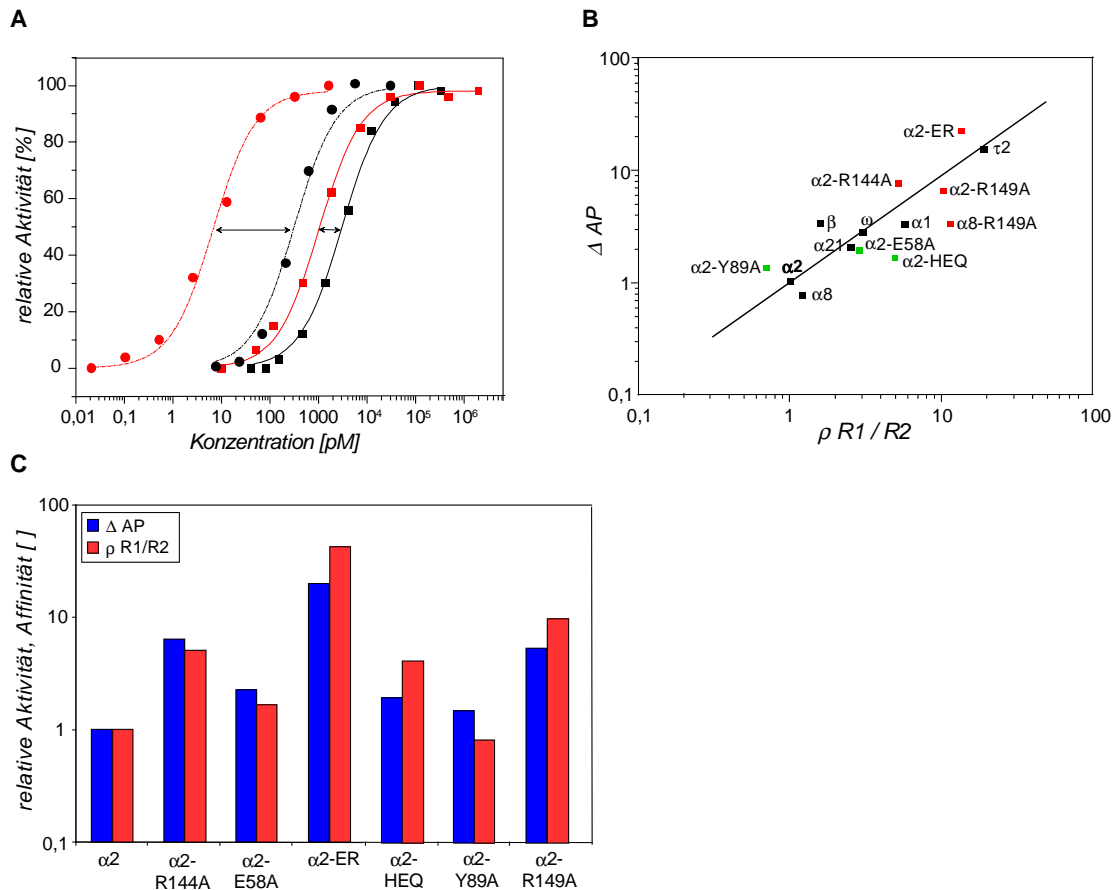


Abbildung 51 Korrelation der Bindungsaffinitäten und Aktivitäten verschiedener Mutanten. (A) Dosis-Wirkungs-Beziehung der (●/●) Assemblierung von ISGF3 und (■/■) AP Aktivität gegen die IFN-Konzentration von IFN $\alpha 2$  (—) bzw. IFN $\alpha 2$ -ER (—). Korrelation der (B, C)  $\Delta AP$  gegen  $\rho R1/R2$ . (■) Interferone. (■) Mutanten, welche die *ifnar2*-Affinität beeinflussen. (■) Mutanten, welche die *ifnar1*-Affinität beeinflussen.

### 3.5 Stabilität der Ligandenbindung im ternären Komplex und Aktivität

Ein Einfluss auf die Aktivität war, neben dem individuellen Beitrag der Bindungsaffinitäten, durch die dynamische Stabilisierung der Ligandenbindung im ternären Komplex in Abhängigkeit von der Rezeptordichte zu erwarten. Um einen möglichen Zusammenhang zu klären, wurden die rel. Dissoziationsratenkonstanten aus dem ternären Komplexes  $^{tern}k_d$  bei niedrigen Rezeptoroberflächenkonzentrationen herangezogen und gegen die relative ISGF3-Assemblierung sowie der relativen AP Aktivität korreliert (Abbildung 52).

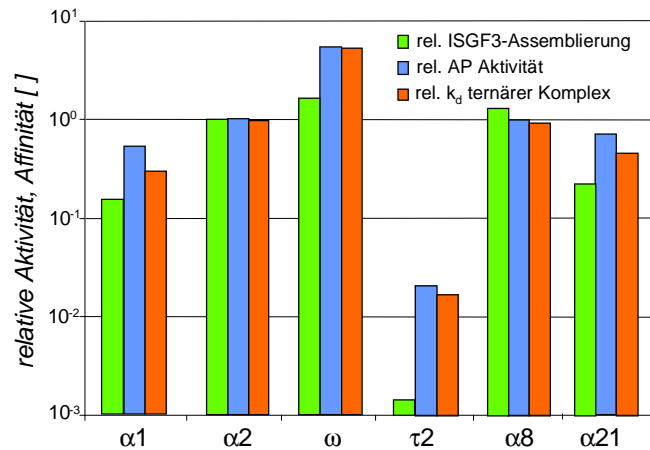
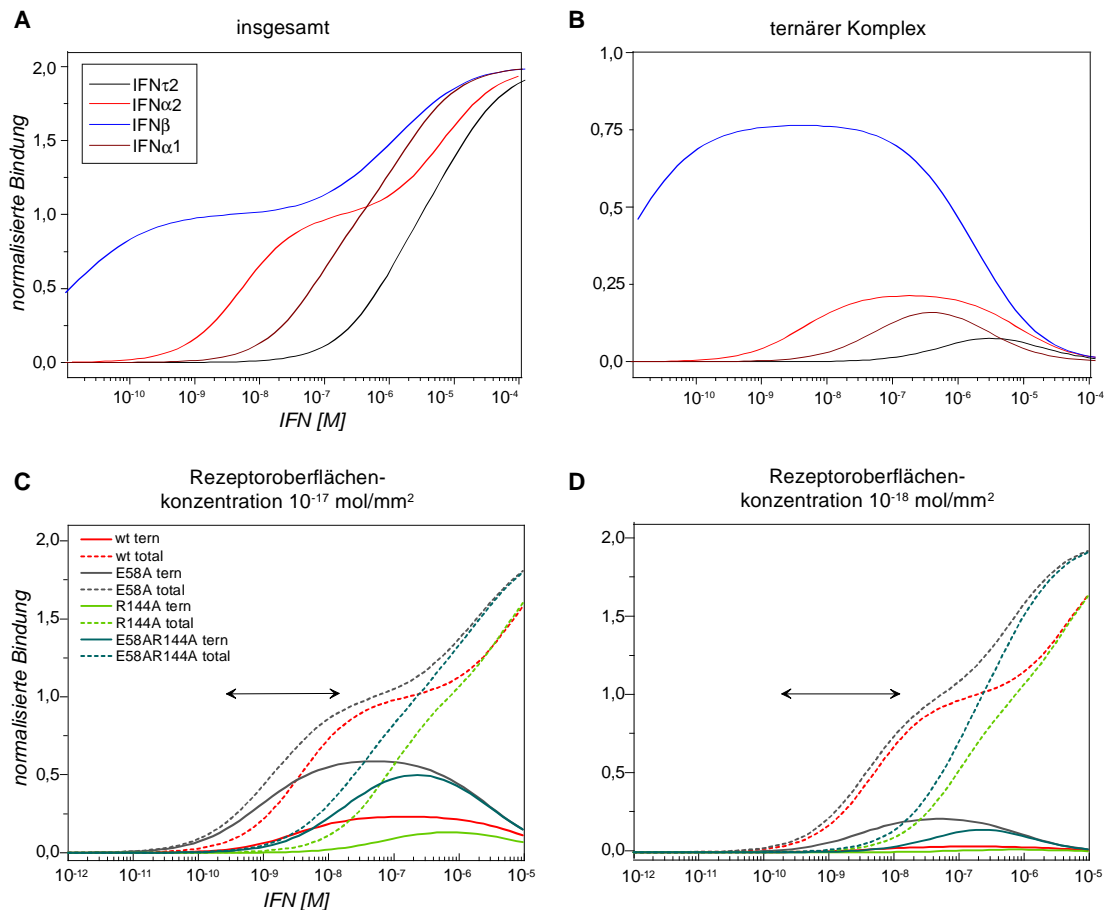


Abbildung 52 Korrelation der relativen Induktion der ISGF3-Assemblierung und der relativen AP Aktivität gegen die relative Dissoziationsratenkonstante der Interferone aus dem ternären Komplex.

Ein möglicher Zusammenhang war hierbei zwischen den relativen  $^{tern}k_d$ -Werten und der relativen AP Aktivität zu beobachten. Bei relativ stabiler Bindung der Interferone im ternären Komplex resultierte daraus eine hohe AP Aktivität. War die Stabilisierung sehr kurzlebig (z.B. IFN $\tau 2$ ), wurde die AP Aktivität kaum aktiviert. Für die Induktion der ISGF3-Assemblierung war dagegen kein deutlicher Bezug zu den Dissoziationsratenkonstanten ( $k_d$ ) aus dem ternären Komplex zu erkennen.

Für verschiedene Aktivitäten konnte bisher eine Abhängigkeit von unterschiedlichen Faktoren, wie z.B. der IFN-Konzentration, der Bindungsaffinität und der Stabilisierung der Ligandenbindung im ternären Komplex, beobachtet werden. Um jedoch die Bedeutung für die Signaltransduktion besser verstehen zu können, muss differenziert werden zwischen dem Anteil an Interferonen, der einerseits insgesamt an den Rezeptoruntereinheiten gebunden vorliegt und andererseits davon zu einem ternären Komplex assemblieren. Da die Bindungsaffinitäten zu ifnar1 und ifnar2 bekannt waren, wurden theoretische Berechnungen für unterschiedliche Interferone bei IFN-Konzentrationen zwischen  $10^{-13}$  und  $10^{-5}$  M und einer Rezeptoroberflächenkonzentration von  $10^{-17}$  mol/mm<sup>2</sup> pro Rezeptoruntereinheit durchgeführt (Abbildung 53 A, B). Ferner war ein Einfluss durch die Rezeptoroberflächenkonzentration zu erwarten. Die Folgen einer veränderten Rezeptordichte auf die ternäre Komplex-Assemblierung wurden ebenfalls für verschiedene Mutanten berechnet (Abbildung 53 C, D).



**Abbildung 53** (A) Anteil an Interferonen, insgesamt gebunden auf der Oberfläche, (B) Anteil an Interferonen, gebunden im ternären Komplex bei einer Rezeptoroberflächenkonzentration von  $10^{-17}$  mol/mm<sup>2</sup>, (—) IFN $\alpha$ 1, (—) IFN $\alpha$ 2, (—) IFN $\beta$ , (—) IFN $\tau$ 2. (C, D) Anteil an Mutanten, gebunden im ternären Komplex sowie insgesamt auf der Oberfläche bei unterschiedlichen Oberflächenkonzentrationen: (C)  $10^{-17}$  mol/mm<sup>2</sup>, (D)  $10^{-18}$  mol/mm<sup>2</sup>, (—) IFN $\alpha$ 2, (—) IFN $\alpha$ 2-E58A, (—) IFN $\alpha$ 2-R144A, (—) IFN $\alpha$ 2-ER, ( $\leftrightarrow$ ) Bereich der AP Aktivität.

Für die Interferonbindung an die Rezeptoruntereinheiten sowie für die Assemblierung ternärer Komplexe zeigt sich eine deutliche Abhängigkeit von den Bindungsaffinitäten (Abbildung 53 A, B). Bei Interferonen, welche eine hohe ifnar2-Affinität gegenüber der ifnar1-Affinität aufweisen (z.B. IFN $\alpha$ 2, IFN $\beta$ ), ist ein sigmoidaler Kurvenverlauf für die Interferonbindung zu erkennen. Durch die großen Unterschiede in den  $K_D$  binden die Interferone zunächst an ifnar2. Ifnar1 assembliert zunächst nur mit dem IFN / ifnar2-Komplex zu einem ternären Komplex. Bei Konzentrationen nahe dem  $K_D$  für ifnar1 können dann die Interferone ebenfalls einen binären Komplex mit ifnar1 ausbilden. Es kommt zu einer Verschiebung des Gleichgewichtes in Richtung der binären Komplexe mit ifnar2 und ifnar1 und zu einer Verdrängung aus den ternären Komplexen. So bildet z. B. das IFN $\alpha$ 2 (—) zunächst binäre Komplexe mit ifnar2 aus, die mit ifnar1 zu ternären Komplexen

assemblieren. Bei Konzentrationen, die sich dem  $K_D$  an ifnar1 ( $>1 \mu\text{M}$ ) annähern, kommt es dann zu einer Verdrängung der ifnar1-Untereinheit aus dem ternären Komplex und zu einer Ausbildung binärer Komplex mit ifnar1.

Kommt es zu einer Annäherung der Bindungsaffinitäten von ifnar1 und ifnar2 ( $\rho$  R1/R2, z.B. IFN $\alpha$ 1, IFN $\tau$ 2), ist ein linearer Kurvenverlauf für die Bindung der Interferone an die Rezeptoruntereinheiten zu beobachten. Vergleichbare Beobachtungen lassen sich für verschiedene Mutanten feststellen (Abbildung 53 C). Die Bindung der Interferone an beide Untereinheiten findet in nahen Konzentrationsbereichen statt, so dass sich die Assemblierung ternärer Komplexe sowie die Verdrängung der Interferone aus dem Komplex überschneiden. Dadurch ist die maximal mögliche Assemblierung ternärer Komplexe begrenzt. Ebenso ist das Konzentrationsfenster für eine maximal mögliche Assemblierung ternärer Komplexe verengt.

Da für die AP Aktivität eine sehr viel höhere Konzentration als für die Induktion der ISGF3-Assemblierung benötigt wurde, wurden die Auswirkungen einer veränderten Rezeptordichte auf die Assemblierung ternärer Komplexe berechnet (Abbildung 53 C, D). Nur ein geringer Einfluss auf die Bindung der Interferone, die insgesamt an den Rezeptoruntereinheiten binden, ist bei einer geringeren Rezeptordichte zu erkennen. Dagegen ist der Anteil an Interferonen gebunden im ternären Komplex bei einer Rezeptordichte deutlich von  $10^{-18} \text{ mol/mm}^2$  gegenüber der Rezeptordichte von  $10^{-17} \text{ mol/mm}^2$  deutlich verringert. Das Gleichgewicht wird bei steigender Rezeptorkonzentration deutlich in Richtung der ternären Komplexe verschoben. Mit diesen Berechnungen lassen sich die extremen Konzentrationsunterschiede bei den kurzfristig und langfristig induzierten Aktivitäten durch den Einfluss einer veränderten Rezeptordichte teilweise erklären. So wurde für die AP Aktivität eine höhere IFN-Konzentration benötigt, um möglicherweise bei einer sinkenden Rezeptordichte genügend ternäre Komplexe ausbilden zu können (Abbildung 53, ( $\Leftrightarrow$ )). Für die Aktivierung die ISGF3-Assemblierung konnte dagegen keine deutliche Erklärung gefunden werden, da sich nach den theoretischen Berechnungen nur eine geringe Anzahl an ternären Komplexen bei den bestimmten  $^{ISGF3}EC_{50}$ -Werten im pM-Bereich ausbilden kann. Hier scheint allein die Interferonbindung an die Rezeptoruntereinheiten auf der Oberfläche von Bedeutung zu sein.



