

**Quantifizierung von Interleukin-6/löslichen
Interleukin-6 Rezeptorkomplexen und Etablierung
eines Nanopartikel-Zelltracking Systems über
synthetische Cargo-Internalisierungsrezeptoren**



HEINRICH HEINE
UNIVERSITÄT DÜSSELDORF

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

Paul Baran

aus Lötzen

Düsseldorf, Mai 2018

aus dem Institut für Biochemie und Molekularbiologie II
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.

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

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

Korreferent: Prof. Dr. rer. nat. Ulrich Flögel

Tag der mündlichen Prüfung: 11.07.2018

Für Christina und Jan Baran

„Natürlich gibt es kein Rezept für den Erfolg. Außer vielleicht die bedingungslose Akzeptanz des Lebens und all dessen, was es bringt.“

Arthur Rubinstein

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen und Fachbegriffe.....	1
Aminosäuren.....	4
Abbildungsverzeichnis.....	5
Tabellenverzeichnis.....	7
1. Einleitung.....	9
1.1 Zytokine der Interleukin-6-Familie.....	9
1.1.1 Das pleiotrope Zytokin Interleukin-6.....	10
1.1.2 Der Interleukin-6 Rezeptorkomplex: Klassische Signaltransduktion.....	11
1.1.3 Der Interleukin-6/lösliche Interleukin-6 Rezeptorkomplex: Trans-Signalweg.....	14
1.1.4 Therapeutische Blockade der IL-6 Signaltransduktion.....	18
1.2 Visualisierung von Entzündungsprozessen.....	21
1.2.1 Nanobodies und deren Anwendungsbereiche.....	23
1.3 Zielsetzung dieser Arbeit.....	28
2. Material und Methoden.....	29
2.1 Material.....	29
2.1.1 Antibiotika.....	29
2.1.2 Antikörper.....	29
2.1.3 Chemikalien.....	30
2.1.4 Enzyme.....	31
2.1.5 Geräte.....	32
2.1.6 Größenmarker.....	33
2.1.7 Kits.....	33
2.1.8 Kulturmedien.....	34
2.1.9 Oligonukleotide.....	34
2.1.10 Plasmide.....	35
2.1.11 Programme und Internetseiten.....	36
2.1.12 Puffer und Lösungen.....	36
2.1.13 Rekombinante Proteine.....	39
2.1.14 Verbrauchsmaterial.....	40
2.1.15 Zelllinien.....	40
2.2 Methoden.....	42
2.2.1 Molekularbiologische Methoden.....	42
2.2.1.1 Bakterienkultivierung.....	42
2.2.1.2 Bestimmung von DNA- und RNA-Konzentrationen.....	42
2.2.1.3 DNA-Gelelektrophorese.....	42
2.2.1.4 DNA-Extraktion aus Agarosegelen.....	42
2.2.1.5 Dephosphorylierung von Plasmid-DNA.....	42
2.2.1.6 Enzymatische Spaltung von DNA.....	43

Inhaltsverzeichnis

2.2.1.7	Herstellung eines pMOWs-Vektors für retrovirale Transduktion	43
2.2.1.8	Ligation von DNA-Fragmenten.....	44
2.2.1.9	Midi-Präparation von Plasmid-DNA	44
2.2.1.10	Mini-Präparation von Plasmid-DNA	44
2.2.1.11	Polymerase-Kettenreaktion (PCR, <i>polymerase chain reaction</i>).....	45
2.2.1.12	Sequenzierung von Plasmid-DNA.....	45
2.2.1.13	Transformation von <i>E.coli</i> -Zellen mit Plasmid-DNA.....	45
2.2.2	Proteinbiochemische Methoden	46
2.2.2.1	Bestimmung des Gesamtproteingehalts mittels BCA	46
2.2.2.2	Durchflusszytometrie	46
2.2.2.3	Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA).....	47
2.2.2.3.1	Interleukin-6 Rezeptor ELISA.....	47
2.2.2.3.2	IL-6 ELISA	48
2.2.2.3.3	IL-6/sIL-6R Komplex-ELISA	48
2.2.2.3.4	Sgp130 ELISA	48
2.2.2.4	Expression und Reinigung von GFP	48
2.2.2.5	Isolierung von humanem Blutserum.....	49
2.2.2.6	Isolierung von endogenem sgp130 aus humanen Serum	49
2.2.2.7	Kopplung von GFP an Latex-Beads.....	50
2.2.2.8	Immunpräzipitation von sIL-6R mittels sgp130Fc.....	50
2.2.2.9	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)	51
2.2.2.10	Surface plasmon resonance (SPR) Analyse	51
2.2.2.11	Western Blot.....	51
2.2.2.12	Zellyse	52
2.2.2.13	Strippen von Western Blot-Membranen	52
2.2.3	Zellbiologische Methoden.....	52
2.2.3.1	Detektion von GFP-PFCs mittels $^1\text{H}/^{19}\text{F}$ Magnetresonanztomographie	52
2.2.3.2	Genexpressionsanalyse der CIR-vermittelten Aufnahme von GFP-PFCs	53
2.2.3.3	Immunfluoreszenz	53
2.2.3.4	Kultivierung von eukaryotischen Zellen.....	54
2.2.3.5	Transfektion von adhärennten Zellen.....	55
2.2.3.6	Retrovirale Transduktion von Ba/F3-gp130 Zellen	55
2.2.3.7	Proliferationassay	56
2.2.3.8	Zellzahlbestimmung.....	56
2.2.4	Tierexperimentelle Methoden	56
2.2.4.1	Tierhaltung	56
2.2.4.2	Isolierung von DNA aus Schwanzspitzen.....	57
2.2.4.3	Bestimmung des Genotyps mittels PCR	57
2.2.4.4	Analyse der CIR2-Expression und GFP-Bindung mittels isolierten murinen Organen.....	59

Inhaltsverzeichnis

3.	Ergebnisse	60
3.1	Bestimmung von humanen IL-6/löslichen IL-6R Komplexen.....	60
3.1.1	Etablierung eines spezifischen IL-6/sIL-6R Komplex-ELISA.....	61
3.1.2	Spezifischer Nachweis von IL-6/sIL-6R Komplexen über den IL-6/sIL-6R Komplex-ELISA von R&D Systems	63
3.1.3	Qualitätsanalyse von rekombinantem IL-6 und sIL-6R für die Quantifizierung von IL-6/sIL-6R Komplexen.....	64
3.1.4	Berechnung der theoretischen IL-6/sIL-6R Komplexmenge unter definierten IL-6 und sIL-6R Konzentrationen.....	65
3.1.5	Quantifizierung von IL-6/sIL-6R Komplexen mit rekombinantem sIL-6R und IL-6	67
3.1.6	Quantifizierung der IL-6/sIL-6R Komplexmengen in humanem Blutserum mit endogenem sIL-6R und rekombinantem IL-6	72
3.1.7	Die experimentell bestimmte Menge an IL-6/sIL-6R Komplexen ist deutlich geringer als die berechnete Menge	75
3.1.8	Einfluss von sgp130 auf die Detektion von IL-6/sIL-6R Komplexen.....	79
3.1.9	Stabilisierung von IL-6/sIL-6R Komplexen durch den Nanobody VHH6.....	83
3.2	Quantifizierung von IL-6/sIL-6R/sgp130 Komplexen.....	87
3.2.1	Bindekapazität von rekombinanten sIL-6R an rekombinantes IL-6	88
3.2.2	Bindekapazität von endogenem sIL-6R an rekombinantes IL-6.....	91
3.3	Zelltypspezifisches Targeting und Tracking durch synthetische Cargo-Internalisierungsrezeptoren	94
3.3.1	Generierung und Aufbau der CIRs	95
3.3.2	Molekularbiologische Charakterisierung von CIRs in eukaryotischen Zellen ..	98
3.3.3	Bindung und Internalisierung von GFP in eukaryotischen Zellen durch CIRs	100
3.3.4	Bindung und Internalisierung von GFP gekoppelten Latex-Beads.....	103
3.3.5	Visualisierung der CIR-vermittelten GFP-PFC Aufnahme mittels ¹ H/ ¹⁹ F Magnetresonanztomographie.....	107
3.3.6	CIR-vermittelte Aufnahme von GFP-PFCs führt zu keiner Aktivierung von zellulären Signalwegen	109
3.3.7	Versuch zur Generierung einer CIR2 <i>Knock-in</i> Maus	111
3.3.8	Charakterisierung des CIR2 ^{Cre-Del} Mausstamms bezüglich der CIR2-Expression und der GFP-Bindung	117
4.	Diskussion.....	119
4.1	Die Mengen an natürlich gebildeten IL-6/sIL-6R Komplexen sind deutlicher geringer als die berechneten Mengen	119
4.2	Stabilisierung von IL-6/sIL-6R Komplexen durch den Nanobody VHH6 führt zu einer höheren Menge an Komplexen	123
4.3	Pufferkapazität von endogenem sIL-6R und sgp130 zu IL-6 ist geringer als bisher vermutet.....	124
4.4	Spezifische Bindung von GFP an CIRs zur zelltypspezifischen Markierung von eukaryotischen Zellen	127
4.5	Bindung und Internalisierung von GFP-gekoppelten Nanopartikeln durch CIRs	129
5.	Zusammenfassung.....	133

Inhaltsverzeichnis

6. Summary.....	135
7. Literaturverzeichnis	137
8. Anhang.....	153
8.1 DNA-Sequenz von CIR2 für den <i>Knock-in</i> in den murinen Rosa26 Locus	153
8.2 Analyse der aktivierten Signalwege von Ba/F3-gp130 Zellen nach Hyper-IL-6 Stimulation	154
8.3 Publikationen.....	155
8.4 Danksagungen	156
8.5 Eidesstaatliche Erklärung	158

Abkürzungen und Fachbegriffe

ADAM	<i>A Disintegrin and Metalloproteinase</i>
AS	Aminosäure(n)
APR	Akute-Phase-Reaktion
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
BFP	<i>Blue Fluorescent Protein</i>
°C	Grad Celsius
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CDR	<i>Complementarity Determining Regions</i>
CIR	Cargo-Internalisierungsrezeptor
CH	konstante schwere Kette (<i>constant heavy chain</i>)
CL	konstante leichte Kette (<i>constant light chain</i>)
CMV	Cytomegalievirus
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbant Assay</i>
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i>
FCS	fötales Kälberserum
f.c.	Endkonzentration (<i>final concentration</i>)
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FOV	Sichtfeld (<i>Field of View</i>)
g	Gramm oder ein Vielfaches der Erdbeschleunigung
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
GFP-PFCs	GFP-gekoppelte Perfluorkarbon-Nanoemulsionspartikel
GFP-LBs	GFP-gekoppelte Latex-Beads
gp130	Glykoprotein 130
h	human bzw. Stunde
hcABs	Schwere-Ketten-Antikörper (<i>Heavy Chain Antibody</i>)
l	Liter
Ig	Immunglobulin
LPS	Lipopolysaccharide
IL	Interleukin
IL-6R	Interleukin-6 Rezeptor
IPTG	Isopropyl β -D-Thiogalactopyranoside
IZD	Intrazelluläre Domäne
JAK	Janus-Kinase
Kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton

Abkürzungen und Fachbegriffe

LBs	Latex-Beads
LIF-R	<i>Leukemia Inhibitory Factor Receptor</i>
LPS	Lipopolysaccharide
MAPK	<i>Mitogen Activated Protein Kinase</i>
MFI	<i>Mean Fluorescence Intensity</i>
mg	Milligramm
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
MHz	Megahertz
Mio	Millionen
min	Minuten
ml	Milliliter
MRT	Magnetresonanztomographie
m/V	Masse pro Volumen
mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
n.d.	nicht detektierbar
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PDGF	<i>Platelet-derived Growth Factor</i>
PFA	Paraformaldehyd
PFCs	Perfluorkarbone (<i>Perfluorocarbons</i>)
PFC-NEs	Perfluorkarbon-Nanoemulsionspartikel
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>Polymerase chain reaction</i>)
pg	Pikogramm
pH	Potential Hydrogenii
PI3K	Phosphoinositol-3-Kinase
PIAS	<i>Protein Inhibitor of Activated STAT</i>
POD	Peroxidase
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RARE	<i>Rapid Acquisition and Relaxation Enhancement</i>
RLU	<i>Relativ Light Units</i>
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Rotationen pro Minute (<i>rounds per minute</i>)
RT	Raumtemperatur
SD	Standardabweichung (<i>Standard Deviation</i>)
sec	Sekunden
SHP2	<i>Src Homology-2 domain-containing Phosphatases</i>
sIL-6R	löslicher (<i>soluble</i>) Interleukin-6 Rezeptor
sgp130	lösliches (<i>soluble</i>) Glykoprotein 130
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>

Abkürzungen und Fachbegriffe

SOCS	<i>Suppressor Of Cytokine Signaling</i>
SPR	<i>Surface Plasmon Resonance</i>
STAT	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription</i>
SyCyR	<i>Synthetic Cytokine Receptors</i>
synNotch	<i>Synthetic Notch Receptor</i>
TALENs	<i>Transcription Activator-Like Effector Nucleases</i>
TAM	Tyrosinaktivierungsmotiv
TBS	<i>Tris Buffered Saline</i>
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TGF- β	<i>Transforming Growth Factor-β</i>
TMD	Transmembrandomäne
TNF- α	<i>Tumour Necrosis Factor-α</i>
U	<i>Units</i>
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter
μ m	Mikrometer
V	Volt
VH	variable schwere Kette (<i>variable heavy chain</i>)
VHH	Einzeldomänenantikörper bzw. Nanobody
VL	variable leichte Kette (<i>variable light chain</i>)
V/V	Volumen pro Volumen
ZBM	Zytokinbindungsmodul

