

Aus dem Institut für Biochemie und Molekularbiologie II

der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: Univ.-Prof. Dr. Jürgen Scheller

**Generierung von biologisch aktivem Hyper-Interleukin 11
durch Intein-vermittelte Proteinligation mit Split-Zytokinen**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnmedizin
der Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Nils-Christopher Frank

2018

Als Inauguraldissertation gedruckt mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Prof. Dr. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. Jürgen Scheller

Zweitgutachter: Prof. Dr. Björn Stork

Meinen Eltern in großer Dankbarkeit gewidmet.

Zusammenfassung

Das menschliche Immunsystem ist tagtäglich einer Vielzahl an Pathogenen ausgesetzt, die es zum Überleben zu bewältigen gilt. Als Kommunikationsmedium nutzt es dabei kleine Proteine, die Zytokine, die daher auch als „Hormone des Immunsystems“ Erwähnung finden.

Interleukine, unter anderem die Interleukin-6-Familie, stellen ein essentielles Werkzeug der Immunzellen dar, die bei Fehlregulation zu Immunsuppression oder autoimmunen Erkrankungen führen können. Um diese Zusammenhänge besser zu verstehen, ist eine weitergehende Erforschung der Interleukin-6-Zytokine, wie Interleukin-11, von großem Interesse für die Medizin.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden molekulare Werkzeuge geschaffen, um das bereits in der Literatur *in vitro* beschriebene IL-11 *trans-signaling* besser untersuchen zu können. IL-11 kann Zellen durch klassische Signalgebung über den membranständigen IL-11R und ein Homodimer des signalvermittelnden Rezeptors gp130 oder durch *trans-signaling* induzieren. IL-11 *trans-signaling* wird über gp130 und den löslichen IL-11R aktiviert. Für die Analyse des *trans-signaling*s wurde eine Intein-basierte Variante eines Hyperzytokins von IL-11, also einer Verknüpfung aus Interleukin und seiner löslichen Rezeptorform, generiert. Hiermit konnte zum einen *trans-signaling* nachgewiesen werden, zum anderen bietet es die Möglichkeit des hintergrundfreien, nicht-toxischen Nachweises von *trans-signaling in vivo*, sodass diese Arbeit als Vorstudie zu Mausversuchen zu werten ist.

Weiterhin wurde in dieser Arbeit untersucht, inwieweit der bereits für andere Zytokine beschriebene *Crosstalk* zwischen Mitgliedern der IL-6-Zytokinfamilie am Beispiel von IL-6 und dem IL-11R erfolgt. Diese Arbeit konnte zeigen, dass der IL-11R als niedrigaffiner α -Rezeptor für IL-6 fungieren kann, wodurch mehrfach in der Literatur beschriebene, bislang ungeklärte Versuchsergebnisse eventuell erklärt werden können.

Abstract

The human immune system is constantly exposed to numerous pathogens which it needs to defend itself against to survive. As a medium of communication, it uses small proteins, the so-called cytokines which are also known as “hormones of the immune system”.

Interleukins, such as the interleukin-6-family, are essential tools of immune cells. Malfunctioning communication between cells via interleukins can cause autoimmune diseases or immunosuppression. To gain a better understanding of these processes, further research of interleukin-6 cytokines such as interleukin-11 is of great interest for medical science.

Within the context of this dissertation, molecular tools were created to examine in vitro IL-11 trans-signaling, a process already described in literature. IL-11 is able to activate cells via the classic signalling pathway over the membrane-bound IL-11R and a homodimer of gp130 or via trans-signaling. IL-11 trans-signaling is activated via gp130 and the soluble variant of IL-11R. Thus, an intein-based variant of a hypercytokine of IL-11, i.e. the connection between interleukin and its soluble receptor form, was generated. By doing so, trans-signaling can be detected, and furthermore, the possibility to establish a background-free, non-toxic form of trans-signaling in vivo was provided. Hence, this dissertation can be considered as a preliminary study for mouse studies.

Furthermore, within this dissertation another focus of research was whether cross-talk between members of the IL-6 cytokine family, namely IL-6 and IL-11R, exists. This has already been proven for other cytokine/receptor combinations. This dissertation shows that IL-11R can serve as a low-level α -receptor for IL-6; a finding that could possibly explain prior unexplained experimental results.

Abkürzungsverzeichnis

<i>Abkürzung</i>	<i>Bedeutung / Erklärung</i>	<i>Abkürzung</i>	<i>Bedeutung / Erklärung</i>
°C	Grad Celsius	ELISA	<i>Enzyme linked immunosorbent assay</i> , enzymgekoppelter
µg	Mikrogramm		Immunadsorptionstest
µl	Mikroliter	ER	Endoplasmatisches Retikulum
A	Ampere	FCS	<i>fetal calf serum</i> , fetales Kälberserum
ADAM	<i>A disintegrin and metalloproteinase</i>	FITC	Fluoresceinisothiocyanat
AP	alkalische Phosphatase	g	Gramm / Erdbeschleunigung
AS	Aminosäure	GFP	<i>Green fluorescent protein</i> , grün fluoreszierendes Protein
BMP-2	<i>bone-morphogenetic protein-2</i>	GLP-1	<i>glucagon-like peptide-1</i>
BCA	<i>bicinchonic acid</i> , Bicinchoninsäure	gp130	Glykoprotein 130 kDa
bp	Basenpaare	h	Stunde / human
BSA	bovines Serumalbumin	H-IL-11	Hyper-Interleukin-11
CBM	<i>Cytokine-binding module</i> , Zytokinbindemodul	H-IL-6	Hyper-Interleukin-6
cm	Zentimeter	HRP	<i>horseradish peroxidase</i> , Meerrettich-Peroxidase
COX-2	Cyclooxygenase-2	ICD	<i>intracellular domain</i> , intrazelluläre Domäne
CRP	C-reaktives Protein	Ig	Immunglobulin
Da	Dalton	I-H-IL-11	Intein-Hyper-IL-11
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>	I-H-IL-6	Intein-Hyper-IL-6
DMSO	Dimethylsulfoxid	IL	Interleukin
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure	IL-11	Interleukin-11
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat	IL-11R	Interleukin-11-Rezeptor
EAE	experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis	IL-6	Interleukin-6
EDTA	Ethylendiamintetraacetat	IL-6R	Interleukin-6-Rezeptor
		IMPDH	Inosin-5'-Monophosphat-Dehydrogenase

<i>Abkürzung</i>	<i>Bedeutung / Erklärung</i>	<i>Abkürzung</i>	<i>Bedeutung / Erklärung</i>
Jak	Janus-Kinase	RNA	<i>ribonucleic acid</i> ,
kDa	Kilodalton		Ribonukleinsäure
l	Liter	RPM	Rotationen pro Minute
LB	Lysogeny Broth	RPMI	<i>Roswell Park Memorial</i>
Lys	<i>lysate</i> , Zellkulturlysat		<i>Institute Medium</i>
m	murin / Meter	RT	Raumtemperatur
MAPK	<i>mitogen-activated protein</i>	SDS	Sodiumdodecylsulfat
	<i>kinase</i>	SDS-PAGE	Sodiumdodecylsulfat-Poly-
min	Minute		acrylamidgelelektrophorese
ml	Milliliter	sec	Sekunden
mM	Millimolar	sgp130	<i>soluble gp130</i> , lösliches gp130
mm	Millimeter	sIL-11R	<i>soluble IL-11R</i> , löslicher
MPa	Megapascal		IL-11R
mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure	sIL-6R	<i>soluble IL-6R</i> , löslicher IL-6R
ng	Nanogramm	Sn	<i>supernatant</i> ,
nM	Nanomolar		Zellkulturüberstand
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese	STAT	<i>signal transducer and activator</i>
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i> ,		<i>of transcription</i>
	phosphatgepufferte Kochsalz-	TAE	Tris-Acetate-EDTA
	lösung	TBS	<i>Tris-buffered saline</i> , Tris-
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> ,		gepufferte Kochsalzlösung
	Polymerasekettenreaktion	TEMED	Tetraethylmethyldiamin
pg	Picogramm	Th17	T-Lymphozyten-Subtyp
pH	<i>potential hydrogenii</i> , pH-Wert,	UV	ultraviolett
	Maß für die Protonenkonzen-	V	Volt
	tration einer Lösung	VE	voll entmineralisiert
PI3K	Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase	VHH	<i>variable domain of the heavy-</i>
PNK	Polynukleotidkinase		<i>chains of heavy-chains-only</i>
POD	Peroxidase		<i>antibodies</i> , Fragment eines
P-STAT3	phosphoryliertes (aktiviertes)		Kamelidenantikörpers
	STAT3	vIL-6	virales IL-6
PVDF	Polyvinylidenfluorid		
RFP	Rezeptorfusionsprotein		

Inhaltsverzeichnis

I. ERLÄUTERUNG DES BEGRIFFS „INTERLEUKINE“	1
1. Definition des Begriffs „Interleukine“	1
2. Die Interleukin-6-Familie	4
3. Das Interleukin-6 und seine Physiologie	8
4. Das Interleukin-11 und seine Physiologie	12
II. AUFGABENSTELLUNG UND ZIELSETZUNG	16
1. Intein-vermittelte Hyper-Interleukin-11-Expression.....	16
1.1. Definitionen des Begriffs „Hyperzytokin“	16
1.2. Erläuterung zu Hyper-Interleukin-11	17
1.3. Erläuterung des Begriffs Inteine	18
1.4. Verwendung von Inteinen zur Generierung von biologisch aktivem H-IL-6 ..	19
1.5. Weiterführung des Projekts „Intein-vermittelte Expression von Hyperzytokinen“	21
1.5.1. Herstellung der I-H-IL-6 _{A/BCD} -Variante	21
1.5.2. Erstellung von Intein-IL-6R-ΔKDEL-Varianten und Mutanten	22
1.6. Zielsetzung des Projekts	22
2. Der IL-11R dient als alternativer Rezeptor für IL-6	23
2.1. Definitionen der Begriffe „Plastizität“ und „ <i>Crosstalk</i> “	23
2.1.1. Der Begriff „Plastizität“	23
2.1.2. Der Begriff „ <i>Crosstalk</i> “	23
2.2. Zielsetzung des Projekts	24
2.3. Untersuchungen zu „Plastizität“ und „ <i>Crosstalk</i> “ bei IL-6 und IL-11R	24
III. MATERIAL UND METHODEN	25
1. Verwendete Materialien.....	25
1.1. Materialien für die DNA-Präparation	25
1.1.1. Nährmedien für Bakterien	25
1.1.2. Bakterienkulturen	25
1.1.3. Antibiotika	26
1.1.4. Plasmide	26

1.1.5. Enzyme.....	28
1.1.6. Oligonukleotide	29
1.2. Materialien für die Synthese von rekombinanten Proteinen in Zellkulturen.....	29
1.2.1. Zelllinien	29
1.2.2. Nährmedien	30
1.3. Materialien für den Proteinnachweis	30
1.3.1. Sodiumdodecylsulfat-Gele und Größenstandard.....	30
1.3.2. Antikörper	30
1.4. Materialien für den Proteinfunktionstest.....	32
1.4.1. Zelllinien	32
1.4.2. Rekombinante Proteine und Inhibitoren	33
1.5. Materialien für die Proteinquantifizierung.....	33
1.5.1. ELISA-Kits.....	33
1.5.2. Antikörper	33
1.5.3. Rekombinante Proteine	34
1.6. Allgemeine Verbrauchsmaterialien und Geräte	34
1.6.1. Verbrauchsmaterialien	34
1.6.2. Geräte	35
1.6.3. Chemikalien, flüssige Verbrauchsmaterialien.....	38
1.6.4. Kits.....	42
2. Angewendete Methoden.....	43
2.1. Methoden für die DNA-Präparation.....	43
2.1.1. Transformation chemisch-kompetenter <i>E. coli</i> -Bakterien	43
2.1.2. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	43
2.1.3. Restriktionsanalyse	44
2.1.4. Plasmidpräparation	45
2.1.4.1. Mini-Präparation	45
2.1.4.2. Midi-Präparation	46
2.1.5. DNA-Konzentrationsbestimmung	46
2.1.6. Agarose-Gelelektrophorese	47
2.1.7. DNA-Gelextraktion, Phosphorylierung, Dephosphorylierung.....	47
2.1.8. Ligation von DNA-Fragmenten	49
2.1.9. Sequenzierung von DNA-Fragmenten.....	49

2.2. Methoden für die Synthese von rekombinanten Proteinen in Zellkulturen..	49
2.2.1. Zellkultivierung	49
2.2.2. Zellzahlbestimmung.....	50
2.2.3. Transfektion, Zytolyse und Gewinnung von Zellkulturüberständen.	50
2.2.4. Etablierung einer stabilen Zelllinie mittels CHO K1-Zellen	51
2.2.5. Erstellung von <i>Cryostocks</i> zum Erhalt der stabilen Zelllinien.....	52
2.2.6. Das <i>Rollerbottle</i> -Verfahren	53
2.2.7. Proteinreinigung	54
2.3. Methoden für den Proteinnachweis.....	55
2.3.1. Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	55
2.3.2. Western Blotting.....	55
2.3.3. Proteindetektion.....	56
2.3.4. Re-Blotting.....	56
2.3.5. Immunopräzipitation mittels Protein-A-Agarose- <i>Beads</i>	57
2.3.6. Immunopräzipitation mittels Acetonfällung	57
2.4. Methoden für den Proteinfunktionstest	58
2.4.1. Zellviabilitätsassay (Proliferationsassay, Ba/F3-Zellen)	58
2.4.2. Zytokinstimulation von Suspensionszellen (Ba/F3-/K-562-Zellen)..	59
2.4.3. Zytokinstimulation von adhärenenten Zellen (HT-29/HepG2-Zellen) .	60
2.4.4. Fluoreszenz-Durchflusszytometrie (FACS-Analyse).....	60
2.5. Methoden für die Proteinquantifizierung	61
2.5.1. <i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i> (ELISA).....	61
2.5.1.1. IL-6-ELISA	61
2.5.1.2. IL-6R-ELISA	62
2.5.1.3. Hyper-IL-6-ELISA.....	62
2.5.1.4. IL-11-ELISA.....	62
2.5.1.5. Hyper-IL-11-ELISA.....	63
2.5.2. BCA-Test	63
IV. ERGEBNISSE	64
1. Etablierung einer <i>trans-signaling</i>-induzierenden Kontrolle für ein Split-Intein-basiertes Expressionssystem für Hyper-Interleukin-11.....	64
1.1. Klonierung von Hyper-Interleukin-11-Fc	65
1.2. H-IL-11-Fc wird in COS-7-Zellen exprimiert und sezerniert	66

1.3.	Funktionalitätstest von H-IL-11-Fc im Zellviabilitätsassay und Immunoblot-Assay gegen P-STAT3.....	67
1.4.	Zusammenfassung.....	70
2.	Darstellung der Inteinprojekte um Hyper-IL-11 und Hyper-IL-6.....	71
2.1.	Klonierung von Split-Intein-basierten Expressionsplasmiden für Hyper-Interleukin-11-Fc	72
2.2.	Überexpression von Split-Intein-basierten Hyper-IL-11-Fc-Plasmiden führt zur Bildung von H-IL-11-Fc.....	75
2.3.	Durch Split-Intein-vermittelte Proteinligation generiertes I-H-IL-11 ist biologisch aktiv.....	78
2.4.	Fortführung und Abschluss des Intein-Hyper-IL-6-Projekts.....	81
2.4.1.	Klonierung von Δ KDEL-Varianten und Expressionstest	82
2.5.	Zusammenfassung.....	87
3.	Identifizierung des IL-11R als alternativer IL-6-Rezeptor	88
3.1.	IL-6 induziert STAT3-Phosphorylierung in IL-6R-defizienten Zellen.....	89
3.2.	IL-6 induziert Proliferation und STAT3-Phosphorylierung in Ba/F3-Zellen, die stabil mit gp130 und IL-11R transduziert sind	92
3.3.	Die Chimäre IL-11R-IL-6-Fc aktiviert die STAT3-Achse	96
3.3.1.	Klonierung des chimären Hyperzytokins sIL-11R-IL-6-Fc.....	97
3.3.2.	Das chimäre Hyperzytokin sIL-11R-IL-6-Fc wird in COS-7-Zellen exprimiert und sezerniert.....	97
3.3.3.	HZ ^C ist biologisch aktiv	98
3.4.	Etablierung eines Hyper-IL-11-ELISA-Systems	102
3.5.	Zusammenfassung.....	104
V.	DISKUSSION UND FAZIT.....	105
1.	Intein-vermittelte Expression von Hyper-Interleukin-11	105
2.	Der IL-11R dient als alternativer Rezeptor für IL-6	112
VI.	LITERATURVERZEICHNIS.....	116
	DANKSAGUNG	128

Abbildungsverzeichnis

Abb. I.1: Signaltransduktion von Interleukinen am Beispiel von Interleukin-6	3
Abb. I.2: Zytokinrezeptorkombinationen in der IL-6-Familie	6
Abb. I.3: Schematische Darstellung eines IL-6-Typ-Zytokins.....	7
Abb. I.4: Aufbau des <i>trans-signaling</i> Inhibitors sgp130Fc.....	11
Abb. I.5: Aufbau des Inhibitors IL-6R VHH.....	12
Abb. I.6: Schematische Übersicht des IL-6 und IL-11 <i>classic</i> bzw. <i>trans-signaling</i> s...	14
Abb. II.1: Schemazeichnung von Hyper-IL-11-Fc	18
Abb. II.2: Schemazeichnung Inteine am Beispiel von Hyper-IL-11	19
Abb. II.3: Schemazeichnung IL-6 mit Split-Stellen (A/BCD, AB/CD, ABC/D).....	21
Abb. III.1: Chemische Reaktion von „Cell Titer Blue“ der Fa. Promega.....	58
Abb. IV.1: Klonierungsschema pcDNA3.1-Hyper-IL-11-Fc.....	66
Abb. IV.2: Expressions-Western Blot von COS-7-Zelllysaten und –Überständen mit H-IL-6 und H-IL-11.	67
Abb. IV.3: H-IL-6 und H-IL-11 aktivieren Ba/F3-gp130-Zellen und sind durch sgp130Fc vollständig inhibierbar.....	68
Abb. IV.4: H-IL-6 und H-IL-11 aktivieren die STAT3-Achse	69
Abb. IV.5: Klonierungsschema pcDNA3.1-sIL-11R-L-IMPDH-KDEL.....	72
Abb. IV.6: Klonierungsschema pMK-RQ-sIL-11R-L-IL-11 (30-117)-IMPDH-KDEL	73
Abb. IV.7: Klonierungsschema pcDNA3.1-IMPDH-IL-11-Fc.....	74
Abb. IV.8: Klonierungsschema pcDNA3.1-IMPDH-IL-11 _{CD} -Fc	74
Abb. IV.9: Schemazeichnungen der Intein-Hyper-IL-11-Plasmide	75
Abb. IV.10: Expressions-Western Blots der I-H-IL-11-Fc / I-H-IL-11 _{AB/CD} -Varianten	76
Abb. IV.11: Die co-transfizierten Intein-Hyper-IL-11-Varianten aktivieren Ba/F3- gp130-Zellen und sind durch sgp130Fc inhibierbar.....	79
Abb. IV.12: I-H-IL-11-Fc und I-H-IL-11 _{AB/CD} aktivieren die STAT3-Achse in Ba/F3-gp130-Zellen.....	80
Abb. IV.13: Schema KDEL-Deletion	82
Abb. IV.14: Klonierungsschema der sIL-6R-ΔKDEL-Konstrukte am Bsp. des pcDNA3.1-sIL-6R-IMPDH-ΔKDEL.....	83
Abb. IV.15: Expressions-Western Blots IL-6R vs. IL-6R ΔKDEL.....	84
Abb. IV.16: Expressions-Western Blot IL-6R AB/CD vs. IL-6R AB/CD Mut ΔKDEL.....	85

Abb. IV.17: Expressions-Western Blot IL-6R ABC/D vs. IL-6R ABC/D Δ KDEL.....	86
Abb. IV.18: Durchflusszytometrieanalyse der K-562-Zellen auf IL-6R und IL-11R ...	89
Abb. IV.19: IL-6 aktiviert STAT3 in K-562 / HEK293 + hIL-11R bei fehlendem IL-6R.....	90
Abb. IV.20: Schematischer Aufbau des IL-6-Inhibitors IL-6-RFP	91
Abb. IV.21: IL-11 aktiviert STAT3 in K-562 / HEK293 + hIL-11R	91
Abb. IV.22: IL-6 regt die Proliferation in Ba/F3-gp130-IL-11R-Zellen an und kann durch RFP inhibiert werden	92
Abb. IV.23: IL-6 regt Proliferation in Ba/F3-gp130-IL-11R-Zellen unter Ausschluss des IL-6R an	93
Abb. IV.24: IL-6 ist in der Lage, STAT3 in Ba/F3-gp130-IL-11R-Zellen zu aktivieren.....	94
Abb. IV.25: IL-11 ist nicht in der Lage, Ba/F3-gp130-IL-6R-Zellen zu stimulieren....	95
Abb. IV.26: Schemazeichnung sIL-11R-IL-6-Fc-Chimäre	97
Abb. IV.27: Vergleichender Western Blot H-IL-6 / H-IL-11 / Hybrid	98
Abb. IV.28: Zellviabilitätsassay Ba/F3-gp130 mit Hyperzytokinen und Inhibitoren ...	99
Abb. IV.29: Hyperzytokinüberstände aktivieren die STAT3-Achse in Ba/F3-gp130- Zellen und sind durch sgp130Fc vollständig inhibierbar.....	100
Abb. IV.30: Coomassie-Gele der Reinigungen von H-IL-11-Fc und HZC	101
Abb. IV.31: Rekombinante Hyperzytokine aktivieren konzentrationsabhängig Ba/F3- gp130-Zellen.....	102
Abb. IV.32: Hyper-IL-11-Komplex-ELISA.....	103
Abb. V.1: <i>Alignment</i> der IL-6-/IL-11-Proteinstrukturen.....	113

Tabellenverzeichnis

Tabelle I.1: Botenstoffeinteilung	1
Tabelle I.2: Zytokineinteilung	2
Tabelle I.3: Zytokine der IL-6-Familie und ihre Wirkungen	4
Tabelle III.1: Inhaltsstoffe LB-Medium und LB-Agarose-Platten	25
Tabelle III.2: Eingesetzte Antibiotika	26
Tabelle III.3: Hergestellte und verwendete Plasmide	26
Tabelle III.4: Verwendete Enzyme	28
Tabelle III.5: Oligonukleotide und ihre Sequenzen	29
Tabelle III.6: Zelllinien und ihre Herkunft (Bereich Synthese rekombinante Proteine)	29
Tabelle III.7: Antikörper und ihre eingesetzten Konzentrationen	30
Tabelle III.8: Zelllinien und ihre Herkunft (Bereich Proteinfunktionstest)	32
Tabelle III.9: Eingesetzte rekombinante Proteine und Inhibitoren	33
Tabelle III.10: ELISA-Antikörper und ihre eingesetzten Konzentrationen	34
Tabelle III.11: Verwendete Verbrauchsmaterialien	34
Tabelle III.12: Angewandte Geräte und ihre Hersteller	36
Tabelle III.13: Chemikalien / Nährmedien	38
Tabelle III.14: Verwendete Lösungen und ihre Zusammensetzung	40
Tabelle III.15: Kits	42
Tabelle III.16: Zelltypen und zugehörige Nährmedien	50

I. ERLÄUTERUNG DES BEGRIFFS „*INTERLEUKINE*“

1. Definition des Begriffs „*Interleukine*“

In den Geweben des menschlichen Organismus kursiert eine Vielzahl von Botenstoffen, die verschiedenste Aufgaben zu erfüllen haben. Sie werden von nahezu allen Zelltypen des Körpers produziert und sind das humorale Medium, über das Zellen miteinander kommunizieren können (s. Tabelle I.1; Löffler, Petrides *et al.* 2007).

Botenstoffe dienen u. a. der Aktivierung oder Deaktivierung von spezifischen Zelltypen über Rezeptoren (z.B. Zytokine), sie regulieren als Hormone die Organfunktionen (z.B. Insulin und Glucagon) oder sie bewirken die Aufnahme von Nähr- und Mineralstoffen (z.B. Calcitonin und PTH). Viele Signalmoleküle arbeiten hierbei antagonistisch, sodass die oben genannten Effekte im Sinne der Homöostase herauf- bzw. herabreguliert werden (Parrilla, Goodman *et al.* 1974, Talmage, Grubb *et al.* 1980).

Botenstofftyp	Funktion
Hormon	Organregulation
Zytokin	Zell-Zell-Kommunikation des Immunsystems
intrazelluläre Signalmoleküle	Weiterleitung des extrazellulären Signals zur Adaptation der Zelle an den einwirkenden Reiz (Genmodifikation, Aktivierung von Zellfunktionen)

Tabelle I.1: Botenstoffeinteilung

Zytokine sind kleine, 15-25 kDa große Peptidfaktoren, die von unterschiedlichen Zelltypen, v. a. von Immunzellen wie T- und B-Lymphozyten, Makrophagen u. a., gebildet werden. In der Regel erfolgt dies kurzfristig *de novo*. Das Zytokin entfaltet seine Wirkung in der näheren Umgebung der sezernierenden, also den Botenstoff ausscheidenden, Zelle. Man spricht hierbei von einer *parakrinen* Übertragung und Wirkungsweise (Löffler, Petrides *et al.* 2007). Kommt es zu einer starken Ausschüttung von Zytokinen in einem lokalen Bereich, kann es über den entstandenen Konzentrationsgradienten im Entzündungsgebiet zu einer Anlockung weiterer Immunzellen kommen, um eingedrungene Erreger abzuwehren. Dieser Mechanismus wird Chemotaxis genannt, während das anlockende Zytokin als *Chemoattractant* oder Chemokin bezeichnet wird (Wolf 1921).

Bei akuten oder chronischen Entzündungsprozessen kann es neben der parakrinen Wirkung auch zu weiterreichendem Transport über das Blut (*endokrine* Übertragung) kommen. Ausschlaggebend sind hier die Durchblutung des entzündeten Gewebes und die Konzentration des ausgeschütteten Botenstoffs (Peters, Jacobs *et al.* 1996).

Man unterteilt bei Zytokinen 4 verschiedene Proteinklassen: Wachstumsfaktoren, Interleukine, Interferone und Chemokine, wobei jede Klasse spezifische Funktionen übernimmt (s. Tabelle I.2).

	Wachstumsfaktoren	Interleukine	Interferone	Chemokine
<i>Bsp.</i>	GM-CSF, PDGF	IL-1, IL-6, TNF α	IFN α , IFN γ	MCP1, CCL
<i>biol.</i>	Proliferationsstimulation	Entzündungsreaktion	Virusabwehr	Chemotaxis Migration
<i>Fkt.</i>	Zelldifferenzierung	Immunabwehr Hämatopoese		

Tabelle I.2: Zytokineinteilung.

Die Zielzellen der Zytokine benötigen zur Signalausprägung einen spezifischen zugehörigen Rezeptor bzw. Rezeptorkomplex, an den das Zytokin binden kann. Nach Zytokin-Rezeptorbindung kann eine intrazelluläre Signalkaskade, z.B. eine Phosphorylierung von Proteinen im Sinne eines molekularen Schalters, aktiviert werden. Hierbei können an unterschiedlichen Zellen auch verschiedene Effekte hervorgerufen werden. Interleukine sind demnach interzelluläre Botenstoffe, die von spezifischen Rezeptoren auf ihren Zielzellen erkannt werden und durch eine Signalkaskade pro- und / oder antiinflammatorische Wirkungen im Bereich von Entzündungszellen, z.B. Lymphozyten oder Makrophagen, auslösen können. Außerdem werden ihnen proliferative und differenzierende Wirkungen, z.B. im blutbildenden System oder der Embryogenese, zugeschrieben (Garbers und Scheller 2013).

Interleukine leiten ihr Signal an die Zielzellen meist über einen membranständigen Rezeptor weiter, der mit einer Tyrosinkinase assoziiert ist, da sie keine eigene Enzymaktivität aufweisen. Diese ist meist eine Janus-Kinase (Jak, s. Abb. I.1 A; Wilks, Harpur *et al.* 1991, O'Shea, Kontzias *et al.* 2013), die ihren Namen aufgrund einer zweifachen Phosphotransferaseaktivität bekommen hat. Obwohl die zweite Phosphotransferase innerhalb des Moleküls vorhanden ist, ist ihre Funktion bis heute nicht eindeutig geklärt (Yamaoka, Saharinen *et al.* 2004). Janus-Kinasen sind durch Autophosphorylierung von Tyrosinresten (I.1 B) in der Lage, weitere Proteine durch

Phosphorylierung zu aktivieren. Hierzu gehören u.a. Proteine der Familie *Signal Transducer and Activator of Transcription* (STAT, verschiedene Subtypen bekannt; vgl. I.1 C). Das STAT-Molekül seinerseits transloziert in aktivierter Form als Homo- oder Heterodimer in den Nucleus (I.1 D), um dort gezielt als Transkriptionsfaktor die Genexpression zu fördern oder inhibierende Funktionen im Sinne einer Promotorinhibition wahrzunehmen (Darnell, Kerr *et al.* 1994, Guschin, Rogers *et al.* 1995).

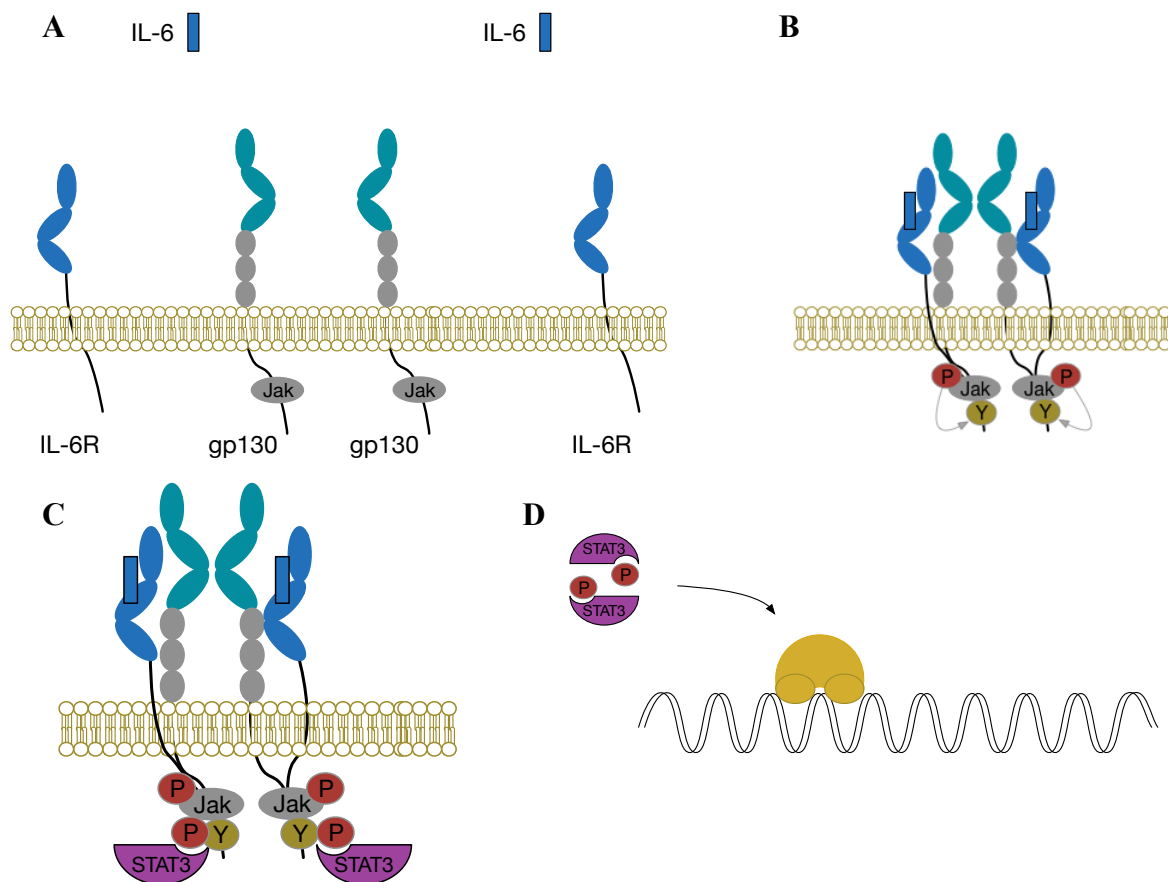


Abbildung I.1: Signaltransduktion von Interleukinen am Beispiel von Interleukin-6

- A: Ausgangszustand vor Signaltransduktion, es werden 2 Moleküle gp130 und IL-6R benötigt
- B: Bindung der IL-6-Moleküle an die IL-6-Rezeptoren, Rekrutierung des gp130-Homodimers, Autophosphorylierung der Januskinasen
- C: Phosphorylierung der Tyrosinreste, Anlagerung der STAT3-Moleküle
- D: Translation des STAT3-Homodimers als Transkriptionsfaktor in den Zellkern

Neben dem o.g. Signalweg werden außerdem der Ras/Raf/MAP-Kinase- (Robinson und Cobb 1997) sowie der Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase/Akt-Signalweg bedient (Takahashi-Tezuka, Hibi *et al.* 1997).

2. Die Interleukin-6-Familie

Um die Vielzahl an unterschiedlichen Botenstoffen zu systematisieren, wurden Proteine in unterschiedliche Proteinklassen und –familien eingeteilt. Zu den Interleukinen zählen neben den sehr prominenten Interleukin-1- und Tumornekrosefaktor (TNF)-Familien auch Interleukine, die der sog. Interleukin-6-Familie angehören, deren Hauptgemeinsamkeit ihre ähnliche Struktur und Proteinfaltung ist, während ihre Wirkung zum Teil sehr ähnlich, zum Teil aber auch sehr unterschiedlich ausfällt.

Interleukin	Sekretion v.a. durch	bedeutsame Zielzellen	mögliche Wirkung
Interleukin-6 (IL-6)	Makrophagen T-Zellen Fibroblasten	Lymphozyten Leukozyten Hepatozyten myel. Stammzellen Osteoklasten	proinflammatorisch, Aktivierung von Akute-Phase-Reaktion, Zelldifferenzierung
Interleukin-11 (IL-11)	Makrophagen Lymphozyten Stromazellen	Lymphozyten Leukozyten Epithelzellen Osteoklasten Kardiomyozyten	antiinflammatorisch, regenerativ / proliferationsanregend, Zelldifferenzierung
Interleukin-27 (IL-27) (= IL-30 + EBI-3)	dendritische Zellen	Lymphozyten	Induktion der Th ₁ -Differenzierung durch Transkriptionsfaktoren, Inhibition von Th ₁₇ -Zellen
Interleukin-30 (IL-30, p28)	dendritische Zellen	T-Lymphozyten NK-Zellen	antiinflammatorisch, Verhinderung von Sepsis durch Modulation der Entzündung
Interleukin-31 (IL-31)	T-Lymphozyten	myel. Stammzellen Epithelzellen Keratinocyten	proinflammatorisch, Auslösung Akute-Phase-Reaktionen
Ciliärer neurotropher Faktor (CNTF)	Schwannzellen Astrozyten	Neuronen	Verhinderung von Motoneurondegeneration (ziliär und spinal)
Cardiotrophin-1 (CT-1)	während der frühen Embryogenese	Kardiomyozyten myel. Stammzellen	Diff. der Stammzellen zu reifen Kardiomyozyten (STAT3-abh.)

<i>Cardiotrophin-like cytokine</i> (CLC, NNT-1/BSF-3)	Stromazellen von Lymphknoten, Milz, Knochenmark	Neuronen B-Lymphozyten	Verhinderung von embryonaler Motoneuronapoptose, topisch proinflammatorisch
Leukämie-inhibierender Faktor (LIF)	Makrophagen T-Lymphozyten Fibroblasten Epithelzellen	embr. Stammzellen hämatopoetische Zellen	Inhibition der Apoptose, Sicherung des Zellüberlebens
Onkostatin M (OSM)	Makrophagen Fibroblasten	embr. Stammzellen myel. Zelllinien T-Lymphozyten	Differenzierung, Induktion der frühen Immunantwort

Tabelle I.3: Zytokine der IL-6-Familie und ihre Wirkungen (Auswahl)

Informationen nach: Arakawa, Sendtner *et al.* (1990), Ganten (2003), Vlotides, Zitzmann *et al.* (2004), Yamaoka, Saharinen *et al.* (2004), Tato und Cua (2008a), Tato und Cua (2008b), Tato und Cua (2008c), Tato und Cua (2008d), Pasquin, Sharma *et al.* (2015), Yan, Mitra *et al.* (2016)

Die meisten Mitglieder der IL-6-Familie leiten Signale über einen Komplex aus β -Rezeptor und α -Rezeptor, mit Ausnahme von IL-31, LIF, CT-1 und OSM, in die Zelle weiter. Die Zytokinrezeptoren der IL-6-Familie gehören der Immunglobulin-Superfamilie an und bestehen aus 3 (α -Rezeptoren) bzw. 5-8 (β -Rezeptoren) Immunglobulin-/Fibronectin-ähnlichen Domänen (vgl. Kap. I.3; Garbers, Hermanns *et al.* 2012).

Mit Ausnahme von IL-31 ist mindestens ein β -Rezeptor aller IL-6-Zytokine eine Kette des Moleküls Glykoprotein 130 (gp130). Während IL-6 und IL-11 ein Homodimer von gp130 rekrutieren, verwenden die anderen IL-6-Zytokine Heterodimere aus gp130 und LIFR, OSMR oder WSX-1. Die oben bereits genannte Ausnahme IL-31 benötigt OSMR und GPL (vgl. Abb I.3; Garbers, Hermanns *et al.* 2012).

Die meisten Zytokine der IL-6-Familie benötigen einen zusätzlichen, nicht-signalkompetenten α -Rezeptor, der eine Bindung des Zytokins an den β -Rezeptor ermöglicht. Diese werden als IL-6R, IL-11R und CNTFR bezeichnet und befinden sich nur auf spezifischen Zelltypen, was die Responsivität gegenüber dem einwirkenden Zytokin determiniert. Eine entsprechende Zuordnung von α - und β -Rezeptoren samt zugehörigen Interleukinen bietet die Abb. I.2.

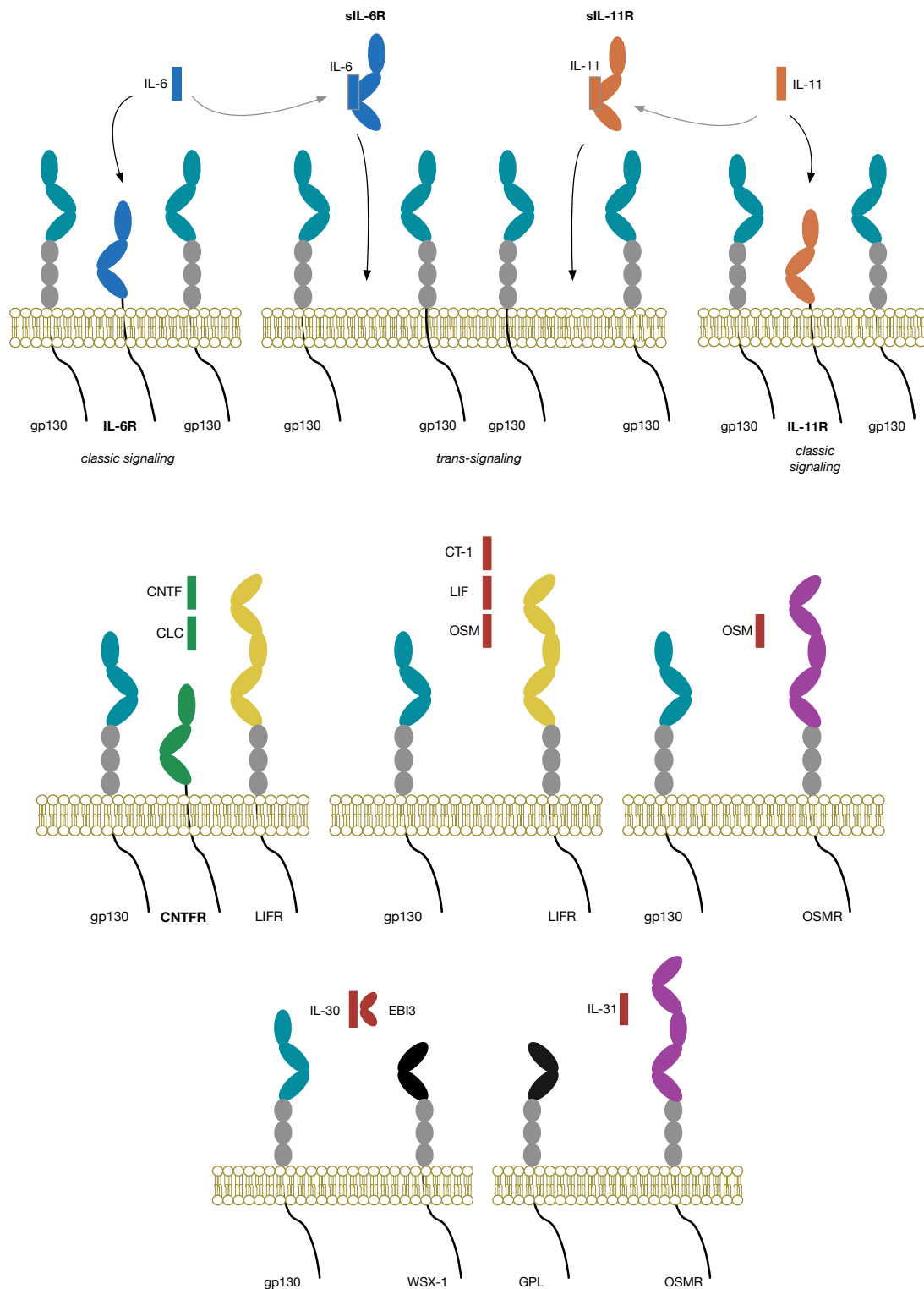


Abb. I.2: Zytokinrezeptorkombinationen in der IL-6-Familie.

Auffällig ist vor allem, dass beinahe alle Zytokine der IL-6-Familie das ubiquitär vorkommende gp130 zumindest singular für die Signaltransduktion nutzen.

IL-6 nutzt analog zu IL-11 als β -Rezeptor ein Homodimer aus gp130, während andere Zytokine die nur auf bestimmten Zellsorten vorkommenden Rezeptoren LIFR, OSMR oder WSX-1 sowie als α -Rezeptor den CNTFR benötigen.

Die intrazelluläre Signalkaskade verläuft allerdings in allen Fällen (mit Ausnahme von IL-27) primär über STAT3, weniger über STAT1 und STAT5.

Allen IL-6-Typ-Zytokinen ist ihre sehr ähnliche strukturelle Morphologie gemeinsam, die klassischerweise als ein tetrahelikales Molekül mit 3 Verbindungsloops beschrieben wird. Innerhalb der Helices spricht man aufgrund ihrer dreidimensionalen Orientierung von einer *up-up-down-down*-Topologie, die bislang ausschließlich in Mediatorproteinen wie Zytokinen und Wachstumsfaktoren nachgewiesen werden konnte (Heinrich, Behrmann *et al.* 2003, Garbers und Scheller 2013). Eine schematische Zeichnung der Proteinfaltung ist in Abb. I.3 dargestellt.

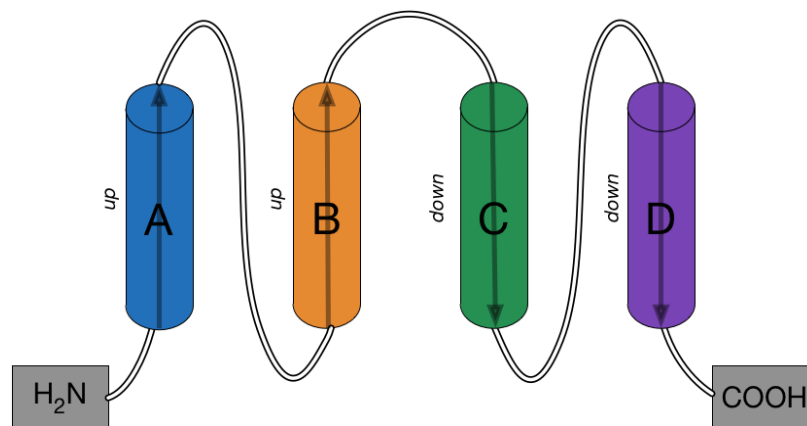


Abb. I.3: Schematische Darstellung eines IL-6-Typ-Zytokins

Die Helices des Zytokins sind farblich abgesetzt und mit den Buchstaben A bis D nummeriert. Die Orientierung der Helices ist durch die grauen Pfeile innerhalb der Helices und die entsprechende Randnotiz dargestellt, während die Verbindungsloops in weiß gezeichnet wurden. N- und C-Terminus sind jeweils in grau dargestellt.

3. Das Interleukin-6 und seine Physiologie

Der Namensgeber der Interleukin-6-Familie ist ein bereits 1986 typisiertes Zytokin, das 212 Aminosäuren lang ist und verkürzt als IL-6 bezeichnet wird (Hirano, Yasukawa *et al.* 1986). Es handelt sich um ein Protein mit pro- und antiinflammatorischen Wirkungen, das von Makrophagen und anderen Immunzellen ausgeschüttet wird und früher wegen seiner Wirkung auf B-Lymphozyten auch unter den Namen B-Zell-Stimulationsfaktor-2 (BSF-2) und Interferon Beta-2 (IFN β 2) bekannt war (Ferguson-Smith, Chen *et al.* 1988).

Seine Signaltransduktion erfolgt über einen membranständigen α -Rezeptor aus der Klasse der Immunglobulin-Superfamilie, der als Interleukin-6-Rezeptor (IL-6R, gp80) bezeichnet wird. Dieser Rezeptor findet sich auf T- und B-Lymphozyten, hämatopoetischen Zellen und Epithelien. Er weist 3 extrazelluläre Domänen auf, von denen die Domäne 1 (D1) als Immunglobulin-ähnlich beschrieben wird. Die Domänen 2 und 3 (D2/D3) sind Zytokin-Binderegionen (*cytokine-binding homology region*), an welche sich die intrazelluläre Domäne (*intracellular domain*, ICD) anschließt (Lupardus, Skiniotis *et al.* 2011).

Da die α -Rezeptoren der IL-6-Familie nicht signalkompetent sind, rekrutieren sie als β -Rezeptoren noch ein Dimer aus auf der Zelloberfläche lokalisierten Membranproteinen. Dies ist im Fall von IL-6 ein Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 130 kDa (gp130), welches für die intrazelluläre Signalkaskade verantwortlich ist. Es besteht aus 6 nach extrazellulär ragenden Domänen, die analog zu den Domänen 1-3 des IL-6R als Immunglobulin-ähnlich (D1) sowie Zytokin-Binderegion (D2/D3) bezeichnet werden. Basal liegen die Domänen 4-6 (D4-6), die als Fibronectin-III-ähnlich bekannt sind (Lupardus, Skiniotis *et al.* 2011). Im intrazellulären Bereich befinden sich Bindungsstellen für Rezeptor-assoziierte Tyrosinkinasen und STAT-Faktoren (Heinrich, Behrmann *et al.* 1998, Pilati und Zucman-Rossi 2015). Nach Aktivierung von gp130 kommt es, wie in Abschnitt I.1. beschrieben, zu einer Aktivierung der Transkriptionsfaktoren der STAT-Familie. Dies sind vor allem der Subtyp STAT3, aber auch in geringerem Umfang STAT1 und STAT5, sodass innerhalb der Signaltransduktion auch häufig von einer „IL-6-gp130-Jak-STAT-Achse“ die Rede ist (Garbers, Aparicio-Siegmund *et al.* 2015).

Neben den genannten kanonischen Signalwegen sind ebenfalls Aktivierungen des Ras-Raf-MAP-Kinase- und des Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase (PI3K)-Wegs zu erwähnen,

wobei für den Ras-Raf-MAPK-Signalweg die Phosphatase SHP-2 in phosphorylierter Form aus JAK1 den Signalweg in Gang setzt (Rose-John 2012).

Unabhängig von der intrazellulären Signalkaskade bezeichnet man diesen Signalweg als *classic signaling*.

Demgegenüber besteht bei Interleukin-6 eine Besonderheit. Im Rahmen von proteolytischen Prozessen, dem sog. *Ectodomain Shedding*, wird der membranständige Rezeptor von o. g. Zellen durch Metalloproteinasen vom Typ ADAM17 und ADAM10 (ADAM: *A disintegrin and metalloproteinase*) losgelöst, sodass dieser in den Extrazellulärraum und ins Blut übergeht (Mullberg, Schooltink *et al.* 1993). Außerdem wird zu einem geringen Teil auch durch einen alternativen *Splicing*-Prozess direkt das verkürzte Protein intrazellulär synthetisiert und sezerniert. Man spricht in diesem Fall vom löslichen Interleukin-6-Rezeptor (*soluble* IL-6R, sIL-6R). Dieser ist extrazellulär in der Lage, an freies Interleukin-6 zu binden und so zum einen als Trägersubstanz für das Zytokin zu dienen, was seine Halbwertszeit massiv verlängert (Scheller, Garbers *et al.* 2014). Zum anderen ist er in der Lage, für Interleukin-6 nicht-responsive Zellen eine Responsivität zu erzeugen. Grund dafür ist, dass der IL-6/sIL-6R-Komplex durch ubiquitär vorkommende gp130-Moleküle jede erdenkliche Körperzelle aktivieren kann (Rose-John 2012). Dieser Signalweg wird als *trans-signaling* bezeichnet und bedient intrazellulär, analog zum *classic signaling*, in der Regel ebenfalls den *Jak-STAT pathway* (Rose-John und Heinrich 1994).