#### 4 Internalisierung der Rezeptoruntereinheiten

Der Einfluss der Rezeptordichte auf die Stabilisierung der Interferonbindung im ternären Komplex konnte bereits gezeigt werden. Daher könnte die Änderung der Rezeptordichte auf einer Zellmembran eine entscheidende Rolle bei der Aktivierung verschiedener Signalwege spielen. Daher stellten sich zunächst folgende Fragen: Wie erfolgt eine Internalisierung der Rezeptoruntereinheiten und besteht eine Abhängigkeit von den Bindungsaffinitäten des gebundenen Interferons?

In Zusammenarbeit mit Gilles Uzé (CNRS, Montpellier) wurde der grundlegenden Frage nachgegangen, ob und in welcher Form eine Internalisierung stattfindet. Hierzu wurden HEK 293T-Zellen mit hohen IFN-Konzentrationen (1 nM) inkubiert und die Änderung der ifnar2- und ifnar1-Rezeptorkonzentration auf der Zelloberfläche mit Hilfe der Antikörper `R1 AA3` gegen ifnar1 und `R2 D5` gegen ifnar2 mittels FACS detektiert.

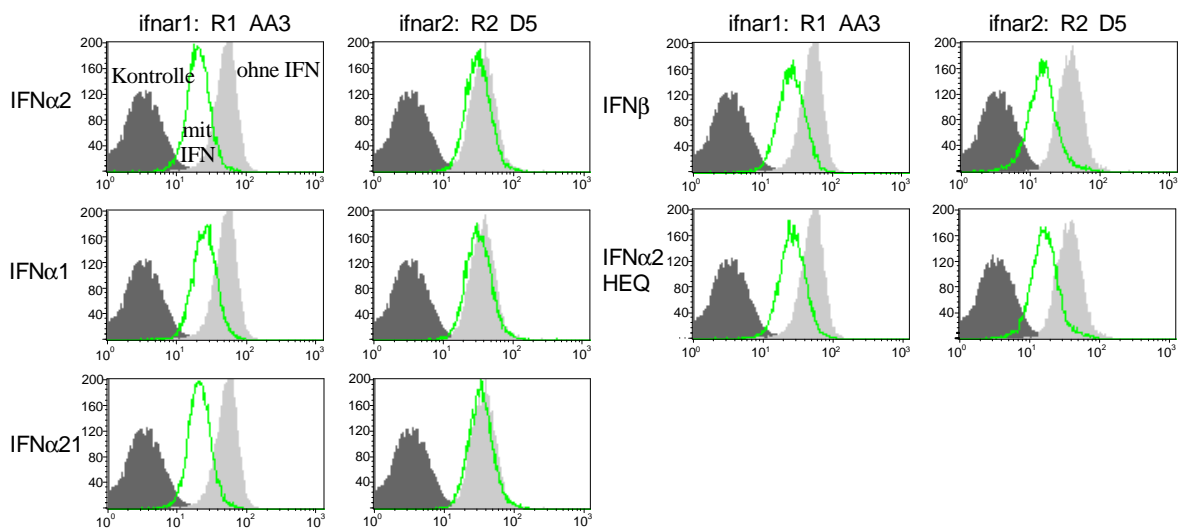


Abbildung 54 Internalisierung der Rezeptoruntereinheiten durch verschiedene Interferonen. Auftrag der Zellzahl gegen die Anzahl an Rezeptoruntereinheiten: (hellgrau) ohne IFN, (grün) mit Interferon, (dunkelgrau) Kontrolle.

Tabelle 10 %-Internalisierung der Rezeptoruntereinheiten.

%-Internalisierung	IFN $\alpha$ 1	IFN $\alpha$ 2	IFN $\alpha$ 21	IFN $\beta$	IFN $\alpha$ 2HEQ
ifnar1	48	58	58	46	46
ifnar2	13	16	11	58	53

Für die ifnar1-Untereinheit konnte nach der Bindung von Interferonen an den Interferonrezeptor eine Internalisierung zu annähernden Anteilen beobachtet werden (Abbildung 54). Die IFN $\alpha$ -Subtypen bewirkten, mit Ausnahme des IFN $\alpha$ 1, eine Internalisierung von ifnar1 zu ~60 %. Für IFN $\beta$  und IFN $\alpha$ 2-HEQ war eine geringfügig geringere Internalisierung von ~50 % zu erkennen. Deutliche Unterschiede waren dagegen bei der Internalisierung der ifnar2-Untereinheit zwischen den Interferonen festzustellen. Für Interferone mit einer relativ hohen ifnar1-Affinität (IFN $\beta$  und IFN $\alpha$ 2-HEQ) war eine vergleichbare Internalisierung von ifnar2 zu ~50 % zu beobachten. Dagegen wurde ifnar2 bei der Bindung der IFN $\alpha$ -Subtypen nur zu ~15 % internalisiert. Demzufolge fand bei niedriger ifnar1-Affinität eine Internalisierung von ifnar1 unabhängig von ifnar2 statt. War jedoch eine hohe Bindungsaffinität zu ifnar1 vorhanden, wurden beide Rezeptoruntereinheiten zu vergleichbaren Anteilen internalisiert. Hierbei wurde möglicherweise der gesamte IFN / Rezeptor-Komplex internalisiert (IFN $\beta$ , IFN $\alpha$ 2-HEQ).

## 5 Bindung der Interferone in lebenden Zellen

Um die differentielle Signaltransduktion verschiedener Interferone verstehen zu können, kann die Detektion der Interferonbindung an seinen Rezeptor auf der Zelloberfläche über Einzelmoleküle hilfreich sein. Hierzu sind der Mechanismus der Assemblierung und des Zerfalls sowie die Bindungskinetik des ternären Komplexes auf der Zellmembran zu klären. Die Kollisionswahrscheinlichkeit beider Rezeptoruntereinheiten wird dabei beeinflusst von der Oberflächenkonzentration, der Lokalisation bzw. der Verteilung und der Diffusionsgeschwindigkeiten der Rezeptoruntereinheiten (individuell oder im ternären Komplex) in der Zellmembran. Ein weiterer wichtiger Punkt ist die Internalisierung der Rezeptoruntereinheiten in Abhängigkeit von dem gebundenen Interferon.

Mit der TIRF-Mikroskopie bzw. der *Laser scanning* Mikroskopie (LSM) sowie Interferonen, die mit langlebigen Quantum Dots (QD655) markiert wurden, war es möglich Einzelmoleküle über einen längeren Zeitraum auf Zellen *in vivo* zu beobachten. Hierzu wurden die QD655 über die Streptavidine an biotinyliertes IFN $\alpha$ 2-S136C kovalent gebunden (IFN $\alpha$ 2-QD).

### 5.1 Affinitäts- und Aktivitätsuntersuchungen

Bevor Untersuchungen auf der Zellmembran *in vivo* durchgeführt werden konnten, wurde der Einfluss eines gebundenen Biotins bzw. eines QDs, mit einer Größe von > 10 nm, auf die Aktivität und Affinität der Interferone geklärt. Hierzu wurden die ISGF3-Assemblierung *in vivo* sowie die Bindungsaffinität an die Rezeptoruntereinheiten *in vitro* spektroskopisch und mikroskopisch untersucht.

### 5.1.1 Aktivität der IFN $\alpha$ 2-QDs

Für verschiedene Zwischenprodukte bei der Herstellung von IFN $\alpha$ 2-QDs zeigte sich ein deutlicher Einfluss auf die Induktion der ISGF3-Assemblierung (Abbildung 55). Für biotinylierte Interferone ( $EC_{50}$  ~15 pM) konnte ein geringer Aktivitätsverlust beobachtet werden. Die IFN $\alpha$ 2-QDs zeigten dagegen einen fünffachen Aktivitätsverlust ( $EC_{50}$  ~50 pM) gegenüber dem IFN $\alpha$ 2 ( $EC_{50}$  8 pM). Mögliche Ursache für die verminderte Aktivität war die Bindung mehrerer Interferone pro QD. Dadurch bestand nicht für alle Interferone die Möglichkeit an die Rezeptoren zu binden, so dass diese für eine Aktivierung nicht zur Verfügung standen. Die Berechnung eines  $EC_{50}$ -Wertes wird jedoch bestimmt von der genauen Kenntnis der Konzentration der Liganden, die eine Bindung eingehen könnte.

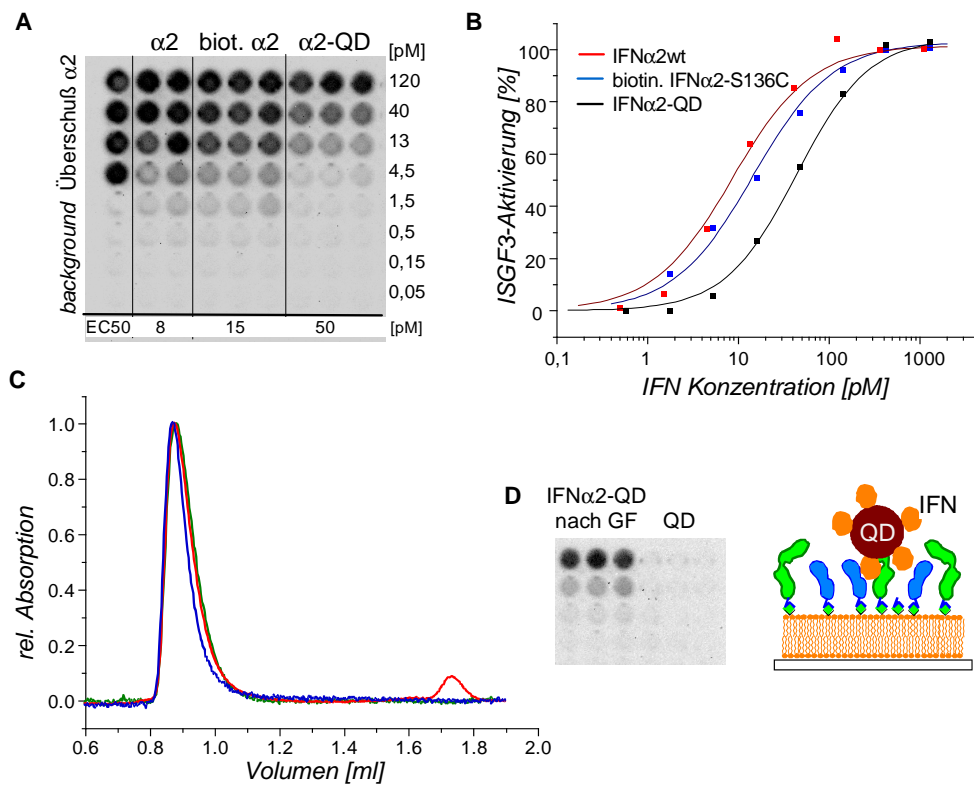


Abbildung 55 (A) Induktion der ISGF3-Assemblierung durch IFN $\alpha$ 2, biotinylierte IFN $\alpha$ 2-S136C und IFN $\alpha$ 2-QD vor der GF. (B) Dosis-Wirkungs-Beziehung der ISGF3-Assemblierung nach Langmuir. (—) IFN $\alpha$ 2, (—) biotinyliertes IFN $\alpha$ 2-S136C, (—) IFN $\alpha$ 2-QD vor GF. (C) Aufreinigung der IFN $\alpha$ 2-QD über GF. (—) QD, (—) IFN $\alpha$ 2 + QD, (—) biotinylierte IFN $\alpha$ 2-S136C + QD. (D) Assemblierung von ISGF3, aktiviert durch IFN $\alpha$ 2-QD nach der GF.

Um die Bindung von biotinylierten IFN $\alpha$ 2 an die QD zu kontrollieren, wurde das Elutionsverhalten von IFN $\alpha$ 2-QD über eine analytische GF untersucht (Abbildung 55 C). Ferner wurde die unspezifische Bindung der Interferone an die QD sowie der Anteil nicht biotinylierter Interferone untersucht, die zu einem falsch positiven Ergebnisse in der Aktivität *in vivo* führen können. Hierzu wurden zunächst IFN $\alpha$ 2 zusammen mit QD injiziert (—). Bei dem erwarteten Elutionsvolumen von 1,75 ml trat für das IFN $\alpha$ 2 ein Peak auf. Für die QD war ein identisches Elutionsverhalten, wie bei einer Injektion von QD ohne Interferonen (—), zu beobachten. Wurde biotinyliertes IFN $\alpha$ 2-S136C zusammen mit QD injiziert (—), trat bei 1,75 ml kein Peak auf. Um die Funktionalität der IFN $\alpha$ 2-QD nachzuweisen, wurde die Aktivierung der ISGF3-Assemblierung mit den IFN $\alpha$ 2-QDs aus der GF untersucht (Abbildung 55 D). Für die IFN $\alpha$ 2-QD konnte eine deutliche Aktivierung der Assemblierung von ISGF3-Komplexen detektiert werden. QD alleine bewirkten dagegen keine Aktivierung. Demnach fand (I.) keine unspezifische Bindung von nicht biotinylierten Interferonen an die QD statt. Ebenso lagen (II.) keine nicht biotinylierten Interferone nach der Markierung und Aufreinigung vor und (III.) eine funktionale Bindung von biotinyliertem IFN $\alpha$ 2-S136C an QD fand statt.

#### 5.1.2 Affinität der IFN $\alpha$ 2-QDs

Neben der Aktivität, war eine äquivalente Bindungsaffinität der IFN $\alpha$ 2-QD von Bedeutung. Um daher den Einfluss der gebundenen QD an die Interferone zu prüfen, wurden die Bindung an ifnar2-EC und die Assemblierung eines ternären Komplexes überprüft (Abbildung 56). Zuvor wurde die unspezifisch Bindung von IFN $\alpha$ 2-QD an die Lipiddoppelschicht kontrolliert. Hierzu wurde die Bindung von IFN $\alpha$ 2-QD zusammen mit einem Überschuss an ifnar2-tgl an immobilisierten ifnar2-EC untersucht (Abbildung 56 A).