Aminosäuren

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

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: Struktureller Aufbau vom IL-6R, gp130, der IL-6-induzierten Signaltransduktion und der IL-6/IL-6R/gp130 Komplexbildung.	12
Abbildung 1.2: Schematische Darstellung zur Aktivierung des klassischen und Trans-Signalweges über IL-6.....	17
Abbildung 1.3: Therapeutische Blockade der IL-6 Signaltransduktion.	20
Abbildung 1.4: Schematische Darstellung des strukturellen Aufbaus von Antikörpern, schwere-Ketten-Antikörpern und Nanobodies.....	25
Abbildung 1.5: Bindung des GFP-Nanobodies an GFP..	27
Abbildung 2.1: Schematische Darstellung zur Genotypisierung der CIR2 ^{fl^{ox}/fl^{ox}} und CIR2 ^{Cre-Del} Mauslinien.	58
Abbildung 3.1: Spezifischer Nachweis von IL-6/sIL-6R Komplexen mittels ELISA. (A).	62
Abbildung 3.2: Spezifischer Nachweis von IL-6/sIL-6R Komplexen mittels R&D Systems IL-6/sIL-6R Komplex-ELISA.....	63
Abbildung 3.3: Qualitätsbestimmung des rekombinanten IL-6 und sIL6R mittels Proliferationsassay und <i>Surface Plasmon Resonance</i> (SPR) Analyse.	65
Abbildung 3.4: Verwendete Formeln zur Berechnung von IL-6/sIL-6R Komplexmengen unter definierten IL-6 und sIL-6R Konzentrationen.	66
Abbildung 3.5: Quantifizierung von IL-6/sIL-6R Komplexen mit rekombinanten IL-6 und sIL-6R.	68
Abbildung 3.6: IL-6/sIL-6R Komplexmengen in humanem Blutserum mit endogenem sIL-6R und rekombinanten IL-6.....	73
Abbildung 3.7: Konzentrationsabhängiger Einfluss von sgp130Fc auf die Quantifizierung von IL-6/sIL-6R Komplexen mit rekombinanten IL-6 und sIL-6R.....	80
Abbildung 3.8: Einfluss von endogenem sgp130 auf die Quantifizierung von IL-6/sIL-6R Komplexen.....	82
Abbildung 3.9: Bindung des VHH6 Nanobodies an den IL-6/sIL-6R Komplex.....	84
Abbildung 3.10: Stabilisierende Funktion des VHH6 auf den IL-6/sIL-6R Komplex.....	86
Abbildung 3.11: Schematische Darstellung zur Präzipitation von IL-6/sIL-6R/sgp130Fc Komplexen mittels Protein A-Agarose.....	88
Abbildung 3.12: Quantifizierung von IL-6/sIL-6R/sgp130Fc Komplexen mit rekombinanten sIL-6R.	90
Abbildung 3.13: Quantifizierung von IL-6/sIL-6R/sgp130Fc Komplexen mit endogenem sIL-6R.....	92
Abbildung 3.14: Aufbau der Cargo-Internalisierungsrezeptoren.....	96
Abbildung 3.15: Klonierungsschema zur Generierung der verschiedenen Cargo-Internalisierungsrezeptoren.	97

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 3.16: Charakterisierung von CIRs in transient transfizierten COS-7, stabil transfizierten CHO und transduzierten Ba/F3-gp130 Zellen.....	99
Abbildung 3.17: Bindung und Internalisierung von GFP in CIR1-3-exprimierenden Zellen..	102
Abbildung 3.18: Charakterisierung und CIR-vermittelte Bindung von GFP-Latex-Beads. ...	104
Abbildung 3.19: Internalisierung von GFP-gekoppelten Latex-Beads in transfizierten COS-7-CIR1-3 Zellen.	106
Abbildung 3.20: ¹⁹ F-MRT von CIR1-3-exprimierenden Zellen.	108
Abbildung 3.21: Genexpressionsanalyse nach Stimulation von Ba/F3-gp130-CIR1-3 Zellen mit GFP-PFCs.....	110
Abbildung 3.22: Schematische Darstellung der TALEN-vermittelten Insertion des CIR2 Gens in den <i>Rosa26</i> Locus.....	112
Abbildung 3.23: Genomischer Nachweis der CIR2 Insertion in den <i>Rosa26</i> Locus von C57BL/6N Mäusen.	114
Abbildung 3.24: Schematische Darstellung zur Aktivierung des CIR2 Gens durch die Verpaarung von CIR2 ^{flox/flox} Mäusen mit einem ACTB-Cre-Deleter-Mausstamm.	116
Abbildung 3.25: Analyse der GFP-Bindung und CIR2-Expression in isolierten Organen aus CIR2 ^{Cre-Del} Mäusen mittels Durchflusszytometrie und Western Blot.	118
Abbildung 4.1: Hypothese zum Bindungsschritt-Model von IL-6 für die Aktivierung des klassischen und des Trans-Signalweges.....	122

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2.1 Primäre Antikörper	29
Tabelle 2.2: Sekundäre Antikörper	30
Tabelle 2.3: Verwendete Chemikalien	30
Tabelle 2.4: Verwendete Geräte	32
Tabelle 2.5: Verwendete Kits	33
Tabelle 2.6: Verwendete Oligonukleotide	34
Tabelle 2.7: Verwendete Plasmide	35
Tabelle 2.8: Verwendete rekombinanten Proteine	39
Tabelle 2.9: Verwendete Verbrauchsmaterialien	40
Tabelle 2.10: Verwendeter <i>E.coli</i> -Stamm.....	40
Tabelle 2.11: Verwendete Zelllinien.....	41
Tabelle 2.12: Übersicht der verwendeten Primer für die Genotypisierung der CIR2 ^{fl_{ox}/fl_{ox}} und CIR2 ^{Cre-Del} Mauslinien.	58
Tabelle 2.13: Übersicht des verwendeten PCR-Programms für die Genotypisierung der CIR2 ^{fl_{ox}/fl_{ox}} und CIR2 ^{Cre-Del} Mauslinien.....	59
Tabelle 3.1: Werte zur Berechnung der IL-6/sIL-6R Komplexmengen.	67
Tabelle 3.2: Zusammenfassung der Ergebnisse der IL-6/sIL-6R Komplexmengen mit drei Konzentrationen an rekombinalem sIL-6R und ansteigenden Mengen an rekombinatem IL-6 aus Abbildung 3.5A.	70
Tabelle 3.3: Zusammenfassung der Ergebnisse der IL-6/sIL-6R Komplexmengen mit drei Konzentrationen an rekombinatem IL-6 und ansteigenden Mengen an rekombinatem sIL-6R aus Abbildung 3.5C.....	71
Tabelle 3.4: Zusammenfassung der Ergebnisse der IL-6/sIL-6R Komplexmengen in humanem Serum mit endogenem sIL-6R und rekombinatem IL-6.....	74
Tabelle 3.5: Vergleich von berechneter zu gemessener Menge an sIL-6R, gebunden in IL-6/sIL-6R Komplexen, aus Abbildung 3.5A..	77
Tabelle 3.6: Vergleich von berechneter zu gemessener Menge an IL-6, gebunden in IL-6/sIL-6R Komplexen, aus Abbildung 3.5A.	78
Tabelle 3.7: Vergleich von berechneter zu gemessener Menge an IL-6, gebunden in IL-6/sIL-6R Komplexen, aus Abbildung 3.5C.....	79
Tabelle 3.8: Zusammengefasste Daten der IL-6/sIL-6R Komplexmengen in sgp130-enthaltenen und sgp130 depletierten-Serum.	83
Tabelle 3.9: Zusammengefasste Daten der stabilisierenden Funktion des VHH6 auf die Detektion von IL-6/sIL-6R Komplexen.	87
Tabelle 3.10: Zusammenfassung der IL-6/sIL-6/sgp130Fc Komplexexperimente und der Bindekapazität von rekombinatem und endogenem sIL-6R an IL-6.....	93

Tabellenverzeichnis

Tabelle 8.1: Übersicht bezüglich der Aktivierung von induzierten Signalwegen in Ba/F3-gp130 Zellen nach Stimulation mit 100 ng/ml Hyper-IL-6.	154
----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----

1. Einleitung

1.1 Zytokine der Interleukin-6-Familie

Bei Zytokinen handelt es sich um kleine, vielfach glykosylierte Proteine, die von verschiedensten Zelltypen produziert und sezerniert werden. Sie haben einen Einfluss auf die Modulation vieler zellulärer Prozesse, wie die Aktivierung, Apoptose, Differenzierung, Migration, sowie die Proliferation von verschiedenen Zellen, indem sie auf Zielzellen autokrin, endokrin oder parakrin einwirken, wenn spezifische Zytokinrezeptoren auf der Zelloberfläche vorhanden sind (Garbers *et al.* 2012; Rose-John 2018).

Zytokine werden aufgrund ihrer Struktur und Rezeptoren in verschiedene Familien eingeordnet. Zu nennen sind hier vor allem die Zytokine der Interleukin-6 (IL-6)-Familie. Die IL-6 Zytokin-Familie besteht aus einer Reihe von verschiedenen Zytokinen, wie das namensgebende IL-6, virales IL-6, IL-11, IL-27, IL-31, *ciliary neurotrophic factor* (CNTF), Leukämie-Inhibitor-Faktor (LIF), *cardiotropin-like cytokine* (CLC), Cardiotropin-1 (CT-1) und Oncostatin M (OSM). Alle IL-6 ähnlichen Zytokine weisen bezüglich ihrer Proteinsequenz eine geringe Homologie auf, es sind allerdings auf struktureller Basis Gemeinsamkeiten vorhanden (Bazan 1989). Sie bestehen aus einem Bündel von vier α -Helices mit einer *up-up-down-down* Topologie, welche bis zum heutigen Zeitpunkt nur in Mediatorproteinen wie Interleukinen, Zytokinen und Wachstumsfaktoren nachgewiesen wurden (Bazan 1990; Rose-John 2018). Für die Signaltransduktion der IL-6 Zytokin-Familie ist eine spezifische Kombination von α - und β -Rezeptoren notwendig. Dabei binden α -Rezeptoren ihren jeweils spezifischen Liganden und interagieren anschließend mit β -Rezeptoren (Garbers *et al.* 2012). Hierzu bilden β -Rezeptoren Homo- oder Heterodimere aus, um eine Signalweiterleitung zu induzieren (Taga & Kishimoto 1997). Bei fast allen Zytokinen der IL-6-Familie erfolgt dies über den membranständigen β -Rezeptor Glykoprotein 130 (gp130). Die Homodimeraktivierung von gp130 erfolgt nur nach der Bindung von IL-6 und IL-11 an ihren entsprechenden α -Rezeptor. Bei allen anderen Zytokinen der IL-6-Familie wird ein Heterodimer mit gp130 und einem anderen β -Rezeptor gebildet (Grotzinger *et al.* 1997; Boulanger *et al.* 2003a). Die einzige Ausnahme stellt IL-31 dar. Der signaltransduzierende Komplex ist ein Heterodimer aus dem OSM- und dem IL-31-Rezeptor (Dillon *et al.* 2004).

Im Rahmen dieser Arbeit ist vor allem ein Zytokin aus der IL-6-Familie von besonderer Bedeutung, das namensgebende IL-6. Dieses ist ein wichtiger Regulator von anti- und pro-inflammatorischen Prozessen und hat einen Einfluss auf viele physiologische Vorgänge, welche im folgenden Abschnitt genauer erläutert werden.

1.1.1 Das pleiotrope Zytokin Interleukin-6

Das pleiotrope Zytokin IL-6 wurde erstmals im Jahr 1986 als B-Zell- Stimulationfaktor 2 (BSF-2) beschrieben (Hirano *et al.* 1986). Dabei handelt es sich um ein 212 Aminosäuren langes Protein, welches ein 29 Aminosäuren langes Signalpeptid beinhaltet. Es besteht aus vier Helices, welche in einer *up-up-down-down*-Topologie angeordnet sind (Bazan 1990; Grötzinger *et al.* 1999; Naka *et al.* 2002). Aufgrund von N-Glykosylierungen kann die Größe von IL-6 jedoch zwischen 21-28 kDa variieren (Schiel *et al.* 1990). Die Glykosylierung hat keinen Einfluss auf die Funktion von IL-6, allerdings wird vermutet, dass sie einen Effekt auf die Stabilität und somit auf die Halbwertszeit von IL-6 hat (Parekh *et al.* 1992; Simpson *et al.* 1997). IL-6 beeinflusst viele physiologische Prozesse, z.B. die Aktivierung der Akute-Phase-Reaktion, die Differenzierung und Proliferation von Immunzellen, die Immunantwort und -abwehr und es kann sowohl anti- als auch pro-inflammatorische Prozesse steuern (Scheller *et al.* 2011b).

Einen entscheidenden Einfluss hat IL-6 auf die Differenzierung verschiedener Immunzellen. Zusammen mit TGF- β induziert es die Differenzierung von naiven CD4-positiven T-Zellen zu Th17-Zellen (Hirota *et al.* 2010) und inhibiert die TGF- β -vermittelte Differenzierung zu regulatorischen T-Zellen (Bettelli *et al.* 2006). Des Weiteren ist es an der Differenzierung, sowie der Proliferation von T-Zellen (Atreya *et al.* 2000; Dominiczki *et al.* 2007), Makrophagen (Nicola *et al.* 1983) und Neutrophilen beteiligt (Walker *et al.* 2008).

In verschiedenen Krankheitsmodellen in der Maus wurde der regenerative Einfluss von IL-6 auf zelluläre Prozesse beschrieben. Bei entzündlichen Darmerkrankungen ist IL-6 für die Neubildung von intestinalen Epithelzellen und für die Erhaltung der Darmbarriere verantwortlich (Grivennikov *et al.* 2009; Spehlmann *et al.* 2013; Kuhn *et al.* 2014). Des Weiteren hat IL-6 einen wichtigen Einfluss auf die Leberregeneration (Cressman *et al.* 1996). In IL-6-defizienten Mäusen wurde nachgewiesen, dass diese eine Glukosetoleranz und Insulinresistenz während einer Hoch-Fett-Diät entwickelten, einhergehend mit verstärkten Entzündungsprozessen in der Leber (Matthews *et al.* 2010). Über den spezifischen *Knock-out* des IL-6R in Hepatozyten konnte in Mäusen gezeigt werden, dass diese ebenfalls eine Glukosetoleranz und Insulinresistenz entwickeln, einhergehend mit der Entwicklung von Leberentzündungen und erhöhten Serumkonzentrationen an IL-6, IL-10 und TNF- α (Wunderlich *et al.* 2010). Diese Ergebnisse zeigen, dass IL-6 protektive und anti-inflammatorische Prozesse steuert, aber auch einen Einfluss auf den Metabolismus hat.

Im Rahmen der Immunantwort hat IL-6 eine wichtige Funktion bezüglich der hepatischen Akute-Phase-Reaktion (APR). Hierdurch wird in Hepatozyten die Produktion von APR-Proteinen, wie dem C-reaktiven Protein, Serum Amyloid A, Haptoglobin und Fibrinogen, während Entzündungen induziert (Gauldie *et al.* 1987; Gabay & Kushner 1999). APR-Proteine haben entscheidende Funktionen bei der Immunabwehr von bakteriellen Pathogenen, Viren

und Pilzen (Neveu *et al.* 2009; Dienz *et al.* 2012; Simons *et al.* 2014). In Mäusen, die mit dem Pathogen *Listeria monocytogenes* infiziert wurden, wurde eine höhere Anzahl an Bakterien in den Nieren sowie der Milz und die reduzierte Bildung von APR-Proteinen nachgewiesen, nachdem IL-6 mittels Antikörper inhibiert wurde (Hoge *et al.* 2013).