Da *classic signaling* und *trans-signaling* auf unterschiedlichen Zelltypen stattfinden, werden den beiden Varianten unterschiedliche physiologische Wirkungen zugesprochen. So wird das *classic signaling* vor allem mit positiven Effekten in Verbindung gebracht, wie z.B. der Einleitung der Akute-Phase-Reaktion, Differenzierung von B-Zellen und Proliferation von Hepatozyten (Scheller, Chalaris *et al.* 2011). Es besitzt weiterhin die Eigenschaften, endotheliale Zellverbände zur Proliferation anzuregen und ihre Apoptose zu unterbinden. In diesem Zusammenhang wirkt es im Pankreas auf intestinale L- und α -Zellen und ist in der Lage, durch die Sekretionsstimulation von GLP-1 auf das Fortschreiten von Diabetes mellitus Typ II regredient zu wirken (Ellingsgaard, Hauselmann *et al.* 2011).

Demgegenüber werden dem *trans-signaling* die eher negativen Eigenschaften chronischer Inflammationen und Autoimmunerkrankungen zugeordnet. Hier sind vor

allem die Genese und Chronifizierung von rheumatoider Arthritis, autoimmuner Enzephalomyelitis und multipler Sklerose zu nennen, die mit einer dauerhaften Aktivierung von Monozyten einhergehen (Scheller, Garbers *et al.* 2014).

Aus diesem Grund war und ist es Ziel, medikamentöse Antagonisten gegen das *trans-signaling* zu synthetisieren, um chronische Entzündungen möglichst früh bekämpfen zu können.

Im Jahr 2009 konnte der monoklonale Antikörper Tocilizumab (*RoActemra*, Fa. Roche Pharma AG) als potenter Inhibitor des IL6-/IL6R-Komplexes entwickelt werden, der an der *Site I* des IL-6R (Interaktion mit den Domänen 2 und 3; Lacroix, Rousseau *et al.* 2015) bindet und so eine Komplexbildung mit IL-6 inhibiert. Tocilizumab besitzt bereits eine EU-Zulassung für die Behandlung von mittelschwerer bis schwerer rheumatoider Arthritis als Kombinationspräparat mit Methotrexat oder in Monotherapie (Venkiteshwaran 2009). Auch gegen autoimmunen Lupus erythematoses wurde Tocilizumab erfolgreich eingesetzt, die Autoantikörperproduktion und der Krankheitsverlauf besserten sich merklich (Illei, Shirota *et al.* 2010). Die antiinflammatorische Potenz konnte im Rahmen einer ersten Studie ebenfalls bei Patienten mit Amyloidose (Courties, Grateau *et al.* 2015) nachgewiesen werden, weitere Studien zur Wirksamkeit gegen Amyloidose sollen folgen (ebd.).

Neben den monoklonalen IL-6R-Antikörpern sind seit kurzem auch monoklonale Antikörper gegen IL-6 in der Behandlung von Arthritis zugelassen. So konnte in ersten Phase-II-Studien gezeigt werden, dass Clazakizumab eine signifikante Verbesserung der klinischen Symptomatik von psoriatischer rheumatoider Arthritis aufweist (Mease, Gottlieb *et al.* 2016). Ähnliche Ergebnisse konnten in Studien ebenfalls zu rheumatoider Arthritis mit dem Antikörper Sirukumab festgestellt werden (Aletaha, Bingham *et al.* 2017, Pelechas, Voulgari *et al.* 2017). Beide Antikörper sind momentan in europäischen Zulassungsverfahren. Der monoklonale IL-6-Antikörper Siltuximab konnte in Studien die Proliferation von Prostata-Carcinomzellen inhibieren (Culig und Puhr 2017) und ist für die Behandlung der multizentrischen Castleman-Erkrankung (MCD) im Ausland bereits im Einsatz (Sarosiak, Shah *et al.* 2016).

Eine weitere Inhibitionsmöglichkeit bietet das Protein sgp130Fc, das als *trans-signaling*-spezifischer Inhibitor eingesetzt wird, da es durch seinen Aufbau aus

löslichem gp130 und der Fc-Domäne von IgG1a (vgl. Abb. I.4) in der Lage ist, die *trans-signaling* induzierenden IL-6/sIL-6R-Komplexe selektiv kompetitiv zu blockieren (Rose-John, Waetzig *et al.* 2007), während der klassische Signalweg nicht kompromittiert wird. Sgp130 wird im humanen Serum in Konzentrationen von 100-300 ng/ml als körpereigener Stoff gefunden, welches durch alternatives *Splicing* entsteht (Jones, Scheller *et al.* 2011).

Mit sgp130Fc wurden bereits präklinische Studien zu Colitis ulcerosa (Atreya, Mudter *et al.* 2000), rheumatoider Arthritis (Nowell, Richards *et al.* 2003) oder entzündlich bedingten Kolonkarzinomen (Becker, Fantini *et al.* 2005) durchgeführt, die jeweils signifikante Reduktionen der Symptomatik oder der Tumorprogression zur Folge hatten.

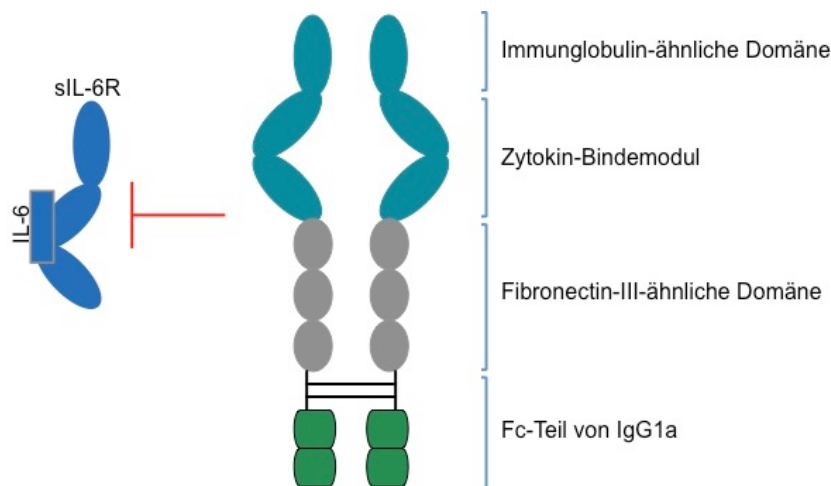


Abb. I.4: Aufbau des *trans-signaling* Inhibitors sgp130Fc

Dargestellt ist der kompetitiv wirksame *trans-signaling* Inhibitor sgp130Fc in schematischer Zeichnung. Er ist ein Fusionsprotein aus der extrazellulären Domäne von gp130 sowie dem Fc-Teil von IgG. Da Hyperzytokine über gp130 Signaltransduktion betreiben, kann ein Überschuss von sgp130Fc Hyperzytokine oder lösliche Rezeptor-Zytokinkomplexe (hier am Beispiel von IL-6/sIL6R) kompetitiv blockieren.

Neben den bereits genannten Möglichkeiten, konnte bereits 1993 eine nicht-humane Antikörperform isoliert werden, die mittlerweile als kleinste antigen-erkennende Domäne gilt und daher als *Nanobody* bezeichnet wird (Hamers-Casterman, Atarhouch *et al.* 1993). Diese monomeren Antikörper, die die variable Region von Schwerekettenantikörpern aus Kamelen, Lamas oder Haifischen enthält, werden auch als VHH (*variable domain of the heavy-chains of heavy-chains-only antibodies*) abgekürzt. Durch ihre kompakte, aber stabile Struktur sind sie in der Lage, durch die

singuläre VHH-Domäne an ihre Zielmoleküle zu binden und bieten so neben den humanen Immunglobulinen die Möglichkeit eines zusätzlichen *targetings* (Van Roy, Ververken *et al.* 2015). Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein IL-6R VHH als Inhibitor verwendet (vgl. Schemazeichnung in Abb. I.5).

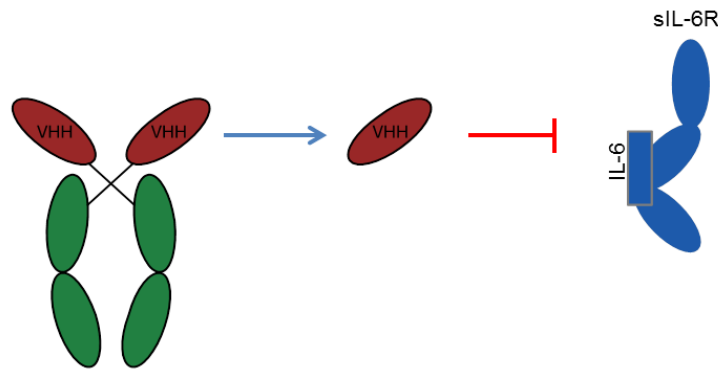


Abb. I.5: Aufbau des Inhibitors IL-6R VHH

In oben gezeigter Schemazeichnung ist ein Schwerekettenantikörper dargestellt, der in dieser Form nicht im humanen System, sondern ausschließlich bei Knorpelfischen und Kamelen vorkommt. Aus diesen Schwerekettenantikörpern werden die variablen Domänen (VHH) isoliert und als bislang kleinste antigenerkennende Domäne eingesetzt.

4. Das Interleukin-11 und seine Physiologie

Interleukin-11 ist ein 199 Aminosäuren großes, ebenfalls zur IL-6-Familie gehörendes Zytokin, das v. a. von Lymphozyten sezerniert wird. Seine typische, dem Interleukin-6 ähnliche Topologie aus ebenfalls 4 Helices und 3 interhelikalen Loops lässt Rückschlüsse auf seine dem IL-6 ähnelnde Morphologie zu. Demgegenüber liegt die sequenzielle Homologie von IL-11 zu IL-6 lediglich bei einer Übereinstimmung von 24% (Curtis, Hilton *et al.* 1997).

Die zugehörigen membranständigen α -Rezeptoren des Interleukins, die sog. Interleukin-11-Rezeptoren (IL-11R), befinden sich, neben den für Zytokine typischen Immunzellen, auf Osteoklasten, Kardiomyozyten und Epithelien (Putoczki und Ernst 2010). Der strukturelle Aufbau des Rezeptors ist wie beim IL-6R in eine Immunglobulin-ähnliche Region (D1), die Zytokinbinderegeion (D2/3) und die intrazelluläre Domäne (ICD) gegliedert.

Auch der IL-11R ist wie der IL-6R nicht signalkompetent und benötigt zur Transduktion ein gp130-Homodimer (vgl. Abb. I.6). Dieses ist in der Lage, über eine Rezeptor-assoziierte Tyrosinkinase (Jak) den Transkriptionsfaktor STAT3 zu phosphorylieren, sodass dieser als Dimer in den Nucleus der Zelle translozieren und die Genexpression modifizieren kann.

Neben diesem hauptsächlich verwendeten Jak-STAT-Signalweg werden außerdem noch der Ras-Raf-MAPK- sowie der PI3K/Akt-Signalweg in geringerem Maße bedient (Garbers und Scheller 2013).

Analog zu Interleukin-6 ist diese Signalwirkung als *IL-11 classic signaling* (Garbers und Scheller 2013) zu bezeichnen.

Bislang konnten im Unterschied zu Interleukin-6 bei Interleukin-11 lediglich erste Hinweise für *trans-signaling* über einen löslichen Interleukin-11R *in vivo* festgestellt werden (Robb, Hilton *et al.* 1996, Lokau, Nitz *et al.* 2016). Ein *Ectodomain Shedding* konnte durch die o.g. Metalloproteinasen der ADAM-Familie (ADAM 10) kürzlich an membranständigen IL-11-Rezeptoren nachgewiesen werden (Lokau, Nitz *et al.* 2016). Ein löslicher IL-11R (sIL-11R) konnte hierbei in ersten Serumproben in geringem pg/ml-Bereich detektiert werden.

Eine biologische Aktivität von künstlich hergestellten Komplexen aus IL-11 und seinem löslichen Rezeptor wurde bereits experimentell bewiesen (Pflanz, Tacke *et al.* 1999).

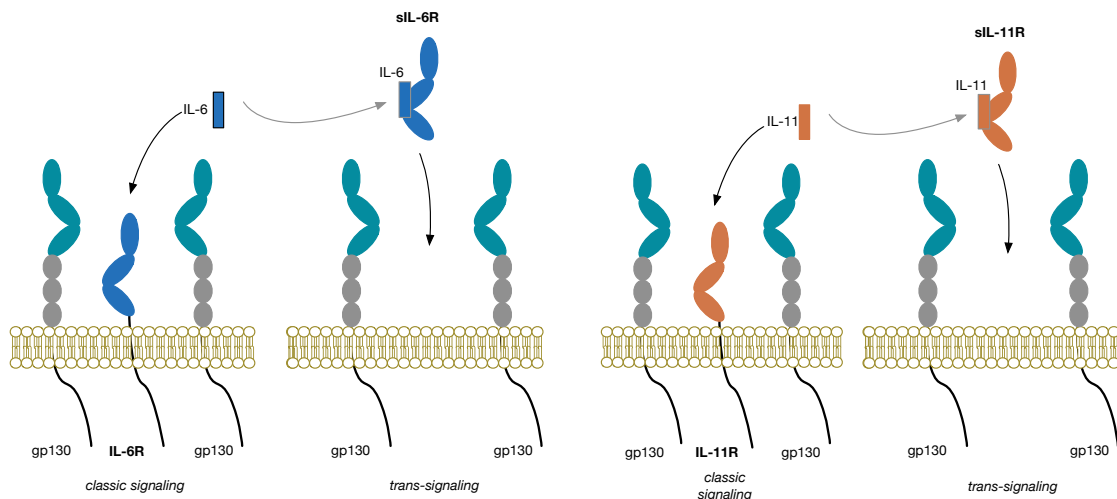


Abb I.6: Schematische Übersicht des IL-6 und IL-11 *classic* bzw. *trans-signaling*s

Wie in der oben gezeigten Darstellung zu erkennen ist, ist IL-6 in der Lage, sowohl an den membranständigen IL-6R als auch den durch *Ectodomain Shedding* und alternatives *Splicing* hervorgebrachten löslichen IL-6R (sIL-6R) zu binden. Beide Zytokin-Rezeptorkombinationen führen zu einer Rekrutierung eines gp130-Homodimers und lösen intrazelluläre Signalkaskaden aus.

Bei Interleukin-11 ist bislang lediglich das *classic signaling* gut beschrieben, lösliche IL-11R-Formen konnten allerdings auf mRNA-Ebene in Mäusen und auf Proteinebene in humanem Serum nachgewiesen werden.

Die Wirkung von IL-11 ist häufig regenerativer, d.h. antiinflammatorischer Natur. Man schreibt ihm Wirkungen bei der epithelialen Wundheilung zu. Außerdem ist IL-11, analog zu IL-6, auch an der Entwicklung und Differenzierung von myeloischen und megakaryozytären Zellen, z.B. Osteoblasten im Synergismus mit u.a. BMP-2 (Suga, Saitoh *et al.* 2004) beteiligt. In diesem Zusammenhang wurde IL-11 bereits früh eingesetzt, um die Chemotherapie-bedingte Thrombozytopenie durch seine thrombopoetische Wirkung zu therapieren (Dorner, Goldman *et al.* 1997).

IL-11 besitzt außerdem chondroprotektive Eigenschaften, da IL-1 vermittelte proinflammatorische Wirkungen in Anwesenheit von IL-11 deutlich abgeschwächt werden. Außerdem wurde auf durch Osteoarthritis geschädigten Chondrozyten eine ausgeprägte *Down-Regulation* der IL-11R-Dichte festgestellt (Yan, Kc *et al.* 2013).

Wie wichtig die Interleukin-Rezeptorinteraktion bei der Gewebedifferenzierung von knöchernen Strukturen und Epithelien ist, wurde z.B. im Rahmen einer Studie von der Forschergruppe um Nieminen *et al.* gezeigt. So wurde herausgefunden, dass ein SNP (*single nucleotide polymorphism*) in der IL-11R-DNA u.a. Craniosynostosen, Dentitio tarda und Hypodontie hervorruft (Nieminen, Morgan *et al.* 2011). Außerdem wurde

kürzlich ein antagonistischer Effekt von IL-11 auf die T_H17-vermittelte IL-17-Produktion in einem EAE-Modell (experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis, entspricht multipler Sklerose im Tierversuchsmodell) beschrieben (Figueiredo, Drohomysky *et al.* 2014). IL-11 scheint neben LIF außerdem während der Schwangerschaft an der endometrialen Implantation des Trophoblasten beteiligt zu sein. So konnte gezeigt werden, dass IL-11 einen großen Einfluss auf die Induktion des maternalen Gewebeumbaus hat (Dimitriadis, Robb *et al.* 2002). Weiterhin wurde herausgefunden, dass die Abwesenheit von IL-11 zu schwerwiegenden Folgen führt. Maternale IL-11 *Knockout*-Mäuse waren entweder infertil oder wiesen eine Störung im Zeitraum der Dezidualisierung, also des stromalen und vaskulären Umbaus, auf, woraus ein Schwangerschaftsabbruch resultierte (Paiva, Menkhorst *et al.* 2009).

Da es aber im Bereich der Wundheilung proliferativ wirkt, werden IL-11, wie vielen seiner proliferativ wirksamen Proteinverwandten, ebenfalls tumorprogressive Eigenschaften bei epithelialen Tumoren zugeschrieben. Grund hierfür ist, dass Antionkogene durch die Aktivierung des IL-11-gp130-STAT3-Signalwegs durch die Einleitung der Proliferation unterdrückt werden (Ernst und Putoczki 2014).

Auch für Interleukin-11 ist es im Rahmen der Zytokinforschung sinnvoll, medikamentöse Therapien für IL-11-vermittelte Erkrankungen, vor allem im Bereich der Onkologie, zu finden. So konnte bereits vor einiger Zeit ein monoklonaler Antikörper gegen gp130 auf hepatozellulären Adenomzellen entwickelt werden, der u.a. IL-11-Signaling blockiert (Sommer, Effenberger *et al.* 2012).

Die Entwicklung spezifischer IL-11- bzw. IL-11R-Antikörper oder -Inhibitoren wäre in der künftigen Forschung wünschenswert.

II. AUFGABENSTELLUNG UND ZIELSETZUNG

1. Intein-vermittelte Hyper-Interleukin-11-Expression

1.1. Definition des Begriffs „Hyperzytokin“

Unter dem Begriff „Hyperzytokine“ sind synthetisch hergestellte Fusionsproteine zu verstehen, die aus einem Zytokin und seinem löslichen Rezeptor hergestellt werden. Als Verbindungsstück dient ein meist wenige Aminosäuren langes Linkerpeptid, welches die beiden Komponenten kovalent miteinander verknüpft und eine Interaktion durch räumliche Nähe fördert bzw. erzwingt. Als erstes Hyperzytokin konnte Hyper-Interleukin-6 im Jahr 1997 erstellt werden (Fischer, Goldschmitt *et al.* 1997).

Hyperzytokine benötigen durch den inbegriffenen Rezeptor keinen membranständigen α -Rezeptor mehr und haben durch die sterische Anordnung eine stark erhöhte Wirksamkeit, die im Vergleich zum Interleukin-Rezeptorkomplex ca. 100-1000fach erhöht ist (Peters, Blinn *et al.* 1998).

Das Designerzytokin Hyper-Interleukin-6 (H-IL-6) zeigt nicht nur eine stark erhöhte Aktivität im Vergleich zu einem IL-6/IL-6R-Komplex. Es konnte auch bewiesen werden, dass dieses Hyperzytokin in der Lage ist, spezifisch IL-6 *trans-signaling* zu induzieren (Fischer, Goldschmitt *et al.* 1997, Rose-John 2012, Scheller, Garbers *et al.* 2014). Damit ist Hyper-IL-6 ein wichtiges molekulares Werkzeug, um *trans-signaling*-Effekte zu untersuchen.

Um zwischen den zellulären Effekten bzw. Phänotypen von IL-6 *classic* und *trans-signaling* zu unterscheiden, gab es bislang unterschiedliche Ansätze, diese zu erklären. Hierbei wurde davon ausgegangen, dass auf physiologischem Weg sowohl der IL-6R als auch der sIL-6R aktiviert wird und somit keine klare Differenzierung zwischen *classic* und *trans-signaling* erfolgen kann.

Bei Versuchen mit transgenen Mäusen mit dem *trans-signaling*-Inhibitor sgp130Fc konnte eine Verringerung der entzündlichen Parameter festgestellt werden, was darauf hindeutet, dass das für chronische Inflammationen typische *trans-signaling* analog zu den *in vitro*-Versuchen blockiert wird. Hiermit konnte allerdings lediglich ein Nachweis des *trans-signaling*-Knockouts im Negativbild erbracht werden (Rabe, Chalaris *et al.* 2008).

Ebenfalls wurden für das γ -Herpesvirus HHV-8 (auch Kaposi-Sarkom-assoziiertes Herpesvirus, KSHV) produzierende virale Interleukin 6 (vIL-6) transgene Mäuse erzeugt (Suthaus, Stuhlmann-Laeisz *et al.* 2012). vIL-6 weist eine Homologie von ca. 25% zum humanen IL-6 auf (ca. 48% ähnlich; Molden, Chang *et al.* 1997) und ist in der Lage, obgleich mit deutlich geringerer Affinität, ebenso wie Hyper-IL-6, ohne membranständigen IL-6R direkt an das gp130-Homodimer zu binden und ein intrazelluläres Signal zu vermitteln (Adam, Rabe *et al.* 2009). Hierbei konnte festgestellt werden, dass Dosen oberhalb eines Grenzwerts von 130 ng/ml vIL-6 für die Mäuse zu einem letalen Ausgang führten (Suthaus, Stuhlmann-Laeisz *et al.* 2012). Da Hyperzytokine gegenüber vIL-6 deutlich gesteigerte Aktivitäten zeigen, darf angenommen werden, dass hier ebenfalls letale Dosen in einem niedrigen Konzentrationsbereich existieren.

In vivo-Analysen von Hyperzytokinen in transgenen Tieren wurden bislang nicht veröffentlicht. Unveröffentlichte Daten von *in vivo*-Untersuchungen deuten aber darauf hin, dass durch die massiv gesteigerte Wirksamkeit des Zytokins die Versuchstiere entweder eine toxizitätsbedingte letale Dosis erhalten oder die übertragenen Gene nicht abgelesen bzw. unterdrückt werden, also einem *gene silencing* unterliegen (Huang, Narayanaswamy *et al.* 2012).

Diese Annahme ist Voraussetzung für das ab Kap. II.1.4 dargestellte Intein-Modell von Hyper-Interleukin-11, da über dieses möglicherweise nicht-toxische Varianten bzw. Vorstufen erstellt werden können.

1.2. Erläuterung zu Hyper-Interleukin 11

Um *trans-signaling*-Effekte zu untersuchen, haben sich Hyperzytokine als ausgezeichnete Werkzeuge erwiesen. Darum wurde zusätzlich zu bereits im Labor vorhandenen Hyper-IL-6-Expressionsplasmiden ein Hyper-IL-11-Expressionsplasmid erstellt (Fischer, Goldschmitt *et al.* 1997).

Hyper-Interleukin-11 (H-IL-11) wird als Fusionsprotein aus Interleukin-11 über ein 17 Aminosäuren langes Linkerpeptid (PPARGGGGSGGGGSVEP) mit dem sIL-11R verbunden (vgl. Schema in Abb. II.1). Zum besseren Nachweis soll das Protein zwei *tags* (Myc, Fc) besitzen, sodass ein antikörperbasierter Nachweis leichter durchführbar ist. Der Fc-*tag* kann weiterhin zur Proteinreinigung mittels Affinitätschromatographie

genutzt werden. H-IL-11 soll in seiner vollständigen Form als Referenz und Standard für weitere Versuche dienen.

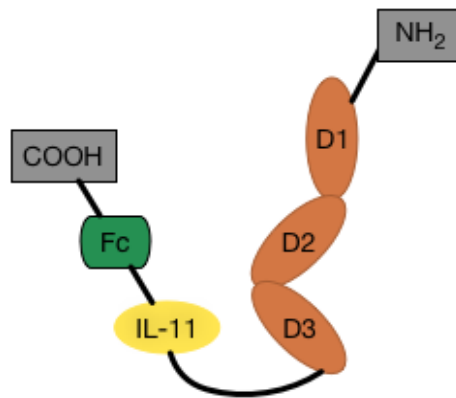


Abb. II.1: Schemazeichnung von H-IL-11-Fc

Interleukin 11 (gelb) ist über ein 17 AS langes Peptid kovalent an die drei extrazellulären Domänen (D1-D3, orange) des sIL-11R gebunden. Das so generierte Hyperzytokin benötigt zur Signaltransduktion ausschließlich den β -Rezeptor gp130. Um den Nachweis und eine Proteinreinigung zu ermöglichen, enthält H-IL-11 einen Fc-tag (grün). N- und C-Terminus sind in grau dargestellt.

1.3. Erläuterung des Begriffs „Inteine“

Unter dem Begriff der Inteine (engl. *inteins* = ***internal proteins***) versteht man physiologisch vorkommende Proteine, die spontan oder durch unterschiedliche Stimuli in der Lage sind, sich aus vorhandenen Proteinen posttranslational herauszuspleißen. Es sind mittlerweile mehr als 500 Inteinmoleküle bekannt (Perler 2002), die in allen Lebensformen vorkommen.

Im Rahmen ihres Spleiß-Mechanismus werden zwei Motive, das N- und das C-Intein, benötigt, die eine hohe Affinität zueinander aufweisen. Neben den auf einem Genabschnitt kodierten Inteinen unterscheidet man hiervon die auf zwei verschiedenen Gensequenzen befindlichen Split-Inteine. Dabei bestehen Split-Inteine aus einem N-terminalen (Int^{N}) und einem C-terminalen (Int^{C}) Genprodukt. Bei beiden Varianten wird die dreidimensionale Anordnung des Moleküls verändert, sodass das Intein die beiden N- und C-terminal gelegenen Aminosäuresequenzen, genannt Exteine, in räumliche Nähe zueinander bringt. Diese Nähe und die Morphologieänderung des Inteins bewirkt nun, dass eine endogene Proteaseaktivität des Inteins aktiviert werden kann und die beiden Exteinanteile miteinander durch eine kovalente Peptidbindung miteinander verknüpft werden können.

Diese Affinität ermöglicht es ihnen, sich bei Coexpression unter physiologischen Bedingungen nach dem Schlüssel-Schloss-Prinzip zu finden und über einen sog. *capture and collapse*-Mechanismus (Shah, Eryilmaz *et al.* 2013) die o.g. Konformationsänderung und die damit verbundene Splicing-Reaktion (sog. *protein trans-splicing*) in Gang zu setzen (vgl. Abb. II.2).

Split-Inteine bieten im Bereich der Zytokine die Möglichkeit, toxische sekretorische Proteine in inaktiven Vorstufen zu synthetisieren und diese dann posttranslational zu funktionsfähigen Proteinen zu fusionieren.

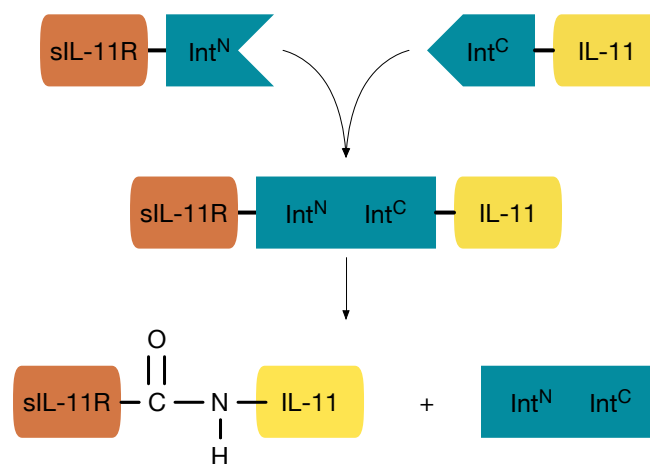


Abb. II.2: Schemazeichnung Inteine am Beispiel von Hyper-IL-11

Inteine sind in der Lage, ihren zugehörigen Konterpart zu finden, da ihre Affinität zueinander eine Bindung auslöst. Anschließend spleißen sie sich selbst aus dem Fusionsprotein heraus und verknüpfen die beiden Exteine, hier IL-11 und sIL-11R, mit einer Peptidbindung.

Int^N: N-terminales Intein **Int^C:** C-terminales Intein

1.4. Verwendung von Inteinen zur Generierung von biologisch aktivem Hyper-Interleukin-6

Im Rahmen des Forschungsprojektes „Intein-vermittelte Expression von Hyperzytokinen“ haben Vorarbeiten bereits gezeigt, dass eine Proteinligation durch funktionsfähige Split-Inteine (IMPDH, gp41-1) zu einem Fusionsprotein im Bereich der Hyperzytokine möglich ist (Homey 2013, Wehmöller 2014). Die Zielsetzung des Forschungsprojekts war, biologisch aktives Hyper-IL-6 durch die Fusion der beiden

Anteile des Zytokins und des zugehörigen Rezeptors durch die spontane inteinvermittelte Proteinligation zu ermöglichen.

Hierbei wurden Hyper-Interleukin-6-Varianten erstellt, die aus Int^C-IL-6-Fc mit dem sIL-6R-L-Int^N-KDEL entstanden (sog. Nonsplit-Variante). Durch den Aufbau der Fusionsproteine wurde sichergestellt, dass vor erfolgtem *intein-splicing* der sIL-6R durch das fusionierte ER-Retentionssignal (KDEL) im ER verbleibt. Erst nach *intein-splicing* wird demnach aktives Hyper-IL-6 sezerniert. Dabei zeigte das erzeugte Fusionsprotein eine vergleichbare biologische Aktivität zu regulär produziertem Hyper-IL-6.

Außerdem wurden Varianten der Fusionsproteine erstellt, die in inaktivem IL-6 resultieren, welches nach Intein-vermittelter Proteinligation wieder aktiviert wurde. Diese Varianten werden nachfolgend als Split²-Hyperzytokine bezeichnet und durch Teilung (*Split*) von IL-6 an verschiedenen Positionen in den Verbindungsloops zwischen den Helices A, B, C und D erreicht (vgl. Abb. II.3). Ein *Split* von IL-6 zwischen der B- und der C-Helix durch Erstellung von Int^C-IL-6_{AB}-Fc und sIL-6R-L-IL-6_{CD}-Int^N-KDEL-Varianten resultierte in aktivem Hyperzytokin nach erfolgter Intein-vermittelter Proteinligation. Die Spaltung des Zytokins hat das Ziel, die Induktion von *classic signaling* durch Nichtvorhandensein eines vollständigen IL-6-Moleküls zu unterbinden und somit ausschließlich Effekte des *trans-signalings* beobachten zu können.

Durch Mutagenese konnte gezeigt werden, dass alleine die Intein-vermittelte Proteinligation zur Bildung des Hyper-Interleukin-6 führt. Die Mutationen wurden durch Aminosäureaustausch im Bereich der Intein-Sequenz sowohl im N-terminalen, rezeptorseitigen, als auch im C-terminalen, zytokinseitigen Anteil durchgeführt. Durch die Mutationen war keine Hyperzytokinbildung in Western Blots oder Zellviabilitätsassays detektierbar, sodass eine mögliche Zellaktivierung durch Komplexbildung ausgeschlossen werden konnte (Wehmöller 2014).

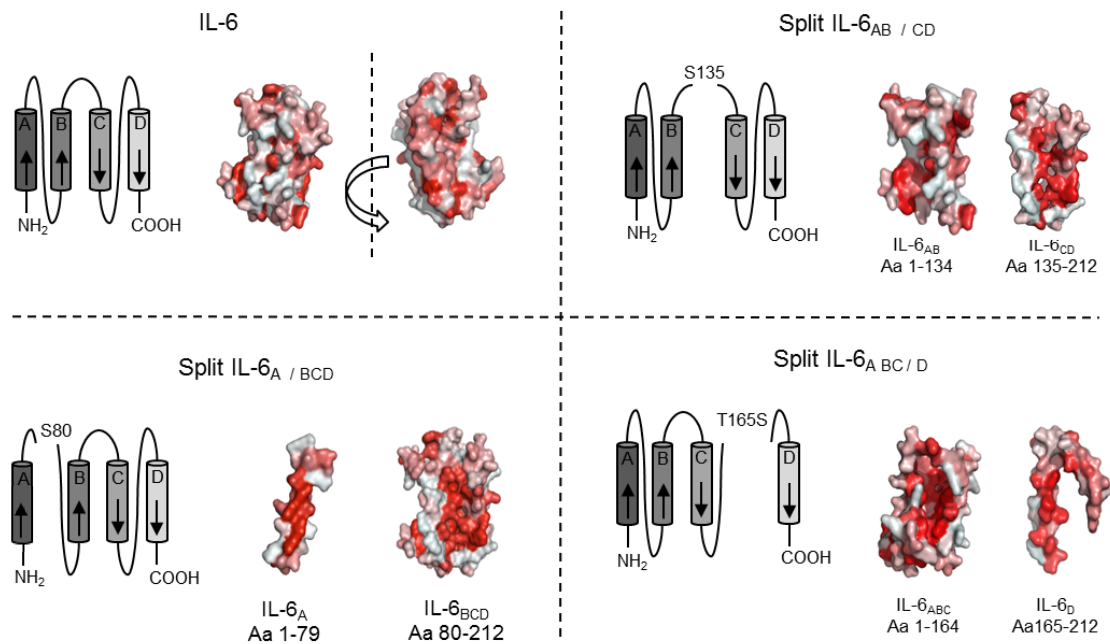


Abb. IL.3: Schemazeichnung IL-6 mit Split-Stellen (A/BCD, AB/CD, ABC/D)

In dieser schematischen Darstellung ist die Topologie eines IL-6-Zytokins mit seiner charakteristischen tetrahelicalen Struktur und den drei Verbindungsloops aufgezeigt. Klassischerweise werden die Helices vom N- zum C-Terminus mit den Buchstaben A bis D nummeriert und weisen aufgrund ihrer Orientierung im Raum eine sog. *up-up-down-down*-Topologie (hier durch schwarze Pfeile angedeutet) auf. Die Split-IL-6 AB/CD-Variante, also die Trennung im BC-Loop, erfolgte am Serin 135 (S135). Weitere Split-Möglichkeiten waren das Serin 80 (S80 für A/BCD) und das Threonin 165, das zum Serin (T165S für ABC/D) mutiert wurde (Moll, Wehmöller *et al.* 2017).

1.5. Weiterführung des Projektes „Intein-vermittelte Expression von Hyperzytokinen“

1.5.1. Herstellung der I-H-IL-6_{A/BCD}-Variante

Um das oben genannte Projekt fortzuführen, sollte initial die noch ausstehende Variante von Intein-Hyper-IL-6_{A/BCD} kloniert und *in vitro* getestet werden. Analog zu den in der Vorstudie durchgeführten Analysen zu I-H-IL-6_{AB/CD} und I-H-IL-6_{ABC/D} sollten in diesem Rahmen die Intein-vermittelte Hyper-IL-6-Expression per Western Blotting und im Anschluss die biologische Aktivität in Zellaktivitätsassays überprüft werden.

1.5.2. Erstellung von Intein-IL-6R-ΔKDEL-Varianten und Mutanten

Um die Entstehung von Intein-Hyper-Interleukin-6 besser zu verstehen, sollte das zelluläre ER-Retentionssignal „KDEL“, das für die Aminosäuren Lysin-Aspartat-Glutamat-Leucin kodiert, durch Klonierung entfernt werden. Hypothetische Konsequenz daraus sollte es sein, dass die normalerweise in der Zelle verbleibenden Rezeptoren durch Abspaltung des Signals sezerniert und so im Zellkulturüberstand nachweisbar sind.

Auch in diesem Rahmen sollte gezeigt werden, dass eine Mutation der Inteine zu einem Funktionsverlust der Intein-Hyper-Interleukin-6-Bildung führt. Insbesondere sollte überprüft werden, ob *inteinsplicing*-defiziente Split²-Hyperzytokinkomponenten, wie z.B. sIL-6R-IL-6_A-Int^N und Int^C-IL-6_{BCD}-Fc, in der Lage sind, nach Sekretion einen aktiven sIL-6R/IL-6-Komplex zu bilden.

1.6. Zielsetzung des Projekts

Ziel des Projektes war es, das bereits bei Hyper-Interleukin-6 etablierte inteinvermittelte Proteinligationssystem auf Hyper-Interleukin-11 auszuweiten und somit seine für sekretorische Proteine angenommene Wirkung allgemeingültig nachweisen zu können. Außerdem sollte auf diese Weise ein Expressionssystem geschaffen werden, welches durch inteinvermittelte Ligation von inaktiven Vorstufen die Produktion von aktivem Hyper-IL-11 ermöglicht. Dieser Ansatz könnte zu einem späteren Zeitpunkt die Etablierung von transgenen Mauslinien vereinfachen und somit eventuell *in vivo*-Analysen von Hyperzytokin-induziertem *trans-signaling* in der IL-6-Familie zu ermöglichen.

Hierbei sollten aus den bestehenden Plasmiden für Hyper-Interleukin-6 sowohl die I-H-IL-11- als auch die Split²-Variante I-H-IL-11_{AB/CD} erstellt werden. I-H-IL-11 setzte sich aus Int^C-IL-11-Fc und sIL-11R-Int^N-KDEL zusammen, während die Split-Variante mit der Spaltungsstelle im BC-Loop aus Int^C-IL-11_{AB}-Fc und sIL-11R-IL-11_{CD}-Int^N-KDEL bestand. Für die o.g. Spaltungsstelle wurde in der Vorstudie um Intein-Hyper-IL-6 die Position zwischen den Helices B und C als optimal ermittelt und ebenfalls für H-IL-11 ausgewählt.

Als Referenz sollte das neu generierte Hyper-Interleukin-11-Fc dienen. Die inteinvermittelte Hyperzytokinbildung sollte mittels Western Blotting analysiert

werden. Die gebildeten Hyperzytokine sollten anschließend in ihrer biologischen Aktivität durch Zellviabilitätsassays und Phospho-STAT3-Assays untersucht werden. Außerdem sollte das begonnene Intein-Hyper-IL-6-Projekt abgeschlossen werden, um auch endgültige Aussagen zu I-H-IL-6 A/BCD treffen zu können und mit den Δ KDEL-Modifikationen die bislang generierten Ergebnisse zu untermauern.

2. Der IL-11R dient als alternativer Rezeptor für IL-6

2.1. Definition der Begriffe „Plastizität“ und „Crosstalk“

2.1.1. Definition des Begriffs „Plastizität“

Unter dem Fachausdruck „Plastizität“ versteht man in der physiologischen Biologie die Veränderbarkeit von Zellen bzw. ihre Adaptation an verschiedene Gegebenheiten. So sind z.B. Muskel- oder Nervenzellen in der Lage, sich an unterschiedliche Situationen durch unterschiedliche zelluläre Verhaltensweisen anzupassen und dadurch verschiedene Funktionen auszuüben (Feldman 2009, Fuentes, Zuloaga *et al.* 2014). Diese flexible Anpassungsweise findet sich auch bei Rezeptoren auf der Zelloberfläche wieder, die die Möglichkeit besitzen, nicht nur im Sinne des Schlüssel-Schloss-Prinzips einen (alleinigen) Liganden zu binden, sondern sich innerhalb eines schmalen Bereichs an seinen Liganden anzupassen, sodass ein Rezeptor mehrere Liganden besitzen kann (Quintana, Soto *et al.* 2015).

2.1.2. Definition des Begriffs „Crosstalk“

Unter dem Begriff *Crosstalk* ist ein Verhalten von Rezeptorliganden zu verstehen, die nicht nur an ihrem ursprünglichen Hauptrezeptor eine Bindung aufweisen, sondern daneben noch Rezeptoren besitzen, an die sie, ggf. mit niedrigerer Affinität, binden und Effekte auslösen. Diese alternativen Rezeptoren können agonistisch, aber auch antagonistisch zum Primärrezeptor wirken. In der Regel finden sich im physiologischen System die verschiedenen Rezeptortypen nicht auf derselben Zelloberfläche, sondern bei unterschiedlichen Zelltypen (Schuster, Kovaleva *et al.* 2003, Salanga, O'Hayre *et al.* 2009). Im Bereich der IL-6-Familie konnte schon mehrfach ein *Crosstalk* nachgewiesen

werden (Schuster, Kovaleva *et al.* 2003, Garbers, Hermanns *et al.* 2012, Garbers, Spudy *et al.* 2013).

2.2. Zielsetzung des Projekts

Ziel des Projekts war es, Untersuchungen zum Verhalten von IL-6 in Bezug zum IL-11R anzustellen. Aufgrund einiger Studien (McFarland-Mancini, Funk *et al.* 2010, Sommer 2014) war der Schluss zulässig, dass IL-6 einen weiteren Rezeptor aufweist, über den es bei *Knockout* des normalerweise rekrutierten IL-6R Signaltransduktion betreibt. Wegen der hohen strukturellen Homologie zwischen IL-6 und IL-11 und der Analogie des benötigten gp130-Homodimers war die naheliegendste These, dass es sich als alternativen α -Rezeptor um den IL-11R handelt.

Daher wurde ein Hyperzytokin aus IL-6 und sIL-11R als initiales Instrument eingesetzt, um eine etwaige Interaktion nachzuweisen. Weiterführende Untersuchungen konnten im Anschluss mit rekombinanten Proteinen auf Zelllinien mit exogen hinzugefügtem und endogen vorhandenem IL-11R durchgeführt werden.

2.3. Untersuchungen zu Plastizität und *Crosstalk* bei IL-6 und IL-11R

Um etwaige *Crosstalk*-Phänomene zwischen IL-6 und dem IL-11R zu untersuchen, sollte ein Hyperzytokin konstruiert werden, das aus dem sIL-11R, einem Linker und IL-6 besteht. Da IL-6 ohne Bindung an seinen α -Rezeptor keinerlei Affinität zu gp130 besitzt (Garbers und Scheller 2013), kann ein solches Hyperzytokin nur dann eine biologische Aktivität entwickeln, wenn eine Bindung zwischen IL-11R und IL-6 stattfindet. Da sowohl IL-6 als auch IL-11 über gp130 ihre Signale transduzieren, können nun vergleichende Versuche mit Hyper-IL-6 durchgeführt werden.

III. MATERIAL UND METHODEN

1. Verwendete Materialien

1.1. Materialien für die DNA-Präparation

1.1.1. Nährmedien für Bakterien

Zur Kultivierung von Bakterien wurde *Lysogeny Broth*-(LB)-Medium (Fa. Carl Roth, Karlsruhe) verwendet.

Zusätzlich zum Flüssigmedium stellen mit Antibiotika versetzte Medium-Agarose-Platten eine wesentliche Basis dafür dar, Bakterienklone zu züchten und zu separieren. Sowohl LB-Medium als auch LB-Agarose wurden vor der Verwendung auf einen pH-Wert von 7,4 justiert und autoklaviert (Tabelle III.1).

Inhaltsstoff	Menge
Natriumchlorid	10 g
Pepton	10 g
Hefeextrakt	5 g
nur Platten: Agar	20 g
Wasser	ad 1000 ml

Tabelle III.1: Inhaltsstoffe LB-Medium und LB-Agarose-Platten.

1.1.2. Bakterienkulturen

Nach der Vorbereitung der Kulturmedien wurden für die Transformation chemisch-kompetente *Escherichia coli*-Bakterien (*E. coli*) vom Typ *XL1 blue* (Genotyp: recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac [F'proAB lacIqZΔM15 Tn10 (TetR)], Fa. Stratagene, La Jolla, CA, USA, heute Fa. Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) verwendet.

1.1.3. Antibiotika

Für die DNA-Präparation in Bakterien wurden folgende Antibiotika wegen der in den Plasmiden vorhandenen Resistenzgene eingesetzt:

Antibiotikum	eingesetzte Konzentration	Hersteller
Ampicillin	200 µg/ml	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Kanamycin	50 µg/ml	
Spectinomycin	50 µg/ml	

Tabelle III.2: Eingesetzte Antibiotika

1.1.4. Plasmide

Die verwendeten Plasmid-DNA-Abschnitte lagen entweder in der Arbeitsgruppe vor bzw. konnten modifiziert werden oder mussten durch eigene Initiative über PCR-generierte DNA-Sequenzen in die Zielvektoren kloniert werden. Hierbei fanden speziell für die Forschungsarbeit synthetisierte Oligonukleotide (s. Kap. III.1.1.6.) Anwendung, die über Restriktionsschnittstellen über *blunt*- oder *sticky-end*-Ligation mit dem zugehörigen Vektor verbunden wurden. Tabelle III.3 listet anhand der Aufgabenstellung aus Kap. II alle hergestellten Plasmide auf, die zugehörigen Klonierungsschemata befinden sich in Kap. IV.

Plasmidname	Kürzel	Plasmidherkunft
pcDNA3.1-sIL-11R-Linker-IL-11-Fc	H-IL-11-Fc	diese Arbeit
pcDNA3.1-sIL-6R-Linker-IL-6-Fc	H-IL-6-Fc	diese Arbeitsgruppe
pcDNA3.1-sIL-11R-Linker-IL-6-Fc	HZ ^C / Hybrid	diese Arbeit
pcDNA3.1-sIL-6R-Linker gggg – InteinN IMPDH GGSGGS-KDEL optimized	sIL-6R-IMPDH (#5)	diese Arbeitsgruppe
pcDNA3.1-SP-Intein C IMPDH-deltaMet-SGGGS-Linker-IL-6-Fc optimized	IL-6-IMPDH (#7)	diese Arbeitsgruppe

pcDNA3.1-sIL-11R-Linker gggg - InteinN IMPDH GGSGGS -KDEL optimized	IL-11R-#5 (nonsplit)	diese Arbeit
pcDNA3.1-SP-InteinC IMPDH delta Met SGSGGS Linker-IL-11-Fc optimized	IL-11-#7 (nonsplit)	diese Arbeit
pcDNA3.1-IL-11R(AflII-AgeI)-Linker gggg-IL-11 (1-117) -InteinN IMPDH GGSGGS -KDEL	sIL-11R AB/CD (Split-IL-11 N- term.)	diese Arbeit
pcDNA3.1-SP-InteinC IMPDH delta Met SGSGGS Linker-IL-11 (118-199)- Fc optimized	IL-11 AB/CD (Split-IL-11 C- term.)	diese Arbeit
pcDNA3.1-IL-11-KDEL-His	IL-11	diese Arbeitsgruppe
pcDNA3.1-IL-11R-Myc	IL-11R (#6001)	diese Arbeitsgruppe
pcDNA3.1-sIL-6R-Linker-IL-6(30-79)- InteinN IMPDH-KDEL	sIL-6R A/BCD	diese Arbeitsgruppe
pcDNA3.1-sIL-6R-Linker-IL-6(30- 134)-InteinN IMPDH-KDEL	sIL-6R AB/CD	diese Arbeitsgruppe
pcDNA3.1-sIL-6R-Linker-IL-6(30- 164)-InteinN IMPDH-KDEL	sIL-6R ABC/D	diese Arbeitsgruppe
pcDNA3.1-sIL-6R-Linker gggg – InteinN IMPDH GGSGGS-deltaKDEL	sIL-6R dKDEL (#5 dKDEL)	diese Arbeit
pcDNA3.1-sIL-6R-Linker-IL-6(30-79)- InteinN IMPDH-deltaKDEL	sIL-6R A/BCD dKDEL	diese Arbeit
pcDNA3.1-sIL-6R-Linker-IL-6(30- 134)-InteinN IMPDH-deltaKDEL	sIL-6R AB/CD dKDEL	diese Arbeit
pcDNA3.1-sIL-6R-Linker-IL-6(30- 164)-InteinN IMPDH-deltaKDEL	sIL-6R ABC/D dKDEL	diese Arbeit

pcDNA3.1-SP-InteinC IMPDH-deltaMet-SGGGS-Linker-IL-6 (80-212)-Fc optimized	IL-6-IMPDH A/BCD	diese Arbeitsgruppe
pcDNA3.1-SP-InteinC IMPDH-deltaMet-SGGGS-Linker-IL-6 (135-212)-Fc optimized	IL-6-IMPDH AB/CD	diese Arbeitsgruppe
pcDNA3.1-SP-InteinC IMPDH-deltaMet-SGGGS-Linker-IL-6 (165-212)-Fc optimized	IL-6-IMPDH ABC/D	diese Arbeitsgruppe
pMS-RQ-IL-11	IL-11_synth.	Fa. Thermo Scientific, Darmstadt
pMK-RQ-sIL-11R-L-IL-11(30-117)	H-IL-11_synth.	
pMK-IL-11 (118-199)	Split IL-11 MCherry Nb	

Tabelle III.3: Hergestellte und verwendete Plasmide

1.1.5. Enzyme

Alle benutzten Enzyme und Puffersysteme wurden den Herstellerangaben entsprechend eingesetzt. Bei Doppelenzymrestriktionen durch Restriktionsenzyme wurde auf eine Mindestenzymaktivität von je 50% im entsprechenden Puffersystem geachtet, sodass eine effiziente Restriktion gewährleistet war. Ausschlaggebend waren hier die Angaben des Herstellers aller verwendeten Enzyme, der Fa. Life Technologies, Darmstadt.