Für die IFN $\alpha$ 2-QD konnte fast keine unspezifische Bindung an die Lipiddoppelschicht beobachtet werden (Abbildung 56 A). Eine deutliche Bindung wurde dagegen für die IFN $\alpha$ 2-QDs an ifnar2-EC detektiert, jedoch zeigte sich eine langsamere Assoziation sowie Dissoziation im Vergleich zu IFN $\alpha$ 2. Ursache für die langsame Assoziation war vermutlich die Größe der QD. Dadurch wurde die Bindungskinetik nicht nur von der Wechselwirkung zwischen Ligand und Rezeptor bestimmt, sondern auch von der Diffusion des Liganden an die Oberfläche. Aufgrund der Größe der QDs von mehr als 10 nm war die Bindungskinetik, besonders die Assoziation, stark von der Diffusion der QDs an die Oberfläche bestimmt. Ebenfalls konnte dadurch die Dissoziation von der Oberfläche zurück in den Flüssigkeitsstrom beeinflusst werden. Die langsame Dissoziation der IFN $\alpha$ 2-QDs von ifnar2-EC wurde jedoch vermutlich überwiegend durch das Verhältnis der gebundenen Interferone pro QD beeinflusst. Waren mehrere Interferone je QD gebunden, kam es zu einer

simultanen Dissoziation und Assoziation der gebundenen Interferone, so dass für den Gesamtkomplex IFN $\alpha$ 2-QD eine insgesamt verminderte Dissoziation von der Oberfläche detektiert wurde. Deutlich wurde dies bei der Veränderung des Mischverhältnisses von Interferon zu QD (Abbildung 56 B). Sank die Konzentration an Interferonen zu QD, konnten statistisch gesehen weniger Interferone pro QD an die Rezeptoruntereinheiten binden und ein geringer Anstieg in der Dissoziation war zu erkennen. Die Dissoziationsgeschwindigkeit von IFN $\alpha$ 2 wurde jedoch nicht erreicht, da trotz eines Überschuss an QDs nicht vollständig ausgeschlossen werden konnte, dass mehrere Interferone pro QD gebunden wurden. Ferner könnte die Dissoziation durch die Masse der QDs beeinflusst werden, wie für die Assoziation beobachtet.

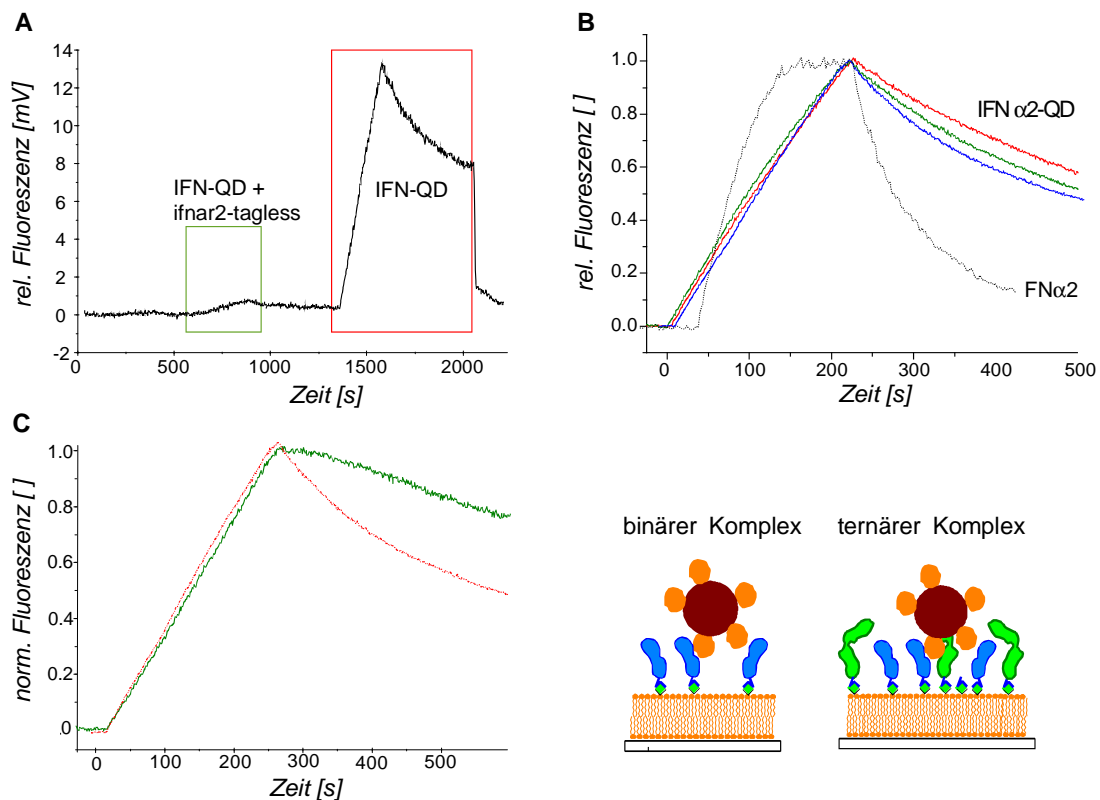
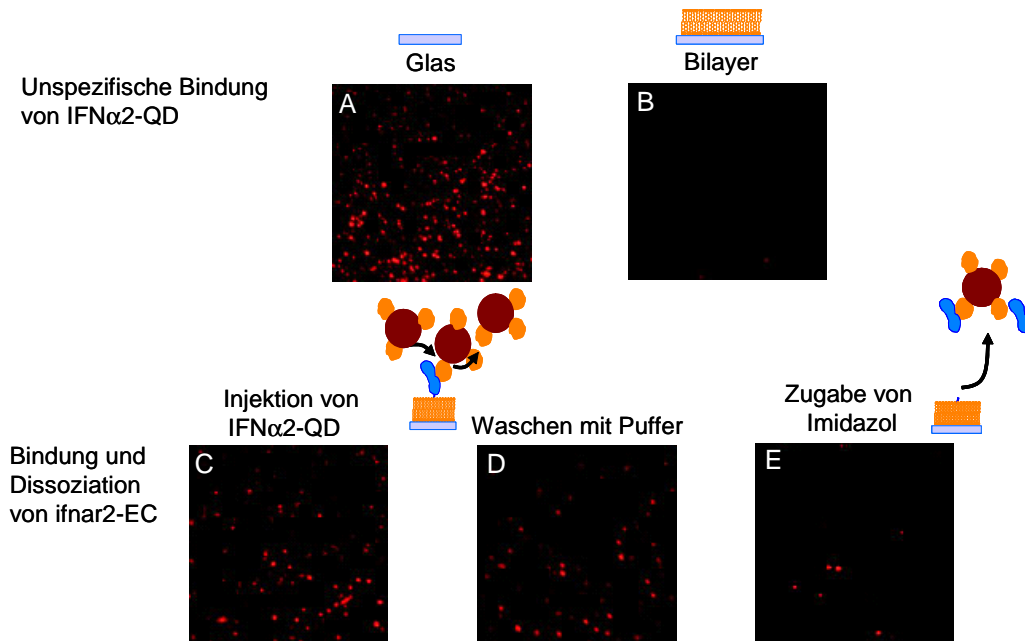


Abbildung 56 *Interaktion der IFN $\alpha$ 2-QD an ifnar2-EC auf einem Lipiddoppelschicht. (A) Unspezifische und spezifische Bindung der IFN $\alpha$ 2-QDs an ifnar2-EC. (B) Auswirkungen des IFN $\alpha$ 2-QD-Verhältnis auf die Bindung von IFN $\alpha$ 2-QD. Verhältnis von biotinylierten IFN $\alpha$ 2-S136C und QD: (—) 4:1, (—) 2:1, (—) 1:1, (—) IFN $\alpha$ 2. (C) Vergleich der Bindungsaffinität der IFN $\alpha$ 2-QD an ifnar2-EC (—) und im ternären Komplex (—).*

Für weitere Interaktionsstudien war es jedoch von Bedeutung ein optimales 1:1-Verhältnis von einem gebundenen Interferon pro QD zu erreichen, um realistische Bindungskinetiken auf der Zelloberfläche zu beobachten. Trotz einer Mehrfachbindung von Interferonen pro QD wurden mit den IFN $\alpha$ 2-QDs Bindungsstudien an ifnar2-EC auf einer Lipiddoppelschicht oder

an mit ifnar2-EGFP transfizierten HeLa-Zellen am TIRF-Mikroskop durchgeführt. Bindungsstudien an ifnar2-EC wurden, wie unter 5.1 beschrieben, durchgeführt (Abbildung 57). Zuvor wurde die unspezifische Bindung der IFN $\alpha$ 2-QDs auf einer Glasoberfläche und auf einer Lipiddoppelschicht kontrolliert.



**Abbildung 57** Visuelle Darstellung der Bindung von IFN $\alpha$ 2-QD an ifnar2-EC auf einer Lipiddoppelschicht. Kontrolle der unspezifischen Bindung auf (A) Glas und (B) einer Lipiddoppelschicht. (C) Injektion von 2 nM IFN $\alpha$ 2-QD auf immobilisiertem ifnar2-EC mit anschließendem (D) Waschen mit Puffer und (E) Entfernung der IFN $\alpha$ 2-QD / ifnar2-EC Komplexe.

Die Injektion von IFN $\alpha$ 2-QDs auf eine Glasoberfläche zeigten (Abbildung 57 A) eine hohe unspezifische Bindung auf Glas. Auf einer Lipiddoppelschicht (Abbildung 57 B) konnte dagegen keine unspezifische Bindung detektiert werden, so dass dies für weitere Untersuchungen als Kontrolle für eine korrekte Ausbildung und Funktionalität der Lipiddoppelschicht genutzt wurde. In den Abbildung 57 C bis E sind die Bindung und die Dissoziation der IFN $\alpha$ 2-QDs an immobilisiertem ifnar2-EC dargestellt, gefolgt von einer Injektion Imidazol, um immobilisiertes ifnar2-EC mit eventuell gebundenen IFN $\alpha$ 2-QD komplett von der Lipidoberfläche zu entfernen. IFN $\alpha$ 2-QD binden an ifnar2-EC (Abbildung 57 C), dissoziierten jedoch durch Waschen mit Puffer nur zu einem geringen Anteil von der Oberfläche (D). Erst durch die Injektion von Imidazol konnten die IFN $\alpha$ 2-QD fast komplett von der Oberfläche entfernt werden. Deutlich wurde, dass durch die Mehrfachbindung der Interferone pro QD eine Dissoziation stark erschwert war und zunächst nur IFN $\alpha$ 2-QD dissoziierten, die eine relativ geringe Anzahl an Interferonen pro QD gebunden hatten. Nach der Injektion von Imidazol konnten die IFN $\alpha$ 2-QD fast vollständig von der Oberfläche entfernt

werden. Dabei wurden die IFN $\alpha$ 2-QD, gebunden an ifnar2-EC, als multi-binäre Komplexe entfernt. Diese Ergebnisse korrespondierten mit den Resultaten aus 5.1.2.

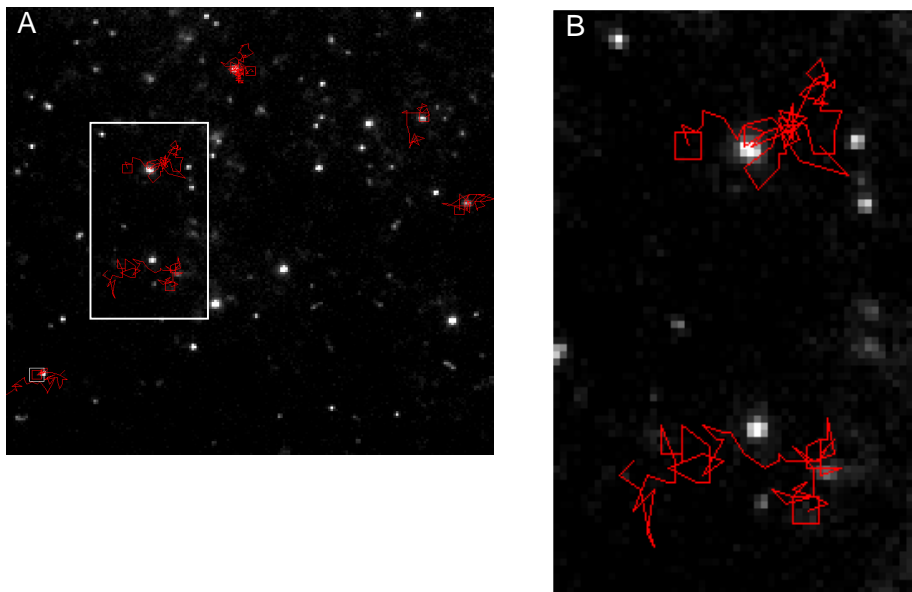


Abbildung 58 (A) Einzelmolekül-tracking von IFN $\alpha$ 2-QD auf ifnar2-EC, immobilisiert auf einer Lipiddoppelschicht. (B) Vergrößerung des Ausschnittes in A.

Neben der spezifischen Bindung der IFN $\alpha$ 2-QD an ifnar2-EC konnten ebenfalls erste Ergebnisse bezüglich der lateralen Diffusionsbewegung von ifnar2-EC auf einer Lipiddoppelschicht detektiert werden (Abbildung 58). Zu bedenken war hierbei, dass ifnar2-EC nicht über seine transmembranen Domäne in der Lipiddoppelschicht verankert waren. Zudem war anzunehmen, dass der Anteil an gebundenen Interferonen pro QD das Diffusionsverhalten beeinflusst. Für einige IFN $\alpha$ 2-QDs konnte jedoch eine deutlich laterale Diffusionsbewegung beobachtet werden, so dass vergleichbare Untersuchungen auf einer Zellmembran durchgeführt werden könnten.

### 5.1.3 Interferonbindung auf Zellen

Um die Bindung von IFN $\alpha$ 2-QD an die Interferonrezeptoren auf der Zelloberfläche zu beobachten, ist der Nachweis einer spezifischen Bindung zu erbringen. Jedoch konnte aufgrund der geringen Oberflächenkonzentration der Rezeptoruntereinheiten in den Zellen die spezifische Bindung der IFN $\alpha$ 2-QD nicht exakt von einer unspezifischen Bindung unterschieden werden. Aus diesem Grund wurden HeLa-Zellen mit ifnar2-EGFP transfiziert, so dass die Rezeptoroberflächenkonzentration der höher affinen Komponente ifnar2 erhöht wurde und der Anteil an spezifisch gebundenen IFN $\alpha$ 2-QD anstieg. Ebenso konnte die Co-Lokalisation und folglich spezifische Bindung der IFN $\alpha$ 2-QD an ifnar2 nachgewiesen werden.

Der Nachteil dieser Methode war, dass sich die ifnar2-Dichte auf der Zellmembran extrem erhöhte und keine physiologischen Bedingungen vorherrschten.

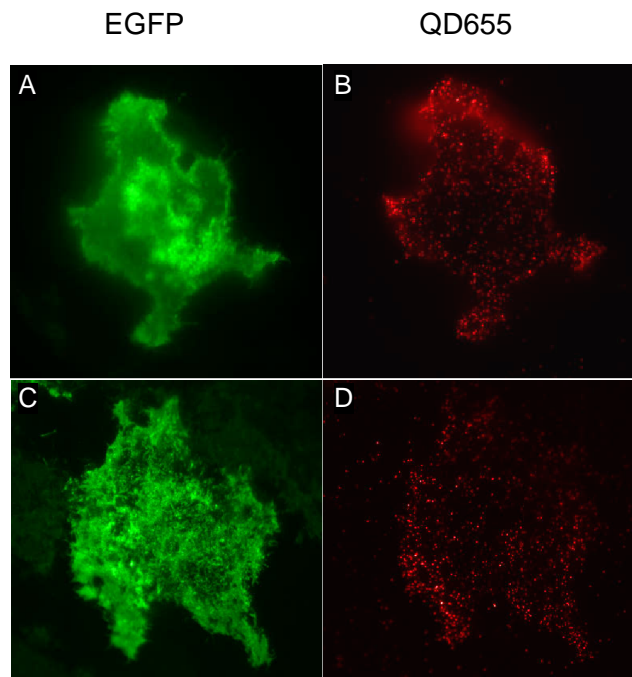


Abbildung 59 Bindung von  $IFN\alpha 2$ -QD (2 nM) an HeLa-Zellen, transfiziert mit ifnar2-EGFP. (A, C) EGFP. (B, D)  $IFN\alpha 2$ -QD.