IL-6 wird von einer Vielzahl unterschiedlicher Zelltypen produziert und sezerniert, wie B- und T-Zellen, Fibroblasten, Endothelzellen, Makrophagen, Monozyten und oftmals auch von Tumorzellen (Kishimoto *et al.* 1995; Naka *et al.* 2002). Die Expression von IL-6 ist im gesunden Menschen streng reguliert. Unter normalen Bedingungen liegen Serumkonzentrationen von 1-10 pg/ml vor (Akira *et al.* 1993; Kishimoto *et al.* 1995). Im Gegensatz dazu sind deutlich höhere Mengen an IL-6 unter pathophysiologischen Bedingungen vorhanden und die Schwere und der Verlauf der Krankheiten korreliert oft mit der Menge an IL-6 (Heikkila *et al.* 2008; Ma *et al.* 2017). Bei Patienten mit Entzündungs-assoziierten Krankheiten, wie z.B. Rheumatoider Arthritis sind typischerweise erhöhte IL-6 Konzentrationen von 20-200 pg/ml während moderaten Entzündungen im Serum vorhanden und in Ausnahmefällen sogar extrem hohe Konzentrationen von bis zu 150 ng/ml (Robak *et al.* 1998; Nowell *et al.* 2003; Chung *et al.* 2011). Unter septischen Bedingungen wurden auch Konzentrationen von mehreren µg/ml nachgewiesen (Waage *et al.* 1989b). Damit IL-6 seine vielzähligen physiologischen Funktionen ausüben kann, muss eine Signaltransduktion in Zielzellen induziert werden. Hierbei sind zwei Formen der Signalweiterleitung bekannt, die in den folgenden Abschnitten genauer erläutert werden.

1.1.2 Der Interleukin-6 Rezeptorkomplex: Klassische Signaltransduktion

Die cDNA des humanen Interleukin-6 α -Rezeptors (IL-6R, CD126 oder gp80) wurde im Jahr 1988 beschrieben (Yamasaki *et al.* 1988). Es handelt sich um einen 80 kDa glykosylierten Typ I Transmembranrezeptor, bestehend aus 468 Aminosäuren. Nach der Bindung von IL-6 an den IL-6R ist eine Homodimerisierung mit zwei signaltransduzierenden β -Rezeptoren, namens gp130 notwendig, um die Signaltransduktion zu induzieren (Murakami *et al.* 1993). Bei gp130 handelt es sich um einen 130 kDa großen Typ I Transmembranrezeptor, bestehend aus einer Immunglobulin (IgG)-ähnlichen Domäne, fünf Fibronectin Typ III Domänen, einer Transmembranregion und einer intrazellulären Domäne (Abbildung 1.1A) (Hibi *et al.* 1990).

Der IL-6R ist modular aufgebaut und besteht aus drei extrazellulären Domänen, einer 52 Aminosäure langen Stalk-Region, einer Transmembrandomäne (TMD) und einer 82 Aminosäure langen intrazellulären Domäne (Abbildung 1.1A). Die drei extrazellulären Domänen bestehen aus einer Immunglobulin (IgG)-ähnlichen Domäne (D1) und zwei Fibronectin Typ III Domänen (D2 und D3) (Yamasaki *et al.* 1988; Varghese *et al.* 2002). Für die Interaktion mit dem Liganden IL-6 sind die Domänen 2 und 3 von essentieller Bedeutung. Diese Domänen bilden das Zytokinbindungsmodul (ZBM) aus (Sprecher *et al.* 1998). Die

Einleitung

Stalk-Region weist zwei wichtige Funktionen auf. Um einen signaltransduzierenden Komplex zu bilden, muss eine definierte Länge von mindestens 83 Å (entspricht 22 Aminosäuren) vorhanden sein, damit eine Interaktion mit gp130 nach IL-6 Bindung erfolgt (Baran *et al.* 2013). Des Weiteren wird der IL-6R in der Stalk-Region von den Matrixmetalloproteasen ADAM10 (A *Disintegrin and Metalloproteinase*) und ADAM17 proteolytisch gespalten, wodurch eine lösliche Form des IL-6R (sIL-6R) generiert wird, an die wiederum IL-6 binden kann (Müllberg *et al.* 1993b; Riethmüller *et al.* 2017).

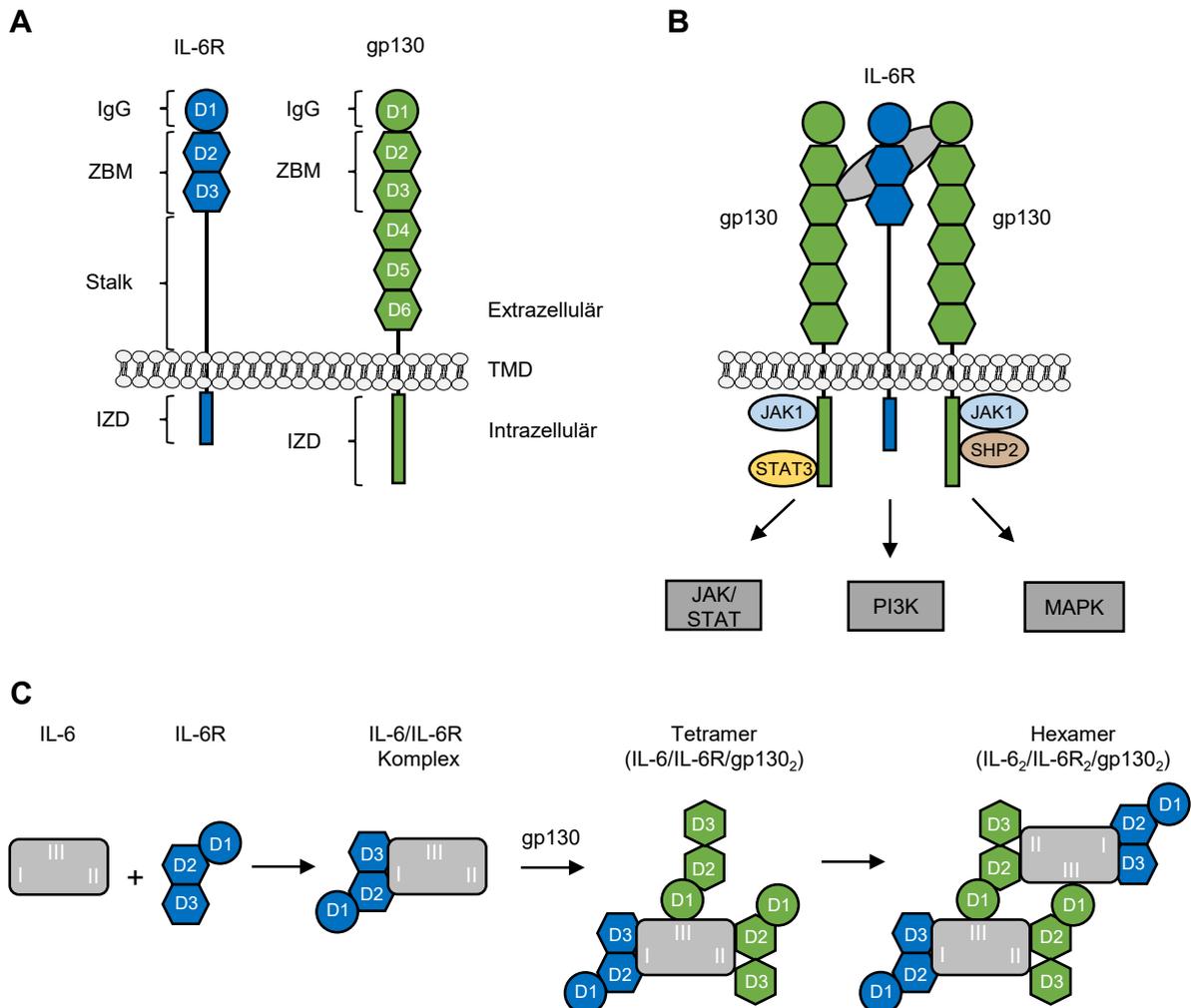


Abbildung 1.1: Struktureller Aufbau vom IL-6R, gp130, der IL-6-induzierten Signaltransduktion und der IL-6/IL-6R/gp130 Komplexbildung. (A) Schematische Darstellung des modularen Aufbaus vom IL-6R (blau) und gp130 (grün). IgG-Domäne (IgG, Kreis), Zytokinbindungsmodul (ZBM), Stalk-Region (schwarzer Strich), Fibronectin Typ III Domänen (Sechsecke), Transmembrandomäne (TMD), Intrazelluläre Domäne (IZD, blauer bzw. grüner Kasten). Weitere Erläuterungen sind in Abschnitt 1.1.2 beschrieben. (B) Die Bindung von IL-6 (graues Oval) an den membranständigen IL-6R führt zur Rekrutierung von zwei gp130 Rezeptoren. Dies führt zur Aktivierung der Signaltransduktion in der Zelle. Über IL-6 wird vor allem der JAK/STAT Signalweg aktiviert, über die Aktivierung von JAK1 und der anschließenden Phosphorylierung von STAT3, welches in den Zellkern transloziert und die Transkription von STAT-Zielgenen induziert. Zusätzlich kann der MAPK- und PI3K-Signalweg über das Adapterprotein SHP2 aktiviert werden. (C) Schematische Darstellung über die Bildung des IL-6/IL-6R/gp130 Komplexes. Nach Bindung von IL-6 an den membranständigen IL-6R, bildet sich der IL-6/IL-6R Komplex. Dies führt zur Rekrutierung von zwei gp130 Molekülen, welche an den IL-6/IL-6R Komplex binden. Bei geringen IL-6 Konzentrationen wird ein tetramerer Proteinkomplex (IL-6/IL-6R/gp130₂) gebildet, über den vermutlich die Signaltransduktion induziert wird. Bei hohen IL-6 Konzentrationen soll ein hexamerer Proteinkomplex (IL-6₂/IL-6R₂/gp130₂) entstehen, welcher vermutlich antagonistisch auf die Aktivierung der Signaltransduktion wirkt. Weitere Erläuterungen sind in Abschnitt 1.1.2 beschrieben. Modifizierte Abbildung nach (Grötzing *et al.* 1999).

Einleitung

Um einen signaltransduzierenden Komplex mit dem IL-6R und gp130 zu formieren, besitzt IL-6 drei konservierte Bindungsepitope. Initial bindet IL-6 über das Epitop 1 an die ZBM des IL-6R. Anschließend erfolgt eine Interaktion von Epitop 2 mit den Domänen 2 und 3, sowie von Epitop 3 mit der IgG Domäne (Domäne 1) von gp130 (Abbildung 1.1C) (Wiesinger *et al.* 2009). IL-6 oder der IL-6R alleine binden nicht an gp130, da eine Affinität zu gp130 nur vorhanden ist, wenn IL-6 am IL-6R gebunden vorliegt (Jostock *et al.* 2001). Aufgrund von strukturellen Analysen wird vermutet, dass der IL-6/IL-6R/gp130 Komplex als Tetramer (IL-6/IL-6R/gp130₂) vorliegen kann (Grotzinger *et al.* 1997). Kristallstrukturanalysen zeigen allerdings auch, dass ein hexamerer Proteinkomplex (IL-6₂/IL-6R₂/gp130₂) gebildet werden kann (Boulanger *et al.* 2003b). In weiterführenden Studien konnte gezeigt werden, dass in Abhängigkeit zu dem Verhältnis zwischen gp130 Rezeptoren und IL-6/IL-6R Komplexen (membranständige und lösliche Komplexe), sowohl tetramere als auch hexamere IL-6/IL-6R/gp130 Komplexe vorliegen können (Abbildung 1.1C). Geringe IL-6 Konzentrationen führen zur Bildung des tetrameren und hohe IL-6 Konzentrationen zur Bildung des hexameren Komplexes (Schroers *et al.* 2005). Es wird vermutet, dass der tetramere Komplex aktiv ist und eine Signalweiterleitung in die Zelle induziert. Der hexamere Komplex soll allerdings eine regulatorische Funktion ausüben und antagonistisch auf die Signalweiterleitung wirken, um den Organismus vor zu hohen IL-6 Konzentrationen zu schützen (Grötzinger *et al.* 1999; Schroers *et al.* 2005). So eine regulatorische Funktion der Komplexbildung konnte z.B. anhand des Insulinrezeptors gezeigt werden. Bei hohen Insulinkonzentrationen kann ein hexamerer Liganden-Rezeptorkomplex gebildet werden, der antagonistisch auf die Signalweiterleitung wirkt (De Meyts 1994). Allerdings ist es bis zum heutigen Zeitpunkt unklar, ob es sich bei der IL-6-assoziierten Komplexbildung genauso verhält.

Nach Bindung von IL-6 an den membranständigen IL-6R erfolgt die Rekrutierung und Bindung von zwei gp130 β -Rezeptoren. Dies führt vor allem zur Aktivierung des JAK/STAT Signalweges (Abbildung 1.1B), über aktivierte Janus-Kinasen (JAKs), welche intrazelluläre Tyrosine von gp130 phosphorylieren (Gerhartz *et al.* 1996; Schmitz *et al.* 2000). Dies führt vor allem zur Rekrutierung von STAT3 (*signal transducer and activator of transcription*) und zu einem geringen Anteil von STAT1, an die phosphorylierten Tyrosine. STAT-Proteine werden wiederum durch JAKs phosphoryliert und bilden Homo- oder Heterodimere aus. Diese translozieren in den Zellkern und binden über spezifische Bindungsstellen an die Promotoren von Zielgenen (Eulenfeld *et al.* 2012). Hierdurch wird die Transkription von Genen aktiviert, die in der Bildung von Akute-Phase-Proteinen, anti-apoptotischen Proteinen, sowie in Zellproliferation und Zellwachstum involviert sind (Ara & Declerck 2010; Ataie-Kachoei *et al.* 2012). Um eine konstitutive IL-6-induzierte Genexpression zu verhindern, sind zwei Arten von Proteinen vorhanden, die eine negative Regulation auf die Aktivierung des JAK/STAT-Signalweges ausüben. SOCS-Proteine (*suppressor of cytokine signaling*) sind *Feedback-*

Inhibitoren, welche an die intrazelluläre Domäne von gp130 binden und mit JAKs interagieren, wodurch die Tyrosin-Phosphorylierung von STAT3 inhibiert wird (Kershaw *et al.* 2013). PIAS-Proteine (*protein inhibitor of activated STAT*) binden direkt an phosphorylierte STAT-Proteine und verhindern deren Bindung an Zielpromotoren (Chung *et al.* 1997). Die Aktivierung des MAPK- und des PI3K-Signalweges erfolgt über die Rekrutierung von SHP2 an ein phosphoryliertes Tyrosin von gp130 (Fukada *et al.* 1996; Lai *et al.* 1999). SHP2 dient als Adapterprotein für den Grb2-SOS Komplex, wodurch eine Aktivierung von Ras stattfindet und die MAPK-Signalkaskade induziert wird (Nakajima *et al.* 1993). SHP2 bindet zusätzlich das Adapterprotein Gab1, wodurch die PI3-Kinase und der PI3K-Signalweg aktiviert wird (Takahashi-Tezuka *et al.* 1998; Eulenfeld *et al.* 2012). Die Signaltransduktion von IL-6 erfolgt allerdings nicht nur durch den membranständigen IL-6R, sondern auch über den sIL-6R, was im folgenden Abschnitt genauer erläutert wird.