Restriktionsendonuclease		Polymerase
<i>AgeI</i> (<i>BshTI</i>)	<i>KpnI</i>	DreamTaq-DNA-Polymerase
<i>AflIII</i> (<i>BspTI</i>)	<i>NcoI</i>	Pfu-DNA-Polymerase
<i>BamHI</i>	<i>NotI</i>	Phusion-DNA-Polymerase
<i>EcoNI</i> (<i>XagI</i>)	<i>PmeI</i> (<i>MssI</i>)	weitere verwendete Enzyme
<i>EcoRI</i>	<i>PmlI</i> (<i>Eco72I</i>)	Polynukleotidkinase (PNK)
<i>HincII</i> (<i>HindII</i>)	<i>XbaI</i>	Alkalische Phosphatase (FastAP)
<i>HindIII</i>		T4-DNA-Ligase

Tabelle III.4: Verwendete Enzyme, aufgeschlüsselt nach Restriktionsendonukleasen, Polymerasen u.a.

1.1.6. Oligonukleotide

Als Oligonukleotide dienten synthetisierte Nukleotide der Fa. Eurofins Genomics, Ebersberg, deren Sequenzen im Folgenden aufgelistet sind:

Primername	DNA-Basensequenz (5' → 3')
Delta KDEL fw	GAGCGGCCTGAGACACGTG
Delta KDEL rev	TGCTCTAGACTATTCCAGCTCGATCAGCAG
sIL-11R fw AflIII	TAACCCCTTAAGACCATGAGCAGCAGCTGC
sIL-11R rev KpnI	CCGGGTACCCAGGCCTCCGGGCTCC
IL-11 fw AgeI	TAATAAACCGGTATCCCCAGACCCTCGGGCC
IL-11 rev NotI	CCCCAAGGGGTTATGCTAG

Tabelle III.5: Oligonukleotide und ihre Sequenzen

1.2. Materialien für die Synthese von rekombinanten Proteinen in Zellkulturen

1.2.1. Zelllinien

Für die vorliegende Arbeit wurden unterschiedliche, am Institut bereits etablierte, eukaryotische Zelllinien angewandt, um die in *E. coli* veränderten und amplifizierten DNA-Sequenzen zu exprimieren. Es wurden verwendet:

Name der Zelllinie	Beschreibung	Herkunft
COS-7	Nierenfibroblasten, adhärent, nicht-human (<i>Cercopithecus aethiops</i> , grüne Meerkatze), wegen der Persistenz einer Mutante des viralen SV40 T-Antigens gut für transiente Transfektionen geeignet	Leibniz-Institut, DMSZ Braunschweig
CHO-K1	Ovarielle Epithelzellen, adhärent, nicht-human (<i>Cricetulus griseus</i> , chinesischer Hamster), aufgrund der hohen Teilungsrate zum Aufbau einer stabilen Zelllinie geeignet	Leibniz-Institut, DMSZ Braunschweig

Tabelle III.6: Zelllinien und ihre Herkunft (Bereich Synthese rekombinante Proteine)

1.2.2. Nährmedien

Um die o.g. und in Kap. III.1.4.1 genannten Zelllinien zu kultivieren, kamen Nährlösungen zum Einsatz, welche in Tabelle III.13 zu finden sind.

1.3. Materialien für den Proteinnachweis

1.3.1. Sodiumdodecylsulfat-Gele und Größenstandard

Um mittels einer Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) Proteine entsprechend ihrer Größe voneinander zu trennen und anschließend zu detektieren, wurden für diese Untersuchung SDS-Gele genutzt, die aus einem 10%igen SDS-Trenngel und einem zugehörigen Sammelgel gegossen wurden. Die verwendeten Chemikalien sind in Tabelle III.13 zu finden.

1.3.2. Antikörper

Um im Rahmen eines Western Blottings unterschiedliche, mit sogenannten *tags* versehene Proteine nachzuweisen, bedient man sich einer Vielzahl von Antikörpern, die humanen und tierischen Ursprungs sind. In dieser Forschungsarbeit wurden folgende Antikörper verwendet:

Antikörper	Beschreibung	Lösungsmittel, WB-Verdünnung
anti-Fc-POD („31318“)	IgG human, polyklonal Hostspezies: Kaninchen Stock: 0,6 µg/µl Fa. Thermo Scientific, Darmstadt	5% BSA in TBS-T, 1:2000
anti-c-Myc („71D10“)	IgG human, monoklonal Hostspezies: Kaninchen Stock: 0,125 µg/µl Cell Signaling, Frankfurt a.M.	TBS-T-Milchpulver, 1:1000
anti-hIL-6Rα („4-11“)	IgG human, monoklonal Hostspezies: Maus	TBS-T-Milchpulver, 1:1000

	Stock: 1 µg/µl Herstellung: (Chalaris, Rabe <i>et al.</i> 2007)	
anti-P-STAT3 („Tyr705“)	IgG human, monoklonal Hostspezies: Kaninchen Stock: 0,2 µg/µl Cell Signaling, Frankfurt a.M.	5% BSA in TBS-T, 1:1000
anti-STAT3 („124H6“)	IgG human, monoklonal Hostspezies: Maus Stock: 0,2 µg/µl Cell Signaling, Frankfurt a.M.	TBS-T-Milchpulver, 1:1000
anti-hIL-11Rα („MAB1977“)	IgG ₁ human, monoklonal Hostspezies: Maus Stock: 0,5 µg/µl R&D Systems, Wiesbaden	TBS-T-Milchpulver, 1:1000
anti-mIL-11Rα („sc-393039“)	IgG ₁ mouse, monoklonal Hostspezies: Maus Stock: 0,2 µg/µl Santa Cruz Biotech., Heidelberg	TBS-T- Milchpulver, 1:1000
anti-Mouse-POD (Sekundär-AK) („A28174“)	IgG (H+L) human, polyklonal Hostspezies: Ziege Stock: 0,6 µg/µl Fa. Thermo Scientific, Darmstadt	TBS-T- Milchpulver, 1:5000
anti-Rabbit-POD (Sekundär-AK) („A27033“)	IgG (H+L) human, polyklonal Hostspezies: Ziege Stock: 0,6 µg/µl Fa. Thermo Scientific, Darmstadt	TBS-T- Milchpulver, 1:5000

Tabelle III.7: Antikörper und ihre eingesetzten Konzentrationen

1.4. Materialien für den Proteinfunktionstest

1.4.1. Zelllinien

Im Folgenden sind die verwendeten Zelllinien aufgeführt, die dazu dienen, die Funktion und Signaltransduktion der Zytokine zu überprüfen (Tabelle III.8).

Name der Zelllinie	Beschreibung	Herkunft
Ba/F3-gp130	Prä-B-Lymphozyt, nicht-adhärent, murin stabile Transduktion mit gp130, Stimulation mit Hyperzytokinen (u.a. H-IL-6) möglich	diese Arbeitsgruppe
Ba/F3-gp130-IL-6R	Prä-B-Lymphozyt, nicht-adhärent, murin stabile Transduktion mit gp130 und IL-6R, Stimulation mit IL-6 oder Hyperzytokinen möglich	diese Arbeitsgruppe
Ba/F3-gp130-IL-11R	Prä-B-Lymphozyt, nicht-adhärent, murin stabile Transduktion mit gp130 und IL-11R, Stimulation mit IL-11 oder Hyperzytokinen möglich	diese Arbeitsgruppe
K-562	Chronisch-leukämische Lymphoblasten, nicht-adhärent, human endogene Expression des IL-11R, Stimulation mit IL-11 möglich	Klinik für Frauenheilkunde des UK Düsseldorf (Prof. Dr. Neubauer)
HT-29	Colorektale Adenokarzinomdrüsenzellen, adhärent, human endogene Expression des IL-11R, Stimulation mit IL-11 möglich	Klinik f. Allgem., Viszeral- u. Kinderchirurgie des UK Düsseldorf (Prof. Dr. Stoecklein)
HepG2	Hepatozelluläre Karzinomzellen, adhärent, human Endogene Expression des IL-6R und IL-11R Stimulation mit IL-6 und IL-11 möglich	Leibniz-Institut, DMSZ Braunschweig

Tabelle III.8: Zelllinien und ihre Herkunft (Bereich Proteinfunktionstest)

1.4.2. Rekombinante Proteine und Inhibitoren

Zur Kultivierung der o.g. Zytokin-abhängig wachsenden Ba/F3-Zellen sowie für Zellviabilitäts- und Phospho-STAT3-Assays wurden rekombinante, gereinigte Proteine aus CHO K1-Zellen mit folgenden Stock-Konzentrationen eingesetzt:

Protein	Stock-Konzentration	Herkunft
IL-6	1,0 µg/µl	Inst. für Biochemie, CAU Kiel (Dr. Garbers)
IL-11	0,1 µg/µl	Inst. für Biochemie, CAU Kiel (Dr. Garbers)
H-IL-6	0,1 µg/µl	Inst. für Biochemie, CAU Kiel (Dr. Garbers)
IL-6-RFP	1,0 µg/µl	Inst. für Biochemie, RWTH Aachen (Prof. Dr. Müller-Newen)
Tocilizumab (<i>RoActemra</i>)	0,27 µg/µl	Fa. Roche, Grenzach-Wyhlen
IL-6R-VHH	1,05 µg/µl	diese Arbeitsgruppe
sgp130Fc	3,147 µg/µl	diese Arbeitsgruppe

Tabelle III.9: Eingesetzte rekombinante Proteine und Inhibitoren

1.5. Materialien für die Proteinquantifizierung

1.5.1. ELISA-Kits

Um eine Quantifizierung von Zellkulturüberständen aus COS-7-Zellen durchführen zu können, kamen mehrere ELISA-Kits zum Einsatz, die Durchführung der Enzymassays erfolgte nach den Angaben der Hersteller (vgl. Tabelle III.15).

1.5.2. Antikörper

Die Antikörper, die keinem kommerziell erworbenen Kit zugehörig sind, sind in folgender Auflistung genannt:

Antikörper	Beschreibung	ELISA-Verdünnung
anti-hIL-6R-biotinyliert („Baf227“)	IgG human, polyklonal Hostspezies: Ziege Stock: 0,2 µg/µl Fa. R&D Systems, Wiesbaden	1:1000 in PBS mit 1% BSA
anti-hIL-6Rα („4-11“)	IgG human, monoklonal Hostspezies: Maus Stock: 1 µg/µl Herstellung: Chalaris, Rabe <i>et al.</i> (2007)	1:1000 in PBS

Tabelle III.10: ELISA-Antikörper und ihre eingesetzten Konzentrationen

1.5.3. Rekombinante Proteine

Sofern ELISA-Kits eingesetzt wurden, sind darin Positiv-Standards enthalten, um die Funktionalität des durchgeführten Assays zu überprüfen.

Bei innerhalb der Arbeitsgruppe etablierten Verfahren konnten quantifizierte CHO-K1-Zellkulturüberstände (z.B. Hyper-IL-6) oder rekombinante Proteine (z.B. IL-6) zum Einsatz kommen (vgl. Tabelle III.9).

1.6. Allgemeine Verbrauchsmaterialien und Geräte

1.6.1. Verbrauchsmaterialien

Name	Größe / Besonderheit	Bezugsfirma
Cryotubes	Nunc, 2 ml	Thermo Scientific, Darmstadt
Einmal-Pipettenspitzen	10 µl, 200 µl, 1000 µl	Starlab, Hamburg
ELISA-Platte	96-well, Nunc	Thermo Scientific, Darmstadt
Eppendorf-Reaktionsgefäß	1,5 ml / 2 ml	Eppendorf AG, Hamburg
FACS-Röhrchen	Polystyrene Round-bottom tube 5 ml	Corning, Corning, USA

Falcon-Röhrchen	15 ml / 50 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Kombitips	Typ plus, 0,5 ml	Eppendorf, Hamburg
Nitrilhandschuhe NitraTex	Größe M	Ansell Healthcare, Brüssel
Pasteurpipetten	Natron-Kalkglas 150 mm	BRAND GmbH, Wertheim
PCR Reaktionsgefäße	PCR-Strips (Tube / Cap)	Starlab, Hamburg
Protein-A-Säule	HiTrap 1 ml	GE Healthcare, Solingen
PVDF-Membran	Porengröße 0,45 µm	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Sterilpipetten	Costar Stripette 2-25 ml	Corning, Corning, USA
Whatman-Cellulose- Papier		VWR Internat., Darmstadt
Zählkammer	TC10 2-Chamber-Slides	BioRad Techn., München
Zellkulturflasche	Rollerflasche, Polystyrol, 2125 cm ² , Filterschraub-verschluss	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zellkulturplatte	96-well (beschichtet)	TPP, Trasadingen, CH
Zellkulturplatte	CytoOne 96-well	Starlab, Hamburg
Zellkulturschale	8,7 cm	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zellkulturschalen	3,4 cm / 5,3 cm / 8,7 cm / 13,7 cm	TPP, Trasadingen, CH
Zell-Scraper	Cell Scrapers, steril, 27 cm	Greiner Bio-One, Frickenhausen

Tabelle III.11: Verwendete Verbrauchsmaterialien

1.6.2. Geräte

Für die vorliegende Untersuchung wurde eine Vielzahl von technischen Geräten benötigt. Folgende tabellarische Auflistung (Tabelle III.12) enthält die benutzten Geräte:

Gerät	Größe / Typ	Hersteller
Agarosegelelektrophoresekammer	Mini-Sub Cell GT Complete System	BioRad Laboratories, München
akkubetriebene Pipettierhilfe	Pipetus-Akku	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Chemolumineszenzkamera	ChemoCam Imager 3.2	Intas Science Imaging Instruments, Göttingen
Chromatographiesystem	ÄKTA prime plus	GE Healthcare Europe, Freiburg
CO ₂ -Inkubator	Brutschrank C 150	Binder, Tuttlingen
Durchflusszytometer	BD FACS Canto II	Becton Dickson GmbH, Heidelberg
Gefrierbehälter	Mr. Frosty	Thermo Scientific, Darmstadt
Gefrierschrank	Premium NoFrost	Liebherr, Rostock
Geldokumentationskamera	Intas iX Imager	Intas Science Imaging Instruments, Göttingen
Heizbad	Julabo sw21	Julabo, Seelbach
Kühlschrank	ProfiLine	Liebherr, Rostock
Lichtmikroskop	Axiovert 25	Carl Zeiss, Jena
Magnetrührer	MR Hei-Mix L Magnetrührer	Heidolph Instruments, Schwabach
Microplate Reader	Infinite M200 pro	Tecan, Crailsheim
Mikrowelle	NN-SD450W	Panasonic Marketing Europe, Wiesbaden
Multipipette	Typ Plus	Eppendorf, Hamburg
pH-Meter	Routine-Meter pH 526	WTW, Weilheim
pH-Meter Elektrode	SenTix Elektrode	WTW, Weilheim
Pipetten	Typ Research Plus	Eppendorf, Hamburg
Präzisionswaage	Kern EW 4200-2NM	Kern&Sohn, Balingen

Pumpe für die Sterilbank	Typ N811KN.18	KNF Neuberger, Freibg. (jetzt NeoLab, Heidelberg.)
Reagenzschüttler	Vibrofix VF1	Janke/Kunkel, Staufen
Rollerbottle-Halterung (Inkubator)	Integra Cellroll	Integra Bioscience, Biebertal
Rollmischer	RM5-30V	Ingenieurbüro CAT M. Zipperer GmbH, Staufen
Scanner	HP Scanjet 5530 photosmart scanner	Hewlett Packard, Böblingen
Schüttler für Gele	Kompaktschüttler KS10 / Wippschüttler WS5	Edmund Bühler GmbH, Hechingen
Schwenkinkubator	Multitron Standard	Infors, Bottmingen, CH
SDS-PAGE-Kammern	Mini-Protean Tetra Cell System	BioRad Laboratories, München
Spektrophotometer	NanoDrop 2000c	VWR Internat., Erlangen
Sterilbank	Mars Safety Class II	Labogene, Lynge, DK
Stromversorgung für Agarose- gelelektrophoresekammern	PowerPac Basic Power Supply	BioRad Laboratories, München
Stromversorgung für SDS-PAGE- Kammern	PowerPac HC High- current Power Supply	BioRad Laboratories, München
Thermocycler	PeqSTAR 96x Universal Gradient	VWR Internat., Erlangen
Thermomixer	Typ 5438 / comfort	Eppendorf, Hamburg
Trockenschrank	Function Line T6	Heraeus-Kulzer, Hanau
Ultratiefkühlschrank	Forma 900 Series	Thermo Scientific, Darmstadt
UV-Tisch Multiband 365/312 nm	40-TCP-26LM, 8 W	Bio-Budget, Krefeld
Vakuummembranpumpe	MPC 052Z	Gardner Denver Thomas GmbH, Ilmenau
Western-Blot Transfersystem	Transblot Turbo	BioRad Laboratories, München

Zellzählssystem	TC10 Automated Cell Counter	BioRad Laboratories, München
Zentrifuge	Typ 5424	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge	Labofuge 400R	Heraeus-Kulzer, Hanau
Zentrifuge (4°C)	Typ 5417R / 5810R	Eppendorf, Hamburg

Tabelle III.12: Angewandte Geräte und ihre Hersteller

1.6.3. Chemikalien, flüssige Verbrauchsmaterialien

Die Tabellen III.13 und Tabelle III.14 enthalten die verwendeten Chemikalien und gebrauchten Lösungen bzw. Puffer:

Chemikalien / Nährmedium	Hersteller
Acrylamid-Mix 30%	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Agarose	Bio Budget, Krefeld
Amersham ECL Prime	GE Healthcare Sciences, Solingen
Ammoniumpersulfat (APS)	Merck KGaA, Darmstadt
Bovines Serumalbumin (BSA)	Invitrogen, Oregon, USA
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich Chemie, München
<i>cOmplete</i> Protease-Inhibitor Cocktail	Roche Holding GmbH, Mannheim
Coomassie Brilliant Blue R-250	Life Technologies GmbH, Darmstadt
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich Chemie, München
<i>Dulbecco's Modif. Eagle Medium</i> (DMEM)	Life Technologies GmbH, Darmstadt
Essigsäure	Merck KGaA, Darmstadt
Ethanol	Merck KGaA, Darmstadt
Ethidiumbromid	AppliChem, Darmstadt
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma-Aldrich Chemie, München
Fetales Kälberserum (FCS)	Life Technologies GmbH, Darmstadt
<i>Gene Ruler 1kb</i> (Größenstandard für Agarosegelelektrophorese)	Life Technologies GmbH, Darmstadt
<i>Gene Ruler Express</i> (Größenstandard für Agarosegelelektrophorese)	Life Technologies GmbH, Darmstadt

Geneticin (G-418-Sulfat)	Genaxxon bioscience, Ulm
Gibco Trypsin / EDTA (0,025% Trypsin, 0,01% EDTA in PBS)	Life Technologies GmbH, Darmstadt
Glucose	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Glycerol	Serva Electrophoresis, Heidelberg
Isopropanol	AppliChem, Darmstadt
Kaliumacetat	Merck KGaA, Darmstadt
LB-Medium	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Magermilchpulver	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
β -Mercaptoethanol	AppliChem, Darmstadt
Methanol	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumchlorid	AppliChem, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Natriumfluorid (NaF)	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumhydroxid	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumorthovanadat (Na_3VO_4)	Merck KGaA, Darmstadt
NP-40	Sigma-Aldrich Chemie, München
<i>Page Ruler Prestained</i> (Größenstandard für SDS-PAGE)	Life Technologies GmbH, Darmstadt
<i>Penicillin-Streptomycin-Gemisch</i>	Genaxxon bioscience, Ulm
POD-Substrat	Roche Holding GmbH, Mannheim
Protein-A-Agarose-Beads	Roche Life Sciences, Grenzach-Wyhlen
<i>Roswell Park Memorial Institute Medium</i> (RPMI)	Life Technologies GmbH, Darmstadt
Streptavidin-HRP-Lösung	R&D Systems, Wiesbaden
Sucrose	Merck KGaA, Darmstadt
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich Chemie, München
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan Hydrochlorid (Tris HCl)	Life Technologies GmbH, Darmstadt
Triton X-100	Sigma-Aldrich Chemie, München
Trypan Blue Dye, 0,4%	BioRad Laboratories, München

Turbofect	Thermo Scientific, Darmstadt
Tween-20	Sigma-Aldrich Chemie, München
Ultra-low IgG fetales Kälberserum (<i>ultra low IgG</i> FCS)	Life Technologies GmbH, Darmstadt

Tabelle III.13: Chemikalien / Nährmedien

Puffer / Lösung	Zusammensetzung	
Blocking Puffer (ELISA)	5%	Sucrose
	1%	BSA
	50,0 ml	PBS
Blocking Puffer (WB, TBS-T-Milchpulver)	150,0 mM	NaCl
	10,0 mM	Tris-HCl, pH 8,0
	0,05%	Tween 20
	5%	Milchtrockenpulver
Destaining-Lösung (Coomassie-Gele)	700 ml	H ₂ O _d
	200 ml	Methanol
	100 ml	Essigsäure
DNA-Ladepuffer (Agarosegele)	20%	Glycerol in TBE-Puffer
	0,1%	Bromphenolblau
Elutionspuffer I (Proteinreinigung)	50,0 mM	Zitratpuffer, pH 3,25
Elutionspuffer II (Proteinreinigung)	50,0 mM	Zitratpuffer, pH 5,5
FACS-Puffer (Durchflusszytometrie)	1%	BSA in PBS
Laemmli-Puffer (5x)	125,0 mM	Tris-HCl, pH 6,8
	10%	SDS
	20%	Glycerol in TBE-Puffer
	5%	β-Mercaptoethanol
	1 Sp.	Bromphenolblau
	150,0 mM	NaCl
PBS (<i>Phosphate Buffered Saline</i> , pH 7,4)	8,0 mM	Na ₂ HPO ₄ , pH 7,4
	1,7 mM	NaH ₂ PO ₄ , pH 7,4

PBS-T	150,0 mM NaCl
	8,0 mM Na ₂ HPO ₄ , pH 7,4
	1,7 mM NaH ₂ PO ₄ , pH 7,4
	0,05% Tween 20
P-STAT3-Lysepuffer / <i>Mild Lysis Buffer</i> (MLB)	50,0 mM Tris-HCl, pH 7,4
	150,0 mM NaCl
	2,0 mM EDTA
	1% Triton-X-100
	1% NP-40
	1,0 mM Na ₃ VO ₄
	1,0 mM NaF
	1 Tabl. <i>cOmplete</i> Protease-Inhibitor
Sammelgelpuffer (SDS-PAGE)	30,3 g Tris-HCl, pH 6,8
	2,0 g SDS
SDS-Laufpuffer (SDS-PAGE)	25,0 mM Tris-HCl, pH 8,3
	192,0 mM Glycin
	0,1% SDS
SDS-Transferpuffer (WB)	25,0 mM Tris
	0,1% SDS
	20% Methanol
	192,0 mM Glycin
<i>Solution 1</i> (S1) (Mini-Präparation)	50,0 mM Glucose
	25,0 mM Tris-HCl, pH 8,0
	10,0 mM EDTA, pH 8,0
	100,0 nM RNase
<i>Solution 2</i> (S2) (Mini-Präparation)	0,2 M NaOH
	1% SDS
<i>Solution 3</i> (S3) (Mini-Präparation)	60 ml 5 M Kaliumacetat
	11,5 ml Essigsäure
	28,5 ml Wasser

<i>Staining-Lösung</i> (Coomassie-Gele)	2 g	Coomassie Brilliant Blue R-250
	400 ml	Methanol
	100 ml	Essigsäure
	500 ml	H ₂ O
<i>Stripping-Buffer</i> (WB)	62,5 mM	Tris-HCl, pH 6,8
	2%	SDS
	0,1%	β-Mercaptoethanol
TAE-Puffer (50x) (Agarosegele)	2 mM	Tris
	100 mM	EDTA
	1 M	Essigsäure
TBS (<i>Tris Buffered Saline</i>)	150 mM	NaCl
	10 mM	Tris-HCl, pH 8,0
TBS-T	150 mM	NaCl
	10 mM	Tris-HCl, pH 8,0
	0,05%	Tween 20
Trenngelpuffer (SDS-PAGE)	90,8 g	Tris-HCl, pH 8,4
	2,0 g	SDS

Tabelle III.14: Verwendete Lösungen und ihre Zusammensetzung

1.6.4. Kits

Tabelle IV.15 listet die gebrauchsfertigen, zum Einsatz gekommenen Kits auf:

Name	Hersteller	Funktion
<i>NucleoSpin Gel and PCR Cleanup</i>	Macherey-Nagel, Düren	PCR-Reinigung, Gelextraktion
<i>Nucleobond Xtra Midi</i>	Macherey-Nagel, Düren	DNA-Midi-Präparation
<i>Human IL-11 DuoSet ELISA</i>	R&D Systems, Minneapolis	ELISA-Set für hIL-11
<i>DuoSet Ancillary Reagent Kit 2</i>	R&D Systems, Minneapolis	Ergänzung zum ELISA-Set für hIL-11
<i>hIL-6-ELISA</i>	Immunotools, Friesoythe	ELISA-Set für hIL-6

Tabelle III.15: Kits

2. Angewendete Methoden

2.1. Methoden für die DNA-Präparation

2.1.1. Transformation chemisch-kompetenter *E. coli*-Bakterien

Um ein Plasmid über *E. coli* zu amplifizieren, wurden die bei -80°C eingefrorenen kompetenten Bakterien über 5 Minuten auf Eis aufgetaut und anschließend mit 2 µl (Retransformation eines bestehenden fertigen Plasmids) bzw. mit 5 µl (Transformation eines Ligationsansatzes) des Plasmids versehen und bei 42°C für 60 Sekunden hitzeaktiviert, damit das Plasmid aufgenommen werden konnte. Anschließend wurden die Zellen mit 500 µl Antibiotika-freiem LB-Medium versetzt und für 1 Stunde bei 37°C und 1000 rpm auf dem Thermomixer inkubiert. Nach Vollendung der Inkubationszeit wurden 100 µl der Bakterienkultur auf antibiotikahaltigen LB-Agar-Platten ausgestrichen und über Nacht für 14-16 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ im Inkubator gelagert.

Am Folgetag wurden die Platten auf angewachsene Bakterienkolonien hin überprüft. Bei durchgeführten Ligationen verwendete man zur Erfolgskontrolle i.d.R. eine sog. *mock*-Platte, die im Ligationsansatz zwar den geschnittenen Vektor, nicht jedoch das Insert enthielt, sodass sich diese Platte annähernd koloniefrei darstellte.

Angewachsene Bakterienkolonien konnten nun zur näheren Untersuchung einer Mini- oder Midi-Präparation unterzogen werden, um im ersten Schritt die Plasmid-DNA zu isolieren.

2.1.2. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die 1986 von Mullis *et al.* entwickelte *in vitro*-Methode zur „exponentiellen Amplifizierung“ (Mullis und Faloona 1987) von DNA-Sequenzen, die als *polymerase chain reaction* (PCR) bekannt wurde, gehört mittlerweile zu den Standardverfahren in biotechnologischen Labors.

Grundlegendes Prinzip bei der PCR ist, dass die DNA in einem ersten Schritt durch Erhitzung denaturiert und ihre Doppelstrangstruktur aufgelöst wird. Es resultieren daraus die nicht-helikalen Einzelstränge. Durch Zugabe von Oligonukleotiden, die spezifisch für die zu synthetisierende Sequenz hergestellt werden, einer hitzestabilen DNA-Polymerase sowie Desoxyribonukleosidtriphosphaten (dNTP), kann eine *in vitro*-Synthese von kurzen DNA-Abschnitten bis ca. 6000 bp erfolgen.

Die beiden hinzugegebenen *primer*, je ein Oligonukleotid in Sinnrichtung auf dem *Sense*-Strang (*forward primer*) und eins in Gegenrichtung auf dem *Antisense*-Strang (*reverse primer*), um das zu synthetisierende Areal zu begrenzen, binden hierbei an einer initialen Sequenz, die individuell verschieden ist. In der Folge lagern sich die in Lösung befindlichen Desoxyribonukleosidphosphate komplementär an beide Einzelstränge, die nun durch die hinzugegebene DNA-Polymerase zu einem vollständigen Doppelstrang verbunden werden.

Da die PCR eine Reihe von Zyklen durchläuft, wächst die neu generierte DNA exponentiell, sodass man von einer Kettenreaktion spricht (Mullis und Faloona 1987).

Durch eine Agarose-Gelelektrophorese kann der Erfolg einer PCR auf die richtige Anzahl an Basenpaaren getestet werden.

2.1.3. Restriktionsanalyse

Als Restriktionsanalyse bzw. Restriktionsverdau bezeichnet man die Spaltung der Plasmid-DNA durch Restriktionsendonukleasen.

Sie gehören zur Enzymklasse der Hydrolasen und spalten daher die DNA-Sequenz unter Anlagerung von Wasser. Da jedes Restriktionsenzym unterschiedliche Erkennungs- und Schnittsequenzen auf der DNA hat, erscheint es logisch, dass eine Vielzahl an verschiedenen kommerziell verfügbaren Enzymen für die wissenschaftliche Forschung angeboten wird.

Als Inserts bezeichnet man in diesem Zusammenhang die für eine biotechnologische Verfahrensweise relevante kodierende Region, die aus einem bestehenden Plasmid per Restriktionsdigestion ausgeschnitten oder über eine Polymerase-Kettenreaktion synthetisiert werden kann. Vektoren sind demgegenüber das Rückgrat des Plasmids, die u.a. die Antibiotikaresistenzgene tragen (Zhou und Gomez-Sanchez 2000).

Für einen Restriktionsverdau muss über eine Plasmidkarte die DNA-Sequenz des Plasmids genau bekannt sein. PC-Programme, wie z.B. *pDraw32* der Fa. AcaClone Software (verfügbar im World Wide Web), erleichtern die Übersichtlichkeit und bieten bereits vom Programm her die Möglichkeit, Restriktionsschnittstellen in der Plasmid-DNA zu erkennen.

Ein Restriktionsverdau sollte in der Folge so angesetzt werden, dass möglichst eindeutig ausgesagt werden kann, ob eine Klonierung erfolgreich war. Hierzu sollten die entstehenden Fragmente weder größentechnisch zu nah beieinander liegen, da dann eine

differenzierte Detektion nicht möglich ist, noch sollten sehr große bzw. kleine Fragmente enthalten sein, da diese auf dem Gel evtl. nicht darstellbar sind oder nicht von ungeschnittenem Plasmid unterschieden werden können.

Ein typischer Restriktionsverdau enthielte einen Vektor mit 4000-6000 bp, während das Insert mit evtl. angrenzenden Regionen bei 300-800 bp herausfällt. Hierzu kann entweder ein mehrfach schneidendes Enzym oder ein Mehrfachverdau mit mehreren kompatiblen Enzymen vorgenommen werden. Die Kompatibilität ergibt sich in der Regel aus dem zugehörigen Puffersystem, welches beim Hersteller erfragt werden muss.

In der Vorgehensweise der Digestion würde man beispielhaft in einem frischen Eppendorf-Reaktionsgefäß einen 10 µl-Ansatz herstellen, der zum einen etwa 1 µg der zu verdauenden DNA enthält, zum anderen 0,5 µl des Restriktionsenzym (entspricht 1 U/µg DNA) sowie 1 µl des zugehörigen Enzym-Puffers. Der Rest des Ansatzes wird mit destilliertem Wasser auf 10 µl aufgefüllt. Der Restriktionsverdau wird für mindestens 3 Stunden, besser jedoch über Nacht bei 37°C im Inkubator gelagert und am Folgetag über eine Agarose-Gelelektrophorese analysiert.

2.1.4. Plasmidpräparation

Die Plasmidpräparation stellt einen essentiellen Bestandteil der Klonierung dar, da nur so DNA aus Mikroorganismen gewonnen, gereinigt und isoliert werden kann. Im Rahmen der Forschungsarbeit wurden zwei verschiedene Varianten, die Mini- und die Midi-Präparation, angewendet, um die DNA aus *E. coli*-Bakterien zu isolieren (O'Sullivan und Klaenhammer 1993, Pich und Schubert 1993).

2.1.4.1. Mini-Präparation

Die Mini-Präparation der Mikroorganismen ist als initialer Selektionsvorgang gedacht. In diesem Vorgang nach Sambrook und Russell (2006) wurden auf LB-Agar-Platten gewachsene Bakterienkolonien mit einer Pipettenspitze aufgenommen und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß mit 2 ml LB-Flüssigmedium ohne Antibiotikum überführt. Anschließend ließ man die selektierten Klone auf einem Heizrüttler über Nacht bei 37°C inkubieren.

Am Folgetag wurden 100 µl des mikroorganismenhaltigen Mediums abgenommen und für eine spätere mögliche Midi-Präparation kühl bei 4°C gelagert. Aus dem restlichen

Medium wurden die Bakterien mittels einer Tischzentrifuge bei 3000 x g und Raumtemperatur für 5 Minuten zentrifugiert, sodass ein dichtes Zellpellet entstand. Der Überstand wurde daraufhin verworfen und das Zellpellet in 100 µl eisgekühlter S1-Lösung (Lösungen vgl. Tabelle III.14.) resuspendiert. Anschließend erfolgte die Zytolyse in 200 µl S2-Lösung bei Raumtemperatur. Hierbei war darauf zu achten, dass der Lysepuffer nicht länger als 5 Minuten auf den jeweiligen Proben verblieb. Abschließend wurde die Lyse mittels 150 µl kalter S3-Lösung je Reaktionsgefäß neutralisiert.

Alle so erstellten Proben wurden nun für 10 Minuten auf Eis inkubiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Die Flüssigkeit wurde anschließend mit 900 µl eisgekühltem, 96%igem Ethanol versetzt und bei 4°C und 13000 x g für 15 Minuten zentrifugiert, sodass sichtbare DNA-Pellets in den Gefäßen entstanden. Der Überstand wurde erneut verworfen und das Pellet in 500 µl 70%igem Ethanol aufgenommen und für 5 Minuten auf Eis inkubiert. Abschließend erfolgte eine erneute Zentrifugation bei 4°C und 13000 x g für 10 Minuten. Der Überstand wurde verworfen und das DNA-Pellet für 15 Minuten luftgetrocknet. Als letzter Schritt erfolgte die Resuspension der DNA in 30 µl destilliertem Wasser.

Um eine erfolgreiche Klonierung zu kontrollieren, wurde im Anschluss an die Mini-Präparation ein Restriktionsverdau durchgeführt.

2.1.4.2. Midi-Präparation

Midi-Präparationen dienen der Vermehrung von aus Minipräparationen hervorgegangenen Bakterienklonen oder von bestätigter DNA. Hierzu wurde das Kit *Nucleobond Xtra Midi-Kit* der Fa. Macherey-Nagel eingesetzt (vgl. Tabelle III.15). Die amplifizierten Plasmide wurden entsprechend den Herstellerangaben isoliert.

Bei zu alten Bakteriensuspensionen aus der Mini-Präparation oder einer Midi-Präparation ohne vorhergehende Mini-Präparation, erfolgte vorab eine Retransformation des Plasmids über eine LB-Agar-Platte.

2.1.5. DNA-Konzentrationsbestimmung

Um eine Standardisierung der Versuche, z.B. Restriktionsverdauen, Transfektion u.a., gewährleisten zu können, ist es notwendig, die in der Plasmidpräparation gewonnene DNA-Probe zu quantifizieren. Dies geschah über eine UV-Spektroskopie am NanoDrop 2000c, Fa. PeqLab, Erlangen, bei der über die Absorption der Lösung bei einem

Wellenlängenbereich von 230 bzw. 260 nm, der typisch für Nukleinsäuren ist, auf den DNA-Gehalt geschlossen werden kann.

2.1.6. Agarose-Gelelektrophorese

Um eine PCR auf ihre Produktivität hin zu überprüfen oder einen Restriktionsverdau auszuwerten, benötigt man eine Agarose-Gelelektrophorese, deren Prinzip es ist, die Trennung von unterschiedlich großen Fragmenten durch Anlegen einer Spannung durchzuführen.

Das Medium, in dem die Größentrennung (hier von DNA-Fragmenten) erfolgt, ist ein 1%iges Agarose-Gel, das mit Tris-Acetat-EDTA- (kurz TAE-) Puffer versetzt und erhitzt wurde. Dieses wurde anschließend in eine Form gegossen und mit 7-14 µl Ethidiumbromid (abhängig von der Taschengröße) versetzt. Das Ethidiumbromid interkaliert in die DNA und ermöglicht so eine Detektion per UV-Licht. Abschließend wurde das noch flüssige Medium mit einem sog. Kamm versehen, der später das Beladen des Gels durch Kammerbildung ermöglicht. Nach dem Abkühlen geht die TAE-Agarose in einen gallertartigen Zustand über und kann nach ca. 20-30 Minuten in eine mit TAE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer gelegt und mit den Proben und dem Standard beladen werden.

Der Standard (i.d.R. *GeneRuler Express*, Fa. Life Technologies, Darmstadt) dient der späteren Auswertung der Proben. Er enthält unterschiedlich große, genormte Fragmente, die ein Abschätzen der Fragmentgrößen der zu untersuchenden Proben ermöglichen.

Die DNA-Proben werden vor dem Beladen mit 6fach-Ladepuffer versetzt, die ein Fortschreiten der Gelelektrophorese sichtbar machen und gleichzeitig die Enzymwirkung der Restriktionsenzyme abstoppen.

Nach der Größentrennung der Proben wird das Gel aus der Kammer entnommen, um danach die DNA-Fragmente über eine UV-Kamera am PC zu detektieren.

2.1.7. DNA-Gelextraktion, Phosphorylierung, Dephosphorylierung

Das Verfahren der Gelextraktion ist eine alternative Methode der Auswertung einer Gelelektrophorese. Hierbei wird nicht lediglich nach der Größentrennung der DNA-Fragmente über das Agarose-Gel eine Bildauswertung mittels einer UV-Kamera vorgenommen, sondern im Vorfeld ein aus einem Plasmid herausgeschnittenes Fragment (Vektor oder Insert) aus dem Gel isoliert.

Hierzu wird die Gelkammer auf einen sog. UV-Tisch (Fa. Bio-Budget, Krefeld) gelegt, der die mit Ethidiumbromid markierten DNA-Fragmente sichtbar macht. Das gesuchte Fragment wird im Anschluss mit einem sterilen Skalpell aus dem Gel vorsichtig aber zügig ausgeschnitten, um andere DNA-Abschnitte aus der Isolierung auszuschließen. Das ausgeschnittene Fragment wird in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und aus der Gelmatrix extrahiert. Gelextraktionen von DNA-Fragmenten wurden mit dem *NucleoSpin Gel and PCR Cleanup*-Kit der Fa. Macherey-Nagel, Düren, durchgeführt. Anschließend wurde die Konzentration der DNA-Fragmente photometrisch bestimmt.

Gereinigte PCR-Produkte werden für den folgenden Einsatz einer Ligation phosphoryliert, d.h. ihnen werden durch Kinaseaktivität reaktionsfreudige Phosphatgruppen angehängt, um eine Bindung mit einem geschnittenen Vektor eingehen zu können. Hierzu werden 12 µl des PCR-Produkts mit 1 µl Polynukleotidkinase (PNK) und 2 µl T4-Ligasepuffer versehen und für 60 min im Inkubator bei 37°C gelagert. Die Verwendung des T4-Ligasepuffers verhindert, dass vor der Ligation eine erneute Reinigung der DNA von Puffern und Enzymen stattfinden muss. Um die Enzymaktivität zu stoppen, muss nach der Phosphorylierung die Lösung für 10 Minuten bei 65°C hitzeinaktiviert werden (Ligation Protocol der Fa. Thermo-Scientific 2012).

Eine entgegengesetzte Reaktion zur Phosphorylierung ist die Dephosphorylierung. Sie spaltet von Vektoren die reaktionsfreudigen Phosphatgruppen durch Hydrolyse der Phosphorsäureanhydridbindungen ab, um eine endogene Religation des Vektors zu verhindern. Diese Problematik besteht ausschließlich bei *blunt*-geschnittenen Vektoren. Obwohl über PCR-generierte Inserts ebenfalls *blunt*-geschnitten sind, besteht die Gefahr einer endogenen Ligation durch die geringe Größe der Inserts und der daraus resultierenden großen Ringspannung nicht.

Eine Dephosphorylierung erfolgt, sofern erforderlich, bereits nach dem Restriktionsverdau und vor der Gelelektrophorese. Hierzu wird dem Restriktionsansatz lediglich 1 µl der alkalischen Phosphatase (*FastAP*) zugesetzt und dieser wird erneut für mindestens 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wird über den darauffolgenden obligatorischen EDTA-enhaltenden 6fach-Ladepuffer abgestoppt und über die Gelextraktion von der DNA getrennt (Dephosphorylation Protocol der Fa. Thermo-Scientific 2013).

2.1.8. Ligation von DNA-Fragmenten

Zur Ligation von DNA-Fragmenten und ihren Zielvektoren wurden 100 ng des linearisierten dephosphorylierten Vektors mit einem drei- oder fünffachen molaren Überschuss an Insert in Anwesenheit von 2 U T4-DNA-Ligase inkubiert (Thermo-Scientific 2012).

Alle Ligationsansätze wurden über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert und am nächsten Tag über eine Transformation in chemisch-kompetenten *E. coli*-Bakterien vermehrt und anschließend untersucht.

2.1.9. Sequenzierung von DNA-Fragmenten

Um die Basensequenz eines DNA-Abschnitts nach seiner Veränderung im Rahmen der Klonierung abschließend überprüfen zu können, wurden 120 ng der zu untersuchenden Probe in 20 µl H₂O_d gelöst an die Firma Seqlab, Göttingen, versandt. Dort konnte mittels Sanger-Sequenzanalyse die DNA-Abfolge bestimmt und nach Versand der Daten mit dem Klonierungsschema auf Erfolg abgeglichen werden.

2.2. Methoden für die Synthese von rekombinanten Proteinen in Zellkulturen

2.2.1. Zellkultivierung

Alle verwendeten Zellen sind immortalisierte Zelllinien, die durch unterschiedliche Nährmedien und Schalensysteme in Kultur gehalten werden.

Als Nährmedien werden je nach Zelltyp spezifisch entweder das *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM) oder das *Roswell Park Memorial Institute Medium* (RPMI) verwendet, die mit 10% FCS und 1% Penicillin-Streptomycin-Gemisch versetzt wurden. Tabelle III.16 listet die den Zelltypen zugeordneten Nährmedien auf.

Nährmedium	Zelltypen	
DMEM (<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>)	- COS-7	- HepG2
	- Ba/F3-gp130/- IL-6R/-IL-11R	- CHO K1
RPMI-1640 (<i>Roswell Park Memorial Institute Medium</i>)	- K-562	- HT-29

Tabelle III.16: Zelltypen und zugehörige Nährmedien

Alle Zelltypen sind so in Kultur zu halten, dass eine zu hohe Zelldichte bzw. vorzeitiger Zelltod vermieden wird. Hierbei ist weiterhin zu beachten, dass vor allem Ba/F3-Zellen bei zu dichtem Wachstum dazu neigen, in ein zytokinunabhängiges Wachstum überzugehen, was Zellviabilitätsassays unmöglich macht. Grundsätzlich sind alle Zellen mehrfach pro Woche (i.d.R. zweimalig) zu passagieren. Adhärente Zellen müssen mittels Trypsin von der Zellkulturschale abgelöst und in PBS gewaschen werden. Zytokinabhängig wachsende Ba/F3-Zellen sind durch Zugabe von H-IL-6, IL-6 oder IL-11 (je nach Zelllinie) in Kultur zu halten.

Eine tägliche mikroskopische Sichtkontrolle aller Zellschalen ist für eine gute Kultivierung notwendig.

2.2.2. Zellzahlbestimmung

Für viele zellbiologische Verfahren ist es notwendig, eine definierte Zellzahl auszusäen, um die Vergleichbarkeit oder die Versuchseffizienz zu gewährleisten. Hierzu wurde das *TC-10 Automated Cell Counting System* der Fa. BioRad Laboratories, München, verwendet. Als systemeigene Färbelösung wurde je Zellzählung 10 µl *Trypan-blue* eingesetzt.

2.2.3. Transfektion, Zytolyse und Gewinnung von Zellkulturüberständen

Den Vorgang der Transfektion, also des transienten oder dauerhaften Internalisierens von DNA in eine eukaryotische Zelle, macht man sich häufig in der Molekularbiologie zunutze, um durch Klonierung veränderte Plasmid-DNA in Zellen mit hoher Proteinbiosyntheseaktivität produzieren zu lassen, sodass diese im Anschluss näher untersucht werden können.

Hierzu wurden am ersten Tag eine Million Zellen pro zu transfizierender Probe auf eine 8,7 cm-Schale ausgesät, sodass am Folgetag die Proben aufgegeben werden konnten. Hierbei wurde 1 ml DMEM^{-/-} Medium, also FCS- und antibiotikumfreies Medium, verwendet, um darin 2,5 µg der Plasmid-DNA zu lösen. Zusätzlich wurde das Medium mit 10 µl *Turbofect* (Fa. Life Technologies, Darmstadt) als Transfektionsreagens versetzt, das zunächst 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubierte und hierdurch eine Liposomenbildung induzierte, die für die DNA-Inkorporation sorgt. Anschließend wurde das Gemisch auf die Zellschale aufgetropft und geschwenkt. Nach 4-6 Stunden Inkubation bei 37°C und 5% CO₂ im Inkubator wurde das Medium wegen der möglichen Zytotoxizität des Transfektionsreagens abgesaugt und durch frisches ersetzt.

Nach 48 Stunden wurden die Überstände abgenommen und durch einen 0,45 mm Sterilfilter geschickt, um größtmögliche Keimfreiheit der Proben zu gewährleisten. Die erhaltenen Überstände wurden in Eppendorf-Reaktionsgefäße aliquotiert, um sie für die spätere Untersuchung zur Verfügung zu haben (Lagerung bei -20°C).

Die auf der Kulturschale anhaftenden Zellen wurden mit 2 ml sterilem PBS versehen und durch Einsatz eines sog. Zell-Schabers (*Scraper*) von der Oberfläche in die Flüssigkeit geschabt. Diese wurde ebenfalls in ein Eppendorf-Gefäß überführt und für 10 Minuten bei 13000 x g und Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und das Zellpellet in 500 µl *Mild Lysis Buffer* (MLB) aufgenommen. Die gelösten Proben wurden für 4 Stunden im Kühlraum bei 4°C im Rotator gelagert, um eine möglichst vollständige Zytolyse zu gewährleisten. Nach Ablauf der Zeit wurde erneut unter o.g. Bedingungen zentrifugiert und der Überstand in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und als Lysat zur weiteren Analyse vorgehalten (Lagerung bei -20°C). Der zurückgebliebene Zelldebris wurde verworfen.

2.2.4. Etablierung einer stabilen Zelllinie mittels CHO K1-Zellen

Stabile Zelllinien sind eine häufig genutzte Methode, um rekombinante Proteine aus eukaryotischen Zellen in größeren Mengen im mg-Bereich zu synthetisieren. Durch die hohe Teilungsrate bei gleichzeitiger Transfektionseffizienz bedient man sich hier der Hamster-Zelllinie CHO K1 (Scahill, Devos *et al.* 1983, Wurm 2004).

Analog zur Transfektion in COS-7-Zellen wurden initial ebenfalls die CHO K1-Zellen auf einer Zellkulturschale zur Transfektion ausgesät. Die benötigte Zellzahl liegt bei dieser Zellsorte bei 250.000 Zellen je Probe. Am Folgetag wurden die Zellen mit 2,5 µg der Plasmid-DNA, wie oben beschrieben, transfiziert und das Medium wurde nach 4-6

Stunden gewechselt. Um nun alle plasmidpositiven Klone von den negativen zu selektieren, wurde ein zusätzliches Selektionsantibiotikum benutzt, das als G-418-Sulfat (Fa. Genaxxon BioScience, Stammkonzentration 50 mg/ml) bezeichnet wird. Dieses Geneticin-enhaltende Antibiotikum ist ein Gentamicin-Derivat und durch die im Plasmid vorkommenden Resistenzgene in der Lage, alle negativen Zellen zu lysieren, während die positiven fortbestehen. Nach wenigen Tagen, wobei der Zeitraum abhängig von der Proliferationsrate und der Reaktion auf das Selektionsantibiotikum ist, war durch die hohe Rate an lysierten Zellen und durch den Verbrauch der Nährstoffe ein Wechsel des Mediums notwendig, damit die positiven Klone weiter anwachsen konnten.

Nach einer Passage der Zellen auf eine neue Kulturschale, konnten die Zellen dann auf einer 96-Kavitäten-Platte vereinzelt werden. Hierbei mussten die Klone täglich auf Koloniewachstum kontrolliert werden, um so ausschließlich die Einzelklone in den Kavitäten zu selektieren. Die ausgewählten Klone wurden nach einigem Größenwachstum auf 3,4 cm-Schalen überführt und für 4 Tage bei 37°C und 5% CO₂ im Inkubator kultiviert. Der gewonnene Überstand konnte per Western Blotting auf die Produktivität des Zytokins hin untersucht werden, sodass weiter ausgewählt werden konnte. Alle Zellen, die das Protein nicht oder nur unzureichend produzierten, wurden verworfen, während die positiven Zellklone auf 8,7 cm-Schalen weitergeführt wurden. Nach Auswahl des besten Klons durch ELISA oder Western Blotting wurden Cryostocks des Klons erstellt. Ziel der stabilen Zelllinie ist die Produktion des Proteins im sog. *Rollerbottle*-Verfahren.

2.2.5. Erstellung von Cryostocks zum Erhalt der stabilen Zelllinien

Dieses Verfahren dient dem schonenden Einfrieren von Zellen, um sie bei -80°C dauerhaft lagern zu können. Die dauerhafte Lagerung bietet den Vorteil, die Zelllinien nicht ständig in Kultur halten zu müssen. Sie beugt außerdem einer Kontamination der Zelllinien vor.