Die Funktionalität der exponierten ifnar2-EGFP auf der Zellmembran wurde zuvor durch die spezifische Bindung von Cy5 markierten  $IFN\alpha 2$ -S136C überprüft (nicht dargestellt). Eine Co-Lokalisation sowie Kompetition durch einen Überschuss an unmarkierten  $IFN\alpha 2$  konnte hierbei beobachtet werden, so dass von einer Funktionalität des exponierten ifnar2-EGFP ausgegangen werden konnte. Die Bindung von  $IFN\alpha 2$ -QD auf mit EGFP-ifnar2 transfizierten HeLa-Zellen sind Abbildung 59 (EGFP: Abbildung 59 A, C, QD655: Abbildung 59 B, D). Eine deutliche Co-Lokalisation von ifnar2-EGFP und  $IFN\alpha 2$ -QD war zu erkennen, so dass von einer spezifischen Bindung an ifnar2-EGFP auszugehen war.



## VI Diskussion

Mit dieser Arbeit sollte gezeigt werden, wie verschiedene Interferone eine differentielle Induktion unterschiedlicher Aktivitäten erreichen. Da die Interferone über einen gemeinsamen Interferonrezeptor ihre differentielle Wirkung entfalten, muss bei der Bindung eines Interferons eine Erkennung stattfinden, die die Induktion verschiedener Aktivitätsmuster veranlasst. Ein möglicher Zusammenhang zwischen der Bindungsaffinität an den Interferonrezeptor und der Aktivität wurde daher überprüft. Hierzu wurde die Charakterisierung der Bindungsaffinität, der Bindungskinetik und der Stöchiometrie für die individuelle Interaktion mit ifnar1-EC und ifnar2-EC sowie für die Assemblierung eines ternären Komplexes *in vitro* durchgeführt. Ferner wurden Untersuchungen im Hinblick auf die Bindungsstelle der Interferone mit ihren Rezeptoruntereinheiten durchgeführt. Um eine differentielle Aktivierung verschiedener Signalwege zu beobachten, wurden kurzfristig und langfristig induzierte Aktivitäten *in vivo* untersucht. Der Einfluss einer spezifisch veränderten Bindungsaffinität auf die Aktivitäten wurde durch die Modulation der Bindungsaffinitäten an ifnar2 und / oder ifnar1 genauer untersucht.

### 1 Aufreinigung verschiedener Interferone und Mutanten

Eine Herausforderung war die effiziente Expression und Aufreinigung ausgewählter Interferone. Hierfür wurde für verschiedene IFN $\alpha$ -Subtypen die etablierte Strategie der heterologen Expression in *E. coli* ausgewählt [92]. Die Rückfaltung und Aufreinigung konnte erfolgreich mit Hilfe einiger Modifikationen für die Interferone und Mutanten durchgeführt werden und ausreichende Mengen mit hoher Reinheit isoliert werden. Für das IFN $\omega$  konnte trotz einer Modifikation der seltenen Codons nur eine geringe Expressionsrate in *E. coli* erreicht werden. Daher wurde die Expression mit Hilfe von Sf9-Insektenzellen durchgeführt und ausreichende Mengen an IFN $\omega$  konnten exprimiert und aufgereinigt werden.

Die Herstellung Fluoreszenz markierter Cystein-Mutanten wurde durch die Ausbildung intermolekularer Disulfidbrücken sowie einer Mehrfachmarkierung aufgrund reduziert vorliegender Cysteinreste beeinflusst. Die Abtrennung einfach und mehrfach Fluoreszenz markierter Interferone konnte mit Hilfe der RPC erfolgreich durchgeführt werden. Hierdurch konnte gewährleistet werden, dass die IFN / Rezeptor-Interaktion nicht durch eine Verunreinigung mehrfach Fluoreszenz markierter Interferone beeinflusst wurde.

## 2 Charakterisierung der Interferonbindung

Um Unterschiede zwischen den verschiedenen Interferonen zu erfassen, war die Charakterisierung der Interaktion zu den Rezeptoruntereinheiten von besonderer Bedeutung. Für verschiedene Interferone wurden die Assoziationsratenkonstanten  $k_a$ , Dissoziationsratenkonstanten  $k_d$  und die Dissoziationsgleichgewichtskonstanten  $K_D$  an die extrazellulären Domänen der Rezeptoruntereinheiten ifnar2 (ifnar2-EC) und ifnar1 (ifnar1-EC) erfolgreich bestimmt. Ferner wurden die Stöchiometrie sowie die Bindungsstellen zwischen den Interferonen und ifnar1 bzw. ifnar2 untersucht.

So konnte für alle untersuchten Interferone sowie Mutanten mit ifnar1 sowie ifnar2 eine 1:1-Stöchiometrie beobachtet werden. Ebenfalls konnte demonstriert werden, dass alle Interferone über ein einheitliches Interaktionsepitop auf ifnar2 sowie auf ifnar1 interagieren. Untersuchungen zeigten eine deutliche Verdrängung der Interferone durch andere Interferone von den Rezeptoruntereinheiten. Ebenso wurden identische Interaktionsepitope auf den Interferonen nachgewiesen. So konnte für die Interaktion mit ifnar2 bei allen IFN $\alpha$ -Subtypen die Bedeutung des homologen Argininrestes  $^{\alpha 2}$ R149A und  $^{\alpha}$ R150A belegt werden, der sich in einer stark reduzierten Bindungsaffinität äußerte. Für den Lysinrest  $^{\omega}$ K150A des IFN $\omega$  an homologer AS-Position zeigte sich dagegen ein geringerer Einfluss. Mögliche Ursache ist eine veränderte Interaktion über den Lysinrest des IFN $\omega$  im Bindungsepitop im Vergleich zu den IFN $\alpha$ -Subtypen. So ist bei IFN $\alpha 2$  eine Salzbrücke zwischen dem R149 und dem E79 nachgewiesen worden [152, 154]. Ebenso konnte für das ifnar1 bei einer Interferonbindung eine Konformationsänderung nachgewiesen werden, die jedoch bei IFN $\alpha 2$ , IFN $\beta$  und IFN $\alpha 2$ -HEQ in vergleichbarer Stärke stattfand (unveröffentlichte Daten). Unterschiedliche Konformationszustände der Rezeptoruntereinheit ifnar1 durch die Bindung von Interferonen, die eine mögliche differentielle Aktivierung von Signaltransduktionswegen bewirken könnten, konnten nicht nachgewiesen werden [148].

Dagegen konnten signifikante Unterschiede in den Bindungskinetiken zu ifnar2-EC und ifnar1-EC zwischen den Interferonen beobachtet werden. Zum einem variierten die Affinitäten zwischen den einzelnen Interferonen zu der jeweiligen Rezeptoruntereinheit über mehrere Größenordnungen und zum anderen konnte jeweils die ifnar2-EC als die höher affine Rezeptorkomponente bei allen Interferonen definiert werden. So war die Bindungsaffinität an ifnar2 bei den untersuchten Interferonen mit einzelnen Ausnahmen bis zu  $10^3$  Größenordnungen stärker als die Affinität zu ifnar1.

Bei der Bindungsaffinität an ifnar2 konnten bei den  $K_D$ -Werten Unterschiede von bis zu  $10^4$  Größenordnungen zwischen den Interferonen beobachtet werden. Ausgeprägte Differenzen

konnten bei den IFN $\alpha$ -Subtypen gezeigt werden. Für IFN $\alpha$ 8, IFN $\alpha$ 21 und insbesondere für das IFN $\alpha$ 1 wurde im Vergleich zu IFN $\alpha$ 2 eine schnellere Dissoziation detektiert. Nur geringe Unterschiede wurden dagegen bei der Assoziationskinetik zwischen den IFN $\alpha$ -Subtypen ermittelt. Das IFN $\tau$ 2 zeigte dagegen eine schnelle, transiente Bindung an ifnar2. Eine erheblich höhere Affinität an ifnar2-EC wurde für IFN $\beta$  beobachtet. Dabei lassen sich die Unterschiede in den Bindungsaffinitäten der Interferone an ifnar2-EC zu einem durch die unterschiedliche elektrostatische Wechselwirkungen erklären. So sind die IFN $\alpha$ -Subtypen und das IFN $\tau$ 2 nach außen negativ geladen, das IFN $\beta$  sowie das IFN $\omega$  sind dagegen nach außen positiv geladen. Die stärkere Assoziation an den nach außen hin negativ geladenen ifnar2 für IFN $\beta$  und IFN $\omega$  lässt sich daher zusätzlich durch eine höhere elektrostatische Anziehung erklären [92]. Zum anderen lassen sich die Unterschiede über spezifische Wechselwirkungen zwischen den Interferonen und ifnar2 erklären.

Da einige Interferone eine transiente, schnelle Bindungsaffinität an ifnar1 aufweisen, wurde diese bisher nicht im Detail untersucht [94, 150]. Für die Bindung der Interferone an ifnar1 konnten in dieser Arbeit ebenfalls charakteristische Unterschiede in der Affinität beobachtet werden, die eine ähnliche Tendenz, wie für die Bindung an ifnar2-EC aufdeckten. Deutliche Unterschiede konnten zwischen den IFN $\alpha$ -Subtypen beobachtet werden, die bedeutend für die differentielle Aktivität sein könnten. Für IFN $\alpha$ 1, IFN $\alpha$ 8 und IFN $\alpha$ 21 konnte im Vergleich zu IFN $\alpha$ 2 eine zweifach höhere Affinität nachgewiesen werden. IFN $\beta$  und IFN $\omega$  zeigten erneut eine wesentlich höhere Affinität an ifnar1-EC, wogegen das IFN $\tau$ 2 eine stark verminderte Affinität offenbarte. Im Gegensatz zu der Assoziation an ifnar2-EC, konnten bei ifnar1-EC keine Unterschiede beobachtet werden. Demnach werden die Unterschiede in den Bindungsaffinitäten an ifnar1-EC durch die Dissoziation bestimmt.

Als einziges Kriterium für eine Unterscheidung der Interferone konnten in dieser Arbeit die unterschiedlichen Bindungsaffinitäten an die Rezeptoruntereinheiten nachgewiesen werden. Andere Faktoren, wie Stöchiometrie, unterschiedliche Bindungsstellen oder Konformationsänderungen von ifnar1 zeigten dagegen keine Unterschiede bei den Interferonen. Durch die Gegensätze in den individuellen Bindungsaffinitäten konnten Unterschiede in dem Verhältnis der Bindungsaffinitäten zu ifnar1 und ifnar2 ( $\rho R1/R2$ ) beobachtet werden, was möglicherweise den Mechanismus der Komplex-Assemblierung beeinflusst.

Für die Charakterisierung der Liganden-induzierten Komplex-Assemblierung wurden die extrazellulären Domänen von ifnar2 (ifnar2-EC) und ifnar1 (ifnar1-EC) auf fluiden Membranen gebunden und die Stabilisierung der Interferonbindung im ternären Komplex für verschiedene Interferone untersucht. Ferner wurden die Stöchiometrie, die Auswirkung veränderter apparenter Rezeptorkonzentrationen und der Effekt einer spezifisch veränderten

Bindungsaffinität überprüft. Eine deutliche Abhängigkeit von den Bindungsaffinitäten sowie von den apparenten Rezeptoroberflächenkonzentrationen der Rezeptoruntereinheiten konnte für die Stabilisierung der Interferonbindung im ternären Komplex gezeigt werden. So wurde ein Interferon im ternären Komplex, in Abhängigkeit von dem gebundenen Interferon und der Rezeptoroberflächenkonzentration, über mehrere Sekunden bis Minuten stabilisiert. Trotz der geringen Bindungsaffinität an ifnar1 konnte bei hohen Oberflächenkonzentrationen eine Stabilisierung bis zu 200-fach beobachtet werden. Je geringer die Oberflächenkonzentration der Rezeptoren wurde, desto weniger wurde das Interferon im ternären Komplex stabilisiert. Dass die Stabilisierung der Interferonbindung im ternären Komplex ein dynamischer Prozess ist und keine intermolekularen Wechselwirkungen zwischen ifnar1 und ifnar2 stattfinden, konnte bereits nachgewiesen werden [93]. Es zeigte sich jedoch für die Interferone eine unterschiedlich hohe Stabilisierung, deren Ursache in den unterschiedlichen Bindungsaffinitäten ( $K_1$  und  $K_2$ ) zu finden war (Abbildung 60, Weg 1). Für die Assemblierung eines ternären Komplexes wurde daher ein Zwei-Schritt-Mechanismus angenommen. Zunächst binden die Interferone an die hoch affine ifnar2-Komponente und bilden zusammen mit der niedrig affinen ifnar1-Komponente ein ternären Komplex aus. Da die Interaktion zwischen Interferon und ifnar1 ein transients kurzlebiger Prozess ist, wird die dynamische Stabilisierung der Interferonbindung im ternären Komplex hauptsächlich durch die Dissoziation ( $k_{-2}$ ) und Re-Assoziation ( $k_2$ ) von ifnar1 bestimmt (Abbildung 60). Bei hohen Oberflächenkonzentrationen besteht daher eine höhere Wahrscheinlichkeit für eine erneute Kollision mit ifnar1 und der Re-Assemblierung zu einem ternären Komplex ( $k_2$ ) als für die Dissoziation des Interferons von ifnar2 ( $k_{-1}$ ) und folglich von der Oberfläche. Sinkt die Oberflächenkonzentration der Rezeptoren, zeigte sich eine deutliche Abhängigkeit von den Bindungsaffinitäten zu ifnar1 ( $K_2$ ) und ifnar2 ( $K_1$ ). Die Stabilisierung des ternären Komplexes wird dann nicht nur von der Gleichgewichtskonstanten  $K_2$  beeinflusst, der über den Anteil an Interferonen im ternären Komplex Auskunft gibt. Der Einfluss von  $K_1$  erhöht sich, da der Anteil an gebundenen Interferonen an ifnar2 an Bedeutung zunimmt. Der Einfluss der ifnar2-Affinität ( $K_1$ ) auf die Stabilisierung der Ligandenbindung im ternären Komplex konnte mit Hilfe von Mutanten, welche spezifisch die ifnar2-Affinität mindern (z.B. IFN $\alpha$ 2-R144A, IFN $\alpha$ 8-R150A), bestätigt werden.

Durch ein verändertes Konzentrationsverhältnis von ifnar1-EC und ifnar2-EC konnte ebenso ein Einfluss beobachtet werden. So konnte demonstriert werden, dass mit steigender ifnar1-Konzentration gegenüber ifnar2 die Stabilisierung der Interferonbindung im ternären Komplex um ein Vielfaches erhöht werden konnte. Durch die steigende Kollisionswahrscheinlichkeit und somit Re-Assemblierung ( $k_2$ ) mit ifnar1-EC, sinkt die

Wahrscheinlichkeit der Dissoziation ( $k_{-1}$ ) aus dem binären Komplex mit ifnar2. Das Gleichgewicht wird in Richtung der ternären Komplexe verschoben.