1.1.3 Der Interleukin-6/lösliche Interleukin-6 Rezeptorkomplex: Trans-Signalweg

Der humane IL-6R wird nur von bestimmten Zelltypen exprimiert, hierzu zählen B-Zellen, Hepatozyten, Neutrophile, Makrophagen und Monozyten (Oberg *et al.* 2006; Scheller & Rose-John 2006; Chalaris *et al.* 2011). Aufgrund dieser Tatsache ist die klassische Signaltransduktion (*classic-signaling*) über den membranständigen IL-6R und gp130 auf eine geringe Anzahl an Zelltypen beschränkt. Für IL-6 ist eine weitere Form der Signalweiterleitung bekannt, nämlich der Trans-Signalweg (*trans-signaling*). Dieser erfolgt über den sIL-6R, der keine intrazelluläre und Transmembrandomäne besitzt. Die Generierung des sIL-6R verläuft über zwei beschriebene Mechanismen. Der überwiegende Anteil an sIL-6R wird durch ADAM-Proteasen generiert (~90%) (Rose-John 2012). Hierbei handelt es sich um Typ I Transmembranproteine mit einer proteolytischen Aktivität (Shedding), wodurch lösliche Formen von Zytokinrezeptoren generiert werden, wie z.B. vom IL-1R, IL-6R und TNF α -Rezeptor (Lokau *et al.* 2016). Die Generierung des im Serum zirkulierenden sIL-6R in der Maus erfolgt ungefähr zu 60% durch myeloide Zellen und zu 30% durch Hepatozyten (McFarland-Mancini *et al.* 2010). Der zweite Mechanismus der zur Generierung des sIL-6R führt, ist das alternative Spleißen der IL-6R mRNA. Bei der Prozessierung der mRNA wird das kodierende Exon für die Transmembrandomäne ausgelassen, wodurch der sIL-6R direkt auf translationaler Ebene generiert wird. Es wird davon ausgegangen, dass ~10% des im Serum vorhandenen sIL-6R durch alternatives Spleißen generiert wird (Lust *et al.* 1992; Riethmüller *et al.* 2017). Durch diese transkriptionelle Veränderung wird die Bindung von IL-6 an den IL-6R allerdings nicht beeinflusst (Horiuchi *et al.* 1994). In Mäusen wurde kein alternatives Spleißen der IL-6R mRNA nachgewiesen, was zusätzlich belegt, dass die Generierung des sIL-6R hauptsächlich auf Sheddingmechanismen beruht (Schumacher *et al.* 2015).

Einleitung

Eine Besonderheit des IL-6 Trans-Signalweges ist, dass der sIL-6R agonistisch auf die IL-6-induzierte Signalweiterleitung wirkt. Der resultierende IL-6/sIL-6R Komplex kann im Gegensatz zu IL-6 auf allen Zellen eine Signaltransduktion über den Trans-Signalweg induzieren, da der β -Rezeptor gp130 ubiquitär exprimiert wird (Saito *et al.* 1992). IL-6 bindet mit der gleichen Affinität an den sIL-6R, wie an den membranständigen IL-6R (Müller-Newen *et al.* 1996). Für viele lösliche Rezeptoren ist dagegen eine antagonistische Wirkung bezüglich der Signaltransduktion beschrieben, wie für den IL-1 α R, TNF α -R und LIF-R (Maliszewski *et al.* 1990; Layton *et al.* 1992; Howard *et al.* 1993). Der IL-6/sIL-6R Komplex erhöht somit die Anzahl an Zelltypen, die mittels IL-6 stimuliert werden können. Es ist bekannt, dass bestimmte Zelltypen, wie Endothelzellen (Romano *et al.* 1997), neuronale Zellen (Marz *et al.* 1998), glatte Muskelzellen (Klouche *et al.* 1999), embryonale Stammzellen (Viswanathan *et al.* 2002) und hämatopoetische Zellen (Audet *et al.* 2001) nur über den Trans-Signalweg stimuliert werden können (Scheller *et al.* 2006).

In den letzten Jahrzehnten wurden immer deutlicher, dass der Trans-Signalweg pathophysiologische Prozesse fördert, die in der Entstehung von Krankheiten involviert sind und der klassische Signalweg vor allem homöostatische Prozesse von IL-6 reguliert (Scheller *et al.* 2014). Dies ist darauf zurückzuführen, dass der klassische Signalweg vor allem anti-inflammatorische Signalwege steuert, die an der Aktivierung von B-Zellen zur Produktion von Antikörpern, Bildung von Akute-Phase-Proteinen im Rahmen der Immunabwehr, der Induktion von Fieber und der Regeneration von Epithelzellen involviert sind (Abbildung 1.2) (Chalaris *et al.* 2011). Der IL-6 Trans-Signalweg führt vor allem zur Aktivierung von pro-inflammatorischen Signalwegen und ist involviert in die Regulierung des angeborenen, sowie des adaptiven Immunsystems (Rose-John *et al.* 2017). Die pro-inflammatorischen Eigenschaften werden vor allem durch die Inhibition der T-Zellapoptose, die Erhaltung von aktivierten T-Zellen und die unkontrollierte Proliferation von Epithelzellen im entzündeten Gewebe gefördert (Abbildung 1.2) (Chalaris *et al.* 2011). Damit über den Trans-Signalweg diese Prozesse gesteuert werden, ist die Komplexbildung von IL-6 mit dem sIL-6R notwendig. Da unter physiologischen Bedingungen nur äußerst geringe Mengen an IL-6 im Serum von Menschen vorliegen (1-10 pg/ml), erfolgt die Komplexbildung vor allem unter pathophysiologischen Bedingungen, bei denen die Menge an IL-6 stark ansteigen kann (Akira *et al.* 1993; Kishimoto *et al.* 1995; Nowell *et al.* 2003). Im gesunden Menschen liegen sIL-6R Serumkonzentrationen von 30-75 ng/ml vor und unter pathophysiologischen Bedingungen können diese Mengen um den Faktor 2-3 ansteigen (Honda *et al.* 1992; Mitsuyama *et al.* 1995; Montero-Julian 2001). Erhöhte sIL-6R Konzentrationen wurden im Menschen bei Asthma (Yokoyama *et al.* 1997), bei entzündlichen Krebserkrankungen im Darm (Becker *et al.* 2004), bei Morbus Crohn (Atreya *et al.* 2000) und bei der rheumatoiden Arthritis (Robak *et al.* 1998) nachgewiesen und werden mit der Entstehung von Adipositas und Diabetes Typ II in Verbindung gebracht (Hamid *et al.* 2004;

Einleitung

Esteve *et al.* 2006). Allgemein führen erhöhte Serumkonzentrationen von IL-6 und sIL-6R zu einer verstärkten Aktivierung des Trans-Signalweges über den IL-6/sIL-6R Komplex, wodurch die Entstehung von chronisch-entzündlichen Erkrankungen und Autoimmunerkrankungen gefördert wird. Bis zum heutigen Zeitpunkt konnte allerdings noch nicht bestimmt werden, in welchem Ausmaß der IL-6/sIL-6R Komplex im Menschen vorliegen kann. Dieses könnte jedoch zusätzlich ein geeigneter Marker für den Verlauf, sowie die Schwere von Entzündungs-assoziierten Erkrankungen sein und weitere Aufschlüsse darüber liefern, zu welchen Anteilen der klassische und der Trans-Signalweg unter pathophysiologischen Bedingungen aktiviert wird. Bisher ist es nur aufgrund von Affinitäts-basierten Berechnungen möglich, Hinweise darüber zu erhalten, wie viel IL-6/sIL-6R Komplex vorliegen kann (Gaillard *et al.* 1999). In den 90er Jahren wurden K_D -Werte zwischen 0,5-1 nM beschrieben (Zohlnhöfer *et al.* 1992; Gaillard *et al.* 1999). Basierend auf diesen Werten sollten bei 1 ng/ml IL-6 und 50 ng/ml sIL-6R umgerechnet 65% des IL-6 einen Komplex mit dem sIL-6R bilden, wodurch vor allem der Trans-Signalweg aktiviert werden würde. Mit weiterentwickelten und sensitiveren Messmethoden wurden dagegen Affinitäten im Bereich von 15-34 nM bestimmt (Adams *et al.* 2017) und es kann davon ausgegangen werden, dass dieser Wert eher der natürlichen Affinität entspricht. Dies würde bedeuten, dass nur noch 3-6% des IL-6 gebunden im Komplex vorliegen und es vor allem zur Aktivierung des klassischen Signalweges führen würde. Da Berechnungen solcher Komplexbildungen jedoch nur als Hilfsmittel geeignet sind, die physiologischen Bedingungen widerzuspiegeln, wäre ein experimenteller Nachweis der gebildeten IL-6/sIL-6R Komplexmengen für ein erweitertes Verständnis von Trans-Signalweg-assoziierten Erkrankungen von großer Nützlichkeit. Darüber hinaus könnten Aufschlüsse darüber erlangt werden, zu welchen Anteilen freies IL-6 und im Komplex gebundenes vorliegt, um in Erfahrung zu bringen, ob überwiegend der klassische oder der Trans-Signalweg aktiviert wird.

Da der natürlich gebildete IL-6/sIL-6R Komplex wieder voneinander abdissoziieren kann, wurde für stabile experimentelle Untersuchungen des Trans-Signalweges das Designerprotein Hyper-IL-6 (HIL-6) generiert. Hierbei handelt es sich um ein Fusionsprotein, bei dem der N-Terminus von IL-6 über einen flexiblen Peptidlinker mit dem C-Terminus vom sIL-6R verbunden ist. HIL-6 hat eine 100-1000fach höhere Affinität auf die Stimulation von gp130 exprimierenden Zellen, im Vergleich zum nicht fest verbundenen IL-6/sIL-6R Komplex (Fischer *et al.* 1997). Anhand von Mausstudien konnte gezeigt werden, dass über den Trans-Signalweg auch physiologisch positive Effekte induziert werden, wie die Regenerierung der Leber nach partieller Hepatektomie, sowie nach Leberschädigung durch D-Galactosamine, (Galun *et al.* 2000; Peters *et al.* 2000; Hecht *et al.* 2001).

Einleitung

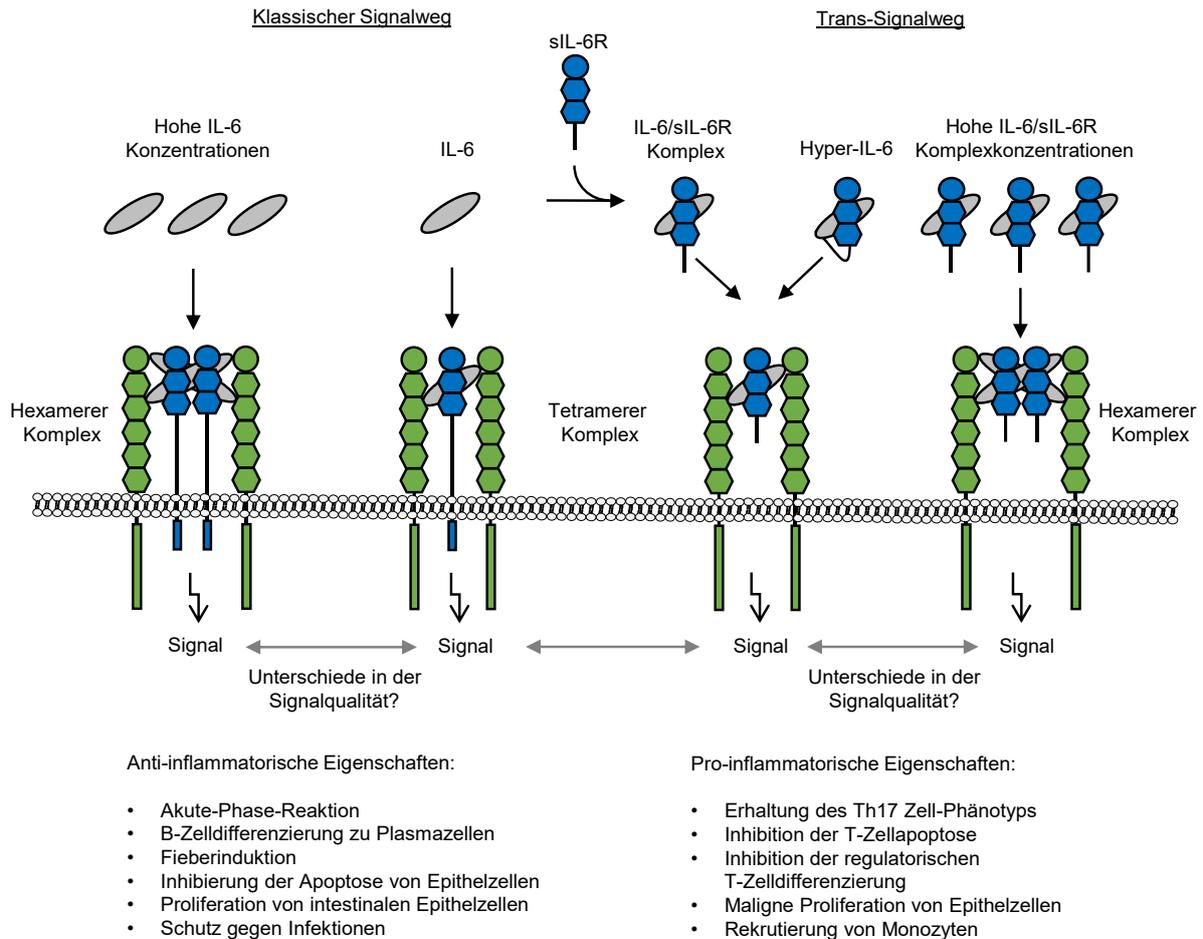


Abbildung 1.2: Schematische Darstellung zur Aktivierung des klassischen und Trans-Signalweges über IL-6. Die Aktivierung von Signalwegen in Zielzellen erfolgt mit IL-6 über zwei unterschiedlichen Wege. Bei dem klassischen Signalweg bindet IL-6 an den membranständigen IL-6R. Dies führt zur Rekrutierung von zwei signaltransduzierende gp130-Rezeptoren und zur Aktivierung der Signaltransduktion in Zielzellen. Die Aktivierung des Trans-Signalweges erfolgt über die Bindung von IL-6 an den sIL-6R, welcher über Ektodomänen-Shedding von ADAM-Proteasen oder durch alternatives Spleißen generiert wird. Der IL-6/sIL-6R Komplex bindet an gp130 und kann somit Zellen stimulieren, die keinen membranständigen IL-6R exprimieren. Bei niedrigen IL-6 Konzentrationen entsteht ein tetramerer Komplex mit dem IL-6R und gp130 (IL-6/IL-6R/gp130₂), über den vermutlich eine Signalweiterleitung erfolgen kann. Bei hohen IL-6 Konzentrationen wird ein hexamerer Komplex mit dem IL-6R und gp130 (IL-6₂/IL-6R₂/gp130₂) gebildet, der vermutlich antagonistisch auf die Signalweiterleitung wirkt. Die Aktivierung des Trans-Signalweges kann auch spezifisch über das Designerzytokin HIL-6 induziert werden. Der klassische Signalweg aktiviert vor allem anti-inflammatorische Eigenschaften und der Trans-Signalweg pro-inflammatorische Eigenschaften. Modifizierte Abbildung nach (Chalaris *et al.* 2011) und (Rose-John 2017).