In einem ersten Schritt werden die Zellen, die auf dafür eigens gehaltenen Kulturplatten ausgesät wurden, in sterilem PBS gewaschen, trypsinisiert und in sterile 15 ml-Falcon-Röhrchen überführt. Diese wurden mit 5 ml sterilem PBS versetzt und für 5 Minuten bei 1500 x g und Raumtemperatur zentrifugiert. Nach Ablauf der Zeit wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet in 1,5 ml FCS mit 10% DMSO resuspendiert. Die Lösung wurde anschließend in ein dafür vorbereitetes, beschriftetes *Cryotube* überführt und im mit Isopropanol gefüllten Gefrierbehälter in den Ultratiefkühlschrank gebracht. Das

Isopropanol sorgt hierbei dafür, dass die Temperatur der *Tubes* nur langsam sinkt, was einen schonenden Einfriervorgang ermöglicht.

2.2.6. Das *Rollerbottle*-Verfahren

Um einen größeren Stock von einigen mg rekombinantem Protein zu generieren, bietet sich das sog. *Rollerbottle*-Verfahren an. Hierzu werden stabile CHO K1-Zellen benötigt, die in einem speziellen Prozess zunächst anwachsen und anschließend über ein sog. Produktionsmedium (DMEM^{+/+/+}) das Protein in den Überstand sezernieren. Voraussetzung für das *Rollerbottle*-Verfahren ist es, dass es sich um ein sekretorisches Protein handelt, da im Rahmen des Syntheseprozesses keine Lysate gewonnen werden. Als Grundlage des Verfahrens wurde das *Standard Operation Protocol* (SOP der Fa. Conaris 2013) in modifizierter Weise verwendet.

Im ersten Schritt wurde der ausgewählte CHO K1-Stamm auf 14 Zellkulturschalen des Durchmessers 13,7 cm ausgesät. Hierzu wurden je 100 µl der trypsinisierten Zellen auf 20 ml Nährmedium verteilt und das Anwachsen wurde für 5 Tage im Inkubator bei 37°C und 5% CO₂ veranlasst. Nach vollständigem Bewuchs der Kulturschale konnten die Nährmedien der Platten abgesaugt, die Zellen in sterilem PBS gewaschen und anschließend trypsinisiert werden. Die nach Zentrifugation erhaltenen 3 Zellpellets aus je 4 bzw. zwei Mal 5 Schalen wurden jeweils in 20 ml DMEM^{+/+} mit 4,4 ml Genitacin-Sulfat (sog. Wachstumsmedium) resuspendiert und in eine sterile *Rollerbottle* überführt. Anschließend wurde das Mediumvolumen auf 400 ml aufgefüllt und die Flasche verschlossen. Diese wurde für 3,5 Tage bei 37°C und 5% CO₂ in einem speziellen Inkubator gelagert, der über ein *Rollerbottle*-Gestell verfügt, sodass eine kontinuierliche, langsame Drehung der Flasche ermöglicht wird. Zweck der Drehung ist es, dass die im Medium enthaltenen Zellen jeden Teil der oberflächenbeschichteten Innenfläche der Flasche erreichen, ohne dabei abgespült zu werden. So kann ein gleichmäßiges Wachstum der Zellen garantiert werden.

Nach einer halben Woche wurden die Flaschenlamellen auf das Anwachsen der Zellen hin überprüft und das Medium wurde vorsichtig abgesaugt und verworfen. Stattdessen wurde mit der Verwendung von sog. Produktionsmedium begonnen, das anstelle des handelsüblichen fetalen Kälberserums (FCS) das *ultra-low IgG-FCS* (Fa. Life Technologies, Darmstadt) enthält. Hintergrund dafür ist, dass bei der Proteinreinigung im Standard-FCS enthaltene bovine Proteine, v.a. Antikörper, das Messergebnis verfälschen und die Proben verunreinigen, sodass speziell gereinigtes FCS für die Produktion sinnvoll

erschien. Nach erneutem Ablauf einer halben Woche wurde das erste Produktionsmedium abgenommen, erneut verworfen und gegen neues Produktionsmedium ausgetauscht. Ab diesem Zeitpunkt begann die Sammlung der Zellkulturüberstände in Mediumflaschen für die spätere Proteinreinigung. Da innerhalb einer halben Woche 400 ml Überstand anfielen, sollten zunächst 2 l (entspr. 2,5 Wochen) für eine adäquate Menge angesammelt werden.

Anschließend wurden die Überstände (vgl. Kap. III.2.2.7.) gereinigt und über einen Protein-A-280 Nachweis in der UV-Spektroskopie (NanoDrop) gemessen.

2.2.7. Proteinreinigung

Um die über das *Rollerbottle*-Verfahren gewonnenen Überstände nun zu reinigen und das hergestellte rekombinante Protein zu isolieren, bediente man sich einer Protein A-Sepharose-Säule des Typs *HiTrap* der Fa. GE Healthcare Sciences, Solingen, die an ein *ÄKTAprime*-Chromatographiesystem (ebenfalls GE Healthcare) angeschlossen wurde.

Zuvor mussten die tiefgefroren gelagerten Überstände bei 4°C langsam über Nacht aufgetaut werden. Eine *cOmplete Protease Inhibitor*-Tablette (Fa. Roche Life Sciences, Grenzach-Wyhlen) wurde nach 5-7 Stunden jeder Mediumflasche hinzugegeben, um eine eventuelle Proteaseaktivität während des Auftauens zu unterbinden.

Am Folgetag konnten die Überstände anschließend in 50 ml-Falconröhrchen überführt und für 45 Minuten und bei 4°C bei 4000 x g zentrifugiert werden. Anschließend wurde der Überstand in ein frisches Falcon dekantiert und erneut bei o.g. Daten zentrifugiert.

Die nun grob von zellulärem Debris befreiten Proben wurden danach durch einen *Bottletop*-Filter mit einer Porengröße von 0,45 µm (*Nalgene Rapidflow*, Fa. Thermo Scientific) auf einer eisgekühlten Schottflasche geschickt.

Geklärte Zellkulturüberstände wurden auf eine in PBS äquilibrierte 1 ml Protein-A-*HiTrap*-Säule geladen. Ungebundene Proteine wurden mit PBS von der Säule gewaschen. Im Anschluss wurden gebundene Proteine mit Zitratpuffer eluiert. Dazu wurde ein Elutionspuffergemisch verwendet, das aus 100 mM Zitronensäure und 100 mM Natriumzitrat hergestellt wurde. Hierbei wurde ein Zitratpuffer auf den pH 3,25 und ein Puffer auf den pH 5,5 hergestellt und in einem 70:30-Verhältnis gemischt und angeschlossen. Das Eluat wurde in 1 ml-Fraktionen gesammelt und mit TRIS pH 10,5 auf einen pH-Wert von 7-8 abgepuffert. Die Proben wurden auf Eis gelagert.

Abschließend wurde die Säule mit dem Zitratpuffer pH 3,25 gespült und der Durchfluss in einer Flasche aufgefangen.

Als Überprüfung der Reinigung wurden Proben der gereinigten Proteine mittels SDS-PAGE und anschließender Färbung mit Coomassie Brilliantblau auf ihren Reinheitsgrad hin analysiert. Die Lagerung des Proteins erfolgte nach Schockgefrierung in flüssigem Stickstoff bei -80°C.

2.3. Methoden für den Proteinnachweis

2.3.1. Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Als Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) wird ein Elektrophoreseverfahren bezeichnet, das in der Lage ist, Proteine nach ihrer Molekülmasse in Kilodalton (kDa) voneinander zu trennen. Das Verfahren wurde durch Laemmli (1970) erstmalig beschrieben und eingesetzt.

Zur Größentrennung der Proteine werden spezielle SDS-Gele hergestellt, die je nach zu detektierender Proteingröße mit 6-12% Polyacrylamid versetzt werden. Im vorliegenden Fall wurden 10%ige SDS-Gele verwendet.

Die Gelelektrophorese lief bei 80-120 V für ca. 1-1,5 Stunden bei Raumtemperatur, sodass eine vollständige Trennung im Bereich des Größenstandards erkennbar war. Anschließend konnte das Gel aus der Kammer entnommen werden, woran sich der Transfer für das Western Blotting anschloss.

2.3.2. Western Blotting

Unter dem Begriff des Western Blottings versteht man eine Übertragung von Proteinen senkrecht zur Laufrichtung der Gelelektrophorese auf eine entsprechende Membran, z.B. eine PVDF-Membran.

Erstmalig angewendet wurde das Verfahren von Burnette (1981), der nach dem DNA-Blotting (Southern Blot nach dessen Erfinder E. Southern) und RNA-Blotting (Northern Blot als „komische“ Fortführung der Bezeichnung durch Alwine, Kemp *et al.* (1977)) das Protein-Blotting logischerweise als „Western Blotting“ namentlich fortführte.

Zur Anwendung wurde zunächst der Transfer auf eine initial aktivierte PVDF-Membran (raumtemp. Methanol, VE-Wasser, Transferpuffer je 2 min) durchgeführt, wobei Membran und Gel mit je 4 Lagen *Whatman*-Papier abgedeckt wurden. Das Blotting erfolgte über 40 Minuten bei 25 V und 4 A, sodass die Proteine im Ergebnis auf der

Membran hafteten. Diese wurde in ein steriles Falcon-Röhrchen überführt und mit 10 ml TBS-T-Milchpulver (Inhaltsstoffe s. Tabelle III.14) für mindestens 1 Stunde auf einen Rotator bei Raumtemperatur verbracht. Die verwendete Lösung sorgte für einen Blockierprozess aller unspezifischen Proteinbindemotive. Nach dreimaligem Waschen mit 10 ml TBS-T bei Raumtemperatur konnte ein Primärantikörper zugegeben werden. Die Membran mit dem enthaltenen Antikörper wurde im Anschluss bei 4°C in einem Rotator befestigt, der über Nacht für eine ausreichende Inkubationszeit sorgte. Am Folgetag konnte nach erneutem dreimaligem Waschen mit TBS-T ein Sekundärantikörper mit Peroxidaseaktivität aufgegeben werden, sofern erforderlich. Der Sekundärantikörper verblieb für 1 Stunde auf der Membran im Rotator bei Raumtemperatur.

2.3.3. Proteindetektion

Zur Proteindetektion wurden die gewaschenen Membranen auf eine gereinigte Klarsichtfolie aufgelegt und ein Chemolumineszenzmittel aus 2 Komponenten (*Amersham ECL Prime*, Fa. GE Healthcare Lifesciences, Freiburg) wurde aufgetragen. Dieses besteht aus einer Peroxid- und einer Luminol-Lösung, die im Verhältnis 1:1 mit je 750 µl auf die Membran pipettiert und durch Schwenken durchmischt wurde. Anschließend wurde die Membran unter eine PC-gestützte chemosensible Kamera (Intas ChemoCam) gelegt, um die per Antikörper markierten Proteine zu detektieren. Je nach Signalstärke mussten hierbei unterschiedlich lange Belichtungszeiten (2 Sekunden bis 2 Minuten) eingehalten werden.

2.3.4. Re-Blotting

Bereits einmal zur Detektion mittels Antikörpern eingesetzte Western-Blotting-Membranen können zur Erstellung des Re-Blots mit einem zweiten Antikörper versetzt werden, um so die Vergleichbarkeit der Detektion in den Proben zu gewährleisten.

Hierzu wurde die in TBS-T gelagerte Membran in ein frisches *Falcon-Tube* überführt, das mit 50 ml *Stripping-Buffer* (zur Zusammensetzung s. Tab. III.14) gefüllt war. An einem vorgewärmten Wasserbad unter einem Abzug wurden nun 50 µl β-Mercaptoethanol (Fa. AppliChem, Darmstadt) hinzupipettiert und das Ganze für 30 Minuten bei 65°C im Wasserbad inkubiert. Das β-Mercaptoethanol sorgt für die Auflösung bestehender Antikörper-Proteinbindungen. Danach wurde die Membran

dreimalig mit TBS-T gewaschen und analog zum Verfahren nach dem *Blotting* für mindestens 1 Stunde in einer TBS-T-Milchpulver-Lösung geblockt. Nach anschließendem Waschprozess mit TBS-T konnte die Zugabe des neuen Antikörpers erfolgen. Die Proteindetektion wurde am Folgetag, wie in Kap. III.2.3.3. beschrieben, durchgeführt.

2.3.5. Immunopräzipitation mittels Protein-A-Agarose-Beads

Als Immunopräzipitation bezeichnet man ein Verfahren, bei dem Proteine oder Nukleinsäuren durch Antigen-Antikörperbindung aus einem Zellkulturüberstand oder -lysat gezielt gefiltert werden können (Yang, Nam *et al.* 2008).

Protein-A-Agarose-Beads (Fa. Roche Life Sciences, Grenzach-Wyhlen) sind kleine kugelige Gebilde aus Agarose in einer Zellulosematrix, die kovalent mit aus Staphylokokken stammendem Protein A verknüpft sind. Protein A hat eine hohe Affinität zur Fc-Region von v.a. IgG-Antikörpern, was Proteine mit einem Fc-Tag zur Präzipitation an die *Beads* zwingt. Interagierende Proteine oder Proteinkomplexe werden analog zu singulären Proteinen gebunden. Man bezeichnet die Präzipitation der Komplexe als Kopräzipitation.

Nach Durchfluss der Lösung durch die *Beads*-enthaltende Säule konnte durch Zugabe eines sauren Elutionspuffers (Zitratpuffer) das Protein oder der Komplex wieder herausgelöst und in geringem Volumen aufgenommen werden.

Ein Nachweis erfolgte anschließend mittels Western Blotting.

2.3.6. Immunopräzipitation mittels Acetonfällung

Im Rahmen der vorliegenden Untersuchung wurde als Alternative zur Immunopräzipitation einmalig eine Acetonfällung eingesetzt. Aceton ist in der Lage, alle Proteine aus einer Lösung zu fällen, da durch Zugabe von Aceton die Löslichkeit aller Proteine in wässrigem Medium stark herabgesetzt wird. Der Nachteil der Benutzung einer Acetonfällung ist es, dass unspezifisch alle Proteine gefällt werden.

Zur Durchführung wurden 5 ml Aceton vorsichtig auf 1 ml Zellkulturüberstand gegeben und für 1 Stunde auf Eis inkubiert. Anschließend wurde die Lösung für 10 min bei 4°C und 10000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und verworfen, während die Proteinpellets kurz luftgetrocknet wurden. Diese wurden in 80 µl H₂O und 20 µl Laemmli-Puffer resuspendiert, bei 95°C für 10 min erhitzt und abschließend per Western Blotting detektiert.

2.4. Methoden für den Proteinfunktionstest

2.4.1. Zellviabilitätsassay (Proliferationsassay, Ba/F3-Zellen)

Zur Durchführung des Assays wurden je nach Untersuchung Ba/F3-Zellen, die mit gp130, gp130/IL-6R sowie gp130/IL-11R stabil transduziert wurden, eingesetzt. Die Zellen wurden zunächst 3 Mal mit 10 ml sterilem PBS gewaschen, um mögliche Zytokintrückstände zu entfernen. Das Zellpellet wurde in 5 ml DMEM resuspendiert und eine Zellzählung wurde durchgeführt.

Im nächsten Schritt wurden 5000 Zellen je Kavität in 100 µl Medium auf eine 96-Kavitätenplatte ausgesät. Zur Testung von Zytokinen wurden nun Triplets der Zellkulturüberstände (20% des Volumens) oder von rekombinanten Proteinen (1 µl) aufgegeben. Um das Volumen konstant zu halten, wurden bei den Kontrollproben alle Volumina auf dasselbe Niveau mit sterilem PBS aufgefüllt.

Als Positivkontrolle fungierte meist ein Hyperzytokin (z.B. Hyper-Interleukin-6, Hyper-Interleukin-11), da dieses über den vorhandenen gp130-Rezeptor *Signaling* betreibt. Als Negativkontrolle wurden lediglich Ba/F3-Zellen ohne Zytokin in die Kavitäten pipettiert. Nach 48 Stunden Inkubationszeit bei 37°C und 5% CO₂ konnte der Assay ausgewertet werden. Hierzu wurde das Reagens *Cell Titer Blue* (Fa. Promega, Madison, USA) verwendet, von welchem auf jede Kavität 20 µl hinzugegeben wurden. Anschließend wurde eine initiale Messung der Fluoreszenz im *Infinite200M Reader* (Fa. Tecan) durchgeführt.

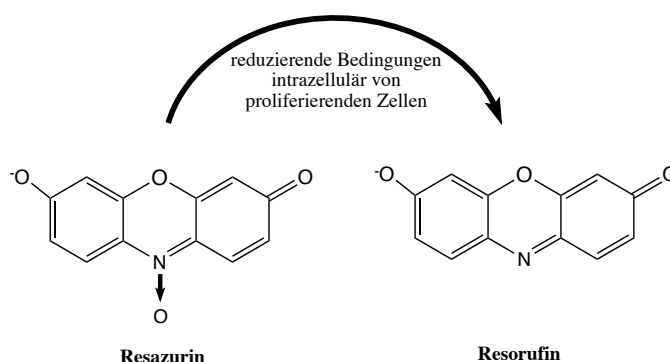


Abb. III.1: Chemische Reaktion von "CellTiter Blue" der Fa. Promega

Dargestellt ist das im Reagens befindliche Resazurin, das durch die proliferierenden Zellen aufgenommen und verstoffwechselt wird. Hierbei entsteht unter den intrazellulär vorkommenden reduzierenden Bedingungen das Molekül Resorufin, das bei 590 nm Fluoreszenz emittiert und über Fluoreszenzmessungen ausgelesen werden kann.

Das o.g. Reagens ist in der Lage, den enthaltenen Wirkstoff Resazurin unter reduzierenden Bedingungen zu Resorufin umzusetzen, welches in einem Wellenlängenbereich von 590 nm fluoresziert und mittels Fluoreszenzspektroskopie durch den verwendeten *Infinite200M Reader* (Fa. Tecan) ausgelesen werden kann. Je mehr Zellen sich durch die aufgegebenen Zytokine innerhalb des Inkubationszeitraums entwickelt haben, desto größer ist der Umsatz von Resazurin zu Resorufin und somit erhöht sich die Fluoreszenz (s. Abb III.1). Anhand der erhaltenen Werte kann im Vergleich zur Negativkontrolle nun abgegrenzt werden, ob und wie stark das aufgegebene Zytokin zur Proliferation der Zellen führt.

Für Inhibitionsassays wurde ein Zellviabilitätsassay wie oben beschrieben in der Anwesenheit der spezifischen Zytokininhibitoren sgp130Fc, Tocilizumab oder IL-6-RFP durchgeführt. Bei sgp130Fc handelt es sich um eine lösliche Form von gp130, die spezifisch IL-6-*trans-signaling* blockiert (Jostock, Mullberg *et al.* 2001), während Tocilizumab als monoklonaler Antikörper durch Blockade des IL-6R sowohl *classic*- als auch *trans-signaling* blockiert (Nishimoto, Yoshizaki *et al.* 2004). IL-6-RFP ist ein Fusionsprotein aus gp130 und dem IL-6R. Hierdurch blockiert es spezifisch IL-6 (Metz, Wiesinger *et al.* 2007).

2.4.2. Zytokinstimulation von Suspensionszellen (Ba/F3-/K-562-Zellen)

Es ist bekannt, dass der Signalweg von Zytokinen der Interleukin-6-Familie über den β -Rezeptor gp130 verläuft. Dieser ist durch die rezeptorassoziierte Tyrosinkinase in der Lage, das intrazelluläre Signalmolekül STAT3 durch Phosphorylierung zu aktivieren.

Um den intrazellulären Signalweg von u.a. Hyper-Interleukin-11 zu untersuchen, wurde ein sog. Phospho-STAT3-Assay auf unterschiedlichen Ba/F3-Zelltypen durchgeführt.

Hierzu wurden die Zellen analog zum Viabilitätsassay zuerst in sterilem PBS gewaschen, um jegliche Zytokinrückstände zu entfernen. Anschließend wurden die Zellen in 5 ml DMEM^{-/-} aufgenommen und es wurde eine Zellzählung (vgl. Kap III.2.2.2.) durchgeführt. Die Zellen wurden auf eine Kulturschale überführt und für 2-3 Stunden bei 37°C gehungert, sodass jegliches Phospho-STAT3-Signal bis zur erneuten Zytokinzugabe verging.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden 1 Million der ausgehungerten Zellen in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß pipettiert und 1 ml des zu testenden Zellkulturüberstands bzw. 1 ml Medium, in welchem rekombinante Proteine gelöst sind, aufgegeben. Die Proben wurden erneut bei 37°C für 15 Minuten inkubiert und anschließend bei 4°C und 13000

rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 50 µl Laemmli-Puffer resuspendiert und bei 95°C für 10 Minuten erhitzt.

Mit P-STAT3-Antikörpern bzw. im Re-Blot mit STAT3-Antikörpern konnten per Western Blotting die Nachweise der Signalentstehung erbracht werden.

Die Durchführung des Assays bei K-562-Zellen erfolgte analog zu den Ba/F3-Zellen, allerdings wurde das Hungern wegen des erhöhten Signalhintergrunds auf separaten Zellschalen zu je 500.000 Zellen durchgeführt. Weiterhin wurde sowohl die Zell- als auch die Überstandzugabe halbiert, sodass lediglich 500 µl Zellkulturüberstand und 500.000 Zellen je Probe eingesetzt wurden.

2.4.3. Zytokinstimulation von adhärenenten Zellen (HT-29-/HepG2-Zellen)

Da es sich bei HT-29- und HepG2-Zellen, im Gegensatz zu o.g. Zelltypen, um adhärenente Zellen handelt, ist das Protokoll für einen P-STAT3-Assay hier abgeändert.

Am ersten Tag wurden die Zellen nach Entfernen des Mediums und nach dem Waschen in sterilem PBS trypsinisiert und gezählt. Anschließend wurden auf 6-Kavitätenplatten jeweils 1 Million Zellen ausgesät und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Medium abgesaugt und durch RPMI^{-/-}-Medium zum Hungern für 3 Stunden ersetzt. Das Medium wurde erneut entfernt und 1 ml steriles, raumwarmes PBS aufgegeben. Mit einem Zellscraper wurden die Zellen vorsichtig in die Flüssigkeit geschabt und mit einer Pipette in die mit Zellkulturüberstand vorbereiteten Reaktionsgefäße überführt (HT-29) bzw. auf der 6-Kavitätenplatte belassen und mit in 500 µl Medium gelösten Proben versehen (HepG2).

Die Inkubationszeit betrug 15-20 Minuten bei 37°C. Anschließend wurde, wie in Kap. III.2.4.2 erläutert, ein Zellpellet durch Zentrifugation erstellt und dieses in 50 µl Laemmli-Puffer (HT-29) bzw. P-STAT3-Lysepuffer (HepG2) aufgenommen. Eine Detektion erfolgte analog durch Western Blotting.

2.4.4. Fluoreszenz-Durchflusszytometrie (FACS-Analyse)

Als Fluoreszenz-Durchflusszytometrie bezeichnet man ein zellanalytisches Verfahren, bei dem mittels einer Kombination aus Laser-Chromatographie und fluoreszenzmarkiertem Antikörper eine hohe Zellzahl innerhalb einer Population untersucht werden kann.

Hierbei wird die zu untersuchende Zelllinie (500.000 Zellen) initial nach mehrmaligem Waschen in 1 ml FACS-Puffer (1% BSA in PBS) für 1 Stunde mit dem primären Antikörper auf Eis inkubiert, um eine ausreichende Bindung zu ermöglichen. Anschließend werden 500 µl FACS-Puffer hinzugefügt. Das Gemisch wird zweimalig zentrifugiert und der Vorgang wiederholt.

Als nächstes werden die Zellen in 100 µl FACS-Puffer resuspendiert, welcher den fluoreszenzmarkierten, sekundären Antikörper enthält. Die Proben werden erneut für 1 Stunde bei 4°C im lichtabgedunkelten Raum inkubiert und anschließend in 1 ml FACS-Puffer zweimalig gewaschen.

Abschließend werden die Zellen in 500 µl FACS-Puffer resuspendiert und gegen eine Referenz durch das FACS-Gerät geschickt, das durch mehrere optische Systeme (Laser, Dioden), die Lichtdurchlässigkeit bzw. Absorption und somit die Oberflächenbeschaffenheit der Zellen untersucht. Je nach Gerätetyp ist abschließend eine Sortierung der Zellen anhand ihrer Absorption (*fluorescence-activated cell sorting* = FACS) möglich (Shapiro, Natale *et al.* 1979, Marder, Maciak *et al.* 1990, Nemecek, Zimmermann *et al.* 2016).

Anhand der FACS-Analyse war es im Rahmen dieser Arbeit möglich, die noch nicht etablierten K-562-Zellen auf die Expression von IL-6R und IL-11R hin zu analysieren.

2.5. Methoden für die Proteinquantifizierung

2.5.1. *Enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA)

Da Zellkulturüberstände oder gereinigte Proteine zwar in z.B. Zellviabilitätsassays auf ihre Funktionalität untersucht werden können, aber dies in der Regel nur mit definiertem Volumen geschieht, ist eine Proteinquantifizierung mit definierten Massen für die Untersuchung von Zytokineffekten durch z.B. Konzentrationsreihen sinnvoll. Dies kann unter anderem mit einem ELISA geschehen, welcher entweder als vorgefertigtes Kit oder aus einem selbst etablierten Antikörper-System angewandt wird.

2.5.1.1. IL-6-ELISA

Als hIL-6-ELISA wurde ein Kit von der Fa. ImmunoTools, Friesoythe (Cat. N° 31670069) angeschafft. Der gesamte Ablauf erfolgte nach den Angaben des Herstellers,

das benötigte Material entstammte hierbei entweder dem Kit oder wurde zusätzlich angesetzt (PBS-T, PBS, PBS-BSA und H₂SO₄).

2.5.1.2. IL-6R-ELISA

Bei diesem ELISA-System wurden mit 50 µl Coating-Antikörper (hIL-6R-Antikörper, „4-11“, 1 mg/ml, Verdünnung 1:1000 in PBS) pro Kavität beschickt und über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Nach dreimaligem Waschen in 200 µl PBS-T pro Kavität wurden alle für Proben vorgesehenen *wells* für 2 Stunden mit der ELISA-Blockinglösung (1% BSA, 5% Sucrose in PBS) versehen, um alle freien Bindeepitope zu blockieren. Nach erneutem Waschen konnten 50 µl der verdünnten Proben aufgetragen werden. Es folgte eine zweistündige Inkubation bei Raumtemperatur. Nach Abschluss der Zeit wurde nach einem Waschschrift mit dem Detektionsantikörper (biotinylierter hIL-6R-Antikörper, „Baf227“, Verdünnung 1:1000 in PBS-BSA) für 1,5 bis 2 Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Kavitäten erneut mit PBS-T gewaschen und 100 µl Streptavidin-HRP (*horseradish peroxidase*, Meerrettichperoxidase, 1:200 in PBS-BSA) je Kavität für 30-45 Minuten hinzupipettiert. Hierbei war zu beachten, dass die Kavitätenplatte dunkel gelagert wurde. Abschließend konnte nach dem obligatorischen Waschschrift 75 µl des Peroxidase-Substrats aufgegeben werden, das bei Bindung der Antikörper zu einer Blaufärbung der Kavität führte. Zum Abstoppen der Reaktion wurden 75 µl 1,8 M Schwefelsäure verwendet und die Absorption wurde mittels des *Infinite200M Readers* (Fa. Tecan) ausgewertet.

2.5.1.3. Hyper-IL-6-ELISA

Der H-IL-6-ELISA ist ein kombinierter Komplex-ELISA der beiden vorgenannten ELISA-Systeme. Hierbei wurde als *Coating*-Antikörper der anti-hIL-6-Antikörper benutzt und mit o.g. Baf227-Antikörper detektiert. Der restliche Ablauf entstammt dem hIL-6R-ELISA-Verfahren. Als Standard diente rekombinantes H-IL-6-Fc.

2.5.1.4. IL-11-ELISA

Um IL-11-Proben quantifizieren zu können, kam das *Human IL-11 DuoSet ELISA*-Kit der Fa. R&D Systems, Minneapolis, zum Einsatz. Der Enzymassay wurde nach den Herstellerangaben durchgeführt.

2.5.1.5. Hyper-IL-11-ELISA

Da eine Quantifizierung der im Rahmen des Projekts neu entstandenen Hyper-IL-11-Varianten über ein kommerziell verfügbares Kit nicht möglich war, wurde analog zum Hyper-IL-6-ELISA ein Komplex-ELISA entwickelt. Hierfür wurde die Kavitätenplatte mit einem dafür beschafften anti-hIL-11R-Antikörper der Fa. R&D Systems, Minneapolis, (MAB1977) konditioniert, um am nächsten Tag mit dem IL-11-ELISA-Kit (s. Kap. III.2.5.1.4.) eine Detektion der Proben zu ermöglichen. Hierbei wurde ebenfalls der Assay (mit Ausnahme des *Coatings*) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Als Standard diente zuvor gereinigtes, rekombinantes H-IL-11-Fc.

2.5.2. BCA-Test

Ein Bicinchoninsäure-Test (engl. *bicinchonic acid*, BCA-Test) ist ein häufig angewandtes Verfahren, bei dem der Gesamtproteinbestand einer Probe ermittelt und gegen einen Standard aus bovinem Serumalbumin (BSA) getestet wird.

Dieser Standard wurde in 8 absteigenden Konzentrationen (3000 ng/ml, 1500 ng/ml, 750 ng/ml, 375 ng/ml, 187,5 ng/ml, 93,75 ng/ml, 46,88 ng/ml, 0 ng/ml) als Dublette auf eine spezielle 96-Kavitäten-Testplatte pipettiert. Parallel dazu wurden Dubletten der zu testenden Proben, meist in einer 1:10-Verdünnung von gewonnenen Lysaten oder Überständen raumtemperiert aufgetragen.

Anschließend wurde ein spezielles Reagenz-Kit (*Pierce BCA Proteinassay Kit*, Fa. Life Technologies, Darmstadt) verwendet, bei dem die beiden enthaltenen Lösungen im Verhältnis 50:1 gemischt und je 200 µl in jede Kavität hinzugegeben wurden. Hierbei entstand eine Reduktionsreaktion, die zweiwertige vorhandene Kupferionen durch BCA zu einwertigen Kupferionen reduzierte. Die reduzierten Kupferionen komplexierten anschließend mit dem BCA und ließen durch violette Verfärbung eine Messung am Spektrometer bei 562 nm nach 30 min Inkubation bei 37°C und 5% CO₂ zu (Smith, Krohn *et al.* 1985). Gegenüber dem Standard ließen sich dann die Gesamtproteinkonzentrationen der einzelnen Proben bestimmen, um beim Western Blotting gleichmäßige Mengen von z.B. 50 µg aufzutragen.

IV. ERGEBNISSE

1. Etablierung einer *trans-signaling*-induzierenden Kontrolle für ein Split-Intein-basiertes Expressionssystem für Hyper-Interleukin-11

Vorherrschendes Interesse dieses Projektes war es, herauszufinden, ob neben dem bereits beschriebenen und gut untersuchten *classic signaling* von Interleukin-11 auch ein bislang ausschließlich *in vitro* nachgewiesenes *trans-signaling* (Dams-Kozłowska, Gryśka *et al.* 2012, Dams-Kozłowska, Kwiatkowska-Borowczyk *et al.* 2013) *in vivo* nachgewiesen werden kann. Ziel war es daher, ein Expressionssystem zu etablieren, welches die Herstellung von Hyperzytokinen auf eine Art und Weise erlaubt, bei der ein bei Hyperzytokinen aufgrund der Toxizität zuvor beobachtetes *gene-silencing* unwahrscheinlich ist.

Bei IL-6 sind diese beiden Signalwege bereits untersucht und verifiziert. Wegen der großen Homologie der beiden Zytokine lag es nahe, dass bei IL-11 ebenfalls ein *trans-signaling* existiert. Grundlegende Voraussetzung hierfür ist ein physiologisch vorkommender löslicher IL-11R (sIL-11R), der kürzlich gefunden werden konnte (Lokau, Nitz *et al.* 2016). Im Rahmen der Arbeit zum *Ectodomain Shedding* konnte ADAM10 als Sheddase für den IL-11R identifiziert und sIL-11R in humanen Serumproben nachgewiesen werden.

Im Rahmen der Studien zu dieser Dissertation wurde ein Expressionssystem etabliert, welches dazu beitragen soll, eine *in vivo*-Untersuchung des IL-11 *trans-signaling*s zu vereinfachen. Hierzu wurden Expressionsplasmide erstellt, mit deren Hilfe

- I) Hyper-Interleukin-11-Fc (H-IL-11-Fc),
- II) der lösliche IL-11R fusioniert mit einem Split-Intein (sIL-11R-IMPDH^N) und
- III) IL-11-Fc fusioniert an ein Split-Intein (IMPDH^C-IL-11-Fc)

exprimiert werden können. Durch die Fusion mit Split-Inteinen können nach Co-Transfektion der lösliche IL-11R und IL-11-Fc durch einen Prozess, der als *protein-transsplicing* bezeichnet wird, posttranslational zu Hyper-IL-11-Fc ligiert werden. Die

resultierenden Fusionsproteine wurden hinsichtlich Expression, Sekretion und biologischer Aktivität charakterisiert.

Die in der Folge gezeigten Darstellungen und Abbildungen sind aus dem Forschungsprojekt hervorgegangen.

1.1. Klonierung von Hyper-Interleukin-11-Fc

Um zu überprüfen, ob eine Split-Intein-vermittelte Ligation von sIL-11R und IL-11-Fc zu funktionalem Hyper-Interleukin-11-Fc führt, wurde initial eine Hyper-IL-11-Fc-Positivkontrolle erstellt.

Hierzu wurde die cDNA, die für sIL-11R-IL-11-Fc kodiert, in pcDNA3.1 eingebracht. Die Klonierung von Hyper-IL-11-Fc erfolgte aufbauend auf dem aus Vorarbeiten bestehenden Hyperzytokinplasmid von pcDNA3.1-Hyper-IL-6-Fc. Über Restriktionsschnittstellen wurden im Anschluss sowohl der lösliche IL-11R (sIL-11R) als auch Interleukin-11 mit dem Vektor ligiert.

Dazu wurde in einem ersten Schritt das von der Fa. Thermo Scientific, Darmstadt, kommerziell erworbene Plasmid des löslichen IL-11R *sticky* mit *AflIII* und *AgeI* geschnitten und das nun generierte Insert mit dem über ebendiese Enzyme geschnittenen Vektor des H-IL-6-Fc-Plasmids per Ligation verbunden.

Hieraus entstand nun ein Hybrid-Hyperzytokin, bestehend aus pcDNA3.1-sIL-11R-Linker-IL-6-Fc, das für das *Crosstalk*-Projekt (vgl. Kap. IV.3) von entscheidender Bedeutung ist.

Die ebenfalls benötigte IL-11-Sequenz sollte über eine Polymerasekettenreaktion generiert werden. Dies war allerdings vielfach wegen der sehr GC-reichen DNA-Sequenz nicht möglich, weshalb die Generierung ebenfalls im o.g. *alio loco* befindlichen kommerziellen Labor erfolgte. Das zur Verfügung gestellte Plasmid wurde danach ebenfalls zunächst *blunt* in pcDNA3.1 kloniert, um in der Folge mit den Enzymen *AgeI* und *NotI* in das o.g. Hybrid-Hyperzytokinplasmid ligiert zu werden (vgl. Abb. IV.1). Die Überprüfung der Plasmide wurde mittels Restriktionsverdau und Sequenzierung durchgeführt.

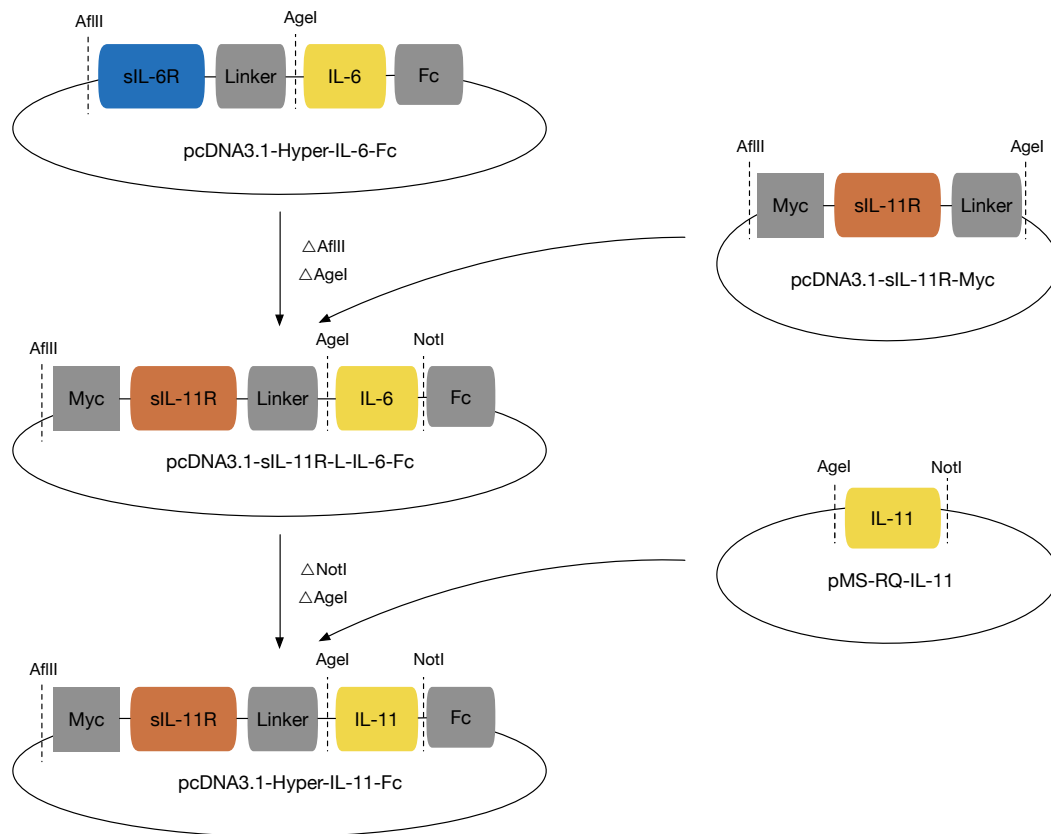


Abb. IV.1: Klonierungsschema pcDNA3.1-Hyper-IL-11-Fc

In einem ersten Schritt wurde das bestehende pcDNA3.1-Hyper-IL-6-Fc-Plasmid mit *AflIII* und *AgeI* geschnitten und das *Backbone* geextrahiert. Gleichzeitig wurde das amplifizierte pcDNA3.1-sIL-11R-Myc-Plasmid mit denselben Enzymen verdaut und ebenfalls extrahiert und gereinigt. Nach Ligation entstand ein pcDNA3.1-sIL-11R-L-IL-6-Fc-Hybrid, das in der Folge, genau wie das kommerziell erworbene pMS-RQ-IL-11 mit *AgeI* und *NotI* geschnitten und zum vollständigen pcDNA3.1-Hyper-IL-11-Fc religiert wurde.

1.2. H-IL-11-Fc wird in COS-7-Zellen exprimiert und sezerniert

Das nun hergestellte, fertige Plasmid wurde in COS-7-Zellen transfiziert, sodass nach dem verwendeten Protokoll (vgl. Kap. III.2.2.3.) nach 48 Stunden Zellkultur-überstände und Zelllysate erstellt werden konnten. Vergleichende Western Blot-Detektionen (vgl. Abb. IV.2) ergaben, dass Hyper-Interleukin-11 ein ähnliches Molekulargewicht wie Hyper-Interleukin-6 von ca. 100 kDa aufweist. Außerdem konnte gezeigt werden, dass das Hyperzytokin in den Zellkulturüberstand sezerniert wird und nicht ausschließlich in der Zelle verbleibt.

Hyper-IL-6 ist genau wie Hyper-IL-11 mit einem Fc-tag versehen, der parallel die Detektion von beiden Zytokinen in der oberen Darstellung der Abb. IV.2 (Western Blotting mit Fc-Antikörper) ermöglicht.

Zusätzlich besitzt H-IL-11 über den eingefügten sIL-11R einen N-terminalen *Myc-tag*, der in der unteren Darstellung im Re-Blot (Western Blotting mit *Myc*-Antikörper) detektiert werden kann, während H-IL-6 diesen *tag* nicht besitzt.

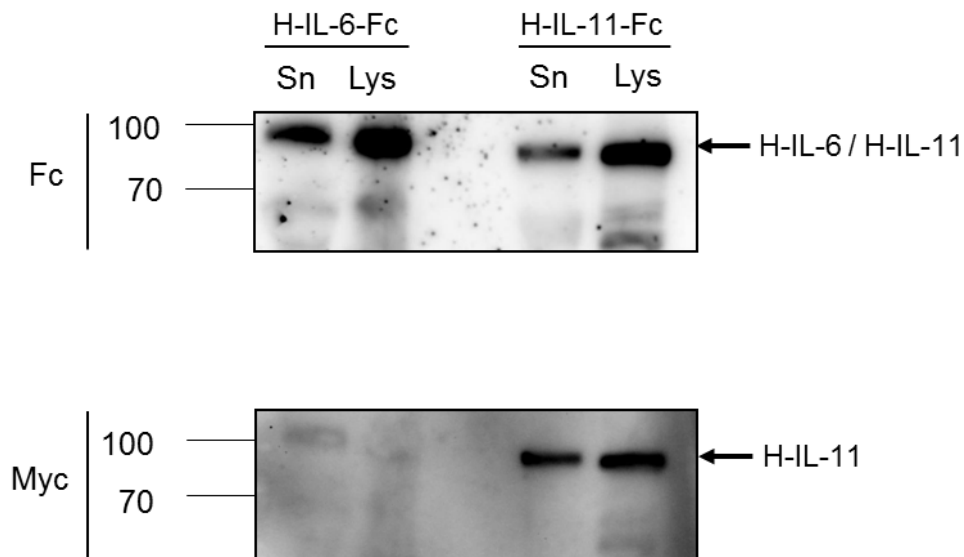


Abb. IV.2: Expressions-Western Blot von COS-7-Zelllysaten und –Überständen mit H-IL-6 und H-IL-11.

Lysate und Überstände aus COS-7-Zellen, die mit H-IL-6-Fc und H-IL-11-Fc transfiziert wurden, konnten mittels Western Blotting analysiert werden. Die Detektion erfolgte unter Verwendung des Fc-Antikörpers gegen den Fc-*tag* (jeweils obere Darstellung) sowie des *Myc*-Antikörpers gegen den bei H-IL-11-Fc enthaltenen c-*Myc-tag* (jeweils untere Darstellung). Es wurden jeweils 20 µl Zelllysate und 80 µg Gesamtprotein aus dem Überstand aufgetragen.

***Sn** = *Supernatant* (Zellkulturüberstand), **Lys** = Zelllysate, n=4.

1.3. Funktionalitätstest von H-IL-11-Fc im Zellviabilitätsassay und Immunoblot-Assay gegen P-STAT3

Im nächsten Arbeitsschritt wurde die biologische Aktivität des Hyperzytokins in einem Zellviabilitätsassay auf Ba/F3-gp130-Zellen untersucht, da nach der bestehenden Hypothese Hyper-IL-11 durch den intrinsischen α -Rezeptor lediglich den β -Rezeptor gp130 auf der Zelloberfläche benötigt, um ein intrazelluläres Signal hervorzurufen. Sollte gp130 zum löslichen IL-11R samt gebundenem Zytokin eine Affinität aufweisen, müsste sich dies in einer vermehrten Zellproliferation ausdrücken.

Der Assay wurde auf einer 96-Kavitätenplatte durchgeführt und mittels Fluoreszenzspektroskopie bei 590 nm nach 90 min ausgewertet (vgl. Kap. III.2.4.1.). Hierzu wurden 5000 Zellen pro Kavität ausgesät und jede Probe als Triplet aufgetragen.

Die gemittelten Werte samt zugehöriger Standardabweichung sind im unten gezeigten Diagramm (Abb. IV.3) dargestellt.

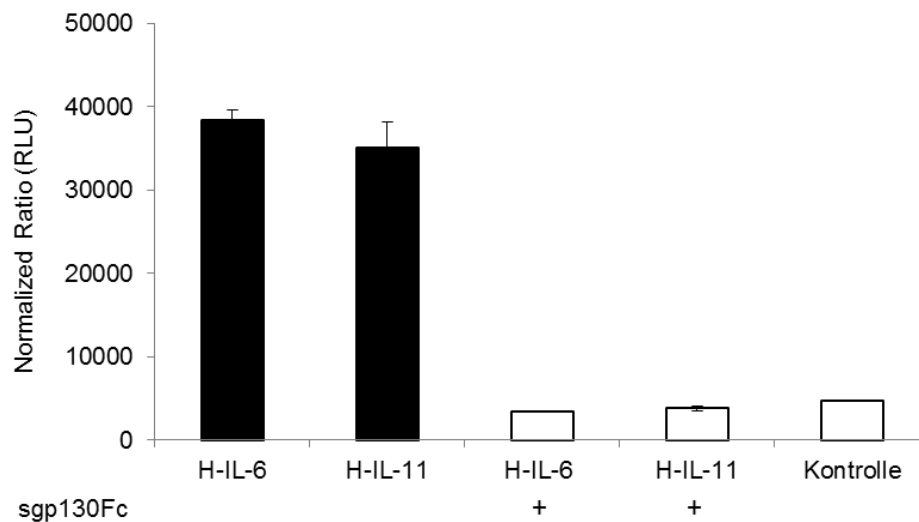


Abb. IV.3: H-IL-6 und H-IL-11 aktivieren Ba/F3-gp130-Zellen und sind durch sgp130Fc vollständig inhibierbar.

Ba/F3-Zellen, die stabil mit gp130 transduziert waren, wurden mit 20% Zellkulturüberstand von transfizierten COS-7-Zellen stimuliert. H-IL-6: Transfektion von pcDNA3.1-H-IL-6-Fc. H-IL-11: Transfektion von pcDNA3.1-H-IL-11-Fc.

Nach 48 Stunden wurde die Zellproliferation, wie in Kap. III.2.4.1. beschrieben, gemessen. Die Proben wurden zudem auch in Anwesenheit von 1 µg/ml sgp130Fc analysiert (Spalten 3/4). n=3.

Das eindeutige Ergebnis des durchgeführten Assays war, dass gegenüber der unstimulierten Kontrolle eine starke Proliferation nach 48 Stunden sowohl bei Hyper-Interleukin-6 als auch Hyper-Interleukin-11 feststellbar ist. Für beide Hyperzytokine fungierte das kompetitiv wirksame sgp130Fc als kompetenter Inhibitor (s. Schemazeichnung in Abb. I.4), das in einer Konzentration von 10 µg/ml bei den Inhibitionskontrollen hinzugegeben wurde. Da beide Hyperzytokine unter sgp130Fc mit der Proliferation unter das unstimulierte Kontrollniveau sanken, ist der Schluss zulässig, dass auch Hyper-Interleukin-11 über gp130 Signaltransduktion betreibt.

Die Ergebnisse der wiederholt durchgeführten Viabilitätsassays verdeutlichen, dass eine Signalkaskade über den β -Rezeptor gp130 umgesetzt wird, da die verwendeten Ba/F3-gp130-Zellen keinerlei α -Rezeptor besitzen.

Um nun in einer zweiten Versuchsanordnung diese Anzeichen für oben genannte Signalkaskade zu stützen, wurde ein Immunoblot-Assay gegen P-STAT3 durchgeführt (s. Abb. IV.4). Gp130 ist über seine Rezeptor-assoziierten Tyrosinkinasen in der Lage, die Transkriptionsfaktoren STAT1 und vor allem STAT3 zu phosphorylieren, sodass bei Aktivierung dieses Signalwegs nach Stimulation der Zellen mit H-IL-11-Fc eine erhöhte Menge von phosphoryliertem STAT3 im Zelllysate detektierbar sein sollte (vgl. Abb. I.1).

Gleichzeitig sollten die Inhibitoren sgp130Fc und IL-6R VHH (s. Schemazeichnung in Abb. I.4 und I.5) zum Einsatz kommen, um ihre Wirkung auf mit H-IL-11-Fc stimulierten Zellen zu überprüfen.

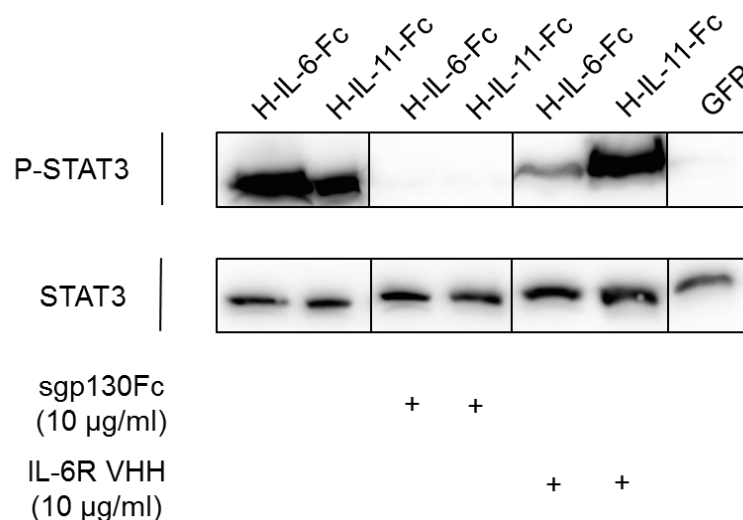


Abb. IV.4: H-IL-6 und H-IL-11 aktivieren die STAT3-Achse

Western Blot-Analyse von Ba/F3-gp130-Zelllysaten gegen phosphoryliertes STAT3 nach 15 min Stimulation. Die Inkubation der Ba/F3-gp130-Zellen erfolgte mit Überständen aus transfizierten COS-7-Zellen. Für die Inhibition mit sgp130Fc und IL-6R VHH wurden die Überstände mit jeweils 10 µg/ml sgp130Fc bzw. IL-6R VHH vorinkubiert. GFP diente als Kontrolle. Zur Analyse wurden jeweils 20 µl der Zelllysate aufgetragen.