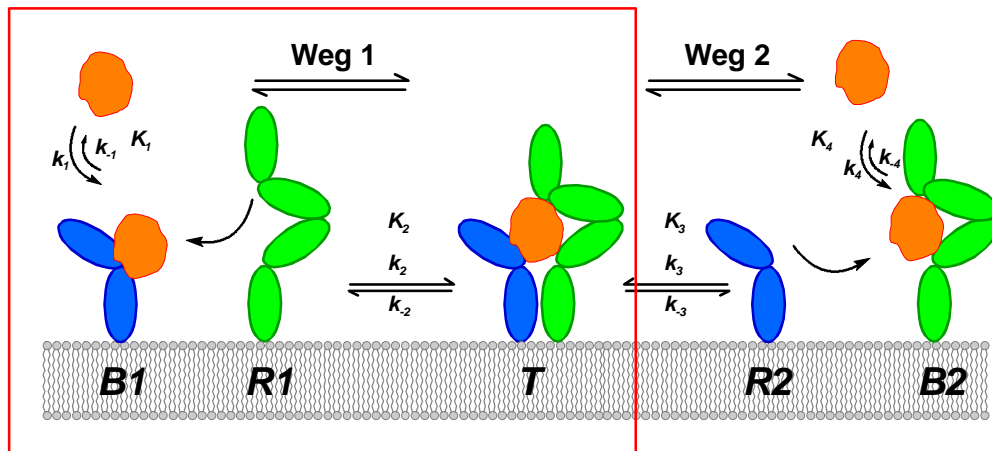


Abbildung 60 Stabilisierung der Interferonbindung im ternären Komplex: Ein Interferon bindet an ifnar2-EC oder ifnar1-EC ( $K_1 / K_4$ ) und assoziiert mit ifnar1-EC bzw. ifnar2-EC unter Ausbildung des ternären Komplexes ( $K_2 / K_3$ ). Roter Rahmen: Hauptweg (Weg 1) der Komplex-Assemblierung und Dissoziation.

Neben der Möglichkeit einen ternären Komplex über ifnar2 auszubilden (Abbildung 60, Weg 1), ist die Assemblierung und der Zerfall eines ternären Komplexes über ifnar1 eine denkbare Alternative (Abbildung 60, Weg 2). Die Wahrscheinlichkeit, welcher Weg für eine Assemblierung genutzt wird, steht in Abhängigkeit zu den jeweiligen Ratenkonstanten der Interferone. Hauptsächlich wird die Assemblierung ternärer Komplexe durch die Assoziationsratenkonstante bestimmt ( $k_1$  und  $k_4$ ), so dass Interferone mit relativ ähnlichen Assoziationsratenkonstanten zu ifnar1 und ifnar2 mit einer höheren Wahrscheinlichkeit beide Wege für eine Komplex-Assemblierung nutzen können (z.B. IFN $\tau$ 2, IFN $\alpha$ 2-ER). Ferner wird der Zerfall eines ternären Komplexes über die Dissoziationsratenkonstante  $k_{-2}$  und  $k_{-3}$  bestimmt. Die Assemblierung und Dissoziation eines ternären Komplexes werden folglich durch die Bindungsaffinitäten ( $K_1$  bis  $K_4$ ) und deren Verhältnis zueinander ( $p R1/R2$ ) beeinflusst. Je stärker sich die Bindungsaffinitäten der Rezeptoruntereinheiten ( $K_D$ ) annähern, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit, dass der ternäre Komplex beide Wege für die Assoziation und/oder Dissoziation nutzt.

Die dynamische Stabilisierung der Interferonbindung im ternären Komplex wird demzufolge beeinflusst durch die individuellen Bindungsaffinitäten an ifnar1 und ifnar2 sowie durch die apparenten Rezeptoroberflächenkonzentrationen. Die Stabilisierung ist dabei hauptsächlich durch die Frequenz der Dissoziation und Re-Assemblierung eines ternären Komplexes

geprägt. Jedoch darf die statische Stabilität eines Komplexes nicht vernachlässigt werden. Diese konnte in dieser Arbeit jedoch nicht untersucht werden.

### 3 Aktivitätsuntersuchungen

Das große Wirkungsspektrum der Interferone wird bereits seit langer Zeit in der medizinischen Forschung genutzt. Zahlreiche Untersuchungen wurden im Hinblick auf unterschiedliche Aktivitäten mit IFN $\alpha$ 2, IFN $\alpha$ 2-Mutanten, IFN $\alpha$ -Hybriden und IFN $\beta$  durchgeführt [61, 66, 101, 147, 151, 167-169].

In dieser Arbeit wurden daher kurzfristig und langfristig induzierte Aktivitäten charakterisiert, um signifikante Unterschiede zwischen den Interferonen zu erkennen. Dabei konnte ein deutlicher Zusammenhang bei der kurzfristig induzierten ISGF3-Assemblierung und der antiviralen (AV) Aktivität beobachtet werden. Dies korreliert mit Beobachtungen, bei denen die antivirale Aktivität nach Blockade der ISGF3-Assemblierung vermindert bis vollständig zum Erliegen kam [39]. Dagegen war zwischen der langfristig induzierten antiproliferativen (AP) Aktivität und der kurzfristig induzierten ISGF3-Assemblierung ein signifikanter Konzentrationsunterschied über mehrere Größenordnungen zu finden, der für eine halbmaximale Aktivierung benötigt wurde. So wurde die kurzfristig induzierte ISGF3-Assemblierung im pM-Bereich, die langfristige AP Aktivität dagegen erst im nM-Bereich angeregt. Denkbare Ursache wäre eine Desensibilisierung der Zelle, die durch eine dauerhafte Erregung mit Interferonen über mehrere Tage hervorgerufen wurde. Die Regulation der Rezeptorpräsentation wäre hierbei eine mögliche Ursache [98-101], die sich z.B. auf die Stabilisierung der Interferonbindung im ternären Komplex auswirken kann. Ebenso konnte eine Abhängigkeit der Internalisierung von dem gebundenen Interferon gezeigt werden. So wurde bei hoch affinen Interferonen, (z.B. IFN $\beta$ , IFN $\alpha$ 2-HEQ) beobachtet, dass möglicherweise der ternäre Komplex internalisiert wird. Dagegen wurde bei niedrig affinen Interferonen (z.B. IFN $\tau$ 2, IFN $\alpha$ 2-R144) hauptsächlich die ifnar1-Untereinheit internalisiert. Beide Ereignisse bewirken eine Veränderung der Oberflächenkonzentration von ifnar1 und ifnar2 auf der Zellmembran, welche sich unterschiedlich auf die dynamische Stabilisierung auswirkt. Ebenso wurde bei den untersuchten Interferonen im Vergleich zu IFN $\alpha$ 2 zumeist eine höhere Potenz für die AP Aktivität gegenüber der induzierten ISGF3-Assemblierung beobachtet ( $\Delta$  AP). Deren Ursache kann bisher nur über die Unterschiede in den Bindungsaffinitäten und in der Stabilisierung der Interferone im ternären Komplex begründet werden.

#### 4 Korrelation von Affinität und Aktivität

Um eine Vielzahl verschiedener Signalwege durch unterschiedliche Interferone über einen gemeinsamen Rezeptor aktivieren zu können, muss bereits bei der Bindung eines Liganden an seinen Rezeptor eine Erkennung und Differenzierung stattfinden. Da andere Faktoren, wie z.B. Stöchiometrie, unterschiedliche Bindungsstellen ausgeschlossen werden konnten, sind die Unterschiede in den Bindungsaffinitäten an ifnar1 und ifnar2 möglicherweise die Hauptursache für die differentielle Aktivität verschiedener Interferone. Deren Einfluss auf die Assemblierung und die Stabilisierung der Interferone im ternären Komplex konnte bereits gezeigt werden. Ebenso konnten Unterschiede in der Aktivierung von kurzfristigen (ISGF3-Assemblierung) und langfristiger (AP) Aktivitäten gezeigt werden. Bereits für verschiedene IFN $\alpha$ 2-Mutanten wurde eine klare Korrelation zwischen Affinität und der AV Aktivität nachgewiesen [147]. Jedoch konnte bisher nicht geklärt, ob und in wie weit die Bindungsaffinitäten an ifnar1 und ifnar2 einen getrennten Einfluss auf die Aktivitäten beisteuern. Ein charakteristischer Einfluss auf die Aktivierung verschiedener Signalwege konnte durch die Bindungsaffinitäten zu ifnar1 und ifnar2 gezeigt werden. So wurde ein deutlicher Zusammenhang zwischen der ifnar2-Affinität und der Induktion der ISGF3-Assemblierung beobachtet. Ebenso konnte eine Korrelation zwischen der ifnar1-Affinität und der AP Aktivität sowie dem Verhältnis der ifnar2 / ifnar1-Affinität ( $\rho R1/R2$ ) und der differentiellen AP Aktivität ( $\Delta AP$ ) nachgewiesen werden. Mit Hilfe von Interferonen, bei denen spezifisch die Bindungsaffinität verändert wurde, konnten die beobachteten Abhängigkeiten zwischen der Aktivität und der Affinität bestätigt werden. Ferner konnte gezeigt werden, dass durch die gezielte Modulation der Bindungsaffinitäten aktiv Einfluss auf verschiedene Signaltransduktionswege genommen werden. Dies kann von besonderer Bedeutung für die medizinische Entwicklung und Anwendung sein.

Warum lässt sich jedoch bei den kurzfristig und langfristig induzierten Aktivitäten eine unterschiedliche Abhängigkeit von den Bindungsaffinitäten zu den Rezeptoruntereinheiten erkennen? Die Konzentrationsunterschiede, die für die kurzfristig induzierte ISGF3-Assemblierung und der langfristigen AP Aktivität benötigt werden, wirken sich zunächst unterschiedlich auf die ternäre Komplex-Assemblierung in Abhängigkeit von der Oberflächenkonzentration der Rezeptoren aus. In pM-Bereich, in dem die ISGF3-Assemblierung induziert wird, liegen nur wenige Interferone gebunden an die Rezeptoruntereinheiten vor, so dass die Assemblierung ternärer Komplexe hierdurch begrenzt ist. Die Verweildauer eines Interferons kann folglich durch eine höhere ifnar2-EC-Affinität verlängert werden, so dass die Wahrscheinlichkeit einen ternären Komplex auszubilden und eine Signaltransduktion zu aktivieren ansteigt. Die Aktivierung einer möglichst hohen Anzahl an ifnar1-Untereinheiten durch Dissoziation und Re-Assoziation

steht dabei in Konkurrenz mit der Stabilität eines ternären Komplexes. Je stabiler sich ein Komplex ausbildet, umso weniger oft kann mit weiteren ifnar1-Untereinheiten ein Komplex ausgebildet werden und dieser aktiviert werden. Dieser Effekt kommt jedoch erst bei Interferonen, mit hoher ifnar1- und ifnar2-Affinität zum tragen (z.B. IFN $\beta$ , IFN $\alpha$ 2-HEQ). Bei einer schnellen transienten Bindung an ifnar1 ist die Stabilisierung der Interferonbindung im ternären Komplex jedoch hauptsächlich durch die Dissoziation und die Re-Assoziation bestimmt.

Dagegen werden bei der langfristig induzierten AP Aktivität aufgrund der Internalisierung der Rezeptoruntereinheiten höhere Konzentrationen benötigt, um eine ausreichende Anzahl an ternären Komplexen ausbilden zu können. Hierbei konnte ein Einfluss durch das Verhältnis der ifnar2 / ifnar1-Affinitäten ( $\rho$  R1/R2) gezeigt werden, der sich auf die Stabilisierung der Interferone im ternären Komplex auswirkt. Ein vergleichbarer Anstieg in der  $\Delta$  AP konnte bei steigendem  $\rho$  R1/R2 beobachtet werden. Diese Beobachtung konnte mit Mutanten, die durch eine niedrigere ifnar2-Affinität (IFN $\alpha$ 2-R144A) oder eine höhere ifnar1-Affinität (IFN $\alpha$ 2-E58A, IFN $\alpha$ 2-HEQ) gegenüber dem Wildtyp einen ansteigenden Wert für  $\rho$  R1/R2 aufwiesen, bestätigt werden.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass bei einer sehr hohen Affinität an die Rezeptoruntereinheiten keine entsprechende Aktivitätssteigerung erzielt werden kann (z.B. IFN $\beta$ ). Daher ist anzunehmen, dass die Aktivität ein Maximum erreicht und trotz höheren Bindungsaffinitäten nicht gesteigert werden kann. Diese Beobachtung konnte bereits für einige andere Ligand / Rezeptor-Wechselwirkungen beobachtet werden [170]. Auch wenn die Ursache für diese Sättigung in der Aktivität nicht klar ist, kann diese zwischen den Aktivitäten variieren.

In wie weit eine differentielle Aktivität sowie die Stärke einer Aktivierung von dem gebundenen Interferon abhängig ist, lässt sich bisher durch verschiedene Faktoren erklären. So scheint für eine kurzfristige induzierte Aktivität, welche im niedrigen Konzentrationsbereich bereits angeregt wird, die Bindungsaffinität zu ifnar2 von besonderer Bedeutung zu sein. Über diese wird bestimmt, wie viel ternäre Komplexe assemblieren können und eine entsprechende Anzahl an Rezeptoren aktivieren können. Dagegen scheint die langfristige AP Aktivität, für die höhere IFN-Konzentrationen benötigt wurden, von mehreren Faktoren beeinflusst zu werden. Entscheidend ist hier möglicherweise die Abnahme der Rezeptoroberflächenkonzentration während der Inkubation mit Interferon. Eine ausreichend hohe Konzentration an Interferon wird benötigt, um eine genügend hohe Anzahl an ternären Komplexen auszubilden. Ferner war ein Zusammenhang zwischen dem Verhältnis der Bindungsaffinitäten ( $\rho$  R1/R2) und der  $\Delta$  AP zu erkennen. Dieser Zusammenhang lässt sich bisher jedoch nicht genau erklären.



---

Mit dieser Arbeit konnte demzufolge nachgewiesen werden, dass zwischen den Interferonen deutliche Unterschiede in den Bindungsaffinitäten an die Rezeptoruntereinheiten ifnar1 und ifnar2 existieren. Stets konnte ifnar2 als die höher affine Komponente gegenüber ifnar1 nachgewiesen werden. Dabei konnten Unterschiede bis zu  $10^3$  Größenordnungen beobachtet werden. Ferner konnte die Bindungsaffinität als einzige Komponente definiert werden, die sich zwischen den Interferonen unterscheidet und Einfluss auf die Aktivität nehmen kann. Stöchiometrie, Bindungsstelle oder Konformationsänderungen auf ifnar1 zeigten keine Unterschiede zwischen den Interferonen. Für die Induktion verschiedener Aktivitäten wurden mit große Konzentrationsunterschieden erreicht, welche sich mit der Änderung der Rezeptoroberflächenkonzentration erklären lässt.