Allgemein werden aber vor allem negative Eigenschaften mit dem Trans-Signalweg assoziiert. Zudem wird vermutet, dass der sIL-6R zusammen mit löslichem gp130 (sgp130) ein Puffersystem bildet, bei dem die negativen Eigenschaften des Trans-Signalweges blockiert werden könnten (Garbers *et al.* 2015; Rose-John 2017). Bei sgp130 handelt es sich um die lösliche Form des membranständigen gp130 β -Rezeptors, welches mit einer Affinität von 10 pM spezifisch den IL-6/sIL-6R Komplex bindet und keine Affinität zu IL-6 oder sIL-6R alleine aufweist (Jostock *et al.* 2001). Sgp130 wirkt dabei antagonistisch auf den IL-6/sIL-6R Komplex und blockiert die Aktivierung des Trans-Signalweges. Es entsteht durch alternatives Spleißen der gp130 mRNA und im humanen Serum liegen Konzentrationen zwischen 100-400 ng/ml vor (Narazaki *et al.* 1993). Im physiologischen Rahmen liegt in der Regel eine ~1000fach

höhere Konzentration an sIL-6R und sgp130 gegenüber IL-6 vor. Somit könnten laut dieser Hypothese über dieses Puffersystem IL-6 Konzentrationen von bis zu 150 ng/ml gebunden werden. Nur bei IL-6 Konzentrationen, die die Menge an sIL-6R und sgp130 übersteigen, sollte somit eine Stimulation von Zellen mittels IL-6 möglich sein (Rose-John 2015). Diese Vermutungen in der Literatur beruhen allerdings auf eine Affinität von 1 nM für die IL-6/sIL-6R Komplexbildung, damit anschließend sgp130 binden kann, um den Komplex zu neutralisieren (Garbers *et al.* 2015). Diese Hypothese konnte bis zum heutigen Zeitpunkt allerdings nicht experimentell bestätigt werden.

Des Weiteren wurde ein *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP) rs2228145 im IL-6R beschrieben, was zum Austausch der Aminosäure Asparaginsäure358 zu einem Alanin358 führt, einhergehend mit einem erhöhten Shedding des IL-6R (Garbers *et al.* 2014). Homozygote Träger dieses SNPs weisen eine geringere IL-6-induzierte Produktion von Akute-Phase-Proteinen auf und sind besser gegen den Ausbruch von kardiovaskulären Erkrankungen oder Rheumatoider Arthritis geschützt (Collaboration *et al.* 2012; Swerdlow *et al.* 2012). In Korrelation mit diesem SNP ist, dass eine geringere Menge an membranständigem IL-6R auf Zellen vorhanden ist und erhöhten Serumkonzentration an sIL-6R, als beim wildtypischen IL-6R (Ferreira *et al.* 2013). Es wird vermutet, dass die protektiven Eigenschaften auf einer schwächeren Aktivierung des klassischen Signalweges in Zielzellen beruhen, wie z.B. Hepatozyten, Monozyten oder Makrophagen. Zeitgleich führt dies zu einer höheren Pufferwirkung von sIL-6R und sgp130 auf IL-6, wodurch dessen Aktivität zusätzlich reduziert werden könnte (Garbers & Scheller 2013). In diesem Kontext haben höhere sIL-6R Serumkonzentrationen einen anti-inflammatorischen Einfluss, welches das Konzept des sIL-6R und sgp130 Puffersystems unterstützt. Allerdings werden erhöhte Mengen an sIL-6R in der Regel mit der Entstehung von Krankheiten in Verbindung gebracht (Robak *et al.* 1998; Scheller *et al.* 2014). Um dies zu unterbinden, sind verschiedene therapeutische Möglichkeiten vorhanden, die eine IL-6-assozierte Signalweiterleitung blockieren. Darauf wird im folgenden Abschnitt eingegangen.

1.1.4 Therapeutische Blockade der IL-6 Signaltransduktion

Eine strikte Regulation des klassischen und des Trans-Signalweges ist essentiell für viele zelluläre Vorgänge. Eine Fehlregulation dieser Signalwege unter pathophysiologischen Bedingungen ist oft verbunden mit verschiedenen Erkrankungen. In vielen Studien wurde belegt, dass eine Hochregulation in der Expression von IL-6 in Zusammenhang mit der Entwicklung von Autoimmunerkrankungen steht. Die Schwere und der Ausgang der Krankheit korreliert dabei in vielen Fällen mit der Menge an vorhandenem IL-6 (Hirano *et al.* 1987; Heikkila *et al.* 2008). Eine Dysregulation von IL-6 wurde in Rheumatoider Arthritis (Nowell *et al.* 2003), entzündlichen Darmerkrankungen (Mitsuyama *et al.* 1991; Hosokawa *et al.* 1999),

Osteoporose (Jilka *et al.* 1992), Asthma (Yokoyama *et al.* 1995) und der Castleman-Krankheit (Yoshizaki *et al.* 1989) nachgewiesen. IL-6 kann zusätzlich das Wachstum von Tumoren begünstigen, wie z.B. Darm- und Brustkrebs, indem es von Tumorzellen exprimiert und als Wachstumsfaktor verwendet wird (Becker *et al.* 2005; Sansone *et al.* 2007).

Die therapeutische Blockade von IL-6-induzierten Krankheiten ist somit von entscheidender Bedeutung. Eine Reihe von Medikamenten ist in der klinischen Entwicklung oder wird bereits für die Behandlung von IL-6-vermittelten Krankheiten verwendet. Hierzu zählen Inhibitoren, die beide Signalwege (klassisch und Trans) oder spezifisch den Trans-Signalweg blockieren (Abbildung 1.3) (Rose-John *et al.* 2017). Verschiedene Inhibitoren wurden entwickelt, die gegen die Bindungsepitope von IL-6 gerichtet sind. Hierzu zählt unter anderem Siltuximab (Epitop 1), welches die Interaktion mit dem IL-6R blockiert und von der FDA für die Behandlung der Castleman-Krankheit zugelassen ist (Sarosiek *et al.* 2016). EBI-029 (Epitop 2) und Olokizumab (Epitop 3) verhindern die Interaktion zwischen gp130 und dem IL-6/IL-6R Komplex (Hunter & Jones 2015). Die Effektivität dieser Antikörper wird in präklinischen oder klinischen Studien untersucht, unter anderem zur Behandlung von Rheumatoider Arthritis, multiplen Myelomen und Prostatakrebs (Shah *et al.* 2016; Takeuchi *et al.* 2016; Schett 2018). Diese Inhibitoren weisen generell eine hohe Wirksamkeit in der Behandlung auf, jedoch ist die Effizienz der Therapie von Patient zu Patient unterschiedlich stark (Tanaka & Mola 2014). Darüber hinaus werden Antikörper gegen den IL-6R eingesetzt, welche die Bindung des IL-6 blockieren. Der monoklonale Antikörper Tocilizumab wird bei Patienten in der Behandlung gegen rheumatoide Arthritis, juvenile idiopathische Arthritis und die Castleman-Krankheit eingesetzt (Calabrese & Rose-John 2014). Der Erfolg von Tocilizumab in Bezug auf die Behandlung Rheumatoider Arthritis führte auch zur Entwicklung von weiteren monoklonalen Antikörpern, die gegen den IL-6R gerichtet sind. Dazu gehört Sarilumab, welches mit einer ~20fach höheren Affinität an den IL-6R bindet als Tocilizumab, wodurch für die Behandlung geringere Konzentrationen notwendig sind (Rafique *et al.* 2014; Raimondo *et al.* 2017). Sarilumab ist bereits für die Therapie von Patienten mit Rheumatoider Arthritis zugelassen, deren Behandlung nicht responsiv gegenüber TNF-Inhibitoren ist und es hat eine längere Serumhalbwertszeit als Tocilizumab, was die Frequenz der Verabreichung reduziert (Fleischmann *et al.* 2017; Raimondo *et al.* 2017). Bei diesen Therapieansätzen ist es jedoch nicht möglich, selektiv den klassischen- oder den Trans-Signalweg zu inhibieren. Es wird vermutet, dass die Inhibierung des klassischen Signalweges zu einer Dysregulation der Immunantwort führt, so dass Patienten, die mit Tocilizumab behandelt werden, ein leicht erhöhtes Risiko aufweisen an Infektionen zu erkranken (Navarro *et al.* 2014; Morel *et al.* 2017) und in seltenen Fällen geringe Perforationen des Magen-Darm-Trakts mit leichten Symptomen auftreten könnten (Strangfeld *et al.* 2017). Um diese Nebenwirkung zu verringern wäre daher die spezifische Blockade des Trans-Signalweges wünschenswert.

Einleitung

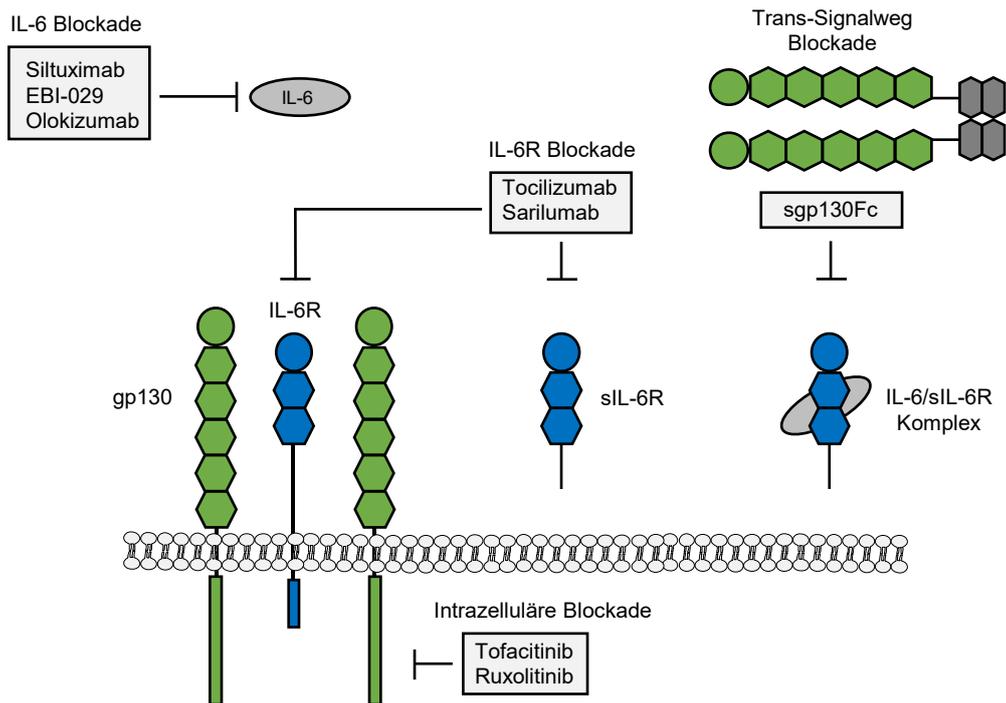


Abbildung 1.3: Therapeutische Blockade der IL-6 Signaltransduktion. Für die Inhibition der IL-6-induzierten Signaltransduktion werden verschiedene Inhibitoren mit unterschiedlichen Funktionen verwendet. Für die Blockade des klassischen und Trans-Signalweges werden monoklonale Antikörper verwendet, die gegen die Bindungsepitope von IL-6 gerichtet sind. Siltuximab bindet an Epitop 1, EBI-029 an Epitop 2 und Olokizumab an Epitop 3. Tocilizumab und Sarilumab binden an den IL-6R (membranständige und lösliche Form) und blockiert die Bindung von IL-6. Für die selektive Blockade des Trans-Signalweges wird sgp130Fc verwendet, welches spezifisch an den IL-6/sIL-6R Komplex bindet. Tofacitinib und Ruxolotinib binden an JAKs und blockieren die intrazelluläre Signalweiterleitung. Weitere Erläuterungen sind in Abschnitt 1.5 beschrieben. Modifizierte Abbildung nach (Hunter & Jones 2015).