Abb. IV.4 ist eine modifizierte Ansicht der Abb. IV.29. n=2.

In der zweiten Spalte der Abb. IV.4 ist deutlich zu erkennen, dass H-IL-11-Fc ein ausgeprägtes P-STAT3-Signal hervorruft und durch den Hyperzytokin-Inhibitor sgp130Fc inhibierbar ist, was durch das fehlende P-STAT3-Signal in der 4. Spalte

wiedergegeben wird. Der eingesetzte Inhibitor IL-6R VHH beeinträchtigt zwar das *Signaling* von H-IL-6-Fc, was an einem abgeschwächten P-STAT3-Signal (5.Spalte) abzulesen ist, jedoch hat der Inhibitor keinerlei Einfluss auf H-IL-11-Fc, da die Inhibition durch den Nanobody an einem intramolekularen IL-6R erfolgt, der bei Hyper-IL-11 nicht vorhanden ist.

Die Negativkontrolle mit GFP sowie die STAT3-Ladekontrolle entsprachen der Arbeitshypothese.

1.4. Zusammenfassung

Anhand der oben dargestellten Ergebnisse aus Zellviabilitätsassays und Phospho-STAT3-Assays konnte Folgendes eindeutig nachgewiesen werden:

➤ **Hyper-Interleukin-11-Fc ist biologisch aktiv und kann über gp130 intrazelluläre Signalkaskaden vermitteln.**

Mit den oben gezeigten Daten lassen sich bereits publizierte Daten zu ähnlichen Versuchsanordnungen im Rahmen des *in vitro*-Nachweises des IL-11 *trans-signaling*s eindeutig bestätigen. Das generierte Plasmid kodiert für ein Protein, das nachweislich auf α -Rezeptor-freien Zellen ein Signal hervorruft, welches ausschließlich über einen *trans-signaling*-Prozess entstehen kann. Außerdem sind in Anwesenheit des kompetitiv wirksamen Inhibitors sgp130Fc keinerlei Proliferation der Zellen oder intrazelluläre Signalkaskaden in der gp130-STAT3-Achse auslösbar. Es ist somit eindeutig verifiziert, dass das Hyperzytokin H-IL-11-Fc ein biologisch aktives Protein wie H-IL-6-Fc ist, das die physiologischen Wirkungen eines sIL-11R/IL-11-Komplexes wirkungsvoll nachbilden und somit als Positivkontrolle für die zu erstellenden Split-Intein-Hyper-IL-11-Varianten dienen kann.

2. Darstellung der Inteinprojekte um Hyper-IL-11 und Hyper-IL-6

In vorangegangenen Studien (Adam, Rabe *et al.* 2009, Suthaus, Stuhlmann-Laeisz *et al.* 2012) konnte nachgewiesen werden, dass Hyperzytokine und verwandte Proteine der IL-6-Familie, z.B. vIL-6, bei *in vivo*-Untersuchungen wegen ihrer ausgeprägten Wirksamkeit in einem physiologischen System einer hohen Toxizität unterliegen. Dies lässt sich durch die kovalente Verknüpfung von Zytokin und Rezeptor bei Hyperzytokinen erklären, der den beiden signaltransduzierenden Anteilen die Verbindung durch räumliche Nähe aufzwingt und so keinerlei Möglichkeit für eine Gleichgewichtsreaktion bietet. Innerhalb eines jeden Hyperzytokinmoleküls befindet sich also ein Zytokin mit einem Rezeptor, während bei physiologisch vorkommender Zytokin-Rezeptor-Komplexbildung vorerst eine auf Stochastik beruhende Affinitätsreaktion stattfinden muss.

Bei Versuchen mit Hyperzytokinen wurde deutlich, dass durch die stark gesteigerte Wirkung im Vergleich zum Komplex bei injizierten Hyperzytokinen die letale Dosis mit ca. 130 ng/ml vergleichsweise niedrig war (Suthaus, Stuhlmann-Laeisz *et al.* 2012). Es war im Zuge dieser Experimente nicht möglich, Mauslinien mit einer stabilen Expression von Hyperzytokinen zu erzeugen. Eine denkbare Erklärung dafür wäre ein toxizitätsinduziertes *gene-silencing*.

Um für *in vivo*-Studien dennoch die Voraussetzungen zu schaffen, wurde in der Vergangenheit eine inteinbasierte Expressionsstrategie für Hyper-Interleukin-6-Fc etabliert, die es ermöglichen sollte, durch Generierung von inaktiven Proteinvorstufen die Produktion von toxischen, sekretorischen Proteinen umzusetzen. Die zugehörigen *in vitro*- (Masterthesis Wehmöller 2014) und *in vivo*-Versuche waren erfolgreich, eine Publikation hierzu steht derzeit noch aus (unveröffentlichte Daten).

In der Folge konnte durch Versuche im Rahmen dieser Dissertation das etablierte System auf Hyper-Interleukin-11-Fc erweitert werden, um eine Generalisierung dieser Produktionsmöglichkeit von toxischen Proteinen zu untermauern.

2.1. Klonierung von Split-Intein-basierten Expressionsplasmiden für Hyper-Interleukin-11-Fc

Als Ausgangsplasmide fanden die für Intein-Hyper-IL-6-Fc generierten Plasmide von pcDNA3.1-sIL-6R-IMPDPH^N, pcDNA3.1-sIL-6R-IL-6_{AB/CD}-IMPDPH^N, pcDNA3.1-IMPDPH^C-IL-6-Fc sowie pcDNA3.1-IMPDPH^C-IL-6_{AB/CD}-Fc bereits aus der Vorstudie Verwendung, die am Institut für Biochemie und Molekularbiologie II der Heinrich-Heine-Universität (Homey 2013, Wehmöller 2014) erstellt wurden. Diese enthielten die benötigten IMPDPH-Inteinsequenzen sowie das identische pcDNA3.1-*Backbone*, sodass lediglich die Zytokine bzw. Zytokinteile und die zugehörigen Rezeptoren durch Restriktionsverdau und Religation ausgetauscht werden sollten (vgl. Klonierungsschemata in den Abb. IV.5-8).

Für das erste zu erstellende Plasmid (pcDNA3.1-sIL11R-IMPDPH^N) erfolgte ein Ausschneiden des sIL-6R aus pcDNA3.1-sIL-6R-IMPDPH^N über *AflIII* und *KpnI*. Der *sticky* geschnittene Vektor wurde mit einem ebenfalls über *AflIII* und *KpnI* geschnittenen sIL-11R-Insert, das über PCR generiert wurde und zuvor *blunt* in einen pcDNA3.1-Vektor kloniert wurde, subkloniert und religiert, sodass o.g. Plasmid fertiggestellt werden konnte (Abb. IV.5).

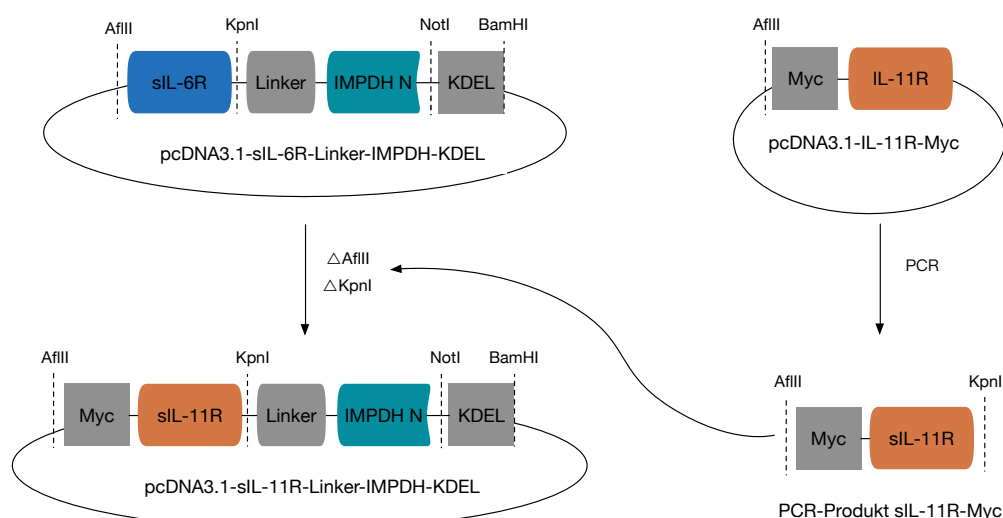


Abb. IV.5: Klonierungsschema pcDNA3.1-sIL-11R-L-IMPDPH-KDEL

Für das im Institut bestehende pcDNA3.1-IL-11R-Myc-Plasmid wurden speziell angefertigte Oligonukleotide erstellt (IL-11R fw *AflIII* / IL-11R rev *KpnI*) und eine PCR auf das Plasmid angewendet. Das synthetisierte sIL-11R-PCR-Produkt wurde initial *blunt* in pcDNA3.1 kloniert (hier nicht dargestellt) und anschließend über *AflIII* und *KpnI* geschnitten und geextrahiert. Auf die gleiche Weise wurde das vorhandene pcDNA3.1-sIL-6R-L-IMPDPH-KDEL-Plasmid verdaut und ebenfalls geextrahiert. Hieraus entstand das neue pcDNA3.1-sIL-11R-L-IMPDPH-KDEL-Plasmid.

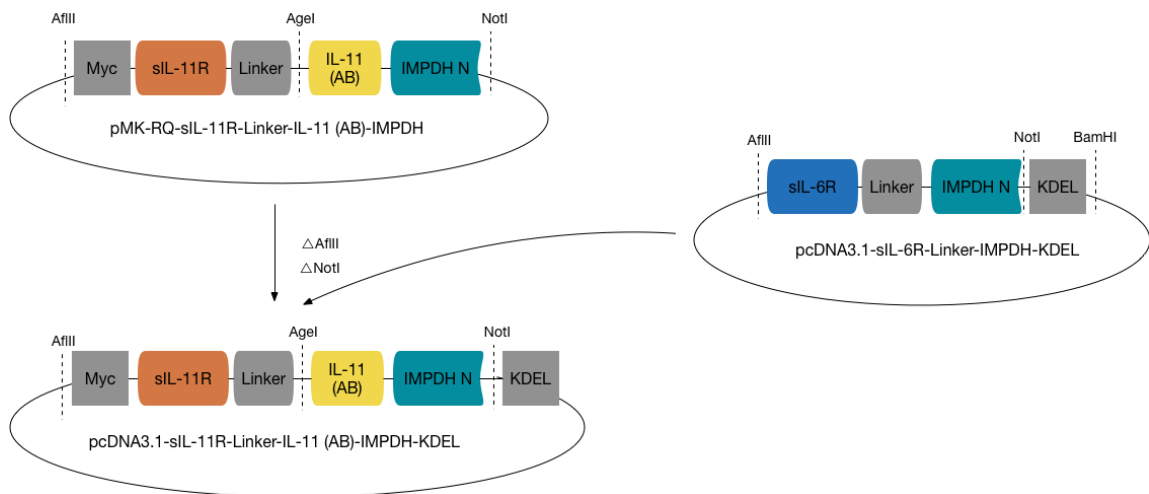


Abb. IV.6: Klonierungsschema pMK-RQ-sIL-11R-L-IL-11(AB)-IMPDH-KDEL

Um die im kommerziell erworbenen Plasmid pMK-RQ-sIL-11R-L-IL-11_{AB}-IMPDH enthaltenen Sequenzen in den pcDNA3.1-Vektor samt KDEL-Signal zu klonieren, wurde mittels *AflIII* und *NotI* gespalten. Die daraus resultierenden gelextrahierten Fragmente wurden zum vollständigen pcDNA3.1-sIL-11R-L-IL-11_{AB}-IMPDH-KDEL religiert.

Das zweite zu generierende Plasmid (pMK-RQ-sIL-11R-Linker-IL-11_{AB}-IMPDH^N) wurde kommerziell bei der Fa. Thermo Scientific, Darmstadt, erworben und nach Amplifikation über *AflIII* und *NotI* geschnitten. Als Vektor diente das pcDNA3.1-sIL-6R-IMPDH^N-Plasmid, das mit ebendiesen Restriktionsenzymen verdaut und gelextrahiert wurde. Ziel dieser Klonierung war das Einbringen in pcDNA3.1 mit KDEL-Sequenz (Abb. IV.6).

Als entsprechende Gegenseiten mit C-terminalem Intein wurde als nächstes das vorhandene pcDNA3.1-IMPDH^C-IL-6-Fc mit *AgeI* und *NotI* verdaut, während das zu inserierende IL-11-Fc-Insert über PCR generiert werden sollte. Wie bereits in Kap. IV.1.1 beschrieben, war eine Generierung nicht über PCR zu erzielen. Daher wurde auch in diesem Fall ein von der Fa. Thermo Scientific, Darmstadt, erworbenes Plasmid (pMS-RQ-IL-11) eingesetzt und über o.g. Restriktionsenzyme geschnitten und mit dem Vektor religiert, sodass sich ein pcDNA3.1-IMPDH^C-IL11-Fc-Plasmid ergab (Abb. IV.7).

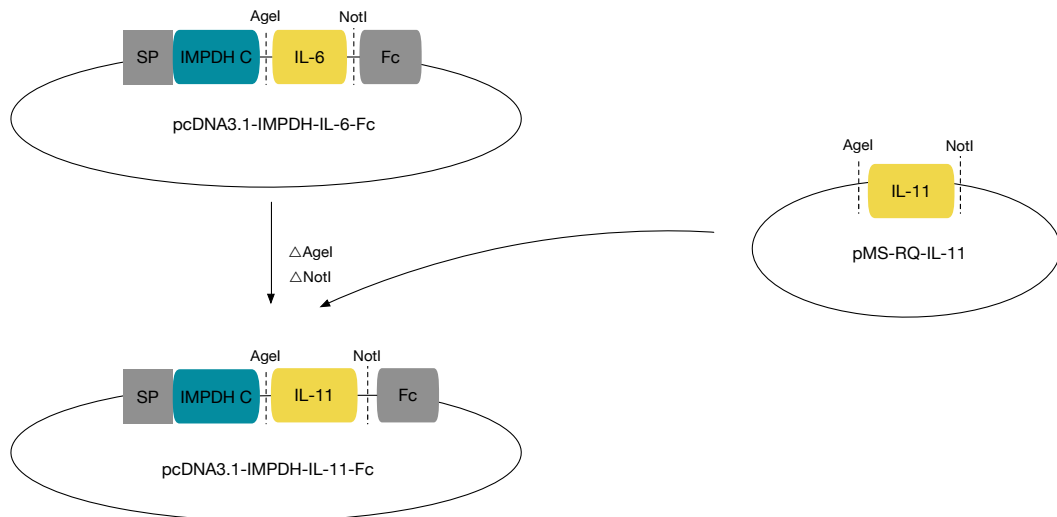


Abb. IV.7: Klonierungsschema pcDNA3.1-IMPDH-IL-11-Fc

Das erworbene pMS-RQ-IL-11-Plasmid wurde mittels *AgeI* und *NotI* restriktionsverdaut und anschließend in den dafür vorbereiteten pcDNA3.1-IMPDH-IL-6-Fc-Vektor kloniert, sodass der Zytokinanteil im Plasmid ausgetauscht wurde.

Das letzte zu erstellende Plasmid wurde ebenfalls bei der Fa. Thermo Scientific, Darmstadt, erworben. Das pMK-RQ-IL-11_{CD}-Plasmid wurde für das Split-Konstrukt amplifiziert und über die Restriktionsenzyme *AgeI* und *NotI* in den ebenso geschnittenen pcDNA3.1-IMPDH^C-IL-6-Fc-Vektor kloniert, sodass ein pcDNA3.1-IMPDH^C-IL-11_{CD}-Fc entstand (Abb. IV.8).

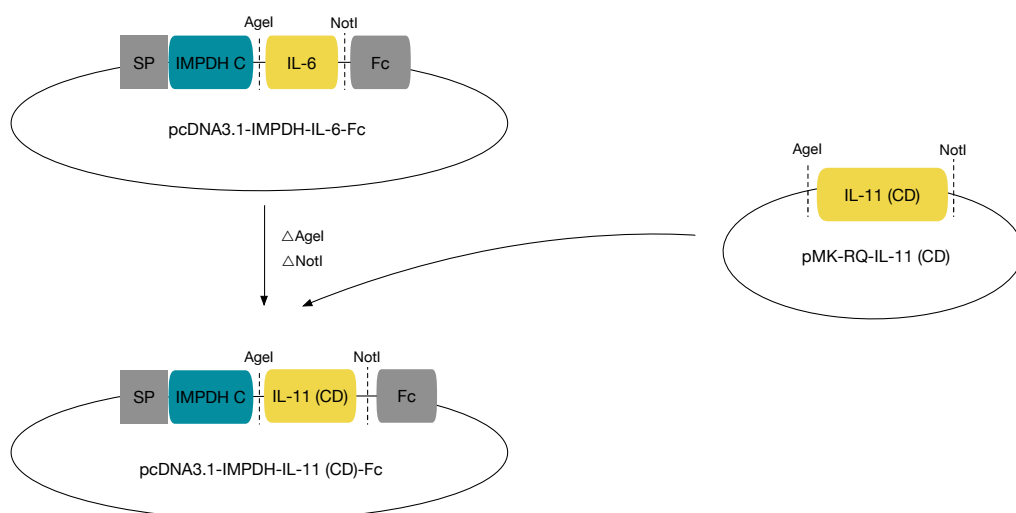


Abb. IV.8: Klonierungsschema pcDNA3.1-IMPDH-IL-11_{CD}-Fc

Um diese Klonierung durchzuführen, wurde der bereits in Abb. IV.7 gezeigte, mit *AgeI* und *NotI* geschnittene Vektor verwendet. Das synthetisierte Split-IL-11-Plasmid wurde ebenfalls mit diesen Restriktionsenzymen geschnitten und anschließend mit dem Vektor ligiert.

2.2. Überexpression von Split-Intein-basierten Hyper-IL-11-Fc-Plasmiden führt zur Bildung von H-IL-11-Fc

Um die Expression der hergestellten Plasmide zu testen, wurden diese in COS-7-Zellen transfiziert und anschließend durch Western Blotting detektiert.

Hierzu wurden die zugehörigen Intein-Zytokin-Plasmide co-transfiziert, sodass eine inteinvermittelte Ligation der Proteinanteile in den Zellen erfolgen konnte.

Eine Bildung von Intein-H-IL-11-Fc (Nonsplit-Konstrukt) aus sIL-11R-IMP^{DH}^N und IMP^{DH}^C-IL-11-Fc sowie Intein-H-IL-11_{AB/CD} (Split²-H-IL-11) aus sIL-11R-Linker-IL-11_{AB}-IMP^{DH}^N und IMP^{DH}^C-IL-11_{CD}-Fc (s. Schemazeichnung in Abb. IV.9 A / B) konnte mittels Western Blotting detektiert werden. Dies liegt daran, dass beide Proteine, genau wie H-IL-11-Fc, sowohl mit einem Myc-tag als auch mit einem Fc-tag versehen sind, der eine antikörperbasierte Detektion im Western Blot ermöglicht (s. Abb. IV.10).

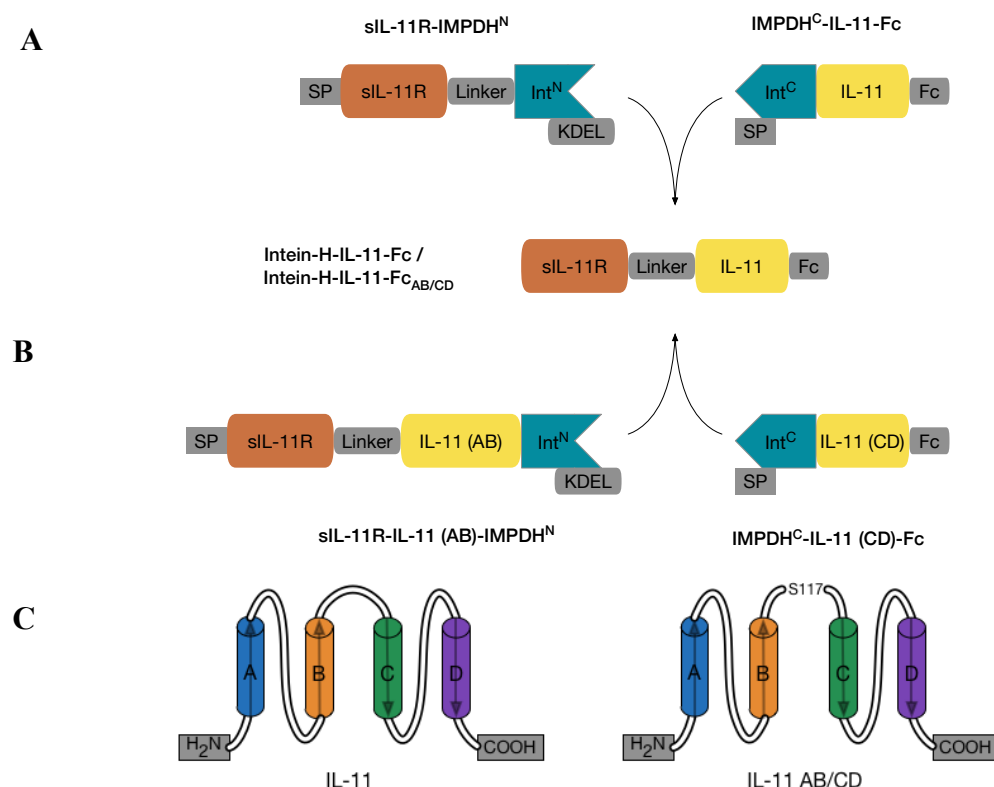


Abb. IV.9: Schemazeichnungen der Intein-Hyper-IL-11-Plasmide

A: Schemazeichnung der Plasmidkonstrukte von sIL-11R-IMP^{DH}^N, IMP^{DH}^C-IL-11-Fc und co-transfiziertes Proteinprodukt Intein-H-IL-11-Fc (Nonsplit-I-H-IL-11). **B:** Schemazeichnung der Plasmidkonstrukte von sIL-11R-Linker-IL-11 (AB)-IMP^{DH}^N, IMP^{DH}^C-IL-11 (CD)-Fc und co-transfiziertes Proteinprodukt Intein-H-IL-11_{AB/CD} (Split²-H-IL-11). **C:** Split-Stelle des gespaltenen Zytokins IL-11 AB/CD. Es erfolgte analog zu IL-6 eine Spaltung zwischen B- und C-Loop, hier an Serin 117.

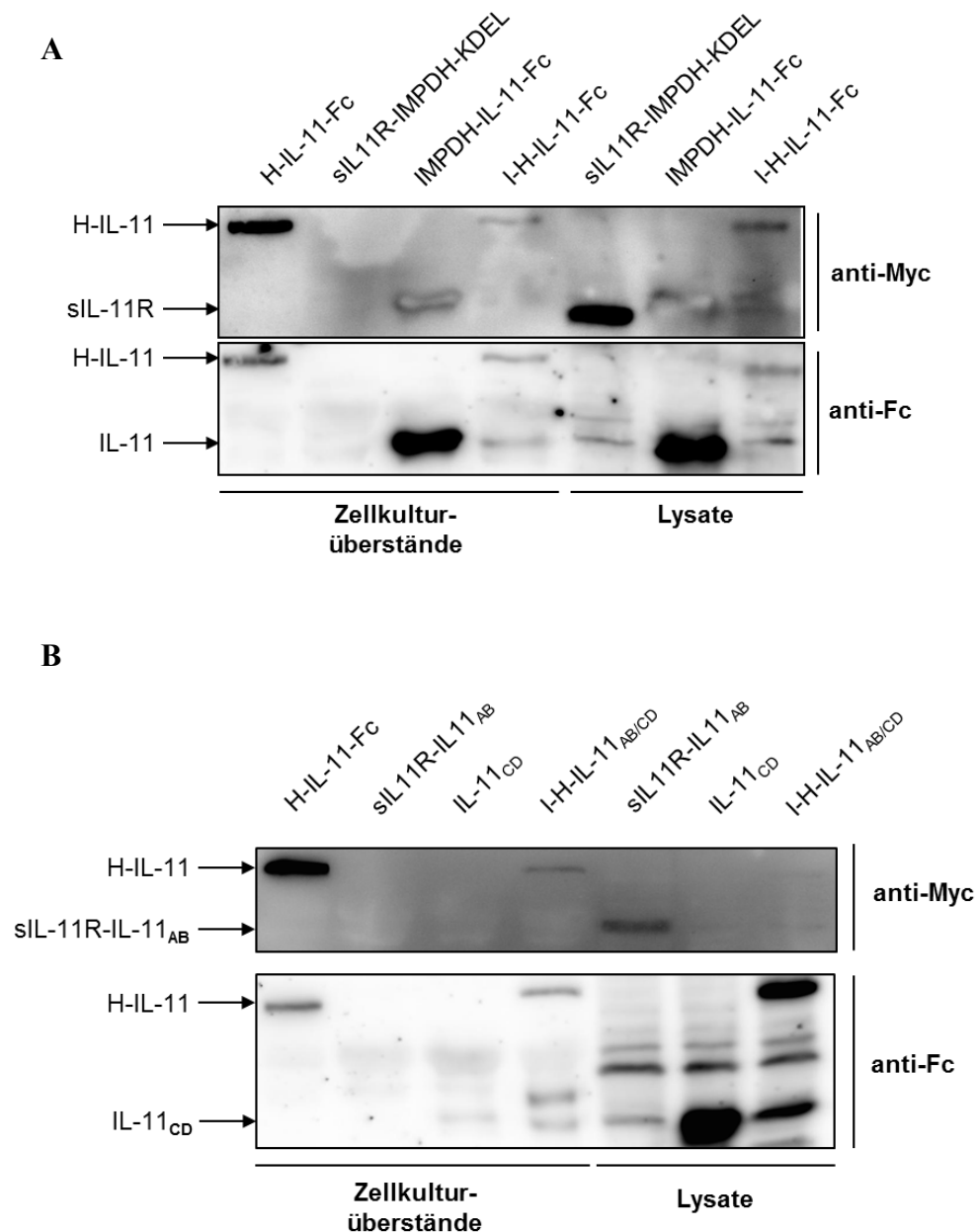


Abb. IV.10: Expressions-Western Blots der I-H-IL-11-Fc und I-H-IL-11_{AB/CD}-Varianten

A: Lysate und Überstände aus COS-7-Zellen, die mit H-IL-11-Fc, sIL-11R-IMPDH-KDEL und IMPDH-IL-11-Fc transfiziert bzw. mit sIL-11R-IMPDH-KDEL sowie IMPDH-IL-11-Fc co-transfiziert („I-H-IL-11-Fc“) wurden, konnten mittels Western Blotting analysiert werden.

B: Lysate und Überstände aus COS-7-Zellen, die mit H-IL-11-Fc, sIL-11R-IL-11_{AB}-IMPDH-KDEL und IMPDH-IL-11_{CD}-Fc transfiziert bzw. mit sIL-11R-IL-11_{AB}-IMPDH-KDEL sowie IMPDH-IL-11_{CD}-Fc co-transfiziert („I-H-IL-11_{AB/CD}“) wurden, konnten durch Western Blotting nachgewiesen werden.

Die Detektion in **A** und **B** erfolgte unter Verwendung des Myc-Antikörpers gegen den c-Myc-tag (jeweils obere Darstellung) sowie des Fc-Antikörpers gegen den enthaltenen Fc-tag (jeweils untere Darstellung). Es wurden jeweils 35 µl Zelllysate und 80 µg Gesamtprotein aus dem Überstand aufgetragen; n=4 (A) bzw. n=6 (B).

Die in Abb. IV.10 A aufgetragenen COS-7-Zellüberstände zeigten gegen die Positivkontrolle von Hyper-IL-11-Fc (1. Spalte) sowohl im Myc- als auch im Fc-Western Blot, dass nach Co-Transfektion von pcDNA3.1-sIL-11R-IMPDH und pcDNA3.1-IMPDH-IL-11-Fc eine inteinbasierte Hyperzytokinbildung erfolgte (4. Spalte für Überstand bzw. 7. Spalte für Lysat).

Es waren somit im Überstand und Lysat Proteine bei ca. 100 kDa detektierbar, die dieselbe Größe aufwiesen wie H-IL-11-Fc.

Die inteinvermittelten Hyperzytokine werden nicht mit derselben Effizienz produziert und sezerniert wie Hyper-IL-11, was sich an den etwas schwächer gezeichneten Banden im Western Blot erkennen ließ. Da aber die inteinbasierte Fusion der beiden Proteinanteile nur dann stattfindet, wenn beide Proteine in ausreichend hoher Konzentration aufeinandertreffen, ist es nicht verwunderlich, dass sich der Nettoumsatz der Proteine im Vergleich zum vollständig translatierten Protein geringer darstellte.

Nach Einzeltransfektion war IMPDH-IL-11-Fc im Überstand und Lysat sowie sIL-11R-IMPDH-KDEL ausschließlich im Lysat detektierbar. Durch das vorhandene ER-Retentionssignal der Aminosäuresequenz „KDEL“ ist sIL-11R-IMPDH-KDEL nicht in der Lage, in den Überstand zu gelangen. Das inteingekoppelte Zytokin (IMPDH-IL-11-Fc) kann, genau wie seine physiologisch vorkommenden Proteinverwandten, die Zellmembran überwinden und ist daher auch im Überstand wiederzufinden. Da der Split-Intein-vermittelte Proteinligationsprozess nicht einhundertprozentig effizient abläuft, können durch Western Blotting auch die Einzelkomponenten sIL-11R und IL-11-Fc nachgewiesen werden. Dies könnte durch Komplexbildung von sIL-11R und IL-11 auch zur Induktion von IL-11 *trans-signaling* führen.

Um die Sekretion von biologisch aktiven H-IL-11-Fc-Vorstufen zu vermeiden, wurde daher in einem zweiten Ansatz eine Split-Zytokin-Strategie verwendet. Dazu wurde die IL-11-cDNA zwischen den Sequenzen, die für den B- und den C-Loop kodieren, gespalten und auf zwei Expressionsplasmide aufgeteilt (vgl. Kap. II.1.3ff und Abb. IV.9 B und C).

Analog zur Nonsplit-I-H-IL-11-Fc-Variante konnten auch in der Split²-Zytokin-Variante, also mit zwischen B- und C-Loop gespaltenem Zytokin (Abb. IV.10 B), Proteine bei ca. 100 kDa durch beide Antikörper detektiert werden, die als Intein-Hyper-IL-11_{AB/CD} (4. Spalte für den Überstand bzw. 7. Spalte im Lysat) interpretiert werden durften.

Da es sich um ein Split-Zytokin handelt, ist es denkbar, dass dieses, anders als das vollständige IL-11-Fc, nicht in der Lage ist, aus der Zelle zu gelangen, da es keine physiologische Tertiärstruktur aufweist. Dies ist daran erkennbar, dass sich im Fc-basierten Western Blot keine Proteinbande bei IL-11_{CD}-Fc im Überstand darstellt (vgl. hierzu Abb. IV.9 in der Nonsplit-Variante).

Wiederum gleich zur Volllängen-Variante war auch hier, dass der sIL-11R durch das KDEL-Signal nicht in der Lage war, in den Überstand sezerniert zu werden.

2.3. Durch Split-Intein-vermittelte Proteinligation generiertes I-H-IL-11 ist biologisch aktiv

Da eine Bildung der Intein-H-IL-11-Varianten erfolgversprechend erschien, wurde die biologische Wirksamkeit durch Zellviabilitätsassays auf Ba/F3-gp130-Zellen erprobt. Hierbei sollte die Wirksamkeit gegen die bereits auf ihre Funktionalität hin untersuchten Hyperzytokine Hyper-IL-6 und Hyper-IL-11 getestet und außerdem einer Inhibition durch sgp130Fc unterzogen werden (s. Abb. IV.11). Die Vorgehensweise bei den erhobenen Daten erfolgte nach oben beschriebenem Protokoll (vgl. Kap. III.2.4.1. und III.2.4.2.).

In der in Abb. IV.11 dargestellten Assayauswertung ist deutlich zu erkennen, dass alle Hyperzytokinvarianten Proliferation induzieren. Die biologische Aktivität von Kulturüberständen von Zellen, denen Plasmide transfiziert wurden, die für Split-Intein-Fusionsproteine kodieren, war etwas geringer als die Aktivität der Überstände von Zellen, die mit H-IL-6-Fc oder H-IL-11-Fc transfiziert wurden. Möglicherweise liegt dies an der unvollständigen Umsetzung der Split-Intein-vermittelten Proteinligation. Allerdings induzierten auch die durch Split-Intein-vermittelte Proteinligation entstandenen Hyperzytokine eine deutliche Proliferation, wohingegen Kontrollüberstände dazu nicht in der Lage waren.

Die vier aufgetragenen Hyperzytokine waren durch sgp130Fc inhibierbar, sodass auch hier geschlussfolgert werden kann, dass es sich um Hyperzytokine handelt, welche ausschließlich die gp130-STAT3-Achse als Signalweg bedienen. Die als Kontrollen eingesetzten Hyperzytokinpräkursoren sowie die zytokinfreie Kontrolle ließen keinerlei Proliferation der Zellen erkennen.

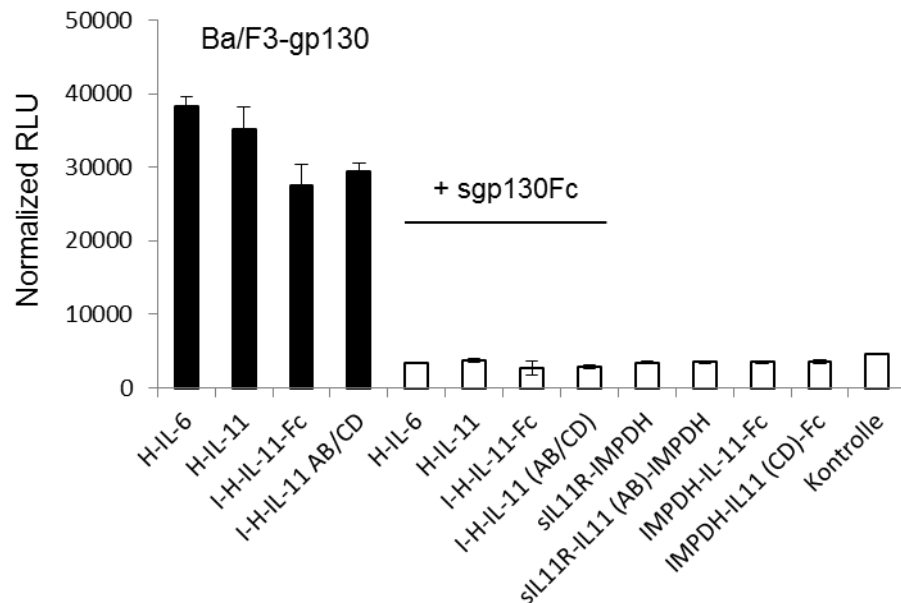


Abb. IV.11: Die co-transfizierten Intein-Hyper-IL-11-Varianten aktivieren Ba/F3-gp130-Zellen und sind durch sgp130Fc inhibierbar.

Ba/F3-Zellen, die stabil mit gp130 transduziert waren, wurden mit 10% Zellkulturüberstand von transfizierten COS-7-Zellen stimuliert. H-IL-6: Transfektion von pcDNA3.1-H-IL-6-Fc. H-IL-11: Transfektion von pcDNA3.1-H-IL-11-Fc. I-H-IL-11-Fc: Co-Transfektion von pcDNA3.1-sIL-11R-IMPDH-KDEL und pcDNA3.1-IMPDH-IL-11-Fc. I-H-IL-11 (AB/CD): Co-Transfektion von pcDNA3.1-sIL-11R-IL-11_{AB}-IMPDH und pcDNA3.1-IMPDH-IL-11_{CD}-Fc. sIL-11R: Transfektion von pcDNA3.1-sIL-11R-IMPDH. sIL-11R-IL-11(AB)-IMPDH: Transfektion von pcDNA3.1-sIL-11R-IL-11_{AB}-IMPDH. IMPDH-IL-11-Fc: Transfektion von pcDNA3.1-IMPDH-IL-11-Fc. IMPDH-IL-11(CD): Transfektion von IMPDH-IL-11_{CD}-Fc.

Nach 48 Stunden wurde die Zellproliferation, wie in Kap. III.2.4.1. beschrieben, gemessen. Die Proben wurden zudem auch in Anwesenheit von 1 µg/ml sgp130Fc analysiert (Spalten 5-8). n=3.

Um die oben gezeigten Daten über eine weitere Versuchsanordnung zu untermauern, wurden erneut Phospho-STAT3-Assays zur Untersuchung der intrazellulären Signaltransduktion durchgeführt. Hierzu kamen ebenfalls Ba/F3-gp130-Zellen zum Einsatz, die nach dem in Kap. III.2.4.3 beschriebenen Protokoll verwendet und anschließend in Laemmli-Puffer erhitzt wurden.

Die aufgetragenen Proben wurden in 10%igen SDS-Gelen getrennt und mittels P-STAT3- und STAT3-Antikörpern durch Western Blotting detektiert.

Die Expression der beiden verschiedenen Split-Intein-Konstrukte wurde in SDS-Gelen für Western Blots aufgetragen, deren Auswertungen in den Abb. IV.12 A (Intein-Hyper-IL-11-Fc) und Abb. IV.12 B (Intein-Hyper-IL-11_{AB/CD}) gezeigt werden.

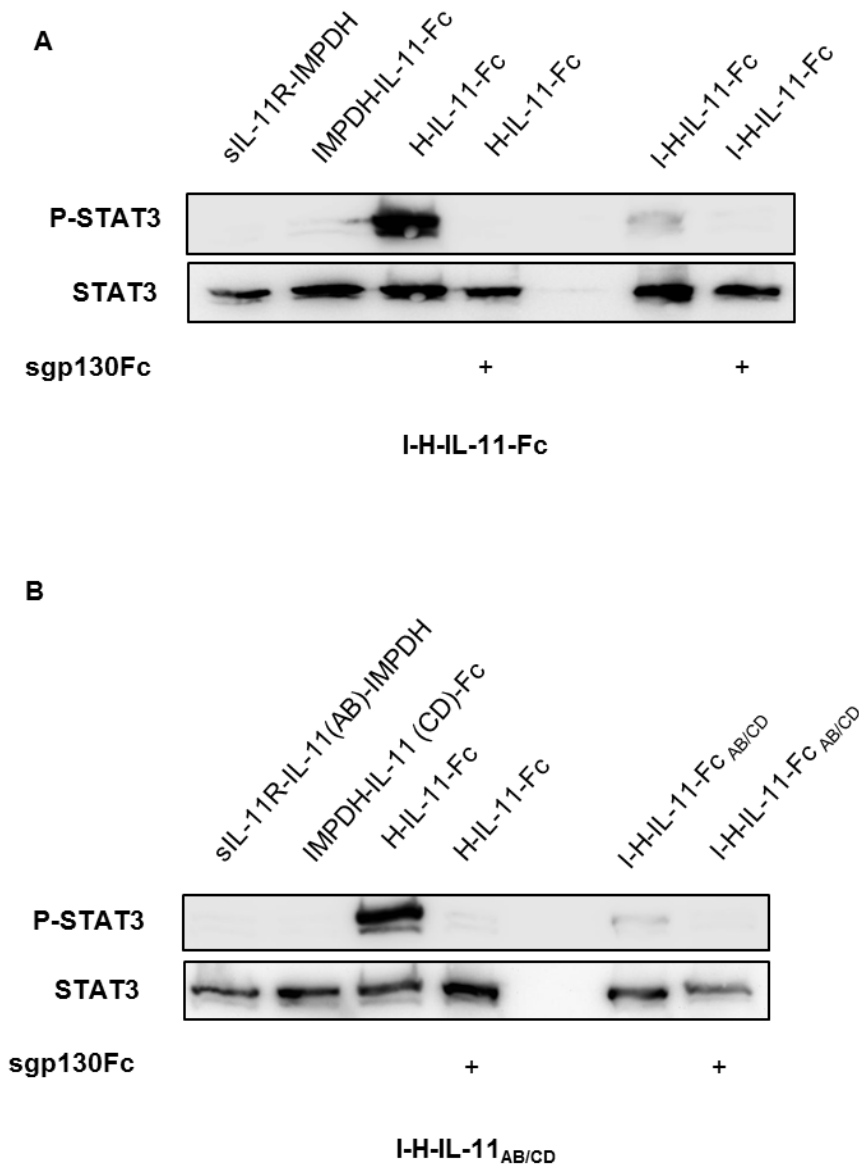


Abb. IV.12: I-H-IL-11-Fc und I-H-IL-11_{AB/CD} aktivieren die STAT3-Achse in Ba/F3-gp130-Zellen.

A: Western Blot-Analyse von Ba/F3-gp130-Zelllysaten gegen phosphoryliertes STAT3 nach 15 min Stimulation. Die Inkubation der Ba/F3-gp130-Zellen erfolgte mit Überständen aus transfizierten COS-7-Zellen. Die Transfektion der COS-7-Zellen erfolgte mit pcDNA3.1-sIL-11R-IMPDH, pcDNA3.1-IMPDH-IL-11-Fc, pcDNA3.1-H-IL-11-Fc sowie in Co-Transfektion von pcDNA3.1-sIL-11R-IMPDH und pcDNA3.1-IMPDH-IL-11-Fc („I-H-IL-11-Fc“). Für die Inhibition mit sgp130Fc wurden die Überstände mit 10 µg/ml sgp130Fc vorinkubiert. Zur Analyse wurden jeweils 20 µl der Zelllysate aufgetragen.

B: Western Blot-Analyse von Ba/F3-gp130-Zelllysaten gegen phosphoryliertes STAT3 nach 15 min Stimulation. Die Inkubation der Ba/F3-gp130-Zellen erfolgte mit Überständen aus transfizierten COS-7-Zellen. Die Transfektion der COS-7-Zellen erfolgte mit pcDNA3.1-sIL-11R-IL-11_{AB}-IMPDH, pcDNA3.1-IMPDH-IL-11_{CD}-Fc, pcDNA3.1-H-IL-11-Fc sowie in Co-Transfektion von pcDNA3.1-sIL-11R-IL-11_{AB}-IMPDH und pcDNA3.1-IMPDH-IL-11_{CD}-Fc („I-H-IL-11_{AB/CD}“). Für die Inhibition mit sgp130Fc wurden die Überstände mit 10 µg/ml sgp130Fc vorinkubiert. Zur Analyse wurden jeweils 20 µl der Zelllysate aufgetragen. n=2.

Wie in Abb. IV.12 A dargestellt, führt die Stimulation von Ba/F3-gp130-Zellen mit hyperzytokinhaltigen Überständen zur Phosphorylierung von STAT3. Im Gegensatz dazu ließen stimulierte Zellen mit Kontrollüberständen, welche lediglich die Hyperzytokineinzelkomponenten (sIL-11R-IMPDH / IMPDH-IL-11-Fc) enthielten, keinerlei STAT3-Phosphorylierung erkennen, wohingegen H-IL-11-Fc als Positivkontrolle ein deutliches Signal hervorrief.

I-H-IL-11-Fc aktivierte ebenfalls STAT3, wenn auch nicht in demselben Umfang wie H-IL-11-Fc. Eine mögliche Erklärung dafür ist die unvollständige Umsetzung der Einzelkomponenten zum vollständigen Hyperzytokin (*trans-splicing*-Fehler).

In Anwesenheit von sgp130Fc sind weder H-IL-11-Fc noch durch inteinvermittelte Proteinligation generiertes I-H-IL-11-Fc in der Lage, eine STAT3-Phosphorylierung zu induzieren (4. und 7. Spalte der P-STAT3-Detektion).

Auch bei I-H-IL-11_{AB/CD} (Abb. IV.12 B) ließen sich analog zur Nonsplit-H-IL-11-Variante keinerlei STAT3-Aktivierungen durch die Rezeptor-Splitzytokin- (sIL-11R-IL-11_{AB}-IMPDH) bzw. Splitzytokinseite (IMPDH-IL-11_{CD}-Fc) feststellen.

Sowohl H-IL-11-Fc als auch I-H-IL-11_{AB/CD} aktivierten die gp130-STAT3-Achse und waren über sgp130Fc inhibierbar. Die geringere STAT3-Aktivierung beim Split²-I-H-IL-11 lässt sich im Vergleich zur Nonsplit-Variante (vgl. Abb. IV.12 A) erneut durch die unvollständige Umsetzung und zusätzlich durch die unreife Tertiärstruktur des Hyperzytokins erklären.

2.4. Fortführung und Abschluss des Intein-Hyper-IL-6-Projekts

Zur Fortführung des Intein-Hyper-IL-6-Projekts, das im Jahr 2013 am Institut für Biochemie und Molekularbiologie II begonnen wurde und als erstes Projekt in einer Reihe von Untersuchungen das Ziel hatte, Hyperzytokine über eine Intein-Expressionsstrategie zu synthetisieren, sollte im Rahmen dieser Dissertation ein weiteres Teilprojekt verfolgt werden. Hierbei sollten Varianten des bestehenden sIL-6R-IMPDH und des sIL-6R-IL-6_{AB}-IMPDH (IL-6R_{AB/CD}-Konstrukt) erstellt werden, bei denen das bislang enthaltene KDEL-Signal abgespalten wurde. Dieses Signal kodiert als ER-Retentionssignal und sorgt dafür, dass die Rezeptoren in die Membran eingebaut werden. Diese Versuchsanordnung diente dazu, zu verifizieren, dass das durch das physiologische KDEL-Signal zurückgehaltene sIL-6R-IL-6_{AB}-

IMPDH-Molekül (IL-6R-IL-6_{AB/CD}-Int^N) singular tatsächlich biologisch inaktiv ist und nur im Zusammenspiel mit der zugehörigen carboxyterminalen Inteinseite (IMPDH-IL-6_{CD}-Fc, Int^C-IL-6_{AB/CD}-Fc) in der Lage ist, aktives H-IL-6 zu bilden und eine Signaltransduktion auszulösen.

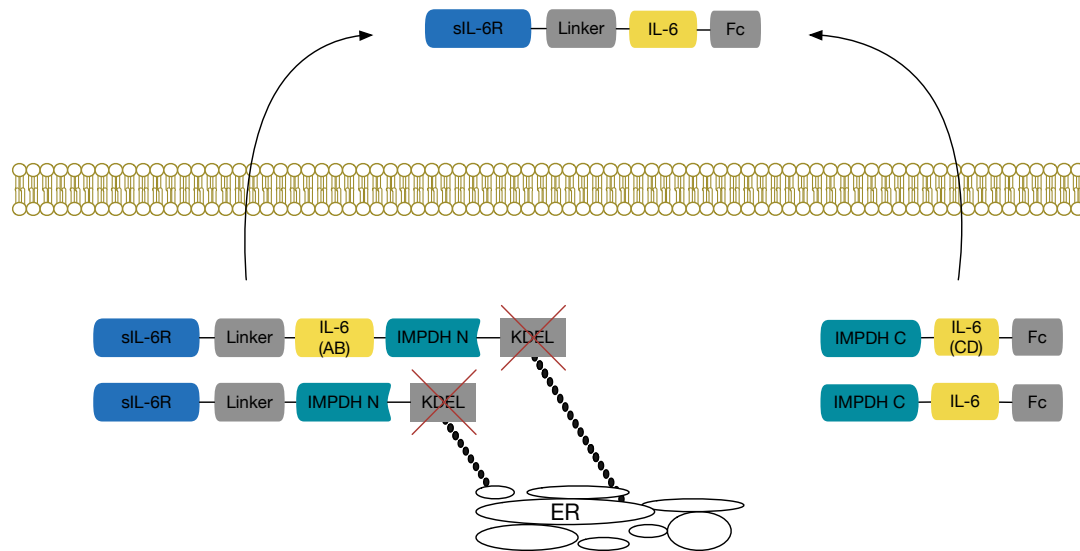


Abb. IV.13: Schema KDEL-Deletion

Das physiologische KDEL-Signal verhindert als ER-Retentionssignal die vermehrte Sekretion der Rezeptorseiten in den Zellkulturüberstand. Während die Interleukin-Seite der Split-Zytokinkonstrukte problemlos durch die Membran diffundieren kann, sollte durch die KDEL-Deletion (hier in rot angedeutet) die Ligationseffizienz für H-IL-6-Fc deutlich gesteigert werden.

2.4.1. Klonierung von Δ KDEL-Varianten und Expressionstest

In diesem Teilprojekt wurden von den vorhandenen Intein-Hyper-IL-6-Varianten von den sIL-6R-IMPDH-KDEL-Fusionsgenen die ER-Retentionssignale (KDEL-Sequenzen) abgespalten (vgl. Klonierungsschema in Abb. IV.13). Hierdurch wurde die durch diese Sequenz verursachte intrazelluläre Retention der Rezeptoren verhindert, sodass diese vermehrt sezerniert wurden. Da diese Varianten ebenfalls den IMPDH-Inteinanteil besaßen und die korrespondierenden co-transfizierten IMPDH^C-IL-6-Fusionsgene für leicht sezernierbare Proteine kodieren, sollte so die Ligationseffizienz zum Hyperzytokin deutlich gesteigert werden.