Eine deutliche Abhängigkeit der Aktivität von der Affinität konnte nachgewiesen werden, die durch spezifisch veränderte Bindungsaffinitäten bestätigt werden konnte. So wurde eine Abhängigkeit zwischen der ISGF3-Assemblierung und der ifnar2-Affinität nachgewiesen. Ebenso konnte eine Abhängigkeit der AP Aktivität von der ifnar1-Affinität und dem Verhältnis der Bindungsaffinitäten gezeigt werden. Ebenso zeigte die Stabilisierung der Interferone im ternären Komplex einen differentiellen Einfluss auf die Aktivitäten.

## VII Ausblick

Um den Zusammenhang von Aktivität und Affinität detaillierter aufklären zu können, ist es notwendig zelluläre Untersuchungen in Richtung der Einzelmolekül-Technik vorzunehmen. Insbesondere der Zusammenhang zwischen der Stabilisierung der Interferonbindung im ternären Komplexes und der Aktivität ist bisher nur begrenzt aufgeklärt. Ferner kann die genaue Ursache für eine Abhängigkeit zwischen der ISGF3-Assemblierung und der ifnar2-Affinität nur begrenzt erklärt werden. Erste Hinweise zeigten, dass die Stabilisierung der Ligandenbindung im ternären Komplex von Bedeutung für die differentielle Aktivierung ist und deutlich differenziert werden muss. Die dynamische Stabilisierung des Liganden im ternären Komplex beinhaltet zu einem die statische Stabilität eines einzigen Komplexes sowie die Frequenz der Dissoziation und Re-Assemblierung eines ternären Komplexes. Beide Zustände können einen unterschiedlichen Einfluss auf die verschiedensten Aktivitäten ausüben.

In diesem Zusammenhang ist der Ablauf einer Signaltransduktion nach der Bindung eines Interferons detaillierter zu klären. Um Einblick in den Mechanismus der Signalaktivierung zu erhalten, ist eine visuelle Darstellung ein wichtiger Ansatzpunkt. Hiermit besteht die Möglichkeit Erkenntnisse im Hinblick auf die Komplex-Assemblierung zu gewinnen sowie Signalwege innerhalb der Zelle zu verfolgen. Dadurch kann ein möglicher Zusammenhang zwischen der Anzahl an Rezeptoraktivierungen über eine bestimmte Zeit, der Komplexstabilität und der Aktivität hergestellt werden. Ein weiterer wichtiger Aspekt ist die Untersuchung der Rezeptorinternalisierung, die ebenfalls in vielfältiger Hinsicht Einfluss auf die Aktivität nehmen kann.

Mit Hilfe von IFN $\alpha$ 2-QDs konnte bereits eine Bindung an die Rezeptoren nachgewiesen werden, die mit ifnar2-EGFP transfiziert waren. Durch die Transfektion von ifnar2-EGFP in HeLa-Zellen war die Möglichkeit gegeben die Co-Lokalisation von Interferon und Rezeptor nachzuweisen und ferner die Anzahl an Rezeptoren auf der Zelloberfläche zu erhöhen. Der Nachteil der QDs war die Anzahl an Bindungsstellen für Streptavidin, wodurch eine hohe Wahrscheinlichkeit besteht, dass mehrere Interferone an ein QD binden. Auch mit einem enormen Überschuss an QD gegenüber den Interferonen konnte eine Mehrfachbindung nicht verhindert werden. Bei Affinitäts-Untersuchungen ist es jedoch von großer Bedeutung, dass pro QD nur ein Interferon gebunden hat. Ist mehr als ein Interferon pro QD gebunden, bindet dieser Komplex an mehr als einen Rezeptor, so dass die Dissoziation beeinflusst wird. Daher konnte ein natives Bindungsverhalten von IFN $\alpha$ 2-QD bisher nicht erreicht werden.

Die Untersuchung der Signaltransduktion nach der Interferonbindung ist ebenfalls von besonderer Bedeutung. Durch die Fluoreszenzmarkierung von Proteinen (z.B. STAT oder Januskinasen), die an der Signalweiterleitung beteiligt sind, könnte die Dauer einer Signaltransduktion, die Lokalisation der beteiligten Proteine sowie die Wandergeschwindigkeit bzw. -richtung nach einer Aktivierung beobachtet werden. Vergleichbare Untersuchungen könnten für die Internalisierung von Interferonrezeptoren durchgeführt werden.

## VIII Abkürzungen

A	Absorption
ADAR	RNA-spezifische Adenosin-Deaminase
AF	Alexa Fluor
Amp	Ampicillin
AP	antiproliferativ
APS	Ammoniumperoxidsulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosin-5'-triphosphat
AV	antiviral
BD	Bindungsdomäne
bp	Basenpaar ( <i>base pair</i> )
B-Primer	Rückwärts-Primer ( <i>backward</i> )
CD	<i>clusters of differentiation</i>
CIP	Alkaline Phosphatase ( <i>calf-intestinale phosphatase</i> )
CSF	kolonien-stimulierender Faktor
DMEM	<i>Dulbesco's modified eagle medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleotidsäure
DTT	Dithiothreitol
dNTP	Desoxy-Nucleosidtriphosphat
dsDNA	doppelsträngige DNA
EC <sub>50</sub>	effektive Konzentration bei 50% Aktivität
	<sup>ISGF3</sup> EC <sub>50</sub> für ISGF3-Aktivierung
	<sup>AP</sup> EC <sub>50</sub> für antiproliferative Aktivität
	<sup>AV</sup> EC <sub>50</sub> für antivirale Aktivität
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
E2F	Elongationsfaktor
eIF2 $\alpha$	eukaryontischer Initiationsfaktor 2 $\alpha$
EPO	Erythropoitin
ERK	<i>extracellular signal regulated kinase</i>
F-Primer	Vorwärts-Primer ( <i>forward</i> )
GAS	IFN $\gamma$ -aktivierte Gensequenz ( <i><math>\gamma</math>-activated sequence</i> )
GDP	Guanosin-5'-diphosphat
GEF	<i>guanine-nucleotide exchange factor</i>
GF	Gelfiltration / Größenausschlußchromatographie
gpt	Guanosin-Phosphoribosyl-Transferase
HAT	Hypoxanthin-Aminopterin-Tymidin
HBS	Hepes-Buffer-Saline
HCMV	humanes Cytomegalovirus
HPRT	Hypoxanthin-Phosphoribosyl-Transferase
IAC	Ionenaustauschchromatographie

---

IFN	Typ I Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
iNOS	NO-Synthetase
IP-10	IFN $\gamma$ induzierbares Protein 10
IPTG	Isopropyl- $\beta$ -thiogalactopyranosid
IRF	Interferon regulierter Faktor
IRS	Insulin-Rezeptor-Sustrat
ISG	Interferon stimuliertes Gen
ISGF3	Interferon stimulierter Genfaktor-3
ISRE	<i>interferon stimulated response element</i>
Jak	Januskinase
kDa	kiloDalton
Konz.	Konzentration
LB	Luria Broth
LCR	Ligase Ketten Reaktion ( <i>ligase chain reaction</i> )
LPS	Lipopolysaccharid
LSM	<i>Laser scanning microscopy</i>
mM	milli Mol
M	mol/l (Mol pro Liter)
MAPK	Mitogen aktivierte Proteinkinase
MBP	Maltose-Binde-Protein
MBP-IFN	Fusionsprotein aus MBP und IFN
MDBK-Zellen	Madin-Darby <i>bovine kidney cells</i>
MDM-Zellen	<i>monocyte-derived macrophages</i>
MES	2-Morpholin-Ethansulfonsäure
MHC-I / II	Haupt-Histokompatibilitätskomplex ( <i>major-histocompatibility-complex</i> –Protein I / II)
Min.	Minuten
Mnk1	<i>MAPK-interacting protein kinase 1</i>
Msk1	<i>mitogen- and stress-activated kinase 1</i>
MW	molare Masse
MyD	<i>myeloid differentiation factor</i>
NF $\kappa$ B	Nuklear-Faktor $\kappa$ B
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
NMR	Kernspinresonanz ( <i>nuclear magnetic resonance</i> )
NRD	negative regulierende Domäne
NTA	<i>nitroso-tetra-acetic acid</i>
OA	Oligoadenylat
OG 488	Oregon Green 488
ORF	offener Leserahmen ( <i>open reading frame</i> )
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBL-Zellen	<i>primary peripheral blood lymphocytes</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
PEG	Polyethylglycol
pI	isoelektrischer Punkt

---

PIAS	<i>protein inhibited of activated STAT family</i>
PI-3-K	Phosphoinositol-3-kinase
PK-A / PK-R	Proteinkinase-A / Proteinkinase-R
PNK	Phosphonucleotid-kinase
pos.	positiv
pRB	Retinoblastom-Protein
QD	Quantum Dot ®
rER	rauhes endoplasmatisches Reticulum
Rif	reflektometrische Interferenz
RNAse-L	Ribonukleotid-Nuklease-L
RPC	<i>reversed phase chromatographie</i>
RT	Raumtemperatur
SD	Subdomäne
SDS	Natriumdodecylsulfat
<i>Sf9</i>	<i>Spodoptera frugiperla</i>
SH2	<i>Src homology region 2</i>
SOCS	<i>suppressor of cytokine signaling</i>
SOPC	Stearyl-oelyl-Phosphatidyl-cholin
ssDNA	einfachsträngige DNA ( <i>single stranded</i> )
STAT	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
SUV	kleine unilaminare Vesikel
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
6-TG	6-Thioguanin
TIRF	<i>total internal reflection fluorescence</i>
TLR	<i>Toll-like-receptor</i>
TNF	Tumornekrosefaktor
TRIS	Tris-(hydroxymethyl-) aminomethan

## IX Literatur

1. Pestka, S., et al., *Interferons and their actions*. Annu Rev Biochem, 1987. **56**: p. 727-77.
2. Bekisz, J., et al., *Human interferons alpha, beta and omega*. Growth Factors, 2004. **22**(4): p. 243-51.
3. Plataniias, L.C., *Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling*. Nat Rev Immunol, 2005. **5**(5): p. 375-86.
4. Biron, C.A., *Role of early cytokines, including alpha and beta interferons (IFN-alpha/beta), in innate and adaptive immune responses to viral infections*. Semin Immunol, 1998. **10**(5): p. 383-90.
5. Ishihara, K. and T. Hirano, *Molecular basis of the cell specificity of cytokine action*. Biochim Biophys Acta, 2002. **1592**(3): p. 281-96.
6. Renauld, J.C., *Class II cytokine receptors and their ligands: key antiviral and inflammatory modulators*. Nat Rev Immunol, 2003. **3**(8): p. 667-76.
7. Langer, J.A., E.C. Cutrone, and S. Kotenko, *The Class II cytokine receptor (CRF2) family: overview and patterns of receptor-ligand interactions*. Cytokine Growth Factor Rev, 2004. **15**(1): p. 33-48.
8. Belardelli, F. and M. Ferrantini, *Cytokines as a link between innate and adaptive antitumor immunity*. Trends Immunol, 2002. **23**(4): p. 201-8.
9. Lindenmann, J., D.C. Burke, and A. Isaacs, *Studies on the production, mode of action and properties of interferon*. Br J Exp Pathol, 1957. **38**(5): p. 551-62.
10. Isaacs, A. and J. Lindenmann, *Virus interference. I. The interferon*. Proc R Soc Lond B Biol Sci, 1957. **147**(927): p. 258-67.
11. Stark, G.R., et al., *How cells respond to interferons*. Annu Rev Biochem, 1998. **67**: p. 227-64.
12. Plataniias, L.C. and E.N. Fish, *Signaling pathways activated by interferons*. Exp Hematol, 1999. **27**(11): p. 1583-92.
13. Goodbourn, S., L. Didcock, and R.E. Randall, *Interferons: cell signalling, immune modulation, antiviral response and virus countermeasures*. J Gen Virol, 2000. **81**(Pt 10): p. 2341-64.
14. Samuel, C.E., *Antiviral actions of interferons*. Clin Microbiol Rev, 2001. **14**(4): p. 778-809, table of contents.
15. Takayanagi, H., et al., *RANKL maintains bone homeostasis through c-Fos-dependent induction of interferon-beta*. Nature, 2002. **416**(6882): p. 744-9.
16. Der, S.D., et al., *Identification of genes differentially regulated by interferon alpha, beta, or gamma using oligonucleotide arrays*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(26): p. 15623-8.
17. de Veer, M.J., et al., *Functional classification of interferon-stimulated genes identified using microarrays*. J Leukoc Biol, 2001. **69**(6): p. 912-20.
18. Ozato, K., H. Tsujimura, and T. Tamura, *Toll-like receptor signaling and regulation of cytokine gene expression in the immune system*. Biotechniques, 2002. **Suppl**: p. 66-8, 70, 72 passim.
19. Uematsu, S. and S. Akira, *[TLR family and viral infection]*. Uirusu, 2004. **54**(2): p. 145-51.
20. Takeuchi, O. and S. Akira, *[Roles of Toll-like receptor in host defense and the mechanism of its signal transduction]*. Nippon Saikingaku Zasshi, 2004. **59**(4): p. 523-9.

21. Akira, S. and K. Takeda, *Toll-like receptor signalling*. Nat Rev Immunol, 2004. **4**(7): p. 499-511.
22. Takeda, K., [*Toll-like receptor*]. Nihon Rinsho Meneki Gakkai Kaishi, 2005. **28**(5): p. 309-17.
23. Kawai, T. and S. Akira, *TLR signaling*. Cell Death Differ, 2006.
24. Okahira, S., et al., *Interferon-beta induction through toll-like receptor 3 depends on double-stranded RNA structure*. DNA Cell Biol, 2005. **24**(10): p. 614-23.
25. Alexopoulou, L., et al., *Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3*. Nature, 2001. **413**(6857): p. 732-8.
26. Diebold, S.S., et al., *Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA*. Science, 2004. **303**(5663): p. 1529-31.
27. Hemmi, H., et al., *The roles of two I kappa B kinase-related kinases in lipopolysaccharide and double stranded RNA signaling and viral infection*. J Exp Med, 2004. **199**(12): p. 1641-50.
28. Kawai, T., et al., *Interferon-alpha induction through Toll-like receptors involves a direct interaction of IRF7 with MyD88 and TRAF6*. Nat Immunol, 2004. **5**(10): p. 1061-8.
29. Schlender, J., et al., *Inhibition of toll-like receptor 7- and 9-mediated alpha/beta interferon production in human plasmacytoid dendritic cells by respiratory syncytial virus and measles virus*. J Virol, 2005. **79**(9): p. 5507-15.
30. Kadowaki, N., et al., *Distinct cytokine profiles of neonatal natural killer T cells after expansion with subsets of dendritic cells*. J Exp Med, 2001. **193**(10): p. 1221-6.
31. Decker, T., et al., *IFNs and STATs in innate immunity to microorganisms*. J Clin Invest, 2002. **109**(10): p. 1271-7.
32. Erlandsson, L., et al., *Interferon-beta is required for interferon-alpha production in mouse fibroblasts*. Curr Biol, 1998. **8**(4): p. 223-6.
33. Tovey, M.G., et al., *Interferon messenger RNA is produced constitutively in the organs of normal individuals*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1987. **84**(14): p. 5038-42.
34. Taniguchi, T. and A. Takaoka, *A weak signal for strong responses: interferon-alpha/beta revisited*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2001. **2**(5): p. 378-86.
35. Carpick, B.W., et al., *Characterization of the solution complex between the interferon-induced, double-stranded RNA-activated protein kinase and HIV-1 trans-activating region RNA*. J Biol Chem, 1997. **272**(14): p. 9510-6.
36. Khabar, K.S., et al., *Effect of deficiency of the double-stranded RNA-dependent protein kinase, PKR, on antiviral resistance in the presence or absence of ribonuclease L: HSV-1 replication is particularly sensitive to deficiency of the major IFN-mediated enzymes*. J Interferon Cytokine Res, 2000. **20**(7): p. 653-9.
37. Der, S.D., et al., *A double-stranded RNA-activated protein kinase-dependent pathway mediating stress-induced apoptosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997. **94**(7): p. 3279-83.
38. Balachandran, S., et al., *Activation of the dsRNA-dependent protein kinase, PKR, induces apoptosis through FADD-mediated death signaling*. Embo J, 1998. **17**(23): p. 6888-902.
39. Zhang, Q., L. Wei, and Y. Wang, [*ISGF3, a critical factor of the IFN-alpha pathway in the antiviral action of HBV*]. Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi, 2005. **19**(2): p. 110-3.
40. Bass, B.L., *RNA editing and hypermutation by adenosine deamination*. Trends Biochem Sci, 1997. **22**(5): p. 157-62.