Für die spezifische Inhibierung von den Trans-Signalweg-assoziierten Krankheiten wurde basierend auf sgp130 ein Fusionsprotein namens sgp130Fc entwickelt. Sgp130Fc besteht aus den gesamten extrazellulären Domänen von gp130, fusioniert mit der Fc-Region eines humanen IgG Antiköpers. Sgp130Fc liegt als Dimer vor und bindet mit einer 10-100fach höheren Affinität spezifisch den IL-6/sIL-6R Komplex, als das im Serum enthaltene monomere sgp130 (Jostock *et al.* 2001). Die Effizienz der spezifischen Trans-Signalweg-Blockade mittels sgp130Fc wurde bereits in vielen präklinischen Untersuchungen gezeigt. Der progressive Verlauf von Arteriosklerose (Schuett *et al.* 2012), Asthma (Ullah *et al.* 2015), inflammatorischen Darmerkrankungen (Atreya *et al.* 2000), verschiedenen Krebsarten (Grivennikov *et al.* 2009; Lo *et al.* 2011; Brooks *et al.* 2016) und neurodegenerativen Erkrankungen (Campbell *et al.* 2014) wird durch die Behandlung mit sgp130Fc in der Maus inhibiert. Sgp130Fc befindet sich aktuell in der klinischen Studie der Phase II, unter dem Namen Olamkicept, und dessen Effektivität wird für die Behandlung von Patienten mit Colitis Ulcerosa untersucht (clinicaltrials.gov, ID: NCT03235752).

Des Weiteren können Inhibitoren verwendet werden, die gegen JAKs gerichtet sind und somit die intrazelluläre Signalweiterleitung blockieren. Ruxolitinib ist gegen JAK1 und JAK2 gerichtet

und ist von der FDA für die Behandlung von Patienten mit Knochenmarksfibrose zugelassen (Wade *et al.* 2017). Tofacitinib ist gegen JAK1 und JAK3 gerichtet und ist von der FDA für die Behandlung von Rheumatoider Arthritis zugelassen. Darüber hinaus wird es in klinischen Studien für die Behandlung von Colitis Ulcerosa und Psoriasis getestet (Winthrop 2017; Fleischmann 2018). Die Behandlung von Krankheiten mit diesen Inhibitoren führt allerdings auch nicht zu einer selektiven Hemmung der IL-6 Signaltransduktion, da auch andere Signalwege blockiert werden.

1.2 Visualisierung von Entzündungsprozessen

Entzündungsprozesse sind oft in der Entstehung und Entwicklung von vielen chronischen Erkrankungen involviert, wie z.B. rheumatoide Arthritis, Morbus Crohn und Alzheimer (Casanova & Abel 2009; Gate *et al.* 2010; Shiozawa *et al.* 2011). Dies erfolgt oft über die Einwanderung von Immunzellen, z.B. Monozyten und Makrophagen, in entzündete Bereiche. Allerdings ist noch nicht vollständig aufgeklärt, inwiefern diese Immunzellen einen Einfluss auf verschiedene Phasen von Entzündungsvorgängen haben. Deswegen ist ein tiefgreifendes Verständnis über die zeitliche Abfolge der Migration, Differenzierung und Lokalisation von Immunzellen notwendig, um neue Ansatzpunkte für die Behandlung von Entzündungs-assoziierten Krankheiten zu identifizieren. Klassische Methoden zur Untersuchung dieser Vorgänge in Mäusen sind histologische Färbungen von isolierten Geweben oder die Analyse von Zellen mittels Durchflusszytometrie. Bei diesen Methoden handelt es sich allerdings um invasive Verfahren, bei denen die entzündeten Bereiche oder Organe isoliert werden müssen, damit eine Untersuchung vorgenommen werden kann (Randolph *et al.* 1999). Für die Detektion von Immunzellen, in ihrem nativen Umfeld, sind vor allem bildgebende Verfahren von großer Bedeutung, aufgrund ihrer nicht-invasiven Anwendungsmöglichkeiten. In der klinischen und wissenschaftlichen Forschung werden hierzu verschiedene Techniken verwendet, wie Multiphotonen Mikroskopie, Biolumineszenz und die Markierung von Zellen über radioaktive Substanzen. Die Anwendungsmöglichkeiten dieser Methoden sind allerdings limitiert, zum Teil aufgrund der geringen Gewebepenetration oder aufgrund von zytotoxischen Nebeneffekten (Thakur *et al.* 1977; Bouso & Moreau 2012; Ahrens & Bulte 2013a).

Für die nicht-invasive Analyse von Entzündungsprozessen ist die Detektion von Immunzellen über Magnetresonanztomographie (MRT) eine weitere geeignete Methode. Diese Technik wird im medizinischen Bereich für die nicht-invasive Diagnose und Beobachtung von verschiedenen Krankheiten angewendet. MRT hat gegenüber anderen Methoden den Vorteil, tiefliegende Gewebeschichten darstellen zu können, keine zytotoxischen Nebenwirkungen aufzuweisen und strahlungsfrei zu sein (Ahrens & Bulte 2013a). Für die Visualisierung der Gewebeanatomie wird das ubiquitäre Vorhandensein von Wasser im Organismus genutzt, indem Wasserstoffkerne (^1H) spezifisch detektiert und aus denen hochauflösende Bilder

Einleitung

erzeugt werden (Tirota *et al.* 2015). MRT ist allerdings nicht in der Lage einzelne Zellen oder Zellarten direkt sichtbar zu machen. Das liegt daran, dass die Zellen keine physikalischen Eigenschaften aufweisen, die sie vom umliegenden Gewebe abgrenzen. Um Zellen oder Strukturen sichtbar zu machen, die sich unter herkömmlichen Bedingungen nur sehr schwer darstellen lassen, werden Kontrastmittel eingesetzt. Gängige MRT-Kontrastmittel bestehen auf Gadolinium-Basis oder superparamagnetischen Eisenoxiden (SPIOs) und führen nach Applikation zu einer positiven oder negativen Kontrastverstärkung des ^1H -Signals in der MRT Messung. Für die Untersuchung des Migrationsverhalten von phagozytierenden Immunzellen können diese *ex vivo* in der Zellkultur mit den Kontrastmitteln markiert werden. Nach anschließender Injektion der markierten Immunzellen in Mäuse, kann das Migrationsverhalten dieser Immunzellen mittels MRT untersucht werden (Kleinschnitz *et al.* 2003; Bulte & Kraitchman 2004; Ahrens & Bulte 2013a). Ein Nachteil ist allerdings, dass Gadolinium und SPIOs in der MRT Messung hypo- oder hyperintense Regionen im Gewebe verursachen können. Dies erzeugt ein Hintergrundsignal, wodurch eine eindeutige Identifizierung der Gewebebereiche, in die die markierten Immunzellen eingewandert sind, erschwert wird (Temme *et al.* 2012). Eine weitere vielversprechende und spezifischere Alternative, für die Detektion von Immunzellen mittels MRT, sind Perfluorkarbone (PFCs, *Perfluorocarbons*). Bei PFCs handelt es sich um perfluorierte Alkane, die eine hohe Menge an Fluor aufweisen. Aufgrund ihrer hydrophoben, wie auch lipophoben Hülle müssen PFCs emulgiert werden, damit sie für physiologische Anwendungen genutzt werden können und haben in der Regel einen Durchmesser von ca. 100 nm (Krafft & Riess 2009; Grapentin *et al.* 2014). Als Emulgatoren werden in der Regel Phospholipide aus Eigelb oder Soja verwendet, da diese nicht zelltoxisch sind und zu keiner Veränderung von zellulären Eigenschaften führen (Ahrens & Zhong 2013). Die PFC-Nanoemulsionspartikel (PFC-NE) bestehen somit aus einer monomeren Lipidschicht, in denen der Perfluorkarbonkern eingeschlossen ist. Ein wichtiger Faktor für die Detektion von PFCs über MRT ist, dass Fluor nahezu vollständig im Organismus fehlt, wodurch eine hochspezifische hintergrundfreie Detektion des Fluor-Signals (^{19}F) ermöglicht wird (Holland *et al.* 1977). In Kombination mit morphologischen ^1H -Aufnahmen des Gewebes und anschließender Überlagerung des ^{19}F -Signals können daher exakte Aussagen zu der anatomischen Lokalisation von Immunzellen gemacht werden, welche PFC-NEs aufgenommen haben (Flögel *et al.* 2008). Ein weiterer Vorteil von PFC-NEs für physiologische Anwendungen ist, dass sie biologisch stabil sind, da sie nicht metabolisiert werden und widerstandsfähig gegenüber niedrigen pH-Werten sind (Krafft 2001; Janjic & Ahrens 2009). Nach intravenöser Applikation diffundieren PFC-NEs aufgrund ihrer Größe nicht durch gesundes Endothel und verbleiben im Blutstrom. Dort werden sie von phagozytierenden Immunzellen, wie Makrophagen, Monozyten und zu einem geringen Anteil von Neutrophilen Granulozyten endozytiert (Flögel *et al.* 2008; Ebner *et al.* 2010; Temme *et al.* 2014). Die

zeitlichen Abläufe von Makrophagen- und Monozyten-Infiltrationen in entzündete Gewebe konnte mit dieser Methode in unterschiedlichen Krankheitsmodellen in Tieren untersucht werden, wie nach Myokardinfarkt (Flögel *et al.* 2008), bei Rheumatoider Arthritis (Flögel *et al.* 2012) und auch bei bakteriellen Infektionen (Hertlein *et al.* 2011).

Bei der Markierung von Monozyten und Makrophagen mit PFC-NE handelt es sich allerdings um ein unspezifisches Targeting-Verfahren, bei dem alle phagozytierenden Immunzellen für die ¹⁹F-MRT Detektion markiert werden. Somit ist es nicht möglich spezifisch zwischen verschiedenen Monozyten-Subpopulationen, anti-inflammatorischen M1, pro-inflammatorischen M2 Makrophagen oder Neutrophilen Granulozyten zu differenzieren (Temme *et al.* 2016). Weiterhin ist es nicht möglich, über PFC-NEs, das Migrationsverhalten von nicht-phagozytierenden Immunzellen, wie z.B. verschiedene T-Zell-Subpopulationen, mittels MRT zu untersuchen. Hierfür wurden Studien durchgeführt, in denen nicht-phagozytierende Zellen aus der Maus *ex vivo* mit Perfluorpolyether-Nanopartikeln markiert und in das Tier injiziert wurden. Über diese Technik konnte unter anderem in der Maus das Migrationsverhalten von markierten dendritischen Zellen in Lymphknoten und die Migration von T-Zellen in diabetischen Mäusen untersucht werden (Srinivas *et al.* 2007; Waiczies *et al.* 2011). Jedoch müssen für diese Untersuchungen die entsprechenden Immunzelltypen isoliert, kultiviert, markiert und dem Organismus wieder zugeführt werden. Dies kann allerdings in manchen Fällen zu einer Veränderung der Zelleigenschaften führen (Siglienti *et al.* 2006). Ein aktives Targeting von spezifischen Immunzelltypen *in vivo* ist mit der intravenösen Applikation von PFC-NEs nicht möglich, wäre jedoch wünschenswert.

Ein direktes Targeting von Zellen kann über die Funktionalisierung von PFC-NEs mit spezifischen Liganden erfolgen. Um ein hohes Maß an Spezifität zu erreichen können z.B. Antikörper, Nanobodies oder Peptide an die Oberfläche von PFC-NEs gekoppelt werden, wodurch eine spezifische Bindung an Zielstrukturen ermöglicht wird (Ahrens & Bulte 2013a). Mittels funktionalisierten PFC-NEs konnten molekulare Prozesse der Angiogenese (Schmieder *et al.* 2014), Tumorgenese (Bae *et al.* 2013) und Thrombosebildung (Temme *et al.* 2015) untersucht werden. Allerdings ist das aktive Targeting von spezifischen Zellpopulationen über funktionalisierte PFC-NEs in vielen Fällen schwierig, da viele endogene Rezeptoren nicht zelltypspezifisch exprimiert werden. Zusätzlich kann die Ligandenbindung an Zielstrukturen zu einer Aktivierung von Signalwegen führen, was zu einer Veränderung der Zelleigenschaften führen kann.

1.2.1 Nanobodies und deren Anwendungsbereiche

Das humane Immunsystem generiert eine Vielzahl an verschiedenen Antikörpern, um ein hoch modulares Abwehrsystem gegen Pathogene zu haben. Ihre Aufgabe ist es, spezifisch an pathogene Antigene zu binden, um eine Immunantwort zu induzieren und Zellen sowie

Einleitung

Moleküle zu rekrutieren, welche an der Beseitigung von Pathogenen involviert sind. Bei Antikörpern handelt es sich um Proteine die von differenzierten B-Zellen, den Plasmazellen, produziert und sezerniert werden. Aufgrund ihrer hohen Affinität, sowie Spezifität werden Antikörper heutzutage in klinischen Anwendungen, wie z.B. gegen Leukämie-assoziierte Erkrankungen, Krebs, Entzündungs-assoziierte Krankheiten und gegen die Abstoßung von Organen nach Transplantationen eingesetzt (Buss *et al.* 2012). Für die wissenschaftliche Grundlagenforschung sind Antikörper ein genauso wichtiges Hilfsmittel. Sie werden für die Erforschung von zellulären Vorgängen, Lokalisierung von Proteinen und für viele methodische Anwendungen wie Western Blots und ELISAs eingesetzt (Helma *et al.* 2015). Antikörper sind 150 kDa große Multidomänenproteine, bestehend aus zwei schweren Ketten (V_H) und zwei leichten Ketten (V_L) (Abbildung 1.4A). Die Bindungsspezifität an das Antigen erfolgt über die sechs (drei V_H und drei V_L) *complementarity determining regions* (CDRs). Allerdings unterliegen Antikörper gewissen Limitierungen in ihrer Anwendung. Aufgrund ihrer Größe haben sie eine schlechte Gewebepenetration, Löslichkeit und Stabilität. Des Weiteren kann es über den Fc-Teil zu unspezifischen Interaktionen mit verschiedenen Zellen, wie Makrophagen und Monozyten kommen (Beckman *et al.* 2007; Chames *et al.* 2009).

Die Entdeckung von schwere-Ketten-Antikörper (hcAbs), welche im Serum vom Camelidaen identifiziert wurden, war ein wichtiger Schritt für den Gebrauch von Antigen-bindenden Proteinen (Hamers-Casterman *et al.* 1993). HcAbs bestehen aus zwei schweren Ketten eines typischen Antikörpers, je einer variablen Antigen-bindenden Domäne und haben ein Molekulargewicht von ~90 kDa (Abbildung 1.4B). Die Bindung des Antigens erfolgt im Gegensatz zu IgG Antikörpern über eine einzelne Antigenbindungsdomäne (VHH), welche isoliert als sogenannter Einzeldomänenantikörper bzw. Nanobody verwendet werden kann (Abbildung 1.4C) (Hamers-Casterman *et al.* 1993). Die VHH-Domäne hat ein Molekulargewicht von ~13-14 kDa und besteht aus neun β -Faltblättern, welche über hypervariable Schleifen miteinander verbunden sind. Drei dieser hypervariablen Schleifen sind dabei die CDRs, welche eine Oberfläche ausbilden, die komplementär zu der Oberfläche des Antigens ist, wodurch eine spezifische Bindung erzielt wird (Abbildung 1.4D). Die Antigen-interagierende Oberfläche der drei CDRs von Nanobodies ist dabei vergleichbar groß wie die sechs CDRs eines konventionellen IgG Antikörpers (Nguyen *et al.* 2000; Muyldermans 2013). Dies ist vor allem auf eine längere CDR3 Region von Nanobodies zurückzuführen, welche bis zu 28 Aminosäuren lang sein kann, im Gegensatz zu IgG Antikörpern mit einer Länge von bis zu 15 Aminosäuren (Wesolowski *et al.* 2009; Muyldermans 2013). Dies begünstigt eine höhere Flexibilität der Bindungseigenschaften und VHHs binden effizienter in kleine Proteinstrukturen, z.B. an das aktive Zentrum von Enzymen, um diese zu inhibieren (De Genst *et al.* 2006).