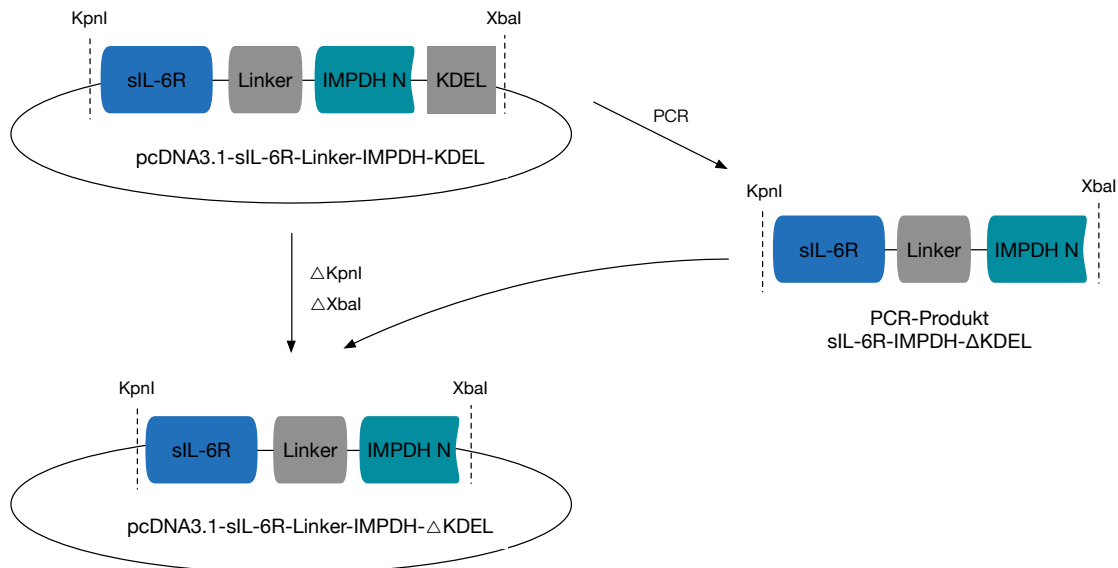


Abb. IV.14: Klonierungsschema der sIL-6R-ΔKDEL-Konstrukte am Bsp. des pcDNA3.1-sIL-6R-IMPDPH-ΔKDEL

Um das ER-Retentionssignal KDEL aus den vorhandenen sIL-6R-Plasmiden zu eliminieren, wurden speziell angefertigte Oligonukleotide (ΔKDEL fw/ ΔKDEL rev) eingesetzt, die entsprechende KDEL-freie Sequenzen generierten. Diese konnten über Restriktionsanalyse verifiziert und anschließend über die Restriktionsschnittstellen *KpnI* und *XbaI* in das vorbereitete pcDNA3.1-sIL-6R-Linker-IMPDPH-Plasmid eingebracht werden.

Analoge Klonierungen für das pcDNA3.1-sIL-6R-Linker-IL-6_{AB}-IMPDPH- und das pcDNA3.1-sIL-6R-Linker-IL-6_{ABC}-IMPDPH-Plasmid wurden durchgeführt.

Diese Versuchsanordnung sollte nachweisen, dass das sIL-6R-IL-6_{AB} / _{ABC}-IMPDPH-Molekül alleine tatsächlich nicht in der Lage ist, eine Signaltransduktion auszulösen, sondern ausschließlich bei Co-Transfektion mit IMPDPH-IL-6_{AB/CD}; _{ABC/D}-Fc die Möglichkeit besitzt, biologisch aktives H-IL-6 zu bilden. Durch die Deletion der KDEL-Sequenz wären erwartungsgemäß die Split-IL-6-Varianten (sIL-6R-IL-6_{AB/CD}; _{ABC/D}-IMPDPH) im Überstand zu finden gewesen, die in biologischen Assays keinerlei intrazelluläre Signaltransduktion auslösen.

Die Klonierung erfolgte mit eigens für dieses Projekt erstellten Oligonukleotiden (ΔKDEL fw/rev, vgl. Kap. III.1.1.6.), die bei einer Polymerasekettenreaktion auf die bestehenden Intein-Varianten (*full length*, AB/CD, ABC/D) zum Einsatz kamen. Die fertigen KDEL-freien (ΔKDEL) PCR-Inserts wurden über einen Restriktionsverdau zuerst blunt in pcDNA3.1 überführt (Restriktion des Vektors über *PmeI*) und anschließend über *KpnI* und *XbaI* in die ursprünglichen Vektoren kloniert.

Nach erfolgreichem Testverdau und positiver Sequenzierung konnten die ΔKDEL-Varianten in COS7-Zellen transfiziert werden. Die erstellten Zellkulturüberstände und Lysate dieser Zellen wurden in den Abb IV.14-16 gegen die originären Zytokine bzw. Rezeptoren mit KDEL-Signal dargestellt.

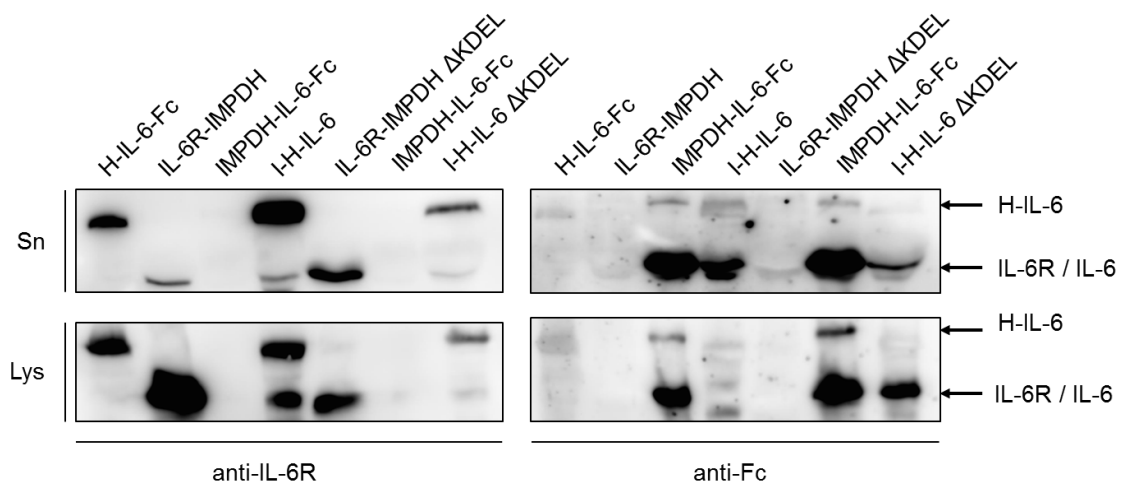


Abb. IV.15: Expressions-Western Blots IL-6R vs. IL-6R Δ KDEL

Lysate und Überstände aus COS-7-Zellen, die mit H-IL-6-Fc, sIL-6R-IMPDH-KDEL, IMPDH-IL-6-Fc und sIL-6R-IMPDH Δ KDEL transfiziert bzw. mit sIL-6R-IMPDH-KDEL und IMPDH-IL-6-Fc („I-H-IL-6-Fc“) sowie mit sIL-6R-IMPDH Δ KDEL und IMPDH-IL-6-Fc („I-H-IL-6 Δ KDEL“) co-transfiziert wurden, konnten mittels Western Blotting analysiert werden.

Die Detektion erfolgte unter Verwendung des IL-6R-Antikörpers gegen den hIL-6R (jeweils linke Darstellung) sowie des Fc-Antikörpers gegen den Fc-tag (jeweils rechte Darstellung). Es wurden jeweils 20 μ l Zelllysate und 80 μ g Gesamtprotein aus dem Überstand aufgetragen. n=3.

In Abb. IV.15 sind vergleichende Western Blots der Intein-Varianten des *full length* sIL-6R mit und ohne KDEL-Signal dargestellt. Es fällt auf, dass innerhalb der anti-IL-6R-Detektion der Rezeptor ohne KDEL-Signal trotz geringerer Expression deutlich stärker in den Überstand sezerniert wird als der Rezeptor mit KDEL-Signal (vgl. Überstand- und Lysatblot der anti-IL-6R-Detektion in der 2. vs. 5. Spalte). Gleichzeitig ist die geringere inteinvermittelte Proteinligation bei den Δ KDEL-Varianten ablesbar (beide Detektionen, vgl. 7. Spalte ohne KDEL vs. 4. Spalte mit KDEL).

In einer weiteren Anordnung wurde die Sekretion der zwischen B- und C-Helix zweigeteilten IL-6-Variante (IL-6_{AB/CD}) mit und ohne KDEL-Signal sowie mit *splicing*-defizienten Inteinen (Mut) analysiert. Die durch Basenaustausch mutierten und somit funktionsuntüchtigen Inteine dienten als Kontrolle dafür, dass die inteinbasierte Hyper-IL-6-Expression im Rahmen dieses Versuchs ausgeschaltet wurde.

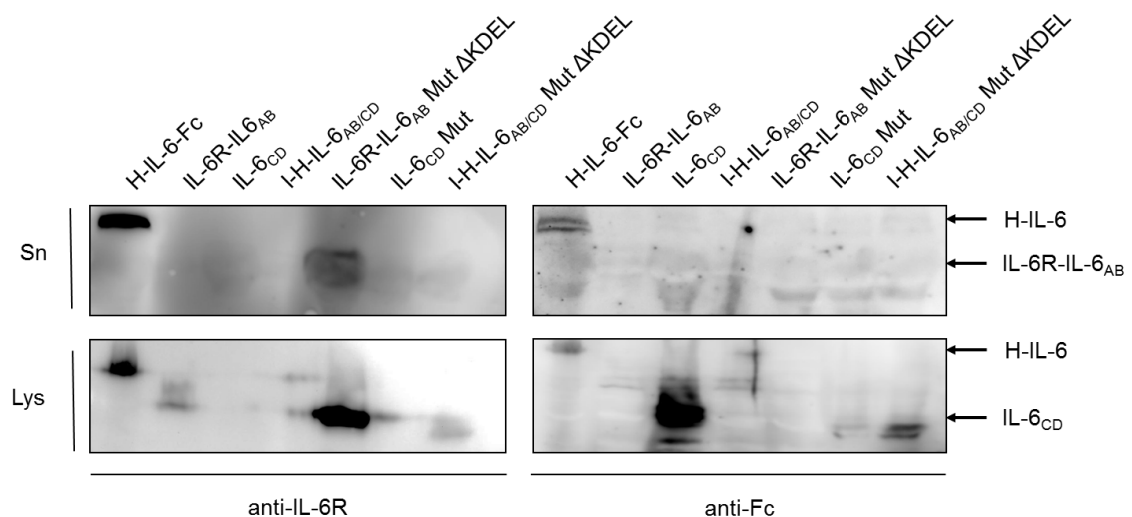


Abb. IV.16: Expressions-Western Blot IL-6R AB/CD vs. IL-6R AB/CD Mut Δ KDEL

Lysate und Überstände aus COS-7-Zellen, die mit H-IL-6-Fc, sIL-6R-IL-6_{AB}-IMPDH-KDEL („IL-6R-IL-6_{AB}“), IMPDH-IL-6_{CD}-Fc („IL-6_{CD}“), sIL-6R-IL-6_{AB}-IMPDH Mut Δ KDEL („IL-6R-IL-6_{AB} Mut Δ KDEL“) und IMPDH-IL-6_{CD}-Fc Mut („IL-6_{CD} Mut“) transfiziert bzw. mit sIL-6R-IL-6_{AB}-IMPDH-KDEL und IMPDH-IL-6_{CD}-Fc („I-H-IL-6_{AB/CD}“) sowie mit sIL-6R-IL-6_{AB}-IMPDH Mut Δ KDEL und IMPDH-IL-6_{CD}-Fc Mut („I-H-IL-6_{AB/CD} Mut Δ KDEL“) co-transfiziert wurden, konnten mittels Western Blotting analysiert werden.

Die Detektion erfolgte unter Verwendung des anti-IL-6R-Antikörpers gegen den hIL-6R (jeweils linke Darstellung) sowie des Fc-Antikörpers gegen den enthaltenen Fc-tag (jeweils rechte Darstellung). Es wurden jeweils 20 μ l Zelllysate und 80 μ g Gesamtprotein aus dem Überstand aufgetragen. n=4.

Für die gezeigte Auftragung der IL-6_{AB/CD}-Varianten (Abb. IV.16) konnten in wiederholten Versuchen keine eindeutigen Ergebnisse in Bezug auf eine Δ KDEL-basierte Sekretion erzielt werden. Es ist zu erkennen, dass ein Fusionsprotein aus löslichem IL-6R und der A- und B-Helix von IL-6 (IL-6R-IL-6_{AB}) nach Deletion des ER-Retentionssignals in den Überstand sezerniert wurde (vgl. 2. vs. 5. Spalte). Es lässt sich ebenfalls konstatieren, dass durch die reguläre AB/CD-Variante Intein-Hyper-IL-6, in der mutierten AB/CD- Δ KDEL-Variante jedoch kein I-H-IL-6 gebildet wurde (vgl. Spalten 4 und 7).

Leider konnte in der anti-Fc-Detektion der Nachweis der mutierten Δ KDEL-Varianten nicht ausreichend untermauert werden, da neben der H-IL-6-Fc Positivkontrolle nicht alle Proteine mit Fc-tag im Re-Blot detektiert werden konnten. Hier fehlen neben I-H-IL-6_{AB/CD} (4. Spalte) auch die Fc-markierten Anteile der IL-6_{CD} Mutante in der Einzel- (6. Spalte) und Co-Transfektion (7. Spalte, hier schwach zu erkennen).

Nach Teilung von IL-6 zwischen der C- und D-Helix (IL-6R-IL-6_{ABC/D}) ergab sich ein ähnliches Bild (Abb IV.17).

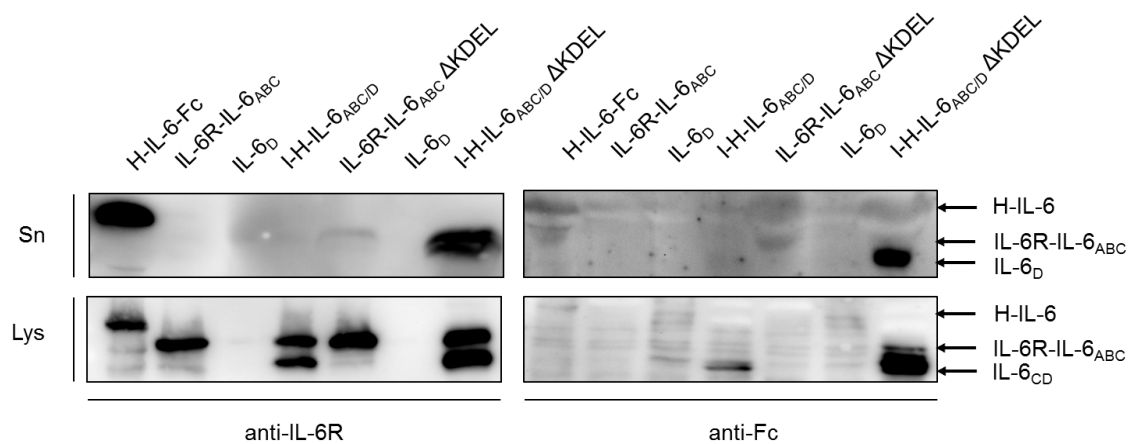


Abb. IV.17: Expressions-Western Blot IL-6R ABC/D vs. IL-6R ABC/D ΔKDEL

Lysate und Überstände aus COS-7-Zellen, die mit H-IL-6-Fc, sIL-6R-IL-6_{ABC}-IMPDH-KDEL („IL-6R-IL-6_{ABC}“), IMPDH-IL-6_D-Fc („IL-6_D“), sIL-6R-IL-6_{ABC}-IMPDH ΔKDEL („IL-6R-IL-6_{ABC} ΔKDEL“) und IMPDH-IL-6_D-Fc („IL-6_D“) transfiziert bzw. mit sIL-6R-IL-6_{ABC}-IMPDH-KDEL und IMPDH-IL-6_D-Fc („I-H-IL-6_{ABC/D}“) sowie mit sIL-6R-IL-6_{ABC}-IMPDH ΔKDEL und IMPDH-IL-6_D-Fc („I-H-IL-6_{ABC/D} ΔKDEL“) co-transfiziert wurden, konnten mittels Western Blotting analysiert werden.

Die Detektion erfolgte unter Verwendung des anti-IL-6R-Antikörpers gegen den hIL-6R (jeweils linke Darstellung) sowie des Fc-Antikörpers gegen den enthaltenen Fc-tag (jeweils rechte Darstellung). Es wurden jeweils 20 µl Zelllysate und 80 µg Gesamtprotein aus dem Überstand aufgetragen. n=2.

Auffallend ist hier, dass neben der gut detektierbaren H-IL-6-Fc-Positivkontrolle kein I-H-IL-6 aus der regulären ABC/D-KDEL- sowie der ΔKDEL-Variante gebildet wurde (4. / 7. Spalte). Stattdessen waren im Lysat der anti-IL-6R-Detektion Degradationsprodukte bei ca. 40-50 kDa nachweisbar, die darauf hinwiesen, dass die ABC/D-Variante für Intein-Hyper-IL-6 nur mäßig stabil ist.

Analog zur AB/CD-Variante in Abb. IV.16 ist auch hier im Re-Blot der anti-Fc-Detektion nicht alles detektierbar, was den Erwartungen entsprochen hätte. So fehlen vor allem die scheinbar instabilen IL-6_{ABC/D}-Varianten, die aus unbekannter Ursache weder im Lysat noch im Überstand nachzuweisen waren.

2.5. Zusammenfassung

Abschließend lässt sich zum inteinbasierten Proteinexpressionssystem Folgendes festhalten:

- **Die inteinvermittelte Proteinligation lässt sich generalisiert für die Expression von Hyperzytokinen einsetzen.**

Durch die Erweiterung des durch Vorarbeiten etablierten Intein-vermittelten Systems zur Generierung von biologisch aktivem Hyper-IL-6 auf Hyper-IL-11 kann festgestellt werden, dass die verwendete Fusionsstrategie über das zuverlässige *trans-splicing* für toxische, sekretorische Proteine wie Hyperzytokine generalisiert anwendbar ist. Die toxischen Effekte der Proteine können über die posttranslationale Ligation aus den inaktiven Vorstufen umgangen werden.

- **Intein-Hyper-IL-11 konnte sowohl als Nonsplit- als auch als Split-Konstrukt erfolgreich verwendet werden.**

Es konnte gezeigt werden, dass eine Verknüpfung der Einzelkomponenten zu biologisch aktivem Hyper-IL-11 sowohl über das Nonsplit- als auch über das Split-Konstrukt erfolgt. Beide Proteine sind in der Lage, die gp130-abhängige Signalkaskade über die STAT3-Phosphorylierung zu aktivieren; dies konnte wiederholt zum einen in Zellviabilitätsassays und zum anderen in P-STAT3-Assays eindeutig belegt werden.

- **Eine Pilotstudie zu I-H-IL-6 Δ KDEL-Varianten konnte die zuvor aufgestellten Hypothesen nur in begrenztem Maße bestätigen.**

Während bei der IL-6R *full length*-Variante die Hypothese, dass durch die Deletion des KDEL-Signals deutlich mehr Rezeptorproteine sezerniert werden, verifiziert wurde, gelang dies aus bislang ungeklärter Ursache bei den Split-Intein-Konstrukten (AB/CD bzw. ABC/D) nicht. In den Western Blots erscheinen deutlich kleinere Degradationsprodukte, die bislang nicht näher zugeordnet werden konnten.

3. Identifizierung des IL-11R als alternativer IL-6-Rezeptor

Im Rahmen des Forschungsprojektes wurde neben den Analysen zur Funktionalität und biologischen Aktivität der Hyper-Interleukin-11-Varianten an einem weiteren Aspekt der Signaltransduktion der Zytokine geforscht. Hierbei ging es um die Findung von Niedrig-Affinitätsrezeptoren der Zytokine im Bereich des sog. *Crosstalks* innerhalb der IL-6-Familie.

Verschiedene Zytokine der IL-6-Familie inklusive IL-6 teilen sich α -Rezeptoren, wie z.B. IL-6R (IL-6, IL-30 und CNTF) und CNTFR (CNTF und CLC) (Garbers, Spudy *et al.* 2013). Zusätzlich ist bekannt, dass OSM über zwei verschiedene β -Rezeptoren (OSMR und LIFR) Signaltransduktion betreiben kann (Garbers und Scheller 2013). Dieser sogenannte *Crosstalk* innerhalb der IL-6-Familie erweitert die Zahl der Zellen, die durch individuelle Zytokine aktiviert werden können. Für IL-6 wurde bislang kein alternativer Rezeptor gefunden, allerdings zeigten sich Unterschiede in Mausmodellen von DSS-induzierter Colitis und in Wundheilungsmodellen zwischen IL-6^{-/-} und IL-6R^{-/-} Mäusen (McFarland-Mancini, Funk *et al.* 2010, Sommer 2014). Es ist also naheliegend, dass es einen alternativen Rezeptor für IL-6 gibt. Tatsächlich wurde kürzlich erstmals CD5 als alternativer Rezeptor für IL-6 beschrieben (Masuda und Kishimoto 2016). Aufgrund der großen Promiskuität von IL-6-artigen Zytokinen und ihren Rezeptoren, waren wir daran interessiert zu erfahren, ob IL-6 in der Lage ist, auch andere α -Rezeptoren der IL-6-Familie zu aktivieren. Nakayama (1998) und Watson, Whittaker *et al.* (1996) konnten zeigen, dass K-562- und HUVEC-Zellen IL-6-responsiv sind. Interessanterweise exprimieren beide Zelllinien keinen IL-6R oder CD5 (Lozzio und Lozzio 1979), allerdings weisen beide Zelllinien eine starke IL-11R-Expression auf. Diese Daten veranlassten uns dazu, einen möglichen *Crosstalk* von IL-6 mit dem IL-11R zu untersuchen.

3.1. IL-6 induziert STAT3-Phosphorylierung in IL-6R-defizienten Zellen

In einem ersten Schritt wurden K-562-Zellen auf eine mögliche IL-6R-Oberflächenexpression untersucht. Wie in Abb. IV. 18 (obere Darstellung) zu erkennen ist, konnte keine IL-6R-Expression auf K-562-Zellen nachgewiesen werden. Allerdings konnte gezeigt werden, dass der IL-11R (Abb. IV.18, untere Darstellung) auf der Zelloberfläche vorhanden ist.

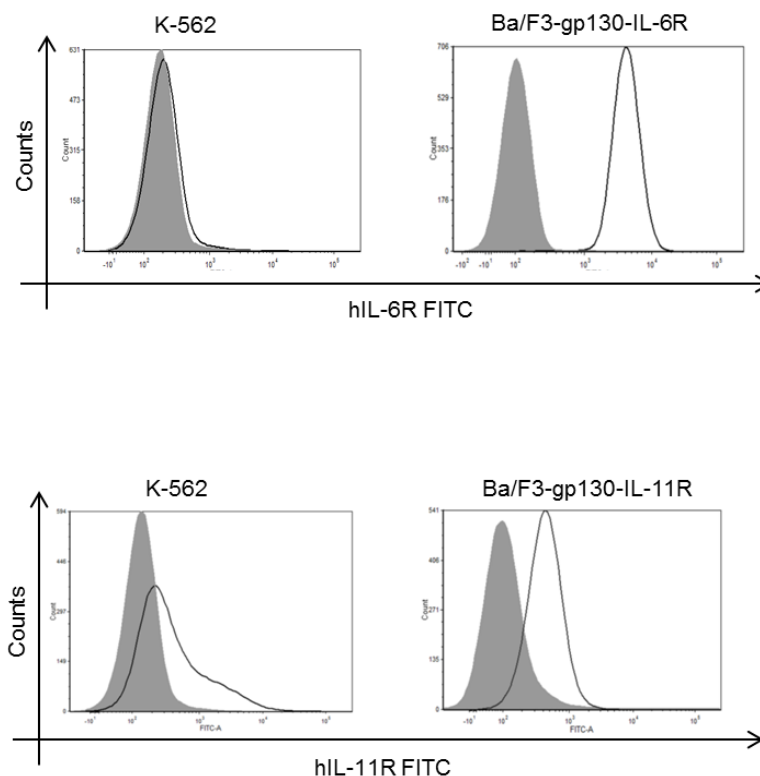


Abb. IV.18: Durchflusszytometrieanalyse der K-562-Zellen auf IL-6R und IL-11R

In den gezeigten Grafiken sind die Ergebnisse der Zytometrieanalyse dargestellt. Im Vergleich zu den weder IL-6R noch IL-11R besitzenden Ba/F3-gp130-Zellen (grau) zeigen die K-562-Zellen ausschließlich bei der Detektion des IL-11R einen *Shift*. Die transduzierten Ba/F3-gp130-IL-6R und Ba/F3-gp130-IL-11R-Zellen dienen als Positivkontrolle. n=2.

*FITC = Fluoresceinisothiocyanat

Um einen möglichen *Crosstalk* von IL-6 mit dem IL-11R zu untersuchen, wurden K-562-Zellen mit IL-6 und IL-11 stimuliert. Nach Stimulation mit steigenden IL-6-Konzentrationen konnte eine konzentrationsabhängige Induktion der STAT3-Phosphorylierung in K-562-Zellen gezeigt werden (s. Abb. IV.18, oben). Die Aktivierung der STAT3-Achse wurde durch Zugabe von 10 µg/ml Tocilizumab nicht beeinflusst, was weiterhin darauf schließen lässt, dass für die IL-6-induzierte STAT3-

Phosphorylierung kein IL-6R benötigt wird. Im Gegensatz dazu lässt sich die STAT3-Phosphorylierung durch einen IL-6-spezifischen Inhibitor (RFP) komplett blockieren. Dies impliziert, dass es sich um einen IL-6-spezifischen Effekt handeln muss.

Der IL-6-spezifische Inhibitor RFP ist ein Fusionsprotein, bestehend aus den jeweils extrazellulären, zytokinbindenden Domänen 2 und 3 des IL-6R sowie den Domänen 1-3 von gp130, das in der Lage ist, freies IL-6 zu binden und somit für einen Viabilitätstest zu inaktivieren. Da es sich um ein Rezeptorfusionsprotein handelt, wurde es im Rahmen der Versuche der Einfachheit halber als „RFP“ abgekürzt. Eine Schemazeichnung des verwendeten Inhibitors ist in Abb. IV.20 dargestellt (Metz, Wiesinger *et al.* 2007).

Da K-562-Zellen den IL-11R exprimieren, waren wir daran interessiert, ob durch Überexpression des IL-11R in HEK293-Zellen eine IL-6-induzierte STAT3-Phosphorylierung erzielt werden kann. Eine IL-6-induzierte Signaltransduktion über einen membranständigen IL-6R kann in HEK293-Zellen ausgeschlossen werden.

Tatsächlich konnte nach IL-6-Stimulation von IL-11R-transfizierten HEK293-Zellen eine konzentrationsabhängige STAT3-Phosphorylierung in HEK293-Zellen nachgewiesen werden (s. Abb. IV.19, untere Darstellung). Diese STAT3-Phosphorylierung war analog zu den Experimenten mit den K-562-Zellen nicht durch Tocilizumab reprimierbar. Der IL-6-Inhibitor RFP unterdrückte jedoch das STAT3-Signal deutlich.

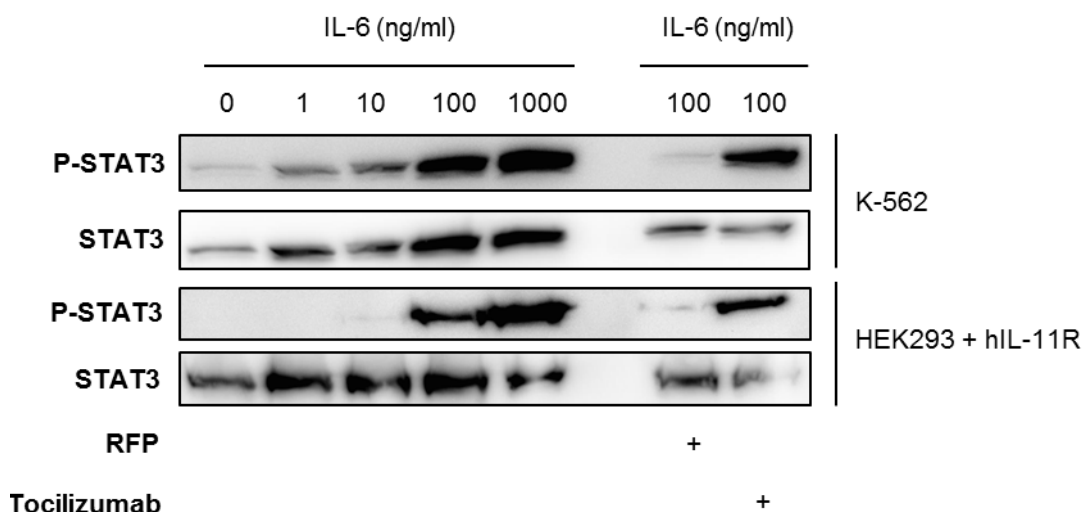


Abb. IV.19: IL-6 aktiviert STAT3 in K-562 und HEK293 + hIL-11R bei fehlendem IL-6R

Western Blot-Analyse von K-562- und HEK293-Zelllysaten gegen phosphoryliertes STAT3 nach 15 min Stimulation. Die HEK293-Zellen wurden vorab mit dem hIL-11R transfiziert. Die Inkubation beider Zelltypen erfolgte mit rekombinantem hIL-6. Für die Inhibition mit RFP und Tocilizumab wurden die Proben mit RFP im molaren Verhältnis 5:1 bzw. Tocilizumab 10 µg/ml vorinkubiert. Zur Analyse wurden jeweils 35 µl der Zelllysate aufgetragen. n=3.

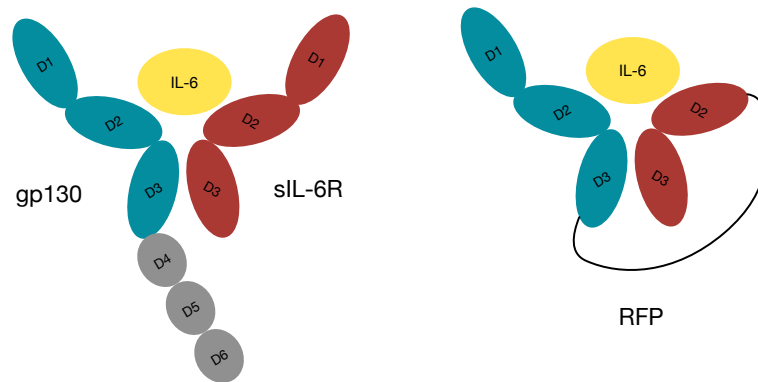


Abb. IV.20: Schematischer Aufbau des IL-6-Inhibitors IL-6-RFP

In dieser Abbildung sind zum einen die reguläre Affinität zwischen IL-6 und dem α/β -Rezeptorkomplex (links) sowie die Affinität zwischen RFP und IL-6 (rechts) dargestellt. Das RFP-Molekül weist hierbei die Zytokin-Bindemodule (CBM-Domänen) von gp130 und IL-6R auf, um freies IL-6 effektiv abfangen zu können.

Um sicherzustellen, dass K-562-Zellen einen biologisch aktiven, oberflächen-exponierten IL-11R exprimieren, wurden zusätzlich IL-11-Stimulationen durchgeführt. Abb. IV.21 zeigt eine konzentrationsabhängige Induktion des STAT3-Signals. Weder Tocilizumab noch RFP sind in der Lage, das Signal zu unterdrücken. Dies lässt darauf schließen, dass K-562-Zellen einen biologisch aktiven IL-11R auf ihrer Oberfläche tragen.

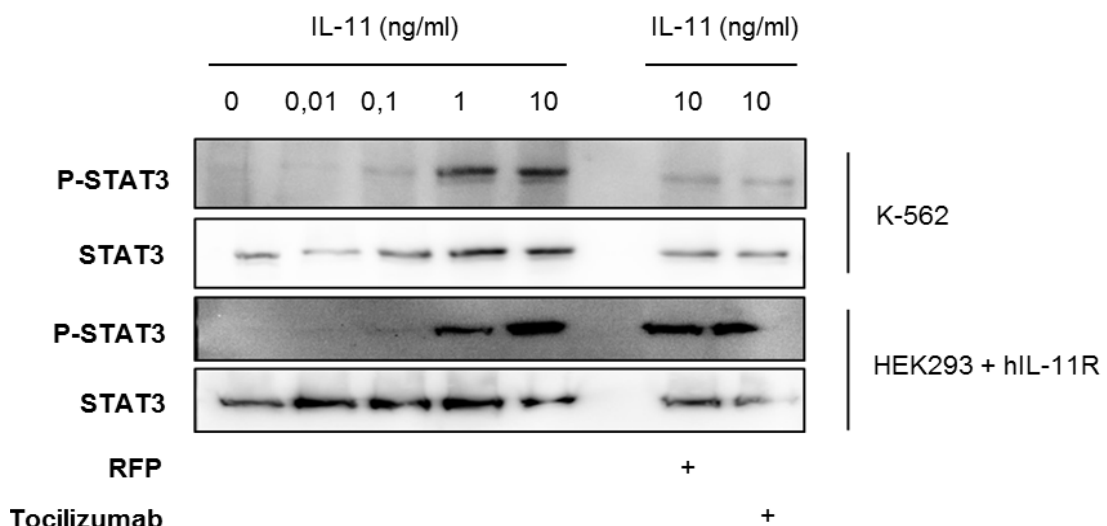


Abb. IV.21: IL-11 aktiviert STAT3 in K-562 / HEK293 + hIL-11R

Western Blot-Analyse von K-562- und HEK293-Zelllysaten gegen phosphoryliertes STAT3 nach 15 min Stimulation. Die HEK293-Zellen wurden vorab mit hIL-11R transfiziert. Die Inkubation beider Zelltypen erfolgte mit rekombinantem hIL-11. Für die Inhibition mit RFP und Tocilizumab wurden die Proben mit RFP im molaren Verhältnis 5:1 bzw. Tocilizumab 10 $\mu\text{g/ml}$ vorinkubiert. Zur Analyse wurden jeweils 35 μl der Zelllysate aufgetragen. $n=3$.

3.2. IL-6 induziert Proliferation und STAT3-Phosphorylierung in Ba/F3-Zellen, die stabil mit gp130 und IL-11R transduziert sind

Nachdem anhand der oben dargestellten Daten nachgewiesen werden konnte, dass durch IL-6 eine Signalaktivierung auf Zellen möglich ist, die den IL-11R tragen, sollte in der Folge untersucht werden, ob durch Zugabe von rekombinanten Proteinen eine Aktivierung von Zellen, die Träger des IL-11R sind, ermöglicht werden kann.

Hierzu wurden initial Ba/F3-gp130-IL-11R-Zellen verwendet, die sowohl gp130 als auch IL-11R stabil transduziert tragen.

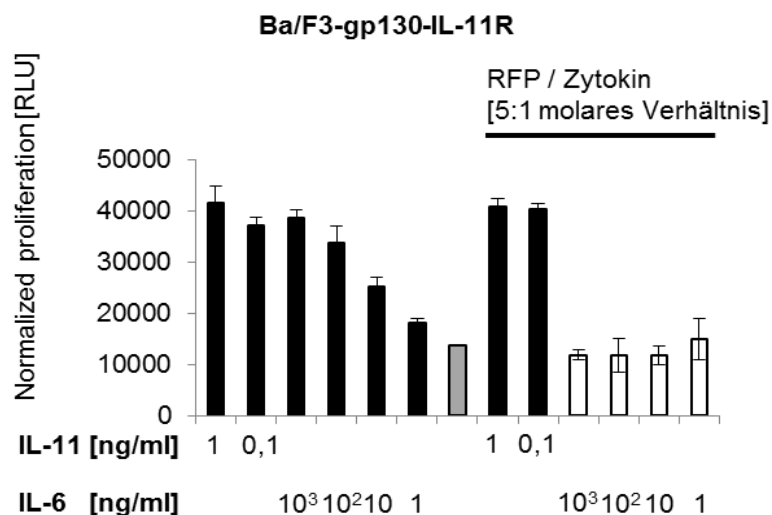


Abb. IV.22: IL-6 regt die Proliferation in Ba/F3-gp130-IL-11R-Zellen an und kann durch RFP inhibiert werden

Ba/F3-Zellen, die stabil mit gp130 und hIL-11R transduziert wurden, wurden mit den angegebenen Konzentrationen IL-6 oder IL-11 stimuliert. Zusätzlich wurde der IL-6-Inhibitor RFP wie angegeben eingesetzt, um eine IL-6-induzierte Proliferation zu unterdrücken. Der graue Balken in der Mitte markiert die unstimulierte Kontrolle. Die Proliferation wurde nach 48 h, wie in Kap. III.2.4.1. beschrieben, quantifiziert. n=3.

Wie in Abb. IV.22 dargestellt, ließ sich durch IL-11 eine Proliferation in Ba/F3-gp130-IL-11R-Zellen induzieren. RFP hatte keinen Effekt auf die IL-11-Stimulation der Zellen. Weiterhin war eine konzentrationsabhängige Steigerung der Proliferation unter IL-6 zu verzeichnen, Konzentrationen von 100 ng/ml IL-6 lösten eine zu 1 ng/ml IL-11 vergleichbare Signaltransduktion aus. Außerdem war zu erkennen, dass in Anwesenheit von RFP keine IL-6-induzierte Proliferation mehr stattfand.

Hieraus lässt sich schließen, dass IL-6 in hohen Konzentrationen in der Lage ist, den IL-11R zu aktivieren.

Da eine Kontamination der Ba/F3-gp130-IL-11R-Zellen mit Zellen, die den IL-6R exprimieren und diesen Effekt auslösen könnten, ausgeschlossen werden sollte, wurde anschließend eine zweite Versuchsanordnung gewählt. In dieser wurden wiederum auf o.g. Zellen Konzentrationsreihen von IL-11 und IL-6 gegenübergestellt und als Inhibitor wurde der monoklonale IL-6R-Antikörper Tocilizumab (*RoActemra*, Fa. Roche) eingesetzt. Wenn eine Kontamination durch IL-6R-exprimierende Zellen in der Versuchsanordnung gegeben gewesen wäre, wäre der oben genannte Effekt durch den Inhibitor unterbunden worden.

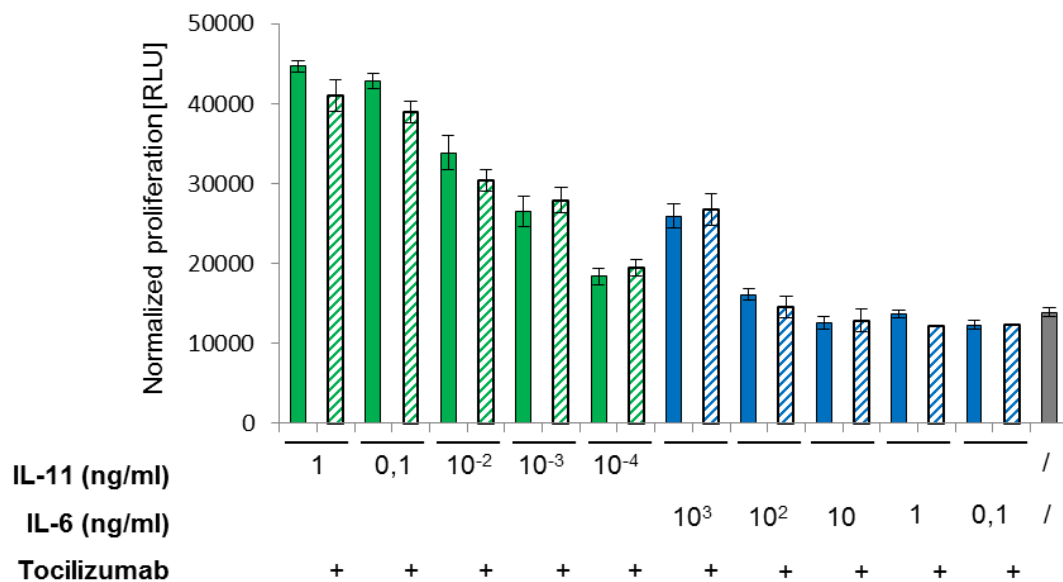


Abb. IV.23: IL-6 regt Proliferation in Ba/F3-gp130-IL-11R-Zellen unter Ausschluss des IL-6R an

Ba/F3-Zellen, die stabil mit gp130 und hIL-11R transduziert wurden, wurden mit den angegebenen Konzentrationen IL-6 oder IL-11 stimuliert. Zusätzlich wurde der IL-6R-Inhibitor Tocilizumab mit 10 µg/ml wie angegeben eingesetzt, um eine IL-6R-vermittelte Signaltransduktion zu unterbinden. Die Proliferation wurde nach 48 h, wie in Kap. III.2.4.1. beschrieben, quantifiziert. n=3.

In der dargestellten Versuchsauswertung (Abb. IV.23) konnte konstatiert werden, dass die Ba/F3-gp130-IL-11R-Zellen durch eine konzentrationsabhängige Steigerung mit IL-11 proliferierten und ab 0,1 ng/ml die Maximalproliferation erreichten (Spalten 1-9). Im Vergleich zu den gleichen Konzentrationen unter Zugabe von Tocilizumab (Spalten 2-10, schraffiert) ließ sich keinerlei Unterschied feststellen, da dieser Inhibitor ausschließlich den IL-6R blockiert.

Weiterhin konnte gezeigt werden, dass IL-6 eine konzentrationsabhängige Steigerung der Proliferationsrate in Ba/F3-gp130-IL-11R-Zellen induziert (Spalten 11-19). Kontrollexperimente mit dem IL-6R-Antagonisten Tocilizumab bestätigten weiterhin einen IL-6R-unabhängigen Effekt von IL-6 (Spalten 12-20, schraffiert).

Anschließend sollte zur Untermuerung und Absicherung der bislang erzielten Ergebnisse der intrazellulären Signaltransduktion durch die IL-6-induzierten Effekte auf die STAT3-Phosphorylierung in Ba/F3-gp130-IL-11R-Zellen untersucht werden.

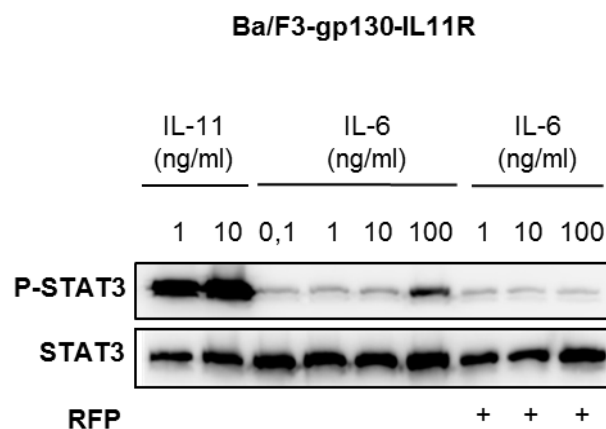


Abb. IV.24: IL-6 ist in der Lage, STAT3 in Ba/F3-gp130-IL-11R-Zellen zu aktivieren

Western Blot-Analyse von Ba/F3-gp130-IL-11R-Zelllysaten gegen phosphoryliertes STAT3 nach 15 min Stimulation. Die Inkubation der Ba/F3-gp130-Zellen erfolgte mit Überständen aus transfizierten COS-7-Zellen. Für die Inhibition mit RFP wurden die Überstände im 5:1-molaren Verhältnis vorinkubiert. Zur Analyse wurden jeweils 35 µl der Zelllysate aufgetragen. n=3.

Abb. IV.24 veranschaulicht, dass eine Stimulation von Ba/F3-gp130-IL-11R-Zellen mit IL-11 zu einer STAT3-Phosphorylierung führt. Weiterhin konnte eine Aktivierung der Zellen durch 100 ng/ml IL-6 detektiert werden, niedrigere Konzentrationen führten zu keinerlei Signalaktivierung. Unter Zugabe des IL-6-RFP konnte die IL-6-Aktivierung erfolgreich inhibiert werden.

Der P-STAT3-Assay stützt demnach die durch Zellviabilitätsassays gezeigten Ergebnisse der Aktivierung von membranständigen Rezeptoren des Typs IL-11R durch rekombinantes IL-6 in hohen Konzentrationen. Es ist also denkbar, dass er als Niedrigaffinitätsrezeptor für IL-6 fungiert.

Als weiterer Gesichtspunkt für einen Crosstalk innerhalb der IL-6-Familie wurde im umgekehrten Fall der Effekt von IL-11 auf eine IL-6R-vermittelte Signaltransduktion untersucht. Dazu wurden Ba/F3-gp130-Zellen, die stabil mit IL-6R transduziert waren,

mit steigenden Konzentrationen IL-11 stimuliert und hinsichtlich ihrer Proliferation und STAT3-Aktivierung untersucht.

Wie in Abb. IV. 25 dargestellt, konnte durch IL-11 keine Signaltransduktion in Ba/F3-gp130-IL-6R-Zellen erzielt werden. Diese Daten decken sich mit den Ergebnissen der Western-Blotting-Analyse der STAT3-Phosphorylierung von IL-11-stimulierten Ba/F3-gp130-IL-6R-Zellen.

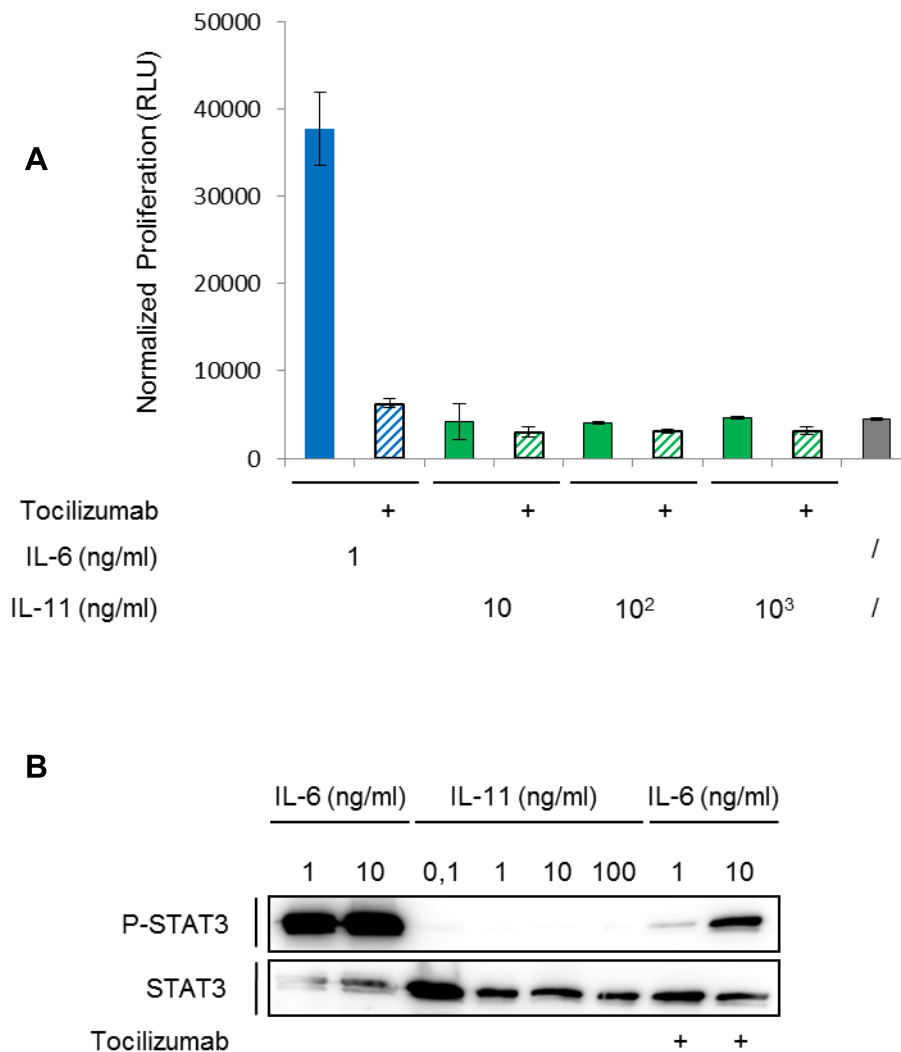


Abb. IV.25: Proliferationsassay und P-STAT3-basierte Western Blotting-Analyse von Ba/F3-gp130-IL-6R mit IL-6/IL-11 und Tocilizumab

A: Ba/F3-Zellen, die stabil mit gp130 und hIL-6R transduziert wurden, wurden mit den angegebenen Konzentrationen IL-6 oder IL-11 stimuliert. Zusätzlich wurde der IL-6R-Inhibitor Tocilizumab mit 100 µg/ml wie angegeben eingesetzt, um eine IL-6R-vermittelte Signaltransduktion zu unterbinden. Die Proliferation wurde nach 48 h, wie in Kap. III.2.4.1. beschrieben, quantifiziert.

B: Western Blot-Analyse von Ba/F3-gp130-IL-6R-Zelllysaten gegen phosphoryliertes STAT3 nach 15 min Stimulation. Die Inkubation der Ba/F3-gp130-IL-6R-Zellen erfolgte mit rekombinantem IL-6 bzw. hIL-11. Für die Inhibition mit Tocilizumab wurden die Lysate mit 100 µg/ml Tocilizumab vorinkubiert. Zur Analyse wurden jeweils 35 µl der Zelllysate aufgetragen. n=5 (A), n=3 (B).

Die oben dargestellten Versuche legen den Schluss nahe, dass im Umkehrschluss IL-11 nicht in der Lage zu sein scheint, den IL-6R zu aktivieren. Der IL-6R fungiert somit nicht als Niedrigaffinitätsrezeptor für IL-11.