41. Schneider-Schaulies, S., et al., *Cell type-specific MxA-mediated inhibition of measles virus transcription in human brain cells*. J Virol, 1994. **68**(11): p. 6910-7.
42. Schwemmle, M., et al., *Vesicular stomatitis virus transcription inhibited by purified MxA protein*. Virology, 1995. **206**(1): p. 545-54.
43. Kochs, G. and O. Haller, *Interferon-induced human MxA GTPase blocks nuclear import of Thogoto virus nucleocapsids*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(5): p. 2082-6.
44. Ortaldo, J.R., et al., *A species of human alpha interferon that lacks the ability to boost human natural killer activity*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1984. **81**(15): p. 4926-9.
45. Ortaldo, J.R., *Regulation of natural killer activity*. Cancer Metastasis Rev, 1987. **6**(4): p. 637-51.
46. Hilkens, C.M., J.F. Schlaak, and I.M. Kerr, *Differential responses to IFN-alpha subtypes in human T cells and dendritic cells*. J Immunol, 2003. **171**(10): p. 5255-63.
47. Takaoka, A., et al., *Cross talk between interferon-gamma and -alpha/beta signaling components in caveolar membrane domains*. Science, 2000. **288**(5475): p. 2357-60.
48. Boehm, U., et al., *Cellular responses to interferon-gamma*. Annu Rev Immunol, 1997. **15**: p. 749-95.
49. Biron, C.A., et al., *Early cytokine responses to viral infections and their roles in shaping endogenous cellular immunity*. Adv Exp Med Biol, 1998. **452**: p. 143-9.
50. Hibbert, L. and G.R. Foster, *Human type I interferons differ greatly in their effects on the proliferation of primary B cells*. J Interferon Cytokine Res, 1999. **19**(4): p. 309-18.
51. Yasuoka, Y., et al., *Combination of tumor necrosis factor alpha and interferon alpha induces apoptotic cell death through a c-myc-dependent pathway in p53 mutant H226br non-small-cell lung cancer cell line*. Exp Cell Res, 2001. **271**(2): p. 214-22.
52. Takaoka, A., et al., *Integration of interferon-alpha/beta signalling to p53 responses in tumour suppression and antiviral defence*. Nature, 2003. **424**(6948): p. 516-23.
53. Paredes, J. and S.E. Krown, *Interferon-alpha therapy in patients with Kaposi's sarcoma and the acquired immunodeficiency syndrome*. Int J Immunopharmacol, 1991. **13 Suppl 1**: p. 77-81.
54. Kirkwood, J.M., et al., *Interferon alfa-2a for melanoma metastases*. Lancet, 2002. **359**(9310): p. 978-9.
55. Verma, A. and L.C. Plataniias, *Signaling via the interferon-alpha receptor in chronic myelogenous leukemia cells*. Leuk Lymphoma, 2002. **43**(4): p. 703-9.
56. Mazzella, G., et al., *Long-term results with interferon therapy in chronic type B hepatitis: a prospective randomized trial*. Am J Gastroenterol, 1999. **94**(8): p. 2246-50.
57. Pianko, S. and J.G. McHutchison, *Treatment of hepatitis C with interferon and ribavirin*. J Gastroenterol Hepatol, 2000. **15**(6): p. 581-6.
58. Katze, M.G., Y. He, and M. Gale, Jr., *Viruses and interferon: a fight for supremacy*. Nat Rev Immunol, 2002. **2**(9): p. 675-87.
59. D'Souza, R. and G.R. Foster, *Diagnosis and treatment of hepatitis C*. J R Soc Med, 2004. **97**(5): p. 223-5.
60. Billiau, A., *Interferon beta in the cytokine network: an anti-inflammatory pathway*. Mult Scler, 1995. **1 Suppl 1**: p. S2-4.
61. Foster, G.R. and N.B. Finter, *Are all type I human interferons equivalent?* J Viral Hepat, 1998. **5**(3): p. 143-52.
62. Sen, G.C., et al., *Antiviral and protein-inducing activities of recombinant human leukocyte interferons and their hybrids*. J Virol, 1984. **50**(2): p. 445-50.

63. Ghaffar, A., et al., *Cross-species antiviral activity of a recombinant human alpha-interferon hybrid*. Ann N Y Acad Sci, 1992. **653**: p. 314-22.
64. Pestka, S., *The human interferon-alpha species and hybrid proteins*. Semin Oncol, 1997. **24**(3 Suppl 9): p. S9-4-S9-17.
65. Hu, R., et al., *Divergence of binding, signaling, and biological responses to recombinant human hybrid IFN*. J Immunol, 1999. **163**(2): p. 854-60.
66. Hu, R., et al., *Protein engineering of interferon alphas*. Methods Mol Med, 2005. **116**: p. 69-80.
67. Marie, I., J.E. Durbin, and D.E. Levy, *Differential viral induction of distinct interferon-alpha genes by positive feedback through interferon regulatory factor-7*. Embo J, 1998. **17**(22): p. 6660-9.
68. MacDonald, N.J., et al., *Different pathways mediate virus inducibility of the human IFN-alpha 1 and IFN-beta genes*. Cell, 1990. **60**(5): p. 767-79.
69. Barnes, B.J., P.A. Moore, and P.M. Pitha, *Virus-specific activation of a novel interferon regulatory factor, IRF-5, results in the induction of distinct interferon alpha genes*. J Biol Chem, 2001. **276**(26): p. 23382-90.
70. Rhodes, J., J. Ivanyi, and P. Cozens, *Antigen presentation by human monocytes: effects of modifying major histocompatibility complex class II antigen expression and interleukin 1 production by using recombinant interferons and corticosteroids*. Eur J Immunol, 1986. **16**(4): p. 370-5.
71. Fleisher, T.A., et al., *Interferon-mediated inhibition of human polyclonal immunoglobulin synthesis*. J Immunol, 1982. **129**(3): p. 1099-103.
72. Neubauer, R.H., et al., *Stimulation of in vitro immunoglobulin production by interferon-alpha*. J Immunol, 1985. **134**(1): p. 299-304.
73. Subramaniam, P.S., et al., *Differential recognition of the type I interferon receptor by interferons tau and alpha is responsible for their disparate cytotoxicities*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995. **92**(26): p. 12270-4.
74. Dereuddre-Bosquet, N., et al., *Anti-HIV potential of a new interferon, interferon-tau (trophoblastin)*. J Acquir Immune Defic Syndr Hum Retrovirol, 1996. **11**(3): p. 241-6.
75. Bazan, J.F., *Structural design and molecular evolution of a cytokine receptor superfamily*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1990. **87**(18): p. 6934-8.
76. Wilson, I.A. and L.K. Jolliffe, *The structure, organization, activation and plasticity of the erythropoietin receptor*. Curr Opin Struct Biol, 1999. **9**(6): p. 696-704.
77. Chow, D., et al., *Structure of an extracellular gp130 cytokine receptor signaling complex*. Science, 2001. **291**(5511): p. 2150-5.
78. Skiniotis, G., et al., *Signaling conformations of the tall cytokine receptor gp130 when in complex with IL-6 and IL-6 receptor*. Nat Struct Mol Biol, 2005. **12**(6): p. 545-51.
79. Duschl, A. and W. Sebald, *Transmembrane and intracellular signalling by interleukin-4: receptor dimerization and beyond*. Eur Cytokine Netw, 1996. **7**(1): p. 37-49.
80. Kotenko, S.V. and S. Pestka, *Jak-Stat signal transduction pathway through the eyes of cytokine class II receptor complexes*. Oncogene, 2000. **19**(21): p. 2557-65.
81. Cunningham, B.C., et al., *Dimerization of the extracellular domain of the human growth hormone receptor by a single hormone molecule*. Science, 1991. **254**(5033): p. 821-5.
82. Sebald, W. and T.D. Mueller, *The interaction of BMP-7 and ActRII implicates a new mode of receptor assembly*. Trends Biochem Sci, 2003. **28**(10): p. 518-21.
83. Stroud, R.M. and J.A. Wells, *Mechanistic diversity of cytokine receptor signaling across cell membranes*. Sci STKE, 2004. **2004**(231): p. re7.

84. Gavutis, M., et al., *Lateral ligand-receptor interactions on membranes probed by simultaneous fluorescence-interference detection*. Biophys J, 2005.
85. Whitty, A., et al., *Interaction affinity between cytokine receptor components on the cell surface*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998. **95**(22): p. 13165-70.
86. Axelrod, D. and M.D. Wang, *Reduction-of-dimensionality kinetics at reaction-limited cell surface receptors*. Biophys J, 1994. **66**(3 Pt 1): p. 588-600.
87. Cutrone, E.C. and J.A. Langer, *Contributions of cloned type I interferon receptor subunits to differential ligand binding*. FEBS Lett, 1997. **404**(2-3): p. 197-202.
88. Pestka, S., *The interferon receptors*. Semin Oncol, 1997. **24**(3 Suppl 9): p. S9-18-S9-40.
89. Deonarain, R., et al., *Interferon-alpha/beta-receptor interactions: a complex story unfolding*. Curr Pharm Des, 2002. **8**(24): p. 2131-7.
90. Arduini, R.M., et al., *Characterization of a soluble ternary complex formed between human interferon-beta-1a and its receptor chains*. Protein Sci, 1999. **8**(9): p. 1867-77.
91. Cohen, B., et al., *Ligand-induced association of the type I interferon receptor components*. Mol Cell Biol, 1995. **15**(8): p. 4208-14.
92. Piehler, J. and G. Schreiber, *Biophysical analysis of the interaction of human ifnar2 expressed in E. coli with IFNalpha2*. J Mol Biol, 1999. **289**(1): p. 57-67.
93. Lamken, P., et al., *Ligand-induced assembling of the type I interferon receptor on supported lipid bilayers*. J Mol Biol, 2004. **341**(1): p. 303-18.
94. Lamken, P., et al., *Functional cartography of the ectodomain of the type I interferon receptor subunit ifnar1*. J Mol Biol, 2005. **350**(3): p. 476-88.
95. DeLisi, C., *The effect of cell size and receptor density on ligand--receptor reaction rate constants*. Mol Immunol, 1981. **18**(6): p. 507-11.
96. DeLisi, C. and R. Chabay, *The influence of cell surface receptor clustering on the thermodynamics of ligand binding and the kinetics of its dissociation*. Cell Biophys, 1979. **1**(2): p. 117-31.
97. Jaitlin, D., et al., *Inquiring into the differential action of interferon (IFN): an IFN-alpha2 mutant with enhanced affinity to ifnar1 is functionally similar to IFNbeta*. Mol Cell Biol, 2006. **26**((5)): p. 1888-97.
98. Evans, T. and D. Secher, *Kinetics of internalisation and degradation of surface-bound interferon in human lymphoblastoid cells*. Embo J, 1984. **3**(12): p. 2975-8.
99. Eid, P., et al., *Interferon removes its own receptors as it blocks the division of Daudi cells*. Eur J Biochem, 1988. **171**(3): p. 675-82.
100. Wagner, T.C., et al., *Interferon receptor expression regulates the antiproliferative effects of interferons on cancer cells and solid tumors*. Int J Cancer, 2004. **111**(1): p. 32-42.
101. Dondi, E., et al., *Down-modulation of responses to type I IFN upon T cell activation*. J Immunol, 2003. **170**(2): p. 749-56.
102. Ragimbeau, J., et al., *The tyrosine kinase Tyk2 controls IFNAR1 cell surface expression*. Embo J, 2003. **22**(3): p. 537-47.
103. Richter, M.F., et al., *Specific contribution of Tyk2 JH regions to the binding and the expression of the interferon alpha/beta receptor component IFNAR1*. J Biol Chem, 1998. **273**(38): p. 24723-9.
104. Leonard, W.J. and J.J. O'Shea, *Jaks and STATs: biological implications*. Annu Rev Immunol, 1998. **16**: p. 293-322.
105. Levy, D.E. and J.E. Darnell, Jr., *Stats: transcriptional control and biological impact*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2002. **3**(9): p. 651-62.

106. Prejean, C. and O.R. Colamonici, *Role of the cytoplasmic domains of the type I interferon receptor subunits in signaling*. *Semin Cancer Biol*, 2000. **10**(2): p. 83-92.
107. Rawlings, J.S., K.M. Rosler, and D.A. Harrison, *The JAK/STAT signaling pathway*. *J Cell Sci*, 2004. **117**(Pt 8): p. 1281-3.
108. Lau, J.F. and C.M. Horvath, *Mechanisms of Type I interferon cell signaling and STAT-mediated transcriptional responses*. *Mt Sinai J Med*, 2002. **69**(3): p. 156-68.
109. Yang, C.H., et al., *Direct association of STAT3 with the IFNAR-1 chain of the human type I interferon receptor*. *J Biol Chem*, 1996. **271**(14): p. 8057-61.
110. Bromberg, J. and J.E. Darnell, Jr., *The role of STATs in transcriptional control and their impact on cellular function*. *Oncogene*, 2000. **19**(21): p. 2468-73.
111. Kile, B.T., et al., *The SOCS box: a tale of destruction and degradation*. *Trends Biochem Sci*, 2002. **27**(5): p. 235-41.
112. Chung, C.D., et al., *Specific inhibition of Stat3 signal transduction by PIAS3*. *Science*, 1997. **278**(5344): p. 1803-5.
113. Kim, T.K. and T. Maniatis, *Regulation of interferon-gamma-activated STAT1 by the ubiquitin-proteasome pathway*. *Science*, 1996. **273**(5282): p. 1717-9.
114. Plataniias, L.C., et al., *The type I interferon receptor mediates tyrosine phosphorylation of insulin receptor substrate 2*. *J Biol Chem*, 1996. **271**(1): p. 278-82.
115. Rani, M.R., et al., *Requirement of phosphoinositide 3-kinase and Akt for interferon-beta-mediated induction of the beta-R1 (SCYB11) gene*. *J Biol Chem*, 2002. **277**(41): p. 38456-61.
116. Rani, M.R., et al., *A role for NF-kappa B in the induction of beta-R1 by interferon-beta*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(48): p. 44365-8.
117. Barca, O., et al., *Interferon beta promotes survival in primary astrocytes through phosphatidylinositol 3-kinase*. *J Neuroimmunol*, 2003. **139**(1-2): p. 155-9.
118. Ruuth, K., et al., *Interferon-alpha promotes survival of human primary B-lymphocytes via phosphatidylinositol 3-kinase*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001. **284**(3): p. 583-6.
119. Wang, K., et al., *Inhibition of neutrophil apoptosis by type 1 IFN depends on cross-talk between phosphoinositol 3-kinase, protein kinase C-delta, and NF-kappa B signaling pathways*. *J Immunol*, 2003. **171**(2): p. 1035-41.
120. Thyrell, L., et al., *Interferon alpha-induced apoptosis in tumor cells is mediated through the phosphoinositide 3-kinase/mammalian target of rapamycin signaling pathway*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(23): p. 24152-62.
121. Plataniias, L.C., *The p38 mitogen-activated protein kinase pathway and its role in interferon signaling*. *Pharmacol Ther*, 2003. **98**(2): p. 129-42.
122. Li, Y., et al., *Role of p38alpha Map kinase in Type I interferon signaling*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(2): p. 970-9.
123. Uddin, S., et al., *Activation of the p38 mitogen-activated protein kinase by type I interferons*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(42): p. 30127-31.
124. Goh, K.C., S.J. Haque, and B.R. Williams, *p38 MAP kinase is required for STAT1 serine phosphorylation and transcriptional activation induced by interferons*. *Embo J*, 1999. **18**(20): p. 5601-8.
125. Kumar, S., J. Boehm, and J.C. Lee, *p38 MAP kinases: key signalling molecules as therapeutic targets for inflammatory diseases*. *Nat Rev Drug Discov*, 2003. **2**(9): p. 717-26.
126. Mayer, I.A., et al., *The p38 MAPK pathway mediates the growth inhibitory effects of interferon-alpha in BCR-ABL-expressing cells*. *J Biol Chem*, 2001. **276**(30): p. 28570-7.