Einleitung

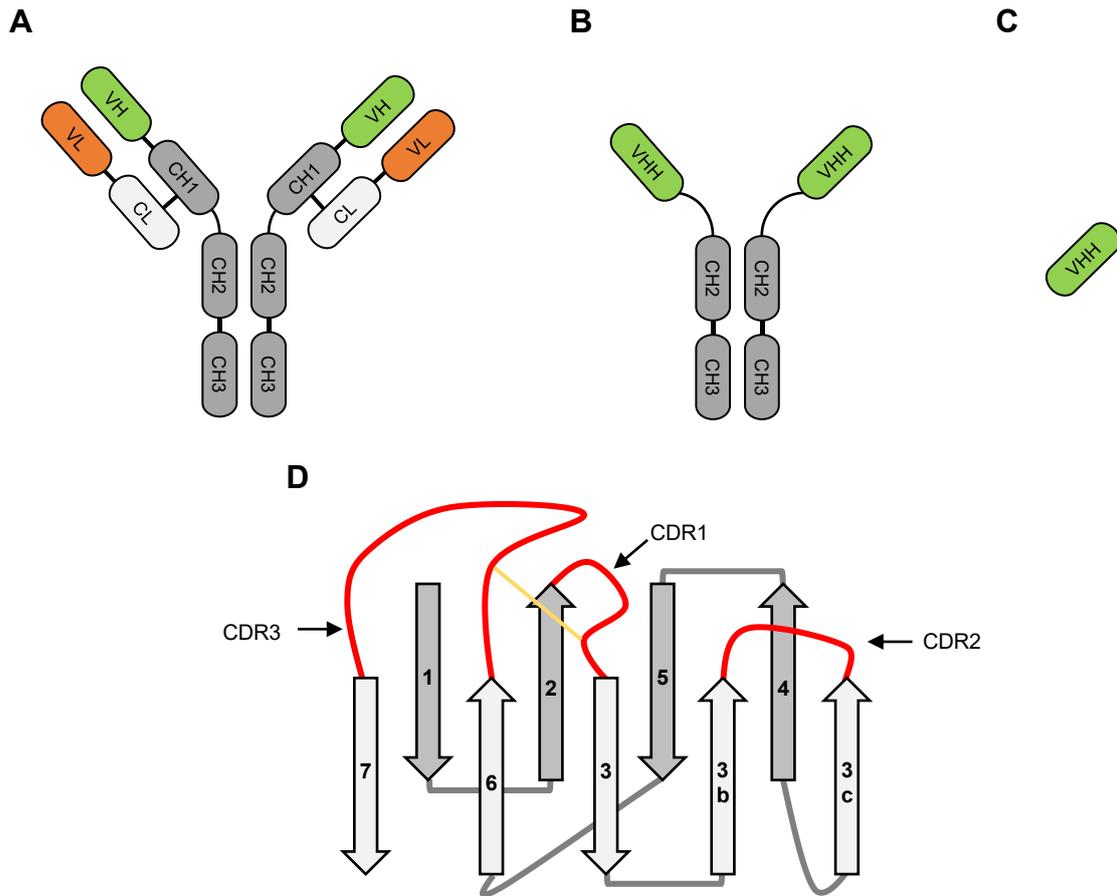


Abbildung 1.4: Schematische Darstellung des strukturellen Aufbaus von Antikörpern, schweren-Ketten-Antikörpern und Nanobodies. (A) Ein konventioneller Antikörper besteht aus zwei leichten (CL und VL) und zwei schweren Ketten (CH1- bis CH3-Domäne und VH). Die spezifische Bindung an das Antigen erfolgt über je drei CDRs der VH- und VL-Domäne. (B) Schwere-Ketten-Antikörper (hcAbs) aus Camelidaen bestehen aus zwei schweren Ketten (CH2- und CH3-Domäne) und je einer VHH-Domäne. Die Erkennung von Antigenen erfolgt mittels drei CDRs. Im Gegensatz zu konventionellen Antikörpern fehlt die leichte Kette und die CH1-Domäne der schweren Kette. (C) Das kleinste funktionelle Antigen-bindende Fragment eines hcAbs ist die VHH-Domäne, auch bekannt als Einzeldomänenantikörper oder Nanobody bzw. VHH. (D) Schematische Darstellung des strukturellen Aufbaus eines Nanobodies. Die Struktur besteht aus neun β -Faltblättern (hellgrau und grau) und drei CDR-Regionen (rot) für die spezifische Erkennung von Antigenen. CDR1 und 3 weisen im Gegensatz zu den CDRs von typischen Antikörpern längere Schleifen auf, um eine größere, sowie stabilere Bindungsoberfläche zu schaffen und sind über eine Disulfidbrücke (gelb) miteinander verbunden. CDR (*complementarity determining regions*), CH (konstante schwere Kette), CL (konstante leichte Kette), VH (variable schwere Kette), VL (variable leichte Kette). Modifizierte Abbildung nach (Wang *et al.* 2016).

Nanobodies weisen eine Reihe von Eigenschaften auf, um in klinischen sowie in wissenschaftlichen Anwendungsbereichen eingesetzt zu werden. Die Produktion findet in hohen Mengen in verschiedenen Expressionsorganismen statt, wie in Mikroorganismen, eukaryotischen Zellen und Pflanzen (Frenken *et al.* 1998; Frenken *et al.* 2000; Ismaili *et al.* 2007). Die Affinitäten zu Antigenen liegen oft im niedrigen nanomolaren bzw. pikomolaren Bereich und sie weisen eine hohe chemische und Thermostabilität auf (Ghahroudi *et al.* 1997; Ries *et al.* 2012; Muyldermans 2013). Nanobodies besitzen aufgrund ihres geringen Molekulargewichts eine gute Gewebepenetration und werden für diagnostische und therapeutische Anwendungen von unterschiedlichen Erkrankungen benutzt (Wang *et al.* 2016). Im medizinischen Bereich wurden nach Verabreichung von Nanobodies, in Mäusen und

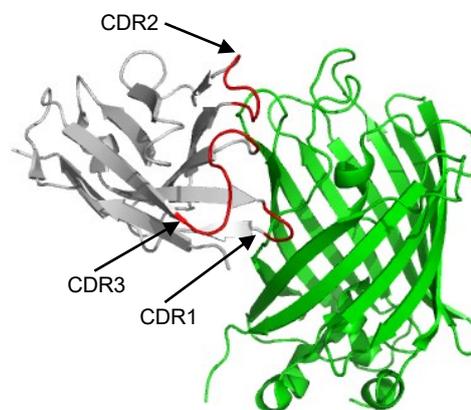
Einleitung

Menschen, keine Immunreaktionen nachgewiesen (Cortez-Retamozo *et al.* 2004; Coppieters *et al.* 2006). Für Forschungszwecke werden Nanobodies für die Stabilisierung von Proteinkomplexen verwendet, um Kristallisationsprozesse und Strukturanalysen zu ermöglichen (Rasmussen *et al.* 2011). Ein anderer Anwendungsbereich von Nanobodies sind bildgebende Verfahren. Für diagnostische Verfahren im Menschen werden sie mit Radionukleotiden markiert, um *in vivo* Brustkrebs und EGF-R-überexprimierende Krebsarten mittels Computertomographie zu detektieren (Huang *et al.* 2008; Vaneycken *et al.* 2011). In der wissenschaftlichen Grundlagenforschung werden Nanobodies auch für die Detektion von Proteinen und zellulären Strukturen eingesetzt (Wang *et al.* 2016).

Im Rahmen dieser Arbeit ist vor allem ein Nanobody von besonderer Bedeutung, der gegen GFP (*green fluorescent protein*) gerichtet ist (Abbildung 1.5). Dabei bindet der GFP-Nanobody mit einer hohen Affinität an GFP ($K_D = \sim 1$ nM) und an der Bindung weisen alle drei CDRs eine wichtige Funktion auf (Kubala *et al.* 2010). GFP-Nanobodies werden dazu verwendet die Lokalisation, sowie den intrazellulären Transport von GFP-gekoppelten Proteinen und Rezeptoren in lebenden Zellen zu verfolgen, indem sie z.B. mit Fluoreszenzproteinen gekoppelt (Chromobody) werden (Rothbauer *et al.* 2006). Sie werden auch für die Präzipitation von GFP-Fusionsproteinen eingesetzt, um Interaktion mit anderen Proteinen nachzuweisen (Wang *et al.* 2016). Des Weiteren können GFP-gekoppelte Proteine auch über GFP-Nanobodies *in vivo* spezifisch ausgeschaltet werden. Hierzu wird der GFP-Nanobody mit Domänen des Ubiquitin-Signalweges fusioniert und durch die spezifische Bindung an das GFP-Fusionsprotein wird der proteolytische Abbau induziert (Caussin *et al.* 2011). Ein weiterer wichtiger Anwendungsbereich für GFP-Nanobodies ist die synthetische Biologie. In diesem Forschungsbereich ist es aufgrund der modularen Struktur von Rezeptoren möglich, bestimmte Domänen unterschiedlichster Rezeptoren zu kombinieren, um synthetische Rezeptoren zu generieren, die in der Natur nicht vorkommen, um sie für einen bestimmten Anwendungsbereich zu verwenden (Lienert *et al.* 2014; Lim & June 2017). Hierdurch können spezifisch zelluläre Funktionen untersucht, Zellvorgänge moduliert oder auch Liganden-gekoppelte Kontrastmittel spezifisch in die Zelle internalisiert werden, um einen Nachweis dieser Zellen zu ermöglichen (Hymel & Peterson 2012; Eersels *et al.* 2016). Beispiele für synthetische GFP-Nanobody-Rezeptoren sind *Synthetic Cytokine Receptors* (SyCyRs) oder *Synthetic Notch Receptors* (synNotch). Durch SyCyRs wird eine Zytokin-vermittelte Signaltransduktion in Zellen induziert. Hierzu wurden die extrazellulären Domänen von Zytokinrezeptoren, unter anderen vom IL-23 Rezeptor und von gp130, durch GFP-Nanobodies ersetzt. Als synthetischer Ligand wird ein homodimeres GFP-GFP-Fusionsprotein verwendet. Über die Bindung des GFP-GFP-Fusionsproteins, an die GFP-Nanobodies, wird bei den entsprechenden Rezeptoren in diesem Fall eine Homodimerisierung induziert. Dies führt zu einer Aktivierung von intrazellulären Signalwegen, wie z.B. der JAK/STAT-Signalweg. Das

Einleitung

Besondere hierbei ist, dass durch SyCyRs eine Aktivierung von intrazellulären Signalmolekülen und Signalwegen induziert wird, die nahezu identisch zu der von den entsprechenden natürlichen Zytokine ist. Über dieses System wird somit eine hintergrundfreie Zytokin-induzierte Signaltransduktion *in vitro* und *in vivo* simuliert, ohne das Vorhandensein der physiologisch vorkommenden Liganden (Engelowski *et al.* 2018). Durch synNotch, die auf T-Zellen exprimiert werden, kann spezifisch über die Zugabe von GFP die Sekretion von Zytokinen und die Zelldifferenzierung induziert werden. GFP-gekoppelte Wirkstoffe können über diese Rezeptoren auch in die Zelle aufgenommen werden. Die Steuerung dieser Vorgänge kann hierbei durch verschiedene intrazelluläre Domänen beeinflusst werden (Roybal *et al.* 2016). Intrazelluläre Domänen von Rezeptoren haben zusätzlich einen entscheidenden Einfluss auf die Internalisierungsrate und die Art der Internalisierung, z.B. über das Endozytose- oder das Phagozytosesystem (East & Isacke 2002; Rosales & Uribe-Querol 2017). Daher können synthetische Rezeptoren mit einem GFP-Nanobody so generiert werden, dass eine Anwendung in bildgebenden Verfahren mittels MRT erfolgen kann. Für die spezifische Bindung und Aufnahme über GFP-Nanobody-haltige Rezeptoren könnten hierfür z.B. GFP-gekoppelte PFC-NEs verwendet werden, um eine Visualisierung von spezifischen Zelltypen, z.B. von nicht-phagozytierenden Zellen, über ^{19}F -MRT zu ermöglichen.



GFP-Nanobody Bindung an GFP

Abbildung 1.5: Bindung des GFP-Nanobodies an GFP. (A) Struktur der Bindung des GFP-Nanobodies (grau) an GFP (grün, PDB 3OGO). Die Bindung erfolgt über die drei CDR-Regionen (rot) des GFP-Nanobodies und 10 Aminosäuren von GFP. Weitere Erläuterungen sind in Abschnitt 1.2.1 beschrieben. Die Proteinstruktur wurde mithilfe von PyMOL erstellt.

1.3 Zielsetzung dieser Arbeit

Bis zum heutigen Zeitpunkt ist nicht bekannt, zu welchen Mengen der IL-6/sIL-6R Komplex vorliegen kann. Das erste Ziel dieser Arbeit ist es daher zu quantifizieren, wie viel IL-6/sIL-6R Komplex bei physiologisch vorkommenden Mengen an IL-6 und sIL-6R gebildet wird. Für die Bestimmung der Komplexmengen wird rekombinantes humanes IL-6 und sIL-6R, sowie der im Blutserum enthaltene endogene sIL-6R verwendet. Zur Simulierung von milden bis hin zu starken Entzündungsbedingungen werden verschiedene IL-6 Konzentrationen zum sIL-6R hinzugefügt. Die IL-6/sIL-6R Komplexbildung wird anschließend mit einem spezifischen ELISA analysiert. Es sollen Rückschlüsse gewonnen werden, zu welchen Anteilen IL-6 und der sIL-6R im Komplex vorliegen können, um einen Vergleich mit der Berechnung der Komplexbildung zu ermöglichen. Ein inhibierender Faktor des Trans-Signalweges ist sgp130. Daher soll auch bestimmt werden, zu welchen Mengen sgp130 an den IL-6/sIL-6R Komplex binden kann, um eine Inhibition des Trans-Signalweges zu ermöglichen. Dazu wird im Blutserum enthaltenes endogenes sgp130 oder rekombinantes sgp130Fc verwendet. Bisher ist es nicht bekannt, zu welchen Anteilen der sIL-6R mit IL-6 in einem Komplex vorliegen kann. Um diese Fragestellung zu beantworten, wird eine Methode entwickelt, um die IL-6/sIL-6R/sgp130 Komplexbildung zu analysieren, damit die maximale Bindekapazität vom sIL-6R an IL-6 bestimmt werden kann.

Im zweiten Teil dieser Arbeit soll ein System entwickelt werden, mit dem ein zelltypspezifisches Targeting über PFC-NEs und die Detektion der markierten Zellen mittels MRT ermöglicht wird. Hierzu werden drei verschiedene synthetische Cargo-Internalisierungsrezeptoren (CIR) generiert, die einen extrazellulären GFP-Nanobody besitzen, über den eine spezifische Bindung von GFP erfolgt. Die CIRs werden zuerst *in vitro* auf ihre Bindungs- und Internalisierungseigenschaften an GFP bzw. GFP-gekoppelte Nanopartikeln charakterisiert. Damit eine Visualisierung von CIR-exprimierenden Zellen über MRT erfolgen kann, werden GFP-gekoppelte PFC-NEs verwendet. Liganden/Rezeptor-Interaktionen führen in der Regel zur Aktivierung von zellulären Signalwegen. Daher könnte die Bindung von GFP-PFCs an die CIRs Signalwege aktivieren, was zu einer Veränderung von Zelleigenschaften führen könnte. Um dies für *in vivo* Anwendungen auszuschließen, wird die Genexpression von murinen prä-B-Zellen *in vitro* analysiert, nachdem eine Bindung von GFP-PFCs an die CIRs erfolgte. Abschließend wird für die Etablierung des Systems eine CIR *Knock-in* Maus erstellt, um die Funktionalität dieses neuen Verfahrens *in vivo* zu untersuchen.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Antibiotika

Ampicillin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe	f.c. 100 µg/ml
Chloramphenicol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe	f.c. 34 µg/ml
Hygromycin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe	f.c. 1 mg/ml
Puromycin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe	f.c. 1,5 µg/ml

2.1.2 Antikörper

Die in dieser Arbeit verwendeten Antikörper sind in Tabelle 2.1 und Tabelle 2.2 aufgelistet.

Tabelle 2.1 Primäre Antikörper

Antikörper	Hersteller
α-humaner IL-6 (8C9)	Monoklonaler Antikörper aus der Maus (Stocklösung 1 µg/µl). Verwendete Verdünnung 1:1000 für den in Abschnitt 3.1.1 beschriebenen IL-6/sIL-6R Komplex-ELISA. ImmunoTools GmbH.
α-humaner IL-6R (4-11)	Monoklonaler Antikörper aus der Maus, Bindung an ein Epitop der Domäne 1 des hIL-6R (Stocklösung 1 µg/µl). Verwendete Verdünnung 1:1000 für das Coating von ELISA Platten und Western Blots. Herstellung beschrieben in (Chalaris <i>et al.</i> 2007).
α-humaner IL-6Rα (BAF227)	Biotinylierter IgG Antikörper aus der Ziege (Stocklösung 0,4 µg/µl). Verwendete Verdünnung 1:1000 als Detektionsantikörper für ELISA. R&D Systems GmbH, Minneapolis, USA.
α-Myc (71D10)	Monoklonaler IgG Antikörper aus dem Kaninchen, Bindung an folgende Aminosäuresequenz: EQKLISEEDL. Verwendete Verdünnung: 1:100 für FACS und 1:1000 für Western Blots. Cell Signaling Technology, Danvers, USA.
α-humaner-CD130 (gp130 [BR-3])	Monoklonaler IgG Antikörper aus der Maus (Stocklösung 1 µg/µl). Verwendete Verdünnung für Präzipitation von endogenem sgp130 aus humanem Blutserum 0,5 µg/50 µl Protein A-Agarose Beads. Abcam, Cambridge, England.

Material und Methoden

α -MHC Klasse I Antikörper

W6/32, aus murinen Hybridomaüberständen. Verwendete Verdünnung für Immunfluoreszenz 1:10. Zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. N. Koch, Universität Bonn.

Tabelle 2.2: Sekundäre Antikörper

Antikörper	Hersteller
α -Kaninchen IgG (H+L)	Alexa Fluor 488. Polyklonaler IgG Antikörper aus dem Kaninchen (Stocklösung 2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$). Verwendete Konzentration im FACS: 0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA.
α -Kaninchen IgG-POD	ImmunoPure Peroxidase Conjugated Goat α -rabbit IgG (H+L, Stocklösung 0,8 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$). Verwendete Verdünnung im Western Blot 1:5000. Thermo Fischer Scientific, Perbio Science, Waltham, MA, USA.
α -Maus IgG-POD	ImmunoPure Peroxidase Conjugated Goat α -mouse IgG (H+L, Stocklösung 0,8 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$). Verwendete Verdünnung im Western Blot 1:5000. Thermo Fischer Scientific, Perbio Science, Waltham, MA, USA.
α -Maus IgG (H&L)	Alexa Fluor 594. Polyklonaler IgG Antikörper aus der Ziege (Stocklösung 2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$). Verwendete Verdünnung für Immunfluoreszenz 1:500. Invitrogen, Carlsbad, CA, USA.

2.1.3 Chemikalien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien sind in Tabelle 2.3 aufgelistet.

Tabelle 2.3: Verwendete Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Acrylamid-Mix 30%	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Agar	AppliChem GmbH, Darmstadt
Agarose	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf
Ammoniumpersulfat (APS)	Merck KGaA, Darmstadt
Bromphenol-Blau	Sigma-Aldrich, Steinheim
Bovines Serum Albumin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Complete Protease Inhibitor Cocktail	Roche Holding GmbH, Mannheim
DAPI	Sigma-Aldrich, Steinheim
Di-Natriumhydrogenphosphat	Merck KGaA, Darmstadt
Direkt PCR-Tail Lösung	Peqlab, Erlangen
DMEM	Life Technologies GmbH, Darmstadt
Essigsäure	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Ethanol	Merck KGaA, Darmstadt
Ethidiumbromid	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich, Steinheim
FBS	Invitrogen, Oregon, USA

Material und Methoden

Glukose	Merck KGaA, Darmstadt
Glycerol	Carl Roth GmbH, Darmstadt
Glycin	Merck KGaA, Darmstadt
HD Green	Intas Science Imaging Instruments, Göttingen
Isopropanol	AppliChem GmbH, Darmstadt
Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Carl Roth GmbH, Darmstadt
Kaliumacetat	Merck KGaA, Darmstadt
Kaliumchlorid	AppliChem GmbH, Darmstadt
Kaliumhydrogenphosphat	Merck KGaA, Darmstadt
LB-Medium	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Magermilchpulver	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Methanol	Merck KGaA, Darmstadt
Mowiol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumchlorid	AppliChem GmbH, Darmstadt
Natriumfluorid	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumorthovanat	Sigma-Aldrich, Steinheim
Nonidet-P40 (NP-40)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Schwefelsäure	AppliChem GmbH, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Sucrose	Merck KGaA, Darmstadt
Paraformaldehyd	Merck KGaA, Darmstadt
Penicillin/Streptomycin	GENAXXON Bioscience, Ulm
Percoll	Sigma-Aldrich, Steinheim
Phorbol-12-myristat-13-acetate (PMA)	Sigma-Aldrich, Steinheim
POD-Substrat	Roche Holding GmbH, Mannheim
Polybren	Sigma-Aldrich, Steinheim
Protein A-Agarose Beads	Roche Holding GmbH, Mannheim
Sucrose	Merck KGaA, Darmstadt
Streptavidin-HRP Lösung	R&D Systems, Wiesbaden
Surfactant P20	GE Healthcare, Freiburg
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Tris	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Triton X-100	Merck KGaA, Darmstadt
Trypan Blue Dye, 0,4%	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
TurboFect	Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA
Tween-20	Sigma-Aldrich, Steinheim

2.1.4 Enzyme

Alle verwendeten Enzyme (Polymerasen, Restriktionsenzyme, Ligasen etc.) wurden von Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) verwendet.

2.1.5 Geräte

Die in dieser Arbeit verwendeten Geräte sind in Tabelle 2.4 aufgelistet.

Tabelle 2.4: Verwendete Geräte

Gerät	Hersteller
9.4 T Bruker AVANCEIII Wide Bore NMR Spektrometer	Bruker BioSpin GmbH, Rheinstetten
Agilent 2100 Bioanalyzer	Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA
Biacore X100 Plus	GE Healthcare, Freiburg
BD FACS Canto II	Becton Dickson GmbH, Heidelberg
Binder CO ₂ -Inkubator 150 (E2) Brutschrank	Binder GmbH, Tuttlingen
Gelelektrophoresekammer	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Heizbad Julabo sw21	Julabo GmbH, Seelbach
Heizblock: Stuart Block Heater	Bibby Scientific, Staffordshire, England
Heracell VIOS 250i CO ₂ Inkubator	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Heraeus Function Line T6 Trockenschrank	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
INTAS Chemo Cam Imager	INTAS Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen
INTAS iX Imager	INTAS Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen
IVIS Lumina-II Imaging System	Perkin Elmer, Waltham, MA, USA
Kühlschrank	Liebherr GmbH, Rostock
M-110S Microfluidizer	Microfluidics Corporation, Newton, MA, USA
Mini-PROTEAN Tetra System	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Neubauer Zählkammer	LO-Laboroptik, Lancing, England
NanoDrop ND-2000	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Olympus BX61 Mikroskope	Olympus Corporation, Tokio, Japan
Peqstar 2x Twin Block Thermal Cycler	PEQLAB Ltd, Crableck Lane, UK
pH-Meter	WTW, Weilheim
Pipetus®-Akku	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Pipetten	Eppendorf GmbH, Hamburg
Pumpe für die Sterilbank	HLC BioTech, Göttingen
Roller: Stuart roller mixer SRT 9D	Bibby Scientific, Staffordshire, England
Schwingmühle MM 400	Retsch GmbH, Haan
Schüttler CH-4103	INFORS AG, Bottmingen
Spannungsquelle Western Blot: Power Pac 300	BioRad Laboratories GmbH, Hercules, USA
Scanlaf Mars Safety Class 2	Weiss Labortechnik GmbH, Heroldsberg
Tecan Infinite M200 PRO Reader	Tecan GmbH, Maennedorf, Schweiz
TC10 Automated Cell Counter	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Trans-Blot Turbo System	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Thermoblock	Eppendorf GmbH, Hamburg
UV-Tisch	Bio-Budget Technologies GmbH, Krefeld
Vortexer	IKA Labortechnik GmbH, Staufen
Waage Precisa 100M-300C	Hartenstein GmbH, Würzburg
Zentrifugen: Centrifuge 5417R	Eppendorf AG, Hamburg
Laborfuge 400R	Heraeus GmbH, Hanau

2.1.6 Größenmarker

Für die Größenbestimmung von Proteinen wurde die PageRuler Prestained Protein *Ladder* (10-180 kDa) verwendet. Für die Größenbestimmung von DNA wurde die GeneRuler Express DNA *Ladder* (100-5000 bp) und die GeneRuler 1 kb DNA *Ladder* (250-10000 bp) von Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) verwendet.

2.1.7 Kits

Die in dieser Arbeit verwendeten Kits sind in Tabelle 2.5 aufgelistet.

Tabelle 2.5: Verwendete Kits

Funktion	Hersteller
Detektion von Chemilumineszenz	Immobilion Western Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore Corporation, Billerica, MA, USA)
Synthese von cDNA aus RNA und die Markierung der cDNA für die Analyse mittels Microarray	Ambion WT Expression und WT Terminal Labelling Kit (Affymetrix, Freiburg)
DNA-Extraktion aus Agarosegelen, Reinigung von PCR-Produkten, Entfernung von Enzymen aus Reaktionsansätzen	NucleoSpin Extract II (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren)
Kit mit 96-Well Platten und standardisierten Puffern für die Detektion von sgp130 und IL-6/sIL-6R Komplexen mittels ELISA	DuoSet ELISA Ancillary Reagent Kit2 (DY008, R&D Systems, Abingdon, UK)
Midi-Präparation von Plasmid DNA	NucleoBond Xtra Midi (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren)
RNA-Extraktion aus Ba/F3-Zellen	RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden)
TopTaq Master Mix für Genotypisierungen	QIAGEN, Hilden
Quantifizierung von humanem IL-6	IL-6 Human ELISA Kit (KHC0061, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA)
Quantifizierung von humanen IL-6/sIL-6R Komplexen	Human IL-6/IL-6 R α Complex DuoSet ELISA (DY8139, R&D Systems, Abingdon, UK)
Quantifizierung von humanem sgp130	Human sgp130 DuoSet ELISA (DY228, R&D Systems, Abingdon, UK)
Proliferationsassay	CellTiter-Blue Cell Viability Assay (Promega GmbH, Mannheim)

2.1.8 Kulturmedien

Medien zur Kultivierung von *E.coli*:

Lysogeny-Broth-(LB)-Medium: 10 g NaCl
 10 g Pepton
 5 g Hefeextrakt
 Ad 1000 ml dH₂O

Lysogeny-Broth-(LB)-Platten: 10 g NaCl
 10 g Pepton
 5 g Hefeextrakt
 20 g Agar
 Ad 1000 ml dH₂O

Zur Selektion von Ampicillin resistenten *E.coli*-Zellen wurde den Medien 100 µg/ml Ampicillin nach dem Autoklavieren zugesetzt. Die Zusammensetzung der Medien wurde (Bertani 1951) entnommen.

Medien zur Kultivierung in der Zellkultur:

DMEM (-/-) Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM)
 High Glucose (4,5 g/l), with stable Glutamine

DMEM (+/+) Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM)
 High Glucose (4,5 g/l), with stable Glutamine, versetzt mit
 10% fötales Kälberserum (FCS) und 1%
 Penicillin/Streptomycin

Das verwendete DMEM Medium und FCS stammen von Life Technologies, Darmstadt. Trypsin/EDTA und Penicillin/Streptomycin wurden von Genaxxon Bioscience GmbH, Ulm bezogen.

2.1.9 Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von Eurofins MWG Operon GmbH, Ebersberg