3.3. Die Chimäre IL-11R-IL-6-Fc aktiviert die STAT3-Achse

Um weiter zu untermauern, dass die gezeigten Effekte auf einer Aktivierung des IL-11R durch IL-6 beruhen, wurde im Folgenden ein chimäres Hyperzytokin generiert. Hyperzytokine sind potente Werkzeuge, um die Signaltransduktion von IL-6-artigen Zytokinen zu induzieren. Dabei wird das Gen eines α -Rezeptors mit dem Gen des zugehörigen Zytokins fusioniert. Im resultierenden Protein wird dadurch die räumliche Nähe von Rezeptor und Zytokin erzwungen, sodass sich die biologische Aktivität ca. um das 100fache, verglichen mit dem Komplex aus Rezeptor und Zytokin, erhöht (Fischer, Goldschmitt *et al.* 1997, Dams-Kozłowska, Gryśka *et al.* 2012). In der vorgelegten Arbeit wurde ein chimäres Hyperzytokin aus sIL-11R und IL-6 erstellt. Da die Einzelkomponenten IL-11R und IL-6 erst durch Komplexbildung eine Konformationsänderung erfahren, die eine Bindung an gp130 ermöglicht, haben beide Einzelkomponenten keinerlei Affinität für gp130. Das chimäre Hyperzytokin sollte also nur dann die STAT3-Achse aktivieren, wenn der IL-11R mit dem fusionierten IL-6 einen Komplex eingeht. In Abb. IV.26 ist das Hyperzytokin schematisch dargestellt. Dieses wurde der Einfachheit halber im Rahmen des Projekts als „HZ^C“ (Kurzform von chimäres Hyperzytokin) oder „Hybrid“ bezeichnet.

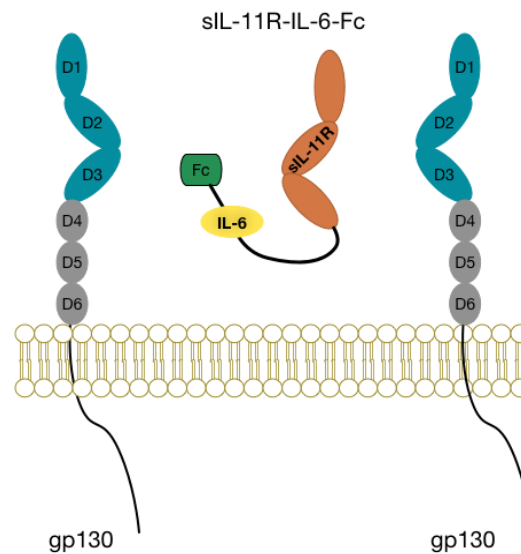


Abb. IV.26: Schemazeichnung sIL-11R-IL-6-Fc-Chimäre

Dargestellt ist der schematische Aufbau der sIL-11R-IL-6-Fc-Chimäre, das aus einem IL-6-Zytokin, einem 17 Aminosäuren langen Linkerpeptid (hier schwarz) sowie den drei extrazellulären Domänen des sIL-11R (orange) besteht.

Die Hypothese im Vorfeld ging davon aus, dass dieses kombinierte Hyperzytokin ähnlich wie Hyper-IL-6 oder Hyper-IL-11 ein gp130-Homodimer zur Signaltransduktion benötigt (randständig).

3.3.1. Klonierung des chimären Hyperzytokins sIL-11R-IL-6-Fc

Um das sIL-11R-IL-6-Fc-Hyperzytokin zu klonieren, kam als Ausgangsplasmid für den Vektor das pcDNA3.1-sIL-6R-Linker-IL-6-Fc-Plasmid sowie für das Insert das pcDNA3.1-IL-11R-Myc zum Einsatz.

In einem nächsten Schritt sollte das IL-11R-Insert initial vorerst *blunt* in pcDNA3.1 kloniert werden, um eine anschließende Subklonierung zu vereinfachen. Hierzu wurde ein beliebiger pcDNA3.1-Vektor (pcDNA3.1-IL-6R) sowie das o.g. Insert-Plasmid mit *PmeI blunt* geschnitten und religiert.

In einem weiteren Schritt erfolgte die Subklonierung in den Zielvektor des H-IL-6-Fc-Plasmids über *AflIII* und *KpnI*. Eine Schemazeichnung der Klonierung ist in Abb. IV.1 zu finden.

3.3.2. Das chimäre Hyperzytokin sIL-11R-IL-6-Fc wird in COS-7-Zellen exprimiert und sezerniert

Das fertige, über Testverdau und Sequenzierung bestätigte Plasmid wurde initial in COS-7-Zellen transfiziert. Nach 48 Stunden konnten Überstände und Lysate generiert werden. In einem vergleichenden Western Blot (s. Abb. IV.27) konnte gezeigt werden,

dass neben Hyper-IL-6-Fc und Hyper-IL-11-Fc auch das sIL-11R-IL-6-Fc als ca. 100 kDa großes Protein exprimiert wird. Das sIL-11R-IL-6-Hybrid konnte hierbei ebenfalls in Überstand und Lysat detektiert werden, wobei die Sekretion in den Überstand schwächer ausfiel als bei den anderen beiden Hyperzytokinen.

Da der im HZ^C enthaltene sIL-11R einen Myc-tag enthält, konnte dieses neben H-IL-11 im Reblot mittels Anti-Myc-Antikörper detektiert werden, sodass eine klare Unterscheidung zu H-IL-6 vorliegt. Im Vergleich zu H-IL-11 zeichnet sich ein knapper Größenunterschied ab, sodass auch hier durch das leicht größer erscheinende HZ^C differenziert werden kann.

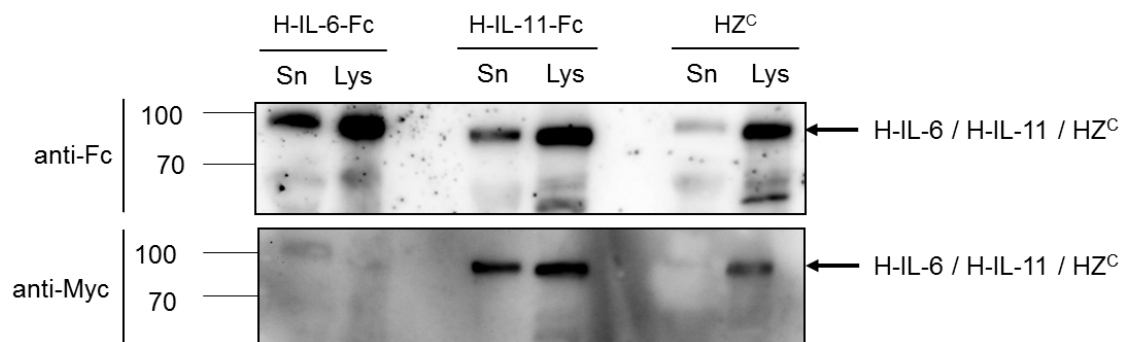


Abb. IV.27: Vergleichender Western Blot H-IL-6 / H-IL-11 / HZ^C

Lysate und Überstände aus COS-7-Zellen, die mit H-IL-6-Fc, H-IL-11-Fc und sIL-11R-IL-6-Fc transifiziert wurden, konnten mittels Western Blotting analysiert werden.

Die Detektion erfolgte unter Verwendung des Fc-Antikörpers gegen den Fc-tag (obere Darstellung) sowie des Myc-Antikörpers gegen den enthaltenen c-Myc-tag (untere Darstellung). Es wurden jeweils 35 µl Zelllysat und 80 µg Gesamtprotein aus dem Überstand aufgetragen. n=4.

*Sn = Supernatant (Zellkulturüberstand), Lys = Lysat

3.3.3. HZ^C ist biologisch aktiv

Nachdem nachgewiesen werden konnte, dass das Protein HZ^C erfolgreich exprimiert wurde, sollten Zellviabilitätsassays mit zwei unterschiedlichen Inhibitoren durchgeführt werden, um das Hyper-sIL-11R-IL-6-Hybrid auf seine biologische Funktion auf Zellen zu untersuchen. Die Ergebnisse sollten mit Hyper-IL-6 und Hyper-IL-11 verglichen werden, sodass ebendiese Proteine als Positivkontrollen mitaufgetragen wurden.

Da bei einem funktionsfähigen Hyperzytokin der IL-6-Familie zur Signaltransduktion lediglich gp130 benötigt wird, wurden für die Versuchsanordnungen Ba/F3-Zellen verwendet, die ausschließlich diesen Rezeptor tragen.

Als Inhibitoren kamen sowohl sgp130Fc als Hyperzytokininhibitor als auch ein IL-6R-Nanobody (VHH-Antikörper) zum Einsatz. Lösliches gp130 (sgp130) ist ein natürlicher Inhibitor des IL-6 *trans-signaling*s und kann Hyperzytokine inhibieren (Jostock, Mullberg *et al.* 2001). Der IL-6R Nanobody bindet *site 1* des IL-6R und blockiert damit die Bindung an IL-6. Damit ist der Nanobody in der Lage, sowohl Signaltransduktion über den membranständigen als auch den löslichen IL-6R sowie Hyper-IL-6 zu blockieren (unveröffentlichte Daten, Patent WO 2008/020079 A1).

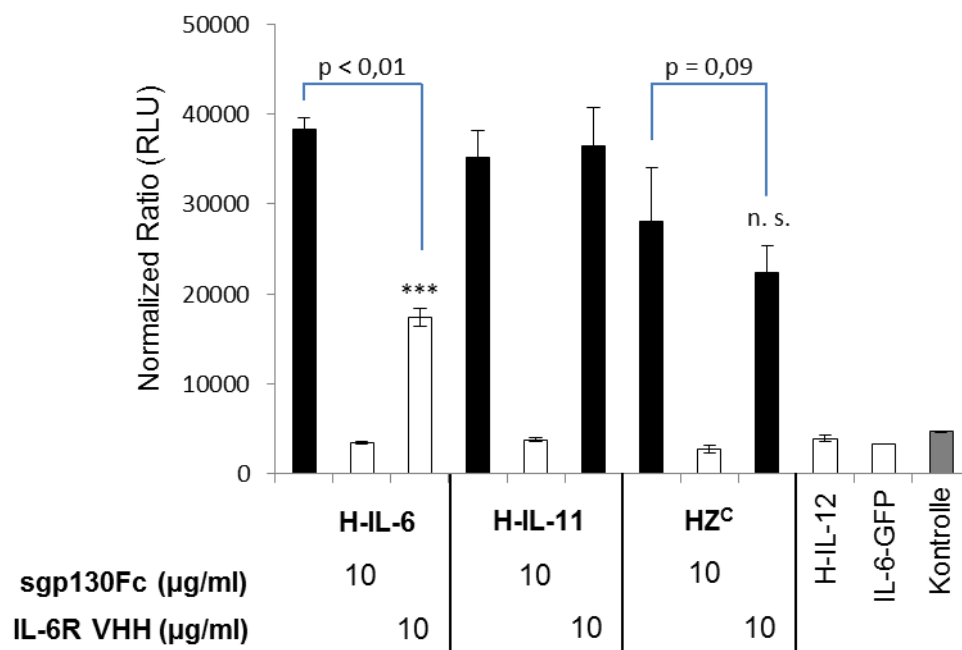


Abb. IV.28: Zellviabilitätsassay Ba/F3-gp130 mit Hyperzytokinen und Inhibitoren

Ba/F3-Zellen, die stabil mit gp130 transduziert wurden, wurden mit den angegebenen Hyperzytokinen aus COS-7-Zellüberständen stimuliert (10%). Zusätzlich wurde der Hyperzytokin-Inhibitor sgp130Fc mit 10 µg/ml eingesetzt, um gp130-basierte Signaltransduktion zu unterbinden. Außerdem fand der IL-6R VHH mit 10 µg/ml wie angegeben Anwendung. Bei diesem wurde, wie angegeben, ein *student's t-test* als Signifikanzberechnung angewendet. Die Proliferation wurde nach 48 h, wie in Kap. III.2.4.1. beschrieben, ausgewertet. n=3.

Erkennbar sind in dem in Abb. IV.28 dargestellten Zellviabilitätsassay, dass alle drei Hyperzytokine (H-IL-6-Fc, H-IL-11-Fc, sIL-11R-IL-6-Fc-Chimäre) über gp130 *Signaling* betreiben und die Zellen zur Proliferation anregen. Alle drei Hyperzytokine scheinen in vergleichbarem Maße die Proliferation anzuregen.

Um sicherzustellen, dass die Hyperzytokine eine spezifische Aktivierung von STAT3 über gp130 induzieren, wurden Stimulationen in Anwesenheit von sgp130Fc durchgeführt. Wie in Abb. IV.29 ersichtlich, lassen sich H-IL-6-Fc, H-IL-11-Fc und HZ^C durch sgp130Fc blockieren.

Der eingesetzte IL-6R VHH konnte lediglich H-IL-6-Fc inhibieren, da dieser spezifisch an den IL-6R bindet und dieses ausschließlich im H-IL-6-Fc-Molekül vorhanden ist.

Die aufgetragenen Negativkontrollen von Hyper-IL-12 und IL-6-GFP wiesen keinerlei Proliferation im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle auf.

In der Folge wurden zur Bestätigung der Zellviabilitätsassays P-STAT3-Assays ebenfalls auf Ba/F3-gp130-Zellen durchgeführt. Die beiden Inhibitoren sgp130Fc und IL-6R VHH wurden in ihrer Konzentration unverändert mit 10 µg/ml eingesetzt. Abb. IV.29 bildet die Western Blots der Anti-P-STAT3- und Anti-STAT3-Detektionen ab.

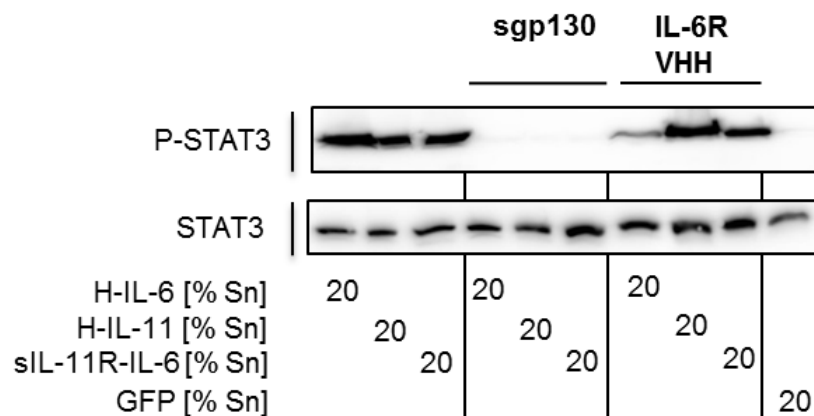


Abb. IV.29: Hyperzytokinüberstände aktivieren die STAT3-Achse in Ba/F3-gp130-Zellen und sind durch sgp130Fc vollständig inhibierbar.

Western Blot-Analyse von Ba/F3-gp130-Zelllysaten gegen phosphoryliertes STAT3 nach 15 min Stimulation. Die Inkubation der Ba/F3-gp130-Zellen erfolgte mit 20% Vol. an COS-7-Zellkulturüberständen. Für die Inhibition mit sgp130Fc und IL-6R VHH wurden die Lysate mit jeweils 10 µg/ml vorinkubiert. Zur Analyse wurden jeweils 35 µl der Zelllysate aufgetragen. n=2.

In obiger Darstellung lässt sich eindeutig erkennen, dass die drei Hyperzytokine H-IL-6-Fc, H-IL-11-Fc und sIL-11R-IL-6-Fc in der Lage sind, eine Phosphorylierung von STAT3 in Ba/F3-gp130-Zellen zu induzieren (Spalten 1-3). Die drei Hyperzytokine sind weiterhin durch sgp130Fc inhibierbar (Spalten 4-6), sodass sich die Daten der Proliferationsassays bestätigen. Auch die singuläre Inhibition von H-IL-6-Fc durch den IL-6R VHH ist durch ein abgeschwächtes P-STAT3-Signal bei H-IL-6-Fc nachvollziehbar (Spalte 7), während H-IL-11-Fc und das sIL-11R-IL-6-Hybrid unbeeinflusst bleiben. Eine Negativkontrolle mit GFP zeigt keinerlei Aktivierung von STAT3 (Spalte 10).

Da die oben angeführten Daten auf Zellkulturüberständen mit undefiniertem Zytokinanteil beruhten, erschien es sinnvoll, den Zellviabilitätstest ebenfalls mit quantifizierten rekombinanten Proteinen in Konzentrationsreihen zu wiederholen. Die rekombinanten Proteine wurden im Rahmen des Projekts durch stabile CHO-K1-Zellen im *Rollerbottle*-Verfahren erstellt und anschließend gereinigt und quantifiziert.

Einen Beleg für die Reinheit der Proteine von H-IL-11-Fc und HZ^C lieferten angefertigte Coomassie-Gele, die in Abb. IV.30 dargestellt sind.

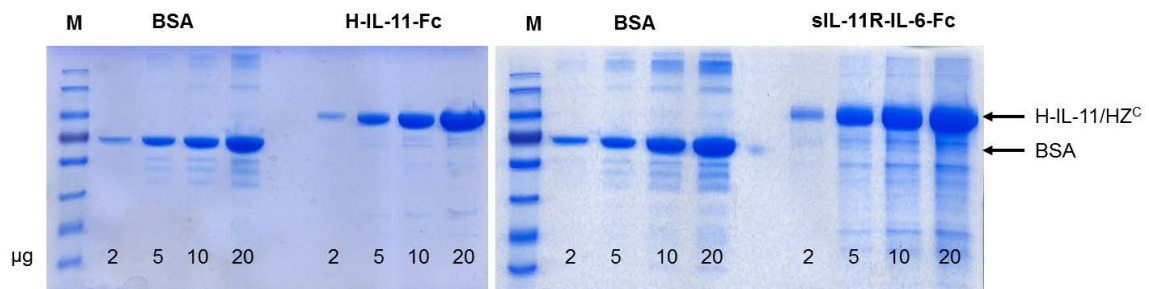


Abb. IV.30: Coomassie-Gele der Reinigungen von H-IL-11-Fc und HZ^C

Hyperzytokine wurden in CHO-K1-Zellen exprimiert und mittels Affinitätschromatographie isoliert. Aufsteigende Mengen der gereinigten Proteine wurden neben BSA mittels SDS-PAGE aufgetrennt und mit Coomassie Brilliantblau visualisiert. n=1.

M = Marker (PageRuler Prestained, Thermo Scientific), **BSA** = bovines Serumalbumin

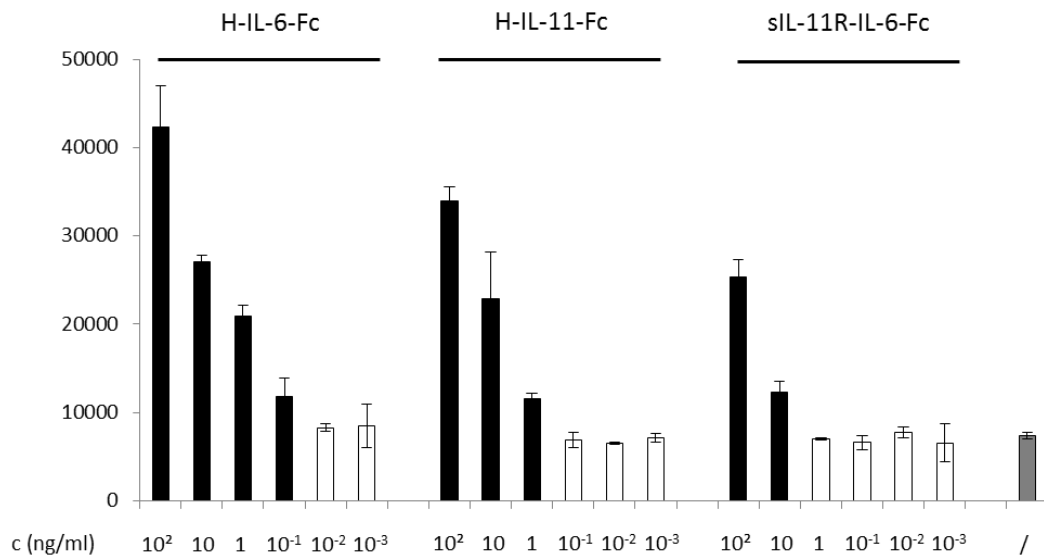


Abb. IV.31: Rekombinante Hyperzytokine aktivieren konzentrationsabhängig Ba/F3-gp130-Zellen

Ba/F3-Zellen, die stabil mit gp130 transduziert wurden, wurden mit den angegebenen Konzentrationen von rekombinanten Hyperzytokinen stimuliert. Die Proliferation wurde nach 48 h, wie in Kap. III.2.4.1. beschrieben, ausgewertet. n=1.

Anhand des in Abb. IV.31 dargestellten Viabilitätsassays konnte gezeigt werden, dass alle drei Hyperzytokine auf Ba/F3-gp130-Zellen aktiv sind und die Zellen zur Zellteilung anregen. Hierbei wird deutlich, dass die sIL-11R-IL-6-Fc-Chimäre etwas weniger potent agiert als Hyper-IL-6 und Hyper-IL-11.

3.4. Etablierung eines Hyper-IL-11-ELISA-Systems

Da es bereits ein im Institut selbst etabliertes ELISA-System zur direkten antikörperbasierten Quantifizierung von Hyper-IL-6-Überständen und rekombinanten Proteinen gab, lag die Überlegung nahe, einen Hyper-IL-11-ELISA nach erfolgreicher Klonierung zu etablieren. Der Vorteil bestünde darin, den bisher zur Quantifizierung der Proteine verwendeten Protein-A280-Nachweis durch den genaueren ELISA zu ersetzen.

Da für das Intein-Projekt bereits ein ELISA-Kit (*Human IL-11 DuoSet ELISA Kit*) der Fa. R&D Systems, Minneapolis, vorlag, wurde ein Komplex-ELISA entwickelt, zu dem ein ebenfalls von R&D beschaffter anti-IL-11R-Antikörper benötigt wurde.

Um die generierten Proteine (H-IL-11-Fc, Intein-H-IL-11-Fc) zu detektieren, wurden die Kavitätenplatten mit dem IL-11R-Antikörper konditioniert und mit dem anti-IL-11-Antikörper detektiert (vgl. Schemazeichnung in Abb. IV.32 B).

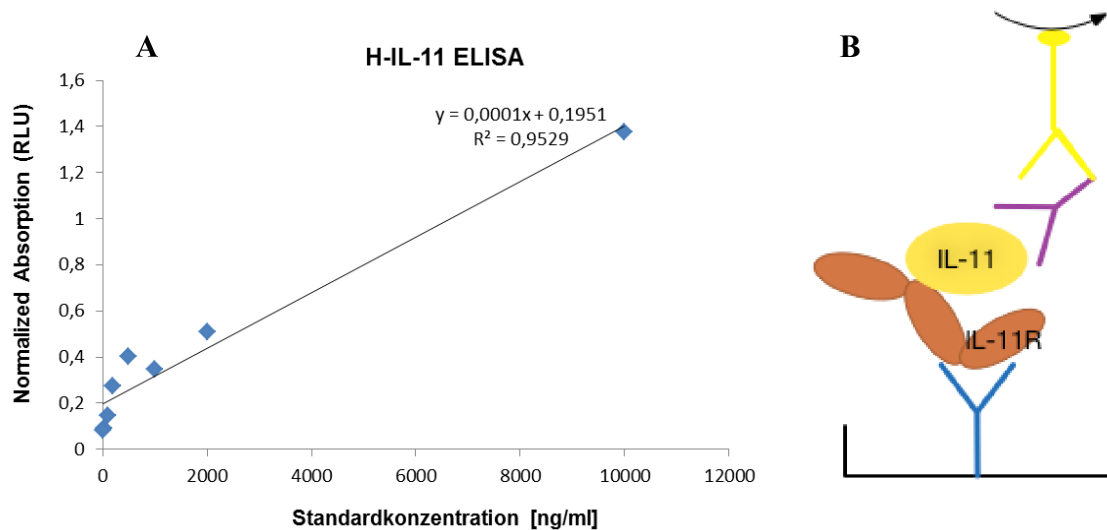


Abb. IV.32: Hyper-IL-11-Komplex-ELISA

A: Aufgetragen ist die Konzentration der Proben im Vergleich zu einem Standard (Abszisse) gegen die vom Gerät ausgewertete Absorption (Ordinate). Als Standard fungierte das zuvor erstellte, hochreine, rekombinante H-IL-11-Fc aus CHO K1-Zellen. Die Auswertung dieses Assays zeigt zum einen, dass Hyper-IL-11 detektiert werden kann, zum anderen ist erkennbar, dass die Sensitivität des Tests nicht ausreichend ist, da vor allem die Konzentrationen zwischen 0 und 2000 ng/ml für die Proteinreinigung entscheidend sind. $n=1$. **B:** schematische Darstellung des ELISA. Die Kavitätenplatten wurden mit IL-11R-Antikörper konditioniert (blau), eine Anlagerung von IL-11R bzw. Hyperzytokinen konnte in anschließender Inkubationszeit erfolgen. Die Detektion erfolgte mittels IL-11-Antikörper (magenta) und zugehörigem Sekundärantikörper für die Assayauswertung (gelb).

In Abb. IV.32 ist die Auswertung der Hyper-IL-11-ELISA-Pilotstudie dargestellt. In dieser sind zwei wichtige Punkte für das weitere Vorgehen mit dem Komplex-ELISA festzuhalten. Erstens ist eindeutig nachvollziehbar, dass Hyper-IL-11 mit dieser Variante detektiert werden kann, sodass der ELISA prinzipiell funktioniert. Zweitens sind viele der im ELISA eingesetzten Proben in den üblichen Verdünnungen so aufgetragen, dass sie zwischen 0 und 2 ng/ml liegen. In diesem Bereich ist der ELISA allerdings nicht sensitiv genug, sodass das Verfahren an sich optimiert werden muss.

3.5. Zusammenfassung

Abschließend ist zum IL-6/IL-11R-*Crosstalk* Folgendes festzuhalten:

➤ **Der IL-11R fungiert als alternativer, niedrigaffiner α -Rezeptor für IL-6.**

Anhand der erzielten Ergebnisse konnte eindeutig belegt werden, dass der IL-11R durch IL-6 aktiviert werden kann. Eine Indikation hierfür ergab sich durch Phospho-STAT3-Assays auf humanen K-562- und transfizierten HEK-293-Zellen. Zellviabilitätsassays und Phospho-STAT3-Assays mit stabil transduzierten murinen Ba/F3-gp130-IL-11R-Zellen konnten diese Daten bestätigen. Anhand eines Fusionsproteins aus sIL-11R und IL-6 wurde eine Interaktion von IL-6 mit dem IL-11R weiter untermauert.

➤ **Der IL-6R kann nicht durch IL-11 aktiviert werden.**

Im Gegenzug zu den oben genannten Ergebnissen konnte nicht bestätigt werden, dass es einen *Crosstalk* zwischen IL-6R und IL-11 gibt. Weder Zellviabilitätsassays noch Phospho-STAT3-Assays konnten einen zellulären Effekt belegen.

➤ **Ein generierter Hyper-IL-11-ELISA ist funktionsfähig, aber nicht ausreichend sensitiv.**

Anhand der oben gezeigten Daten konnte der Beleg erbracht werden, dass der erstellte Hyper-IL-11-ELISA zwar funktioniert, das System allerdings nicht sensitiv genug für eine routinemäßige Laboranwendung ist. Eine Optimierung sollte hier in Zukunft erfolgen.

V. DISKUSSION UND FAZIT

1. Intein-vermittelte Expression von Hyper-Interleukin-11

Es ist bereits bekannt, dass das an einer Vielzahl von Zellen wirksame, pleiotrope Zytokin Interleukin-11, das vor allem an regenerativen Prozessen beteiligt ist, an einen membranständigen α -Rezeptor (Interleukin-11-Rezeptor, IL-11R) bindet. Dieser befindet sich vor allem auf Immunzellen (B-Lymphozyten, Makrophagen), hämatopoetischen Zellen, Kardiomyozyten, Osteoklasten und epithelialen Zellen (Putoczki und Ernst 2010). Um eine intrazelluläre Signalkaskade auszulösen, wird zusätzlich ein Homodimer aus gp130-Molekülen benötigt, das als signalkompetenter β -Rezeptor fungiert. Dieser Signalweg, der sich intrazellulär in einer Phosphorylierung von STAT-Molekülen äußert, wird als klassischer Signalweg (*classic signaling*) bezeichnet. Die Existenz einer löslichen *Splice*-Variante des mIL-11R (Robb, Hilton *et al.* 1996) sowie der Nachweis von IL-11R-*Ectodomain Shedding* durch ADAM10 (Lokau, Nitz *et al.* 2016) deuten darauf hin, dass IL-11 *trans-signaling* auch *in vivo* relevant ist. Weiterhin konnte gezeigt werden, dass ein Hyperzytokin aus sIL-11R und IL-11 (Hyper-IL-11) analog zu Hyper-IL-6 in der Lage ist, die gp130/STAT3-Achse zu aktivieren (Dams-Kozłowska, Gryśka *et al.* 2012, Dams-Kozłowska, Kwiatkowska-Borowczyk *et al.* 2013). Da es bei IL-6 hinsichtlich der Wirkung deutliche Unterschiede zwischen dem klassischen und dem *trans*-Signalweg gibt, die teilweise in antagonistischer Weise bei Inflammationen oder im Rahmen der Differenzierung im Körper agieren (Heikkilä, Ebrahim *et al.* 2008, Scheller, Chalaris *et al.* 2011), ist es wichtig, zu erforschen, was ein solcher Signalweg beim strukturverwandten IL-11 bewirkt. Interessant ist in diesem Zusammenhang vor allem, ob der *trans*-Signalweg homolog zu IL-6 an chronischen, autoimmunen Erkrankungen (z.B. Multiple Sklerose, M. Crohn) beteiligt ist (Scheller, Garbers *et al.* 2014).

Im Rahmen dieser Forschungsarbeit wurde analog zu bekannten Arbeiten (Dams-Kozłowska, Gryśka *et al.* 2012) ein Hyperzytokin aus löslichem IL-11R und Interleukin-11 hergestellt. Beide Proteine wurden kovalent über ein flexibles Linkerpeptid miteinander verbunden. Dieses Hyperzytokin besitzt durch seine räumliche Nähe eine um ein Vielfaches gesteigerte biologische Aktivität gegenüber dem

Komplex aus IL-11R und IL-11 (Dams-Kozłowska, Gryśka *et al.* 2012). Weiterhin induzieren Hyperzytokine wie z.B. Hyper-IL-11 ausschließlich *trans-signaling* und bieten so eine gute Möglichkeit der Erforschung dieses Signalwegs durch die entsprechende Signalverstärkung.

In vivo-Strategien, um *trans-signaling* zu untersuchen, beinhalten die Verwendung von IL-6- und IL-6/sIL-6R-transgenen Mäusen, sowie Mäusen, die transgen für den *trans-signaling*-Inhibitor sgp130Fc sind. Im ersten Fall ist es schwer, zwischen Effekten von *classic* und *trans-signaling* zu unterscheiden, da eine IL-6-Überexpression beide Signale verstärkt. Im Fall der sgp130Fc-Überexpression werden die Effekte des *trans-signaling*s lediglich indirekt durch dessen Abwesenheit bzw. durch vollständige Inhibition beschrieben (Rabe, Chalaris *et al.* 2008). Es wäre also vorteilhaft, *trans-signaling*-Phänotypen direkt untersuchen zu können, z.B. durch den Einsatz von Hyperzytokinen. Dies wird jedoch durch toxische Effekte von hohen Hyperzytokinleveln im Serum erschwert. So konnte beispielsweise bei vorangegangenen Studien mit vIL-6, einem IL-6-Homolog aus humanem Herpesvirus 8, beobachtet werden, dass bei *in vivo*-Versuchen hohe Serumkonzentrationen des Proteins zu einer frühen Letalität der Versuchstiere führten (Adam, Rabe *et al.* 2009, Suthaus, Stuhlmann-Laeisz *et al.* 2012). Ähnlich wie Hyper-IL-6 kann auch vIL-6 direkt an gp130 binden und eine Signaltransduktion einleiten (Molden, Chang *et al.* 1997). Allerdings sind Hyperzytokine wie Hyper-IL-6 und Hyper-IL-11 im Vergleich zu vIL-6 ca. 10-100fach potenter bezüglich der Signaltransduktion. Es ist also zu erwarten, dass Hyperzytokine damit auch stärkere toxische Effekte auf Zellen haben. Daher ist es nicht überraschend, dass bis zum heutigen Datum kein Bericht über Mäuse, die transgen für Hyper-IL-6 oder Hyper-IL-11 sind, existiert.

Alternativ zur transgenen Maus sind natürlich auch Hyperzytokin-Injektionen denkbar, um *trans-signaling in vivo* zu untersuchen. Hierbei lässt sich die Dosis auf nicht-toxische, aber biologisch aktive Konzentrationen anpassen. Allerdings bergen Langzeitstudien Risiken, wie z.B. Stressreaktionen, veränderte Hormonkonzentrationen und Injektionsinfektionen. Weiterhin bleibt die Proteinkonzentration im Serum nicht stabil, sondern fällt abhängig von der Serumhalbwertszeit konstant ab, was zu Verfälschungen in den Ergebnissen führen kann.

In dieser Arbeit wird ein Split-Intein-basiertes Expressionssystem für Hyperzytokine vorgestellt, mit dem sich aktive Hyperzytokine aus inaktiven Vorstufen herstellen

lassen. Dazu wurde in vorangehenden Arbeiten ein Intein-vermitteltes Proteinexpressionssystem etabliert, das auf dem *protein trans-splicing*-Mechanismus (Perler, Davis *et al.* 1994, Lockless und Muir 2009) der Inosin-5'-Monophosphat-Dehydrogenase (IMPDH) beruht. Dabei konnte gezeigt werden, dass durch Split-Intein vermittelte Proteinligation eine posttranslationale Proteinfusion aus inaktiven Hyperzytokinvorstufen zu funktionsfähigem Hyper-Interleukin-6 herbeigeführt werden konnte (Bachelorthesis Homey 2013).

Hierbei wurde initial die Zytokin- mit der carboxyterminalen Inteinsequenz verknüpft, während die komplementäre aminoterminalen Seite mit der Rezeptorseite verbunden war. Nach der Translation ermöglichte die Inteinstrategie, dass die inaktiven Vorstufen zum aktiven Hyperzytokin fusioniert wurden.

Da bei diesem Vorgehen das IMPDH^C-IL-6-Fc ein vollständiges IL-6-Molekül enthält und daher bei nicht vollzogener posttranslationaler Ligation in der Lage ist, den klassischen Signalweg zu aktivieren, wurden die Hyperzytokinvorstufen zusätzlich in einer weiteren Arbeit (Masterthesis Wehmöller 2014) modifiziert. Hierbei wurde das aus vier Helices bestehende IL-6-Molekül an allen drei vorkommenden, unstrukturierten Verbindungsloops (zwischen A- und B, B- und C- sowie C- und D-Helix, vgl. Abb. II.3.), basierend auf der Kristallstruktur der Zytokine, gespalten. Die resultierenden N-terminalen (IL-6^N) und C-terminalen (IL-6^C) Zytokinfragmente wurden als Fusionsproteine mit dem sIL-6R und dem N-terminalen Split-Intein (sIL-6R-IL-6^N-Int^N-KDEL) oder einem Fc-tag (Int^C-IL-6^C-Fc) exprimiert. Diese Varianten wurden als sog. Split²-Zytokinkonstrukte bezeichnet. In der sich anschließenden Untersuchung konnte gezeigt werden, dass alle Split-Konstrukte das Fusionsprotein erstellten, während Ligationseffizienz und biologische Aktivität unter den Split-Varianten bei einer Fragmentierung zwischen dem B- und C-Loop von IL-6 am größten war (Masterthesis Wehmöller 2014).

Als zusätzliche Kontrolle zu den oben erwähnten Split²-Zytokin-Varianten wurde das KDEL-ER-Retentionssignal abgespalten. KDEL codiert für die Aminosäuren Lysin-Asparaginsäure-Glutaminsäure-Leucin und sich an löslichen Proteinen am Carboxyterminus befindet, konnte bereits 1987 als Retentionssignal identifiziert werden. Hierbei wurde gezeigt, dass eine KDEL-Deletion an grp78, grp94 (*glucose-related proteins* 78 und 94) und der Proteindisulfid-Isomerase bei bereits bekannten Sequenzen eine Sekretion in COS-Zellen zur Folge hatte (Munro und Pelham 1987). Eine Übertragung

der KDEL-Sequenz eines normalerweise sezernierbaren Proteins (Cathepsin D) führte in einer Folgestudie zur vollständigen intrazellulären Retention des Proteins (Pelham 1988). Die Autoren gingen allerdings nicht davon aus, dass das Signal an einen membranständigen Rezeptor bindet und so die Proteine immobilisiert bzw. retiniert, sondern über ein nicht näher spezifiziertes, zwischen endoplasmatischem Retikulum und Golgi-Apparat geschaltetem Sortierkompartiment zurückgehalten werden, da es rekurrent im ER akkumuliert nachgewiesen werden konnte (Pelham 1989). In aktuellen Studien wird die KDEL-Sequenz gezielt genutzt, um antikarzinogene Impfproteine in das ER von Tumorzellen einzubringen. Hierbei wird durch die antigenflankierte Sequenz das bei Brust- und Pankreas-Carcinomen überexprimierte Calreticulin im ER zurückgehalten, um die Tumorprogression zu stoppen (Perez-Trujillo, Garza-Morales *et al.* 2017).

Das Ziel der KDEL-Deletion im Rahmen dieser Arbeit sollte es sein, aufzuzeigen, dass das durch das physiologische KDEL-Signal zurückgehaltene sIL-6R-IL-6_{AB}-Molekül ohne seine carboxyterminale Inteinseite (IMPDH-IL-6_{CD}-Fc) singulär tatsächlich biologisch inaktiv ist. Es sollte daher nur im Zusammenspiel mit beiden Seiten in der Lage sein, aktives H-IL-6 zu bilden und durch die KDEL-Deletion zu einer gesteigerten extrazellulären Proteinfusion kommen. Dies wäre durch eine gesteigerte H-IL-6-Konzentration im Zellkulturüberstand nachweisbar.

Es stellte sich allerdings heraus, dass Split²-Zytokin-Konstrukte von IL-6 ohne KDEL-Signal nicht sezerniert wurden und auch keinerlei Hyperzytokinformierung zu beobachten war. Stattdessen konnten Degradationsprodukte mit geringerem Molekulargewicht detektiert werden.

Eine mögliche Ursache dafür könnte das ER-assoziierte Degradationssystem (ERAD) sein. Dieses System, das dafür sorgt, fehlgefaltete Proteine einem gesteuerten Abbau zuzuführen, bestehen vorrangig aus zwei Hauptproteinen, Hrd1 und Doa10, die drei verschiedene Proteolysesysteme (ERAD-L, ERAD-M und ERAD-C) bedienen. Fehlgefaltete Proteine, die sich im ER-Lumen oder eingebaut in die ER-Membran befinden, werden durch den Hrd1-Komplex über ERAD-L und -M abgebaut. Bereits cytosolische, fehlerhafte Proteine werden ERAD-C und dem Doa10-Komplex zugeführt (Lemus und Goder 2014). Mono- oder Polyubiquitinylierungen in der Folge sind als Qualitätskontrolle vermutet, wobei Monoubiquitinylierungen nicht zur Aktivierung des ERAD führen, sondern lediglich eine Retention im ER verursachen (Feldman und van der Goot 2009).

Da es sich bei den Split-Zytokinen um posttranslational gefaltete Proteine handelt und sich die Tertiärstruktur des Proteins durch den Splitvorgang des Zytokins nicht mehr physiologisch darstellt, könnte dies eine mögliche Ursache für die Proteolyse sein.

Weiterhin wurde in der vorliegenden Doktorarbeit untersucht, ob die für Hyper-IL-6 beschriebene Intein-vermittelte Proteinligation auf andere Zytokine übertragbar ist. Dazu wurden Plasmide für Intein-vermittelte Expression von Hyper-IL-11 erstellt.

Inteine sind physiologisch vorkommende Proteine, die eigenständig oder auf einen stimulierten Reiz hin, eine posttranslationale Splicing-Reaktion in Gang setzen und sich selbst aus diesen Proteinen herauspleißen. Zum jetzigen Zeitpunkt sind mehr als 500 Inteinmoleküle bekannt (Perler 2002). Der vormals bereits erläuterte Mechanismus des *protein trans-splicing* setzt durch den Splicing-Vorgang die N- und C-terminal der Inteine flankierenden Exteine in räumliche Nähe und verknüpft diese durch eine Peptidbindung (Shah, Eryilmaz *et al.* 2013, Li 2015). Für diesen Vorgang werden keine Enzyme oder Cofaktoren benötigt (Tori und Perler 2017).

Inteine werden aktuell für Proteinzyklisierungen, Inkorporation von nicht-kanonischen Aminosäuren in Zielproteine und segmentale, isotopische Markierungsvorgänge eingesetzt (Li 2015). Letztgenanntes Labeling wird vor allem zur strukturellen Analyse von Proteinstrukturen durch Kernspinresonanzspektroskopie (NMR-Spektroskopie) eingesetzt, indem stabile Isotope an spezifischen Segmenten eingebracht werden (Xu, Ayers *et al.* 1999). Inteine werden außerdem zur Proteinreinigung verwendet, um detektierbare *tags* in die Zielstrukturen einzubringen und so die Reinigung zu vereinfachen (Volkmann, Sun *et al.* 2009). Auch wurden Inteine bereits als Produktionsmedium von toxischen, hochmolekularen Proteinen in *E. coli* beschrieben (Evans, Benner *et al.* 1998, Wu, Wood *et al.* 2002, Guo, Li *et al.* 2004, Subramanyam, Chang *et al.* 2013), wobei multiple Strategien verfolgt wurden, um die Toxizität durch eine Inteinstrategie zu umgehen. Guo *et al.* (2004) produzierten ein an das Intein CBD fusioniertes Gelonin in *E. coli*, wobei Gelonin zurückgefaltet wurde, um das aktive Toxin zu erhalten. Evans *et al.* (1998) deletierten einige Aminosäuren der unstrukturierten C-terminalen Anhänge der *RNase A* und *HpaI*. Die gekürzten Endonucleasen wurden als Fusionsproteine mit einem Intein in *E. coli* synthetisiert. Die fehlenden C-Termini wurden chemisch synthetisiert und durch das *trans-splicing* als Extein an die gekürzten Proteine ligiert. Wu *et al.* (2002) separierten die *homing-Nuclease I-TevI* in eine DNA-Schnitt- und eine DNA-Bindedomäne und exprimierten

sie separat voneinander am Hybrid-Split-Intein *Npu^N/Sspc^C DnaE* in *E. coli*.

Rekombinante Expression von großen und konkurrierenden Genen durch Split-Inteine in eukaryotischen Zellen konnte anhand von L-Typ-Calciumkanälen beschrieben werden, wobei unser Kenntnisstand bislang keine Expression von sezernierbaren Proteinen innerhalb des ER-Golgi-Komplexes beschrieben wurde. Subramanyam *et al.* (2013) berichteten über einen L-Typ-Ionenkanal, wobei die *trans-splicing*-Reaktion im Cytoplasma stattfand.

In der vorliegenden Arbeit wurde die Intein-Strategie dazu eingesetzt, biologisch aktives Hyper-IL-11 zu generieren. Dieses ist, als full length-Protein intrazellulär synthetisiert, cytotoxisch, sodass eine Proteinbiosynthese aus inaktiven Präkursorvarianten vielversprechend erschien. Inhibitionsversuche mit sgp130 haben gezeigt, dass das resultierende Hyper-IL-11 in der Lage war, *trans-signaling* spezifisch zu induzieren. Basierend auf den Kristallstrukturen von IL-6 und IL-11 und den Daten aus der vorangegangenen Masterarbeit (Wehmöller 2014), konnten distinkte Positionen in der IL-11-Sequenz identifiziert werden, an denen das Zytokin zweigeteilt werden konnte. Dadurch entstand eine verkürzte Split²-IL-11-Variante, die erst nach Intein-vermittelter Proteinligation wieder zu einem aktiven Zytokin zusammengefügt wird. Diese Strategie stellte sicher, dass die Hyperzytokine aus inaktiven Vorstufen hergestellt wurden. Folglich handelt es sich dabei um ein hintergrundfreies Hyperzytokin-Expressionssystem, welches ausschließlich *trans-signaling* induziert.

Im Rahmen dieser Forschungsarbeit konnte eindeutig nachgewiesen werden, dass das Expressionssystem auf Hyper-IL-11 übertragbar ist. Somit konnte eine verallgemeinernde Aussage zum Intein-vermittelten Expressionssystem für toxische, sekretorische Proteine am Beispiel der Hyperzytokine getroffen werden. Man ist nun mittels des generierten Systems in der Lage, solche Proteine unter *in vitro*-Bedingungen effizient aus inaktiven Präkursoren zu synthetisieren, sodass die intrazellulär toxische Wirkung umgangen wird. Erste *in vivo*-Versuche deuten weiterhin darauf hin, dass eine Split-Intein vermittelte Hyperzytokinbildung aus inaktiven Vorstufen in der Maus möglich ist (unveröffentlichte Daten).

Für künftige *in vivo*-Versuche bringt der Ansatz der Split²-Zytokine den Vorteil, dass zwei separate Mauslinien mit den inaktiven Hyperzytokinpräkursoren etabliert werden können, während diese bei Kreuzung der Mauslinien in einer transgenen Hyperzytokinmaus münden. Über gewebsspezifische Promotoren sollte dieses System

der Injektion der Zytokine überlegen sein.

Der bei uns etablierte Ansatz ist für singuläre und Multidomänenproteine einsetzbar und erlaubt die einfachere Erstellung von Mauslinien und stabilen Zelllinien aus inaktiven Vorstufen.

Durch die in dieser Arbeit erstellte stabile CHO-K1-Zelllinie können durch das vorhandene, etablierte *Rollerbottle*-Verfahren in kurzer Zeit große Mengen an rekombinantem Hyper-IL-11 erstellt werden, sofern dies für die weiteren Untersuchungen notwendig wird. Das sezernierte Protein wurde im Zuge dieser Untersuchung auch mittels Affinitätschromatographie gereinigt und konnte damit als Referenzprotein für Aktivitätsassays und ELISA dienen.

Da nach der Herstellung von gereinigtem H-IL-11 aus CHO-K1-Zellüberständen größere Mengen an reinem Hyperzytokin zur Verfügung standen, wurde weiterhin versucht, einen Komplex-ELISA zur spezifischen Detektion von H-IL-11 bzw. Komplexen aus sIL-11R und IL-11 nachzuweisen. Dazu wurden Antikörper gegen beide Komponenten des Hyperzytokins eingesetzt. Mittels des ELISAs konnte nach Beschichtung einer Kavitätenplatte mit einem IL-11R-Antikörper und Detektion mittels IL-11-Antikörper Hyper-IL-11 detektiert werden, allerdings war weder eine ausreichende Anzahl an Wiederholungen möglich, noch war es bei den Untersuchungen möglich, den Assay so sensitiv zu gestalten, dass eine Quantifizierung der Proben möglich war. Eine alternative Reihenfolge durch *Coating* mit IL-11-Antikörper und Detektion mittels IL-11R-Antikörper, also in umgekehrter Reihenfolge, könnte hier Abhilfe schaffen. Leider lag zum Zeitpunkt der Forschungsarbeit kein biotinylierter IL-11R-Antikörper vor, sodass der umgekehrte Test nicht mehr durchgeführt werden konnte.

2. Der IL-11R dient als alternativer Rezeptor für IL-6

Eine steigende Anzahl von Studien lässt vermuten, dass zusätzlich zum IL-6R ein unbekannter alternativer Rezeptor für IL-6 existiert. So wurde gezeigt, dass sich die Phänotypen hinsichtlich DSS-induzierter Colitis und Wundheilung der Haut von IL-6^{-/-} und IL-6R^{-/-} Mäusen unterscheiden (McFarland-Mancini, Funk *et al.* 2010, Sommer, Engelowski *et al.* 2014). Weiterhin wurde beobachtet, dass die erythroleukämische Zelllinie K-562 IL-6-responsiv ist, wobei sie keinen membranständigen IL-6R trägt (Nakayama 1998). Zu ähnlichen Ergebnissen kamen Watson, Whittaker *et al.* (1996) mit HUVEC-Zellen und Li, Hsieh *et al.* (2009) mit HT-29-Zellen. Interessanterweise wird zwar in keiner dieser Zelllinien der IL-6R exprimiert, alle diese Zelllinien besitzen allerdings den verwandten IL-11R (Mahboubi, Biedermann *et al.* 2000, Chen, Lin *et al.* 2002, Yoshizaki, Nakayama *et al.* 2006). IL-6 und IL-11 sind die einzigen Mitglieder der IL-6-Zytokinfamilie, die über ein gp130-Homodimer Signaltransduktion induzieren. Trotz geringer Sequenzhomologie sind sich die Kristallstrukturen von IL-6 und IL-11 sehr ähnlich (vgl. *Alignment* in Abb. V.1).

Mutagenesestudien haben außerdem gezeigt, dass sich die für die Komplexbildung mit α -Rezeptor und gp130 benötigten Strukturen von IL-6 und IL-11 an nahezu identischen Positionen der Moleküle befinden (Kurth, Horsten *et al.* 1999). Darum ist es vorstellbar, dass es zwischen IL-6 und IL-11 einen *Crosstalk* geben kann.

Crosstalk-Phänomene konnten bereits anhand anderer Beispiele innerhalb der IL-6-Familie wie zwischen p28 und dem IL-6R (Garbers, Spudy *et al.* 2013) und CNTF und dem IL-6R (Schuster, Kovaleva *et al.* 2003) aufgedeckt werden. Hierbei fungieren die nicht-homologen Rezeptoren als Niedrigaffinitätsrezeptoren, die bei hohen Konzentrationen des Zytokins als alternative Rezeptoren aktiviert werden können.

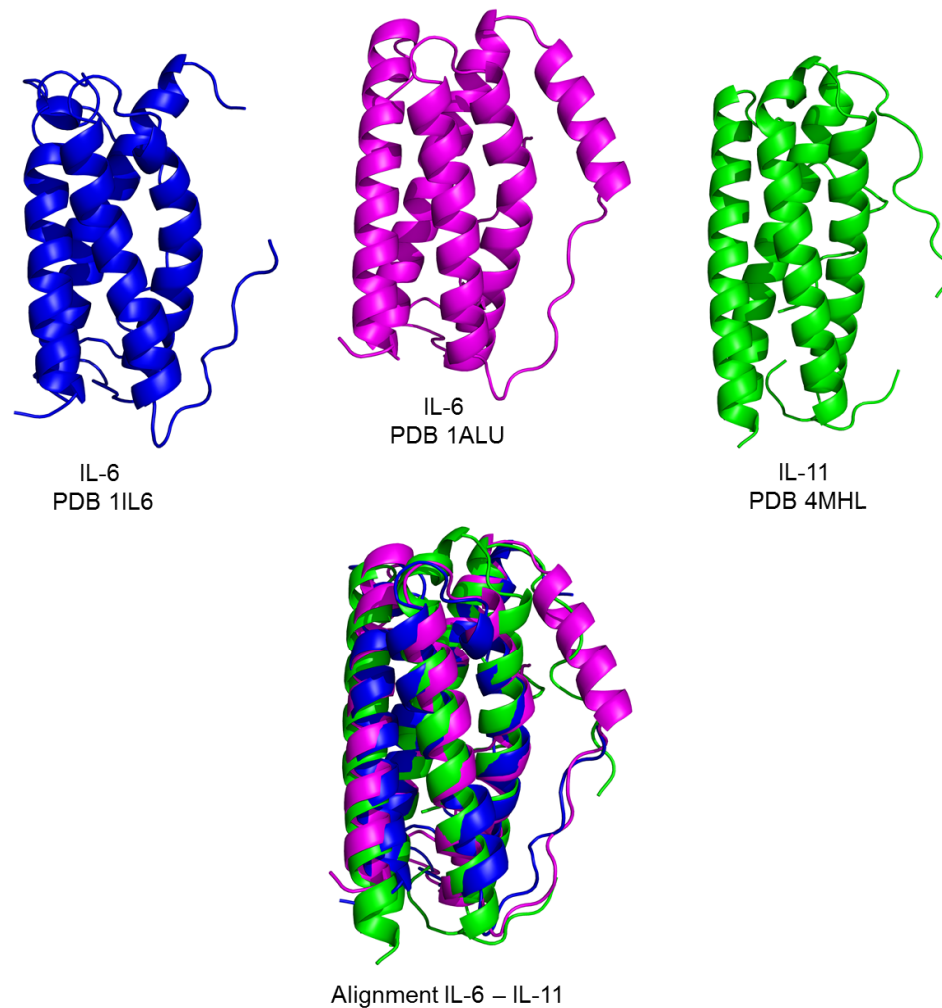


Abb. V.1: Alignment der IL-6-/IL-11-Proteinstrukturen.

Der strukturelle Aufbau von IL-6 und IL-11 ist sehr ähnlich. Kristallstrukturen von IL-6 (blau, PDB 1IL6 und lila PDB 1ALU) und IL-11 (grün, PDB 4MHL) wurden *aligned* / übereinander gelegt. Um das *Alignment* zu generieren, wurden von PDB 1IL-6 die Aminosäuren 142-153 entfernt. Das Strukturalignment wurde mit der Software „PyMOL v0.99rc6“ (open-source) generiert.

In der vorliegenden Arbeit wird der IL-11R zum ersten Mal als alternativer Rezeptor für IL-6 beschrieben. Hierzu wurden in einem ersten Ansatz K-562-Zellen sowie transient mit dem IL-11R transfizierte HEK293-Zellen mit IL-6 stimuliert. Sowohl nach IL-11R-Überexpression als auch bei endogener IL-11R-Expression in K-562-Zellen konnte gezeigt werden, dass durch hohe Konzentrationen von IL-6 die gp130/STAT3-Achse aktiviert werden konnte. Die Aktivierung des IL-11R mit IL-6 war konzentrationsabhängig, wie Experimente mit stabil mit IL-11R transduzierten, murinen Ba/F3-Zellen gezeigt haben. Die IL-6-vermittelte Aktivierung von IL-11R-tragenden Zellen konnte nicht durch den IL-6R-spezifischen Antikörper Tocilizumab

unterdrückt werden. Im Gegensatz dazu konnte die Signaltransduktion durch den IL-6-Antagonisten RFP inhibiert werden. Damit lässt sich eine IL-6R-vermittelte, IL-6-induzierte Signaltransduktion in den vorliegenden Experimenten ausschließen und legt den Schluss nahe, dass der IL-11R als Niedrigaffinitätsrezeptor für IL-6 dienen kann. Für die IL-6-vermittelte Induktion der gp130/STAT3-Achse in IL-6R-defizienten Zellen wurden Konzentrationen im Bereich von 10-100 ng/ml benötigt. Eine physiologische Rezeptoraktivierung erfolgt bei etwa 1 ng/ml. Dass für einen *Crosstalk* mit einem verwandten Rezeptor ca. 10-fach erhöhte Zytokinkonzentrationen benötigt werden, deckt sich mit bislang innerhalb der IL-6-Familie aufgedeckten *Crosstalk*-Phänomenen (Schuster, Kovaleva *et al.* 2003 zu IL-6R und CNTF, Garbers, Spudy *et al.* 2013 zu IL-6R und p28).

Um die mögliche Interaktion zwischen IL-6 und dem IL-11R näher untersuchen zu können, wurde im Rahmen dieser Arbeit das chimäre Hyperzytokin sIL-11R-IL-6-Fc (HZ^C) generiert. IL-6 hat keinerlei Affinität zu gp130, wenn es nicht an seinen α -Rezeptor gebunden vorliegt (Rose-John 2012). Die beobachtete biologische Aktivität des chimären Hyperzytokins lässt sich also auf eine direkte Interaktion von IL-6 mit dem sIL-11R zurückführen. Kontrollexperimente in Anwesenheit von sgp130Fc und IL-6R VHH zeigten weiterhin eine IL-6R-unabhängige, spezifische gp130-Aktivierung durch das Hyperzytokin. Diese Experimente legen weiterhin den Schluss nahe, dass es neben einer Aktivierung von membranständigem IL-11R durch IL-6 auch zu einer Aktivierung von löslichem IL-11R durch IL-6 kommen kann.

Allerdings bleibt an dieser Stelle abzuwarten, welche biologische Relevanz diese Art der Rezeptoraktivierung besitzt. Sollte es ein physiologisch vorkommendes IL-11 *trans-signaling* mit einem löslichen IL-11R *in vivo* geben, wäre ein Vorkommen eines IL-6/IL-11R *trans-signalings* ebenfalls denkbar.

Kürzlich wurde außerdem CD5 als möglicher alternativer IL-6-Rezeptor vorgeschlagen (Zhang, Xin *et al.* 2016). CD5 befindet sich natürlicherweise als Marker auf T-Lymphozyten (Youinou, Jamin *et al.* 1999) sowie auf einem spezifischen B-Zelltyp (B-1a), der sowohl murin als auch human nur einen kleinen Teil der B-Zelllinien ausmacht. Im humanen peripheren Gewebe machen sie einen Anteil von 5-30% aus (Lydyard, Youinou *et al.* 1987, Kasaian, Ikematsu *et al.* 1992), während murine B-Zellen ca. 30-60 % CD5⁺ sind (Hayakawa, Hardy *et al.* 1985).

In einer aktuellen Studie konnte gezeigt werden, dass CD5 als alternativer Rezeptor für IL-6 fungieren kann und in der Lage war, die gp130-STAT3-Achse zu aktivieren.

Sowohl ein *trans-signaling* über sIL-6R als auch ein *classic signaling* über den membranständigen IL-6R wurde vorab ausgeschlossen. Bei den untersuchten Zelllinien (B16, A20, MB49, NIH-3T3, C4) handelte es sich um murine B-Zell-Melanom-, Lymphom- und Karzinomzellen (Zhang, Xin *et al.* 2016).

Die in meiner Arbeit verwendeten murinen Ba/F3-gp130-IL-11R Zellen und humanen K-562-Zellen exprimieren allerdings kein CD5 (Lozzio und Lozzio 1979, Garcia-Hernandez, Castellanos *et al.* 1997). Dies schließt eine CD5-Interaktion in den von mir dargestellten Experimenten aus.

Die Identifikation des IL-11R als potentieller Niedrigaffinitätsrezeptor für IL-6 kann die verschiedenen Phänotypen von IL-6^{-/-} und IL-6R^{-/-} Mäusen in DSS-induzierter Colitis und Wundheilung erklären (McFarland-Mancini, Funk *et al.* 2010, Sommer, Engelowski *et al.* 2014).

Sowohl IL-6 als auch IL-11 werden außerdem in Wundheilungsprozessen stark hochreguliert (Singh, Berry *et al.* 2006). Dadurch können lokal im Gewebe durchaus Konzentrationen erreicht werden, die einen *Crosstalk* ermöglichen.

Interessanterweise werden im Unterschied zu IL-11R^{-/-} Mäusen in IL-6R^{-/-} Mäusen keine Wundheilungsstörungen beobachtet (McFarland-Mancini, Funk *et al.* 2010, Nishina, Komazawa-Sakon *et al.* 2012, Sommer, Engelowski *et al.* 2014). In einem Modell mit akuten Leberschäden konnte gezeigt werden, dass die hepatische Wundheilung von IL-11 induzierter Hepatozytenproliferation abhängt. Außerdem konnte dargelegt werden, dass ein IL-11R-Agonist einen verbessernden Einfluss auf die Leberschäden hatte (Nishina, Komazawa-Sakon *et al.* 2012).

In der entzündlichen Umgebung werden während der Wundheilung hohe IL-6-Konzentrationen sezerniert. Die lokalen IL-6-Konzentrationen innerhalb des Wundgewebes könnten daher eine IL-6-induzierte IL-11R-Aktivierung in der Wundregion auslösen. Außerdem induziert IL-6 eine COX-2-abhängige IL-11 *up*-Regulation während der epithelialen Wundheilung (Singh, Berry *et al.* 2006). Daher kann ein IL-6/IL-11 *Crosstalk* nicht nur IL-11, sondern auch eine IL-11R abhängige STAT3-Phosphorylierung während der frühen Wundheilung auslösen und dadurch Signalwege initiieren, die eine IL-6- und IL-11-abhängige Gewebereparatur durch maximale gp130-Aktivierung ermöglichen.

VI. Literaturverzeichnis

Adam, N., Rabe, B., Suthaus, J., Grotzinger, J., Rose-John, S. und Scheller, J. (2009). "Unraveling viral interleukin-6 binding to gp130 and activation of STAT-signaling pathways independently of the interleukin-6 receptor." J Virol 83(10): 5117-5126.

Aletaha, D., Bingham, C. O., 3rd, Tanaka, Y., Agarwal, P., Kurrasch, R., Tak, P. P. und Popik, S. (2017). "Efficacy and safety of sirukumab in patients with active rheumatoid arthritis refractory to anti-TNF therapy (SIRROUND-T): a randomised, double-blind, placebo-controlled, parallel-group, multinational, phase 3 study." Lancet 389(10075): 1206-1217.

Alwine, J. C., Kemp, D. J. und Stark, G. R. (1977). "Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes." Proc Natl Acad Sci U S A 74(12): 5350-5354.

Arakawa, Y., Sendtner, M. und Thoenen, H. (1990). "Survival effect of ciliary neurotrophic factor (CNTF) on chick embryonic motoneurons in culture: comparison with other neurotrophic factors and cytokines." J Neurosci 10(11): 3507-3515.

Atreya, R., Mudter, J., Finotto, S., Mullberg, J., Jostock, T., Wirtz, S., Schutz, M., Bartsch, B., Holtmann, M., Becker, C., Strand, D., Czaja, J., Schlaak, J. F., Lehr, H. A., Autschbach, F., Schurmann, G., Nishimoto, N., Yoshizaki, K., Ito, H., Kishimoto, T., Galle, P. R., Rose-John, S. und Neurath, M. F. (2000). "Blockade of interleukin 6 trans signaling suppresses T-cell resistance against apoptosis in chronic intestinal inflammation: evidence in crohn disease and experimental colitis in vivo." Nat Med 6(5): 583-588.

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

Burnette, W. N. (1981). "'Western blotting': electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A." Anal Biochem 112(2): 195-203.

Chalaris, A., Rabe, B., Paliga, K., Lange, H., Laskay, T., Fielding, C. A., Jones, S. A., Rose-John, S. und Scheller, J. (2007). "Apoptosis is a natural stimulus of IL6R shedding and contributes to the proinflammatory trans-signaling function of neutrophils." Blood 110(6): 1748-1755.

Chen, H. F., Lin, C. Y., Chao, K. H., Wu, M. Y., Yang, Y. S. und Ho, H. N. (2002). "Defective production of interleukin-11 by decidua and chorionic villi in human anembryonic pregnancy." J Clin Endocrinol Metab 87(5): 2320-2328.

Courties, A., Grateau, G., Philippe, P., Flipo, R. M., Astudillo, L., Aubry-Rozier, B., Fabreguet, I., Fahd, W., Fain, O., Guggenbuhl, P., Hachulla, E., Papo, T., Richez, C., Sibilia, J., Morel, J., Berenbaum, F., Sellam, J., Club Rhumatismes, I. und the, R. R.

- (2015). "AA amyloidosis treated with tocilizumab: case series and updated literature review." Amyloid 22(2): 84-92.
- Culig, Z. und Puhr, M. (2017). "Interleukin-6 and prostate cancer: Current developments and unsolved questions." Mol Cell Endocrinol.
- Curtis, D. J., Hilton, D. J., Roberts, B., Murray, L., Nicola, N. und Begley, C. G. (1997). "Recombinant soluble interleukin-11 (IL-11) receptor alpha-chain can act as an IL-11 antagonist." Blood 90(11): 4403-4412.
- Dams-Kozłowska, H., Gryśka, K., Kwiatkowska-Borowczyk, E., Izzycki, D., Rose-John, S. und Mackiewicz, A. (2012). "A designer hyper interleukin 11 (H11) is a biologically active cytokine." BMC Biotechnol 12: 8.
- Dams-Kozłowska, H., Kwiatkowska-Borowczyk, E., Gryśka, K. und Mackiewicz, A. (2013). "Designer cytokine hyper interleukin 11 (H11) is a megakaryopoietic factor." Int J Med Sci 10(9): 1157-1165.
- Darnell, J. E., Jr., Kerr, I. M. und Stark, G. R. (1994). "Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins." Science 264(5164): 1415-1421.
- Dimitriadis, E., Robb, L. und Salamonsen, L. A. (2002). "Interleukin 11 advances progesterone-induced decidualization of human endometrial stromal cells." Mol Hum Reprod 8(7): 636-643.
- Dorner, A. J., Goldman, S. J. und Keith, J. C., Jr. (1997). "Interleukin-11: biological activity and clinical studies." BioDrugs 8(6): 418-429.
- Ellingsgaard, H., Hauselmann, I., Schuler, B., Habib, A. M., Baggio, L. L., Meier, D. T., Eppler, E., Bouzakri, K., Wuest, S., Muller, Y. D., Hansen, A. M., Reinecke, M., Konrad, D., Gassmann, M., Reimann, F., Halban, P. A., Gromada, J., Drucker, D. J., Gribble, F. M., Ehse, J. A. und Donath, M. Y. (2011). "Interleukin-6 enhances insulin secretion by increasing glucagon-like peptide-1 secretion from L cells and alpha cells." Nat Med 17(11): 1481-1489.
- Ernst, M. und Putoczki, T. L. (2014). "Molecular pathways: IL11 as a tumor-promoting cytokine-translational implications for cancers." Clin Cancer Res 20(22): 5579-5588.
- Evans, T. C., Jr., Benner, J. und Xu, M. Q. (1998). "Semisynthesis of cytotoxic proteins using a modified protein splicing element." Protein Sci 7(11): 2256-2264.
- Feldman, D. E. (2009). "Synaptic mechanisms for plasticity in neocortex." Annu Rev Neurosci 32: 33-55.
- Feldman, M. und van der Goot, F. G. (2009). "Novel ubiquitin-dependent quality control in the endoplasmic reticulum." Trends Cell Biol 19(8): 357-363.
- Ferguson-Smith, A. C., Chen, Y. F., Newman, M. S., May, L. T., Sehgal, P. B. und Ruddle, F. H. (1988). "Regional localization of the interferon-beta 2/B-cell stimulatory factor 2/hepatocyte stimulating factor gene to human chromosome 7p15-p21." Genomics 2(3): 203-208.

- Figueiredo, C. A., Drohomysrecky, P. C., McCarthy, S. D., Leontyev, D., Ma, X. Z., Branch, D. R. und Dunn, S. E. (2014). "Optimal attenuation of experimental autoimmune encephalomyelitis by intravenous immunoglobulin requires an intact interleukin-11 receptor." PLoS One 9(7): e101947.
- Fischer, M., Goldschmitt, J., Peschel, C., Brakenhoff, J. P., Kallen, K. J., Wollmer, A., Grotzinger, J. und Rose-John, S. (1997). "I. A bioactive designer cytokine for human hematopoietic progenitor cell expansion." Nat Biotechnol 15(2): 142-145.
- Fuentes, E. N., Zuloaga, R., Valdes, J. A., Molina, A. und Alvarez, M. (2014). "Skeletal muscle plasticity induced by seasonal acclimatization involves IGF1 signaling: implications in ribosomal biogenesis and protein synthesis." Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol 176: 48-57.
- Ganten, D. R., Klaus (2003). "Grundlagen der Molekularen Medizin." Heidelberg, Springer Verlag, 2. Auflage.
- Garbers, C., Aparicio-Siegmund, S. und Rose-John, S. (2015). "The IL-6/gp130/STAT3 signaling axis: recent advances towards specific inhibition." Curr Opin Immunol 34: 75-82.
- Garbers, C., Hermanns, H. M., Schaper, F., Muller-Newen, G., Grotzinger, J., Rose-John, S. und Scheller, J. (2012). "Plasticity and cross-talk of interleukin 6-type cytokines." Cytokine Growth Factor Rev 23(3): 85-97.
- Garbers, C. und Scheller, J. (2013). "Interleukin-6 and interleukin-11: same same but different." Biol Chem 394(9): 1145-1161.
- Garbers, C., Spudy, B., Aparicio-Siegmund, S., Waetzig, G. H., Sommer, J., Holscher, C., Rose-John, S., Grotzinger, J., Lorenzen, I. und Scheller, J. (2013). "An interleukin-6 receptor-dependent molecular switch mediates signal transduction of the IL-27 cytokine subunit p28 (IL-30) via a gp130 protein receptor homodimer." J Biol Chem 288(6): 4346-4354.
- Garcia-Hernandez, B., Castellanos, A., Lopez, A., Orfao, A. und Sanchez-Garcia, I. (1997). "Murine hematopoietic reconstitution after tagging and selection of retrovirally transduced bone marrow cells." Proc Natl Acad Sci U S A 94(24): 13239-13244.
- Guo, C., Li, Z., Shi, Y., Xu, M., Wise, J. G., Trommer, W. E. und Yuan, J. (2004). "Intein-mediated fusion expression, high efficient refolding, and one-step purification of gelonin toxin." Protein Expr Purif 37(2): 361-367.
- Guschin, D., Rogers, N., Briscoe, J., Witthuhn, B., Watling, D., Horn, F., Pellegrini, S., Yasukawa, K., Heinrich, P., Stark, G. R. und et al. (1995). "A major role for the protein tyrosine kinase JAK1 in the JAK/STAT signal transduction pathway in response to interleukin-6." EMBO J 14(7): 1421-1429.
- Hamers-Casterman, C., Atarhouch, T., Muyldermans, S., Robinson, G., Hamers, C., Songa, E. B., Bendahman, N. und Hamers, R. (1993). "Naturally occurring antibodies devoid of light chains." Nature 363(6428): 446-448.

- Hayakawa, K., Hardy, R. R., Herzenberg, L. A. und Herzenberg, L. A. (1985). "Progenitors for Ly-1 B cells are distinct from progenitors for other B cells." J Exp Med 161(6): 1554-1568.
- Heikkila, K., Ebrahim, S. und Lawlor, D. A. (2008). "Systematic review of the association between circulating interleukin-6 (IL-6) and cancer." Eur J Cancer 44(7): 937-945.
- Heinrich, P. C., Behrmann, I., Haan, S., Hermanns, H. M., Muller-Newen, G. und Schaper, F. (2003). "Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation." Biochem J 374(Pt 1): 1-20.
- Heinrich, P. C., Behrmann, I., Muller-Newen, G., Schaper, F. und Graeve, L. (1998). "Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway." Biochem J 334 (Pt 2): 297-314.
- Hirano, T., Yasukawa, K., Harada, H., Taga, T., Watanabe, Y., Matsuda, T., Kashiwamura, S., Nakajima, K., Koyama, K., Iwamatsu, A. und et al. (1986). "Complementary DNA for a novel human interleukin (BSF-2) that induces B lymphocytes to produce immunoglobulin." Nature 324(6092): 73-76.
- Homey, L. (2013). Inteinvermittelte Fusion von Interleukin-6 und seinem löslichen Interleukin-6-Rezeptor. B.Sc. Bachelor-Thesis, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- Huang, X., Narayanaswamy, R., Fenn, K., Szpakowski, S., Sasaki, C., Costa, J., Blancafort, P. und Lizardi, P. M. (2012). "Sequence-specific biosensors report drug-induced changes in epigenetic silencing in living cells." DNA Cell Biol 31 Suppl 1: S2-10.
- Illei, G. G., Shirota, Y., Yarboro, C. H., Daruwalla, J., Tackey, E., Takada, K., Fleisher, T., Balow, J. E. und Lipsky, P. E. (2010). "Tocilizumab in systemic lupus erythematosus: data on safety, preliminary efficacy, and impact on circulating plasma cells from an open-label phase I dosage-escalation study." Arthritis Rheum 62(2): 542-552.
- Jones, S. A., Scheller, J. und Rose-John, S. (2011). "Therapeutic strategies for the clinical blockade of IL-6/gp130 signaling." J Clin Invest 121(9): 3375-3383.
- Jostock, T., Mullberg, J., Ozbek, S., Atreya, R., Blinn, G., Voltz, N., Fischer, M., Neurath, M. F. und Rose-John, S. (2001). "Soluble gp130 is the natural inhibitor of soluble interleukin-6 receptor transsignaling responses." Eur J Biochem 268(1): 160-167.
- Kasaian, M. T., Ikematsu, H. und Casali, P. (1992). "Identification and analysis of a novel human surface CD5- B lymphocyte subset producing natural antibodies." J Immunol 148(9): 2690-2702.
- Kurth, I., Horsten, U., Pflanz, S., Dahmen, H., Kuster, A., Grotzinger, J., Heinrich, P. C. und Muller-Newen, G. (1999). "Activation of the signal transducer glycoprotein 130 by both IL-6 and IL-11 requires two distinct binding epitopes." J Immunol 162(3): 1480-1487.

- Lacroix, M., Rousseau, F., Guilhot, F., Malinge, P., Magistrelli, G., Herren, S., Jones, S. A., Jones, G. W., Scheller, J., Lissilaa, R., Kosco-Vilbois, M., Johnson, Z., Buatois, V. und Ferlin, W. (2015). "Novel Insights into Interleukin 6 (IL-6) Cis- and Trans-signaling Pathways by Differentially Manipulating the Assembly of the IL-6 Signaling Complex." J Biol Chem 290(45): 26943-26953.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." Nature 227(5259): 680-685.
- Lemus, L. und Goder, V. (2014). "Regulation of Endoplasmic Reticulum-Associated Protein Degradation (ERAD) by Ubiquitin." Cells 3(3): 824-847.
- Li, Y. (2015). "Split-inteins and their bioapplications." Biotechnol Lett 37(11): 2121-2137.
- Li, Y. Y., Hsieh, L. L., Tang, R. P., Liao, S. K. und Yeh, K. Y. (2009). "Interleukin-6 (IL-6) released by macrophages induces IL-6 secretion in the human colon cancer HT-29 cell line." Hum Immunol 70(3): 151-158.
- Lockless, S. W. und Muir, T. W. (2009). "Traceless protein splicing utilizing evolved split inteins." Proc Natl Acad Sci U S A 106(27): 10999-11004.
- Löffler, G., Petrides, P. und Heinrich, P. (2007). Biochemie & Pathobiochemie. Heidelberg, Springer Verlag. 8. Auflage.
- Lokau, J., Nitz, R., Agthe, M., Monhasery, N., Aparicio-Siegmund, S., Schumacher, N., Wolf, J., Moller-Hackbarth, K., Waetzig, G. H., Grotzinger, J., Muller-Newen, G., Rose-John, S., Scheller, J. und Garbers, C. (2016). "Proteolytic Cleavage Governs Interleukin-11 Trans-signaling." Cell Rep 14(7): 1761-1773.
- Lozzio, B. B. und Lozzio, C. B. (1979). "Properties and usefulness of the original K-562 human myelogenous leukemia cell line." Leuk Res 3(6): 363-370.
- Lupardus, P. J., Skiniotis, G., Rice, A. J., Thomas, C., Fischer, S., Walz, T. und Garcia, K. C. (2011). "Structural snapshots of full-length Jak1, a transmembrane gp130/IL-6/IL-6Ralpha cytokine receptor complex, and the receptor-Jak1 holocomplex." Structure 19(1): 45-55.
- Lydyard, P. M., Youinou, P. Y. und Cooke, A. (1987). "CD5-positive B cells in rheumatoid arthritis and chronic lymphocytic leukemia." Immunol Today 8(2): 37-39.
- Mahboubi, K., Biedermann, B. C., Carroll, J. M. und Pober, J. S. (2000). "IL-11 activates human endothelial cells to resist immune-mediated injury." J Immunol 164(7): 3837-3846.
- Marder, P., Maciak, R. S., Fouts, R. L., Baker, R. S. und Starling, J. J. (1990). "Selective cloning of hybridoma cells for enhanced immunoglobulin production using flow cytometric cell sorting and automated laser nephelometry." Cytometry 11(4): 498-505.
- Masuda, K. und Kishimoto, T. (2016). "CD5: A New Partner for IL-6." Immunity 44(4): 720-722.

- McFarland-Mancini, M. M., Funk, H. M., Paluch, A. M., Zhou, M., Giridhar, P. V., Mercer, C. A., Kozma, S. C. und Drew, A. F. (2010). "Differences in wound healing in mice with deficiency of IL-6 versus IL-6 receptor." J Immunol 184(12): 7219-7228.
- Mease, P. J., Gottlieb, A. B., Berman, A., Drescher, E., Xing, J., Wong, R. und Banerjee, S. (2016). "The Efficacy and Safety of Clazakizumab, an Anti-Interleukin-6 Monoclonal Antibody, in a Phase IIb Study of Adults With Active Psoriatic Arthritis." Arthritis Rheumatol 68(9): 2163-2173.
- Metz, S., Wiesinger, M., Vogt, M., Lauks, H., Schmalzing, G., Heinrich, P. C. und Muller-Newen, G. (2007). "Characterization of the Interleukin (IL)-6 Inhibitor IL-6-RFP: fused receptor domains act as high affinity cytokine-binding proteins." J Biol Chem 282(2): 1238-1248.
- Molden, J., Chang, Y., You, Y., Moore, P. S. und Goldsmith, M. A. (1997). "A Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-encoded cytokine homolog (vIL-6) activates signaling through the shared gp130 receptor subunit." J Biol Chem 272(31): 19625-19631.
- Moll, J. M., Wehmöller, M., Frank, N. C., Homey, L., Baran, P., Garbers, C., Lamertz, L., Axelrod, J. H., Galun, E., Mootz, H. D. und Scheller, J. (2017). "Split2 protein-ligation generates active IL-6-type Hyper-cytokines from inactive precursors." ACS Synth Biol.
- Mullberg, J., Schooltink, H., Stoyan, T., Gunther, M., Graeve, L., Buse, G., Mackiewicz, A., Heinrich, P. C. und Rose-John, S. (1993). "The soluble interleukin-6 receptor is generated by shedding." Eur J Immunol 23(2): 473-480.
- Mullis, K. B. und Faloona, F. A. (1987). "Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction." Methods Enzymol 155: 335-350.
- Munro, S. und Pelham, H. R. (1987). "A C-terminal signal prevents secretion of luminal ER proteins." Cell 48(5): 899-907.
- Nakayama, K. (1998). "Expression of IL-6, IL-6 receptor and its signal transducer gp130 mRNAs in megakaryocytic cell lines." Leuk Lymphoma 29(3-4): 399-405.
- Nemecek, A., Zimmermann, H., Rubenthaler, J., Fleischer, V., Paterka, M., Luessi, F., Muller-Forell, W., Zipp, F. und Siffrin, V. (2016). "Flow cytometric analysis of T cell/monocyte ratio in clinically isolated syndrome identifies patients at risk of rapid disease progression." Mult Scler 22(4): 483-493.
- Nieminen, P., Morgan, N. V., Fenwick, A. L., Parmanen, S., Veistinen, L., Mikkola, M. L., van der Spek, P. J., Giraud, A., Judd, L., Arte, S., Brueton, L. A., Wall, S. A., Mathijssen, I. M., Maher, E. R., Wilkie, A. O., Kreiborg, S. und Thesleff, I. (2011). "Inactivation of IL11 signaling causes craniosynostosis, delayed tooth eruption, and supernumerary teeth." Am J Hum Genet 89(1): 67-81.
- Nishimoto, N., Yoshizaki, K., Miyasaka, N., Yamamoto, K., Kawai, S., Takeuchi, T., Hashimoto, J., Azuma, J. und Kishimoto, T. (2004). "Treatment of rheumatoid arthritis with humanized anti-interleukin-6 receptor antibody: a multicenter, double-blind, placebo-controlled trial." Arthritis Rheum 50(6): 1761-1769.

- Nishina, T., Komazawa-Sakon, S., Yanaka, S., Piao, X., Zheng, D. M., Piao, J. H., Kojima, Y., Yamashina, S., Sano, E., Putoczki, T., Doi, T., Ueno, T., Ezaki, J., Ushio, H., Ernst, M., Tsumoto, K., Okumura, K. und Nakano, H. (2012). "Interleukin-11 links oxidative stress and compensatory proliferation." Sci Signal 5(207): ra5.
- Nowell, M. A., Richards, P. J., Horiuchi, S., Yamamoto, N., Rose-John, S., Topley, N., Williams, A. S. und Jones, S. A. (2003). "Soluble IL-6 receptor governs IL-6 activity in experimental arthritis: blockade of arthritis severity by soluble glycoprotein 130." J Immunol 171(6): 3202-3209.
- O'Shea, J. J., Kontzias, A., Yamaoka, K., Tanaka, Y. und Laurence, A. (2013). "Janus kinase inhibitors in autoimmune diseases." Ann Rheum Dis 72 Suppl 2: ii111-115.
- O'Sullivan, D. J. und Klaenhammer, T. R. (1993). "Rapid Mini-Prep Isolation of High-Quality Plasmid DNA from *Lactococcus* and *Lactobacillus* spp." Appl Environ Microbiol 59(8): 2730-2733.
- Paiva, P., Menkhorst, E., Salamonsen, L. und Dimitriadis, E. (2009). "Leukemia inhibitory factor and interleukin-11: critical regulators in the establishment of pregnancy." Cytokine Growth Factor Rev 20(4): 319-328.
- Parrilla, R., Goodman, M. N. und Toews, C. J. (1974). "Effect of glucagon: insulin ratios on hepatic metabolism." Diabetes 23(9): 725-731.
- Pasquin, S., Sharma, M. und Gauchat, J. F. (2015). "Ciliary neurotrophic factor (CNTF): New facets of an old molecule for treating neurodegenerative and metabolic syndrome pathologies." Cytokine Growth Factor Rev 26(5): 507-515.
- Pelechas, E., Voulgari, P. V. und Drosos, A. A. (2017). "Sirukumab: a promising therapy for rheumatoid arthritis." Expert Opin Biol Ther: 1-9.
- Pelham, H. R. (1988). "Evidence that luminal ER proteins are sorted from secreted proteins in a post-ER compartment." EMBO J 7(4): 913-918.
- Pelham, H. R. (1989). "Control of protein exit from the endoplasmic reticulum." Annu Rev Cell Biol 5: 1-23.
- Perez-Trujillo, J. J., Garza-Morales, R., Barron-Cantu, J. A., Figueroa-Parra, G., Garcia-Garcia, A., Rodriguez-Rocha, H., Garcia-Juarez, J., Munoz-Maldonado, G. E., Saucedo-Cardenas, O., Montes-De-Oca-Luna, R. und Loera-Arias, M. J. (2017). "DNA vaccine encoding human papillomavirus antigens flanked by a signal peptide and a KDEL sequence induces a potent therapeutic antitumor effect." Oncol Lett 13(3): 1569-1574.
- Perler, F. B. (2002). "InBase: the Intein Database." Nucleic Acids Res 30(1): 383-384.
- Perler, F. B., Davis, E. O., Dean, G. E., Gimble, F. S., Jack, W. E., Neff, N., Noren, C. J., Thorner, J. und Belfort, M. (1994). "Protein splicing elements: inteins and exteins--a definition of terms and recommended nomenclature." Nucleic Acids Res 22(7): 1125-1127.

- Peters, M., Blinn, G., Solem, F., Fischer, M., Meyer zum Buschenfelde, K. H. und Rose-John, S. (1998). "In vivo and in vitro activities of the gp130-stimulating designer cytokine Hyper-IL-6." J Immunol 161(7): 3575-3581.
- Peters, M., Jacobs, S., Ehlers, M., Vollmer, P., Mullberg, J., Wolf, E., Brem, G., Meyer zum Buschenfelde, K. H. und Rose-John, S. (1996). "The function of the soluble interleukin 6 (IL-6) receptor in vivo: sensitization of human soluble IL-6 receptor transgenic mice towards IL-6 and prolongation of the plasma half-life of IL-6." J Exp Med 183(4): 1399-1406.
- Pflanz, S., Tacke, I., Grotzinger, J., Jacques, Y., Minvielle, S., Dahmen, H., Heinrich, P. C. und Muller-Newen, G. (1999). "A fusion protein of interleukin-11 and soluble interleukin-11 receptor acts as a superagonist on cells expressing gp130." FEBS Lett 450(1-2): 117-122.
- Pich, U. und Schubert, I. (1993). "Midiprep method for isolation of DNA from plants with a high content of polyphenolics." Nucleic Acids Res 21(14): 3328.
- Pilati, C. und Zucman-Rossi, J. (2015). "Mutations leading to constitutive active gp130/JAK1/STAT3 pathway." Cytokine Growth Factor Rev 26(5): 499-506.
- Putoczki, T. und Ernst, M. (2010). "More than a sidekick: the IL-6 family cytokine IL-11 links inflammation to cancer." J Leukoc Biol 88(6): 1109-1117.
- Quintana, P., Soto, D., Poirot, O., Zonouzi, M., Kellenberger, S., Muller, D., Chrast, R. und Cull-Candy, S. G. (2015). "Acid-sensing ion channel 1a drives AMPA receptor plasticity following ischaemia and acidosis in hippocampal CA1 neurons." J Physiol 593(19): 4373-4386.
- Rabe, B., Chalaris, A., May, U., Waetzig, G. H., Seegert, D., Williams, A. S., Jones, S. A., Rose-John, S. und Scheller, J. (2008). "Transgenic blockade of interleukin 6 transsignaling abrogates inflammation." Blood 111(3): 1021-1028.
- Robb, L., Hilton, D. J., Willson, T. A. und Begley, C. G. (1996). "Structural analysis of the gene encoding the murine interleukin-11 receptor alpha-chain and a related locus." J Biol Chem 271(23): 13754-13761.
- Robinson, M. J. und Cobb, M. H. (1997). "Mitogen-activated protein kinase pathways." Curr Opin Cell Biol 9(2): 180-186.
- Rose-John, S. (2012). "IL-6 trans-signaling via the soluble IL-6 receptor: importance for the pro-inflammatory activities of IL-6." Int J Biol Sci 8(9): 1237-1247.
- Rose-John, S. und Heinrich, P. C. (1994). "Soluble receptors for cytokines and growth factors: generation and biological function." Biochem J 300 (Pt 2): 281-290.
- Rose-John, S., Waetzig, G. H., Scheller, J., Grotzinger, J. und Seegert, D. (2007). "The IL-6/sIL-6R complex as a novel target for therapeutic approaches." Expert Opin Ther Targets 11(5): 613-624.
- Salanga, C. L., O'Hayre, M. und Handel, T. (2009). "Modulation of chemokine receptor activity through dimerization and crosstalk." Cell Mol Life Sci 66(8): 1370-1386.

- Sambrook, J. und Russell, D. W. (2006). "Preparation of Plasmid DNA by Alkaline Lysis with SDS: Miniprep." CSH Protoc 2006(1).
- Sarosiek, S., Shah, R. und Munshi, N. C. (2016). "Review of siltuximab in the treatment of multicentric Castleman's disease." Ther Adv Hematol 7(6): 360-366.
- Scahill, S. J., Devos, R., Van der Heyden, J. und Fiers, W. (1983). "Expression and characterization of the product of a human immune interferon cDNA gene in Chinese hamster ovary cells." Proc Natl Acad Sci U S A 80(15): 4654-4658.
- Scheller, J., Chalaris, A., Schmidt-Arras, D. und Rose-John, S. (2011). "The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6." Biochim Biophys Acta 1813(5): 878-888.
- Scheller, J., Garbers, C. und Rose-John, S. (2014). "Interleukin-6: from basic biology to selective blockade of pro-inflammatory activities." Semin Immunol 26(1): 2-12.
- Schuster, B., Kovaleva, M., Sun, Y., Regenhard, P., Matthews, V., Grotzinger, J., Rose-John, S. und Kallen, K. J. (2003). "Signaling of human ciliary neurotrophic factor (CNTF) revisited. The interleukin-6 receptor can serve as an alpha-receptor for CTNF." J Biol Chem 278(11): 9528-9535.
- Shah, N. H., Eryilmaz, E., Cowburn, D. und Muir, T. W. (2013). "Naturally split inteins assemble through a "capture and collapse" mechanism." J Am Chem Soc 135(49): 18673-18681.
- Shapiro, H. M., Natale, P. J. und Kamentsky, L. A. (1979). "Estimation of membrane potentials of individual lymphocytes by flow cytometry." Proc Natl Acad Sci U S A 76(11): 5728-5730.
- Singh, B., Berry, J. A., Shoher, A. und Lucci, A. (2006). "COX-2 induces IL-11 production in human breast cancer cells." J Surg Res 131(2): 267-275.
- Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J. und Klenk, D. C. (1985). "Measurement of protein using bicinchoninic acid." Anal Biochem 150(1): 76-85.
- Sommer, J. (2014). Role of Interleukin-6 receptor in a murine dextran sodium sulfate induced colitis model and expression and functional characterization of novel variants of its beta-receptor gp130. PhD Thesis, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- Sommer, J., Effenberger, T., Volpi, E., Waetzig, G. H., Bernhardt, M., Suthaus, J., Garbers, C., Rose-John, S., Floss, D. M. und Scheller, J. (2012). "Constitutively active mutant gp130 receptor protein from inflammatory hepatocellular adenoma is inhibited by an anti-gp130 antibody that specifically neutralizes interleukin 11 signaling." J Biol Chem 287(17): 13743-13751.
- Sommer, J., Engelowski, E., Baran, P., Garbers, C., Floss, D. M. und Scheller, J. (2014). "Interleukin-6, but not the interleukin-6 receptor plays a role in recovery from dextran sodium sulfate-induced colitis." Int J Mol Med 34(3): 651-660.

- Subramanyam, P., Chang, D. D., Fang, K., Xie, W., Marks, A. R. und Colecraft, H. M. (2013). "Manipulating L-type calcium channels in cardiomyocytes using split-intein protein transsplicing." Proc Natl Acad Sci U S A 110(38): 15461-15466.
- Suga, K., Saitoh, M., Kokubo, S., Nozaki, K., Fukushima, S., Yasuda, S., Sasamata, M. und Miyata, K. (2004). "Synergism between interleukin-11 and bone morphogenetic protein-2 in the healing of segmental bone defects in a rabbit model." J Interferon Cytokine Res 24(6): 343-349.
- Suthaus, J., Stuhlmann-Laeisz, C., Tompkins, V. S., Rosean, T. R., Klapper, W., Tosato, G., Janz, S., Scheller, J. und Rose-John, S. (2012). "HHV-8-encoded viral IL-6 collaborates with mouse IL-6 in the development of multicentric Castleman disease in mice." Blood 119(22): 5173-5181.
- Takahashi-Tezuka, M., Hibi, M., Fujitani, Y., Fukada, T., Yamaguchi, T. und Hirano, T. (1997). "Tec tyrosine kinase links the cytokine receptors to PI-3 kinase probably through JAK." Oncogene 14(19): 2273-2282.
- Talmage, R. V., Grubb, S. A., Norimatsu, H. und Vanderziel, C. J. (1980). "Evidence for an important physiological role for calcitonin." Proc Natl Acad Sci U S A 77(1): 609-613.
- Tato, C. M. und Cua, D. J. (2008). "SnapShot: Cytokines I." Cell 132(2): 324, 324 e321.
- Tato, C. M. und Cua, D. J. (2008). "SnapShot: cytokines II." Cell 132(3): 500.
- Tato, C. M. und Cua, D. J. (2008). "SnapShot: cytokines III." Cell 132(5): 900.
- Tato, C. M. und Cua, D. J. (2008). "SnapShot: Cytokines IV." Cell 132(6): 1062 e1061-1062.
- Thermo-Scientific (2012) "Ligation Protocol. Retrieved from https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/MAN0011906_DNAert_Ligation_Vector_DNA_UG.pdf."
- Thermo-Scientific (2013) "Dephosphorylation Protocol. Retrieved from https://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/MAN0011972_Dephosphorylation_Proteins_UG.pdf."
- Tori, K. und Perler, F. (2017). "Sequential formation of two branched intermediates during protein splicing of class three inteins." Extremophiles 21(1): 41-49.
- Van Roy, M., Ververken, C., Beirnaert, E., Hoefman, S., Kolkman, J., Vierboom, M., Breedveld, E., t Hart, B., Poelmans, S., Bontinck, L., Hemeryck, A., Jacobs, S., Baumeister, J. und Ulrichs, H. (2015). "The preclinical pharmacology of the high affinity anti-IL-6R Nanobody(R) ALX-0061 supports its clinical development in rheumatoid arthritis." Arthritis Res Ther 17: 135.
- Venkiteshwaran, A. (2009). "Tocilizumab." MAbs 1(5): 432-438.
- Vlotides, G., Zitzmann, K., Stalla, G. K. und Auernhammer, C. J. (2004). "Novel neurotrophin-1/B cell-stimulating factor-3 (NNT-1/BSF-3)/cardiotrophin-like cytokine

(CLC)--a novel gp130 cytokine with pleiotropic functions." Cytokine Growth Factor Rev 15(5): 325-336.

Volkmann, G., Sun, W. und Liu, X. Q. (2009). "Controllable protein cleavages through intein fragment complementation." Protein Sci 18(11): 2393-2402.

Watson, C., Whittaker, S., Smith, N., Vora, A. J., Dumonde, D. C. und Brown, K. A. (1996). "IL-6 acts on endothelial cells to preferentially increase their adherence for lymphocytes." Clin Exp Immunol 105(1): 112-119.

Wehmöller, M. (2014). Generierung von biologisch aktivem Hyper-IL-6 durch Intein-vermittelte Proteinligation von Split-Zytokinen. M.Sc. Master-Thesis, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

Wilks, A. F., Harpur, A. G., Kurban, R. R., Ralph, S. J., Zurcher, G. und Ziemiecki, A. (1991). "Two novel protein-tyrosine kinases, each with a second phosphotransferase-related catalytic domain, define a new class of protein kinase." Mol Cell Biol 11(4): 2057-2065.

Wolf, E. P. (1921). "Experimental Studies on Inflammation : I. The Influence of Chemicals Upon the Chemotaxis of Leucocytes in Vitro." J Exp Med 34(4): 375-396.

Wu, W., Wood, D. W., Belfort, G., Derbyshire, V. und Belfort, M. (2002). "Intein-mediated purification of cytotoxic endonuclease I-TevI by insertional inactivation and pH-controllable splicing." Nucleic Acids Res 30(22): 4864-4871.

Wurm, F. M. (2004). "Production of recombinant protein therapeutics in cultivated mammalian cells." Nat Biotechnol 22(11): 1393-1398.

Xu, R., Ayers, B., Cowburn, D. und Muir, T. W. (1999). "Chemical ligation of folded recombinant proteins: segmental isotopic labeling of domains for NMR studies." Proc Natl Acad Sci U S A 96(2): 388-393.

Yamaoka, K., Saharinen, P., Pesu, M., Holt, V. E., 3rd, Silvennoinen, O. und O'Shea, J. J. (2004). "The Janus kinases (Jaks)." Genome Biol 5(12): 253.

Yan, D., Kc, R., Chen, D., Xiao, G. und Im, H. J. (2013). "Bovine lactoferricin-induced anti-inflammation is, in part, via up-regulation of interleukin-11 by secondary activation of STAT3 in human articular cartilage." J Biol Chem 288(44): 31655-31669.

Yan, J., Mitra, A., Hu, J., Cutrera, J. J., Xia, X., Doetschman, T., Gagea, M., Mishra, L. und Li, S. (2016). "Interleukin-30 (IL27p28) alleviates experimental sepsis by modulating cytokine profile in NKT cells." J Hepatol 64(5): 1128-1136.

Yang, Y., Nam, S. W., Lee, N. Y., Kim, Y. S. und Park, S. (2008). "Superporous agarose beads as a solid support for microfluidic immunoassay." Ultramicroscopy 108(10): 1384-1389.

Yoshizaki, A., Nakayama, T., Yamazumi, K., Yakata, Y., Taba, M. und Sekine, I. (2006). "Expression of interleukin (IL)-11 and IL-11 receptor in human colorectal adenocarcinoma: IL-11 up-regulation of the invasive and proliferative activity of human colorectal carcinoma cells." Int J Oncol 29(4): 869-876.

Youinou, P., Jamin, C. und Lydyard, P. M. (1999). "CD5 expression in human B-cell populations." Immunol Today 20(7): 312-316.

Zhang, C., Xin, H., Zhang, W., Yazaki, P. J., Zhang, Z., Le, K., Li, W., Lee, H., Kwak, L., Forman, S., Jove, R. und Yu, H. (2016). "CD5 Binds to Interleukin-6 and Induces a Feed-Forward Loop with the Transcription Factor STAT3 in B Cells to Promote Cancer." Immunity 44(4): 913-923.

Zhou, M. Y. und Gomez-Sanchez, C. E. (2000). "Universal TA cloning." Curr Issues Mol Biol 2(1): 1-7.

Danksagung

Zuallererst möchte ich Herrn Prof. Dr. Jürgen Scheller für die freundliche Überlassung des Themas dieser Dissertation danken. Sein reges Interesse am Fortgang der Untersuchungen, seine zahlreichen Anregungen und Hinweise während der Laborarbeit haben wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Ein ganz besonderer Dank geht auch an den Betreuer meiner Arbeit, Herrn PhD Jens Moll, der mir zu jeder Zeit engagiert beratend zur Seite gestanden hat. Seine bereitwillige Unterstützung beim Auftreten von Schwierigkeiten, seine Förderung des Projektes und seine Geduld haben in besonderer Weise das Fortschreiten der Untersuchungen vorangebracht.

Außerdem möchte ich der Forschungskommission der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf danken, die diese Arbeit durch Fördergelder unterstützt hat.

Weiterhin danke ich im Besonderen Herrn Dr. Manuel Franke, Herrn Paul Baran, Frau Larissa Lamertz und Frau Erika Engelowski sowie den technischen Assistentinnen Frau Nadine Horstick-Muche und Frau Ilse Meyer. Ihnen gilt wie allen anderen Mitarbeitern des Instituts für Biochemie und Molekularbiologie II mein Dank für ihre Tipps und Hilfestellungen im Labor und die vielen netten Gespräche, ohne die ich mich als Zahnmediziner nicht so problemlos in der Biochemie zurechtgefunden hätte.

Meinem geschätzten zahnärztlichen Kollegen und Mitdoktoranden Markus Rosenfeldt danke ich für seine Hilfe und Unterstützung inner- und außerhalb des Labors, da wir als Team gemeinsam viel mehr erreicht haben, als wir beide es vermutlich alleine geschafft hätten. Danke für deine kritische Meinung im Studium, während der Promotion und bei der Arbeit bis heute.

Mein größter Dank gebührt meinen lieben Eltern, die mich auf diesem langen Weg zu jeder Zeit vorbehaltlos unterstützt haben. Danke für eure Motivation, Geduld und Zeit, die ihr mir jederzeit gewährt habt, wenn ich Probleme hatte. Ich danke außerdem meinen beiden Großmüttern, die mich schon während des Studiums immer wieder motiviert haben.