127. Ishida, H., et al., *Involvement of p38 signaling pathway in interferon-alpha-mediated antiviral activity toward hepatitis C virus*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2004. **321**(3): p. 722-7.
128. Rani, M.R., et al., *Characterization of beta-R1, a gene that is selectively induced by interferon beta (IFN-beta) compared with IFN-alpha*. *J Biol Chem*, 1996. **271**(37): p. 22878-84.
129. Lewerenz, M., K.E. Mogensen, and G. Uze, *Shared receptor components but distinct complexes for alpha and beta interferons*. *J Mol Biol*, 1998. **282**(3): p. 585-99.
130. Abramovich, C., et al., *Differential tyrosine phosphorylation of the IFNAR chain of the type I interferon receptor and of an associated surface protein in response to IFN-alpha and IFN-beta*. *Embo J*, 1994. **13**(24): p. 5871-7.
131. Lefevre, F., et al., *Interferon-delta: the first member of a novel type I interferon family*. *Biochimie*, 1998. **80**(8-9): p. 779-88.
132. Uze, G., G. Lutfalla, and K.E. Mogensen, *Alpha and beta interferons and their receptor and their friends and relations*. *J Interferon Cytokine Res*, 1995. **15**(1): p. 3-26.
133. Mogensen, K.E., et al., *The type I interferon receptor: structure, function, and evolution of a family business*. *J Interferon Cytokine Res*, 1999. **19**(10): p. 1069-98.
134. Pestka, S., C.D. Krause, and M.R. Walter, *Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors*. *Immunol Rev*, 2004. **202**: p. 8-32.
135. Oritani, K., P.W. Kincade, and Y. Tomiyama, *Limitin: an interferon-like cytokine without myeloerythroid suppressive properties*. *J Mol Med*, 2001. **79**(4): p. 168-74.
136. Takahashi, I., et al., *A new IFN-like cytokine, limitin, modulates the immune response without influencing thymocyte development*. *J Immunol*, 2001. **167**(6): p. 3156-63.
137. Martal, J.L., et al., *IFN-tau: a novel subtype I IFN1. Structural characteristics, non-ubiquitous expression, structure-function relationships, a pregnancy hormonal embryonic signal and cross-species therapeutic potentialities*. *Biochimie*, 1998. **80**(8-9): p. 755-77.
138. Radhakrishnan, R., et al., *Crystal structure of ovine interferon-tau at 2.1 A resolution*. *J Mol Biol*, 1999. **286**(1): p. 151-62.
139. Alexenko, A.P., et al., *A classification for the interferon-tau*. *J Interferon Cytokine Res*, 2000. **20**(9): p. 817-22.
140. Demmers, K.J., K. Derecka, and A. Flint, *Trophoblast interferon and pregnancy*. *Reproduction*, 2001. **121**(1): p. 41-9.
141. Guex, N. and M.C. Peitsch, *SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling*. *Electrophoresis*, 1997. **18**(15): p. 2714-23.
142. Radhakrishnan, R., et al., *Zinc mediated dimer of human interferon-alpha 2b revealed by X-ray crystallography*. *Structure*, 1996. **4**(12): p. 1453-63.
143. Karpusas, M., et al., *The crystal structure of human interferon beta at 2.2-A resolution*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1997. **94**(22): p. 11813-8.
144. Karpusas, M., et al., *The structure of human interferon-beta: implications for activity*. *Cell Mol Life Sci*, 1998. **54**(11): p. 1203-16.
145. Adolf, G.R., et al., *Natural human interferon-alpha 2 is O-glycosylated*. *Biochem J*, 1991. **276** ( Pt 2): p. 511-8.
146. Seto, M.H., et al., *Homology model of human interferon-alpha 8 and its receptor complex*. *Protein Sci*, 1995. **4**(4): p. 655-70.
147. Piehler, J., L.C. Roisman, and G. Schreiber, *New structural and functional aspects of the type I interferon- receptor interaction revealed by comprehensive mutational*

- analysis of the binding interface*. Journal of Biological Chemistry, 2000. **275**(51): p. 40425-40433.
148. Runkel, L., et al., *Systematic mutational mapping of sites on human interferon-beta-1a that are important for receptor binding and functional activity*. Biochemistry, 2000. **39**(10): p. 2538-51.
  149. Piehler, J. and G. Schreiber, *Mutational and structural analysis of the binding interface between type I interferons and their receptor ifnar2*. Journal of Molecular Biology, 1999. **294**(1): p. 223-237.
  150. Roisman, L.C., et al., *Mutational analysis of the IFNAR1 binding site on IFNalpha2 reveals the architecture of a weak ligand-receptor binding-site*. J Mol Biol, 2005. **353**(2): p. 271-81.
  151. Runkel, L., et al., *Differences in activity between alpha and beta type I interferons explored by mutational analysis*. J Biol Chem, 1998. **273**(14): p. 8003-8.
  152. Roisman, L.C., et al., *Structure of the interferon-receptor complex determined by distance constraints from double-mutant cycles and flexible docking*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(23): p. 13231-6.
  153. Chill, J.H., et al., *The human type I interferon receptor. NMR structure reveals the molecular basis of ligand binding*. Structure (Camb), 2003. **11**(7): p. 791-802.
  154. Chill, J.H., et al., *The human interferon receptor: NMR-based modeling, mapping of the IFN-alpha 2 binding site, and observed ligand-induced tightening*. Biochemistry, 2002. **41**(11): p. 3575-85.
  155. Goldman, L.A., et al., *Characterization of antihuman IFNAR-1 monoclonal antibodies: epitope localization and functional analysis*. J Interferon Cytokine Res, 1999. **19**(1): p. 15-26.
  156. Cutrone, E.C. and J.A. Langer, *Identification of critical residues in bovine IFNAR-1 responsible for interferon binding*. J Biol Chem, 2001. **276**(20): p. 17140-8.
  157. Cajean-Feroldi, C., et al., *Identification of residues of the IFNAR1 chain of the type I human interferon receptor critical for ligand binding and biological activity*. Biochemistry, 2004. **43**(39): p. 12498-512.
  158. Gross, G., et al., *Stabilisation of human interferon beta synthesis in Escherichia coli by zinc ions*. Biochim Biophys Acta, 1985. **825**(2): p. 207-13.
  159. Flores, I., T.M. Mariano, and S. Pestka, *Human interferon omega (omega) binds to the alpha/beta receptor*. J Biol Chem, 1991. **266**(30): p. 19875-7.
  160. Lin, L.S., R. Yamamoto, and R.J. Drummond, *Purification of recombinant human interferon beta expressed in Escherichia coli*. Methods Enzymol, 1986. **119**: p. 183-92.
  161. Kidd, I.M. and V.C. Emery, *The use of baculoviruses as expression vectors*. Appl Biochem Biotechnol, 1993. **42**(2-3): p. 137-59.
  162. Yamanishi, K. and H. Yasuno, *[Ligase chain reaction (LCR)]*. Hum Cell, 1993. **6**(2): p. 143-7.
  163. Wiedmann, M., et al., *Ligase chain reaction (LCR)--overview and applications*. PCR Methods Appl, 1994. **3**(4): p. S51-64.
  164. Lata, S. and J. Piehler, *Stable and functional immobilization of histidine-tagged proteins via multivalent chelator headgroups on a molecular poly(ethylene glycol) brush*. Anal Chem, 2005. **77**(4): p. 1096-105.
  165. Lata, S., M. Gavutis, and J. Piehler, *Monitoring the dynamics of ligand-receptor complexes on model membranes*. J Am Chem Soc, 2006. **128**(1): p. 6-7.
  166. Piehler, J. and G. Schreiber, *Fast transient cytokine-receptor interactions monitored in real time by reflectometric interference spectroscopy*. Anal Biochem, 2001. **289**(2): p. 173-86.

- 
167. David, M., *Signal transduction by type I interferons*. Biotechniques, 2002. **Suppl**: p. 58-65.
  168. Doly, J., et al., *Type I interferons: expression and signalization*. Cell Mol Life Sci, 1998. **54**(10): p. 1109-21.
  169. Runkel, L., et al., *Mapping of IFN-beta epitopes important for receptor binding and biologic activation: comparison of results achieved using antibody- based methods and alanine substitution mutagenesis*. J Interferon Cytokine Res, 2001. **21**(11): p. 931-41.
  170. Pearce, K.H., Jr., et al., *Growth hormone binding affinity for its receptor surpasses the requirements for cellular activity*. Biochemistry, 1999. **38**(1): p. 81-9.

---

## Danksagung

Ein herzliches Dankeschön gilt meinem Doktorvater Dr. Jacob Piehler für das interessante Thema und für die hervorragende Betreuung meiner Arbeit.

Prof. Dr. Walter Volknandt danke ich, dass er sich bereit erklärt hat die Co-Korrektur zu übernehmen.

Prof. Dr. Robert Tampé danke ich für die Möglichkeit, meine Doktorarbeit an seinem Institut durchführen zu dürfen.

Unseren Kooperationspartner Dr. Gilles Uzé und José Van der Heyden danke ich für die langjährige Zusammenarbeit und die Einführung in verschiedene Zellaktivitätsassays.

Ich danke Prof. Dr. Gideon Schreiber für die freundliche Überlassung verschiedener IFN $\alpha$ 2-Mutanten. Dr. H.J. Obert, Serono GmbH danke ich für die Überlassung von IFN $\beta$  (Rebif®). Ebenso möchte ich mich bei Dr. Jaques Martal für die Bereitstellung von ovinen IFN $\tau$ 2 danken.

Bei meinem Kollegen Peter Lamken möchte ich mich für die langjährige Zusammenarbeit auf engstem Raum bedanken und für die Präparation großer Mengen an ifnar1. Ein Dank an Martynas Gavutis für die Einführung in die Rif- und TIRF-Spektroskopie und vielen „biophysikalischen“ Erkenntnissen. Ebenfalls möchte ich mich bei Dirk Schaible bedanken für die freundschaftliche Zusammenarbeit und Einweisung am LSM sowie an der TIRF-Mikroskopie. Bei Jennifer Strunk bedanke ich mich für die freundschaftliche langjährigen Zusammenarbeit sowie für die Herstellung von Fluoreszenz markiertem ifnar1. Anette Reichel danke ich für die Herstellung von MBP-H10. Ein Dank auch an meine Kollegen Dirk Paterok und Pia Müller. Bei Susanne Schrodtt möchte ich mich für die gemeinsame Promotionszeit bedanken und der daraus entstandenen Freundschaft.

Ebenfalls möchte ich mich bei Eckhard Linker für die Hilfe und Tipps in der Zellkultur bedanken.

Meiner Mutter danke ich für die immerwährende Unterstützung während meiner gesamten Studienzeit.



---

# Lebenslauf

## Persönliche Informationen

Geburtsdatum: 30. Juni 1975  
Geburtsort: Darmstadt  
Familienstand: ledig  
Nationalität: deutsch

## Naturwissenschaftliche Ausbildung

### Promotion

seit 05/2002 **Promotion** am Institut für Biochemie des Biozentrums der J.W. Goethe-Universität Frankfurt am Main (Arbeitsgruppe Dr. Jacob Piehler) in Kooperation mit dem Weizmann-Institut / Israel und der Universität Montpellier / Frankreich

### Studium

02/2002 **Abschluss: Diplom-Humanbiologin** an der Philipps-Universität Marburg, Note 1.0

08/2001 – 01/2002 **Diplomarbeit** am Institut für Physiologische Chemie an der Philipps-Universität Marburg im Arbeitskreis Zelluläre Biochemie und am Institut für Biochemie der Universität Frankfurt (Dr. Jacob Piehler)

10/1999 **Vordiplom**

10/1997 – 08/2000 **Studium der Humanbiologie** an der Philipps-Universität Marburg

## Ausbildung

08/1996 – 01/1997 praktische Ausbildung in der Engel-Apotheke in Darmstadt mit Abschluss zur pharmazeutisch-technischen Assistentin, Note 2.0

07/1996 theoretische und praktische Prüfung

08/1994 – 07/1996 Ausbildung zur pharmazeutisch-technischen Assistentin an der Martin-Behaim-Schule in Darmstadt

---

## Industriepraktika

- 02/2002 – 03/2002 **Merck KGaA**, Darmstadt (8 Wochen)  
Industriepraktikum im Bereich Pharmazeutische Entwicklung,  
Betreuer: Dr. N. Sievers und Dr. Chr. Schröter  
Projekt: Etablierung von analytischen Methoden im Labor
- 09/1998 – 10/1998 **Zentrum der Rechtsmedizin**  
der J.W. Goethe Universität, Frankfurt (2 Wochen)  
Praktikum in der Abteilung forensische Molekularbiologie  
Betreuer: Dr. Jens Armend und Dr. R. Zehner  
Projekt: Identifizierung von Fleischfliegenarten auf molekular-  
biologischer Basis

## Publikationen

Gavutis M., Jaks E., Lamken P., Piehler J., *Determination of the 2-dimensional interaction rate constants of a cytokine receptor complex*. Biophysical Journal, 2006, Feb. 10.

Jaitin DA., Roisman LC., Jaks E., Gavutis M., Piehler J., Van der Heyden J., Uzé G., Schreiber G., *Inquiring into the differential action of interferons (IFNs): an IFN $\alpha$ 2 mutant with enhanced affinity to ifnar1 is functionally similar to IFN $\beta$* . Molecular Cell Biology, 2006, March 26 (5): 1888-97.

Eva Jaks

Friedrichsdorf, den 31. 03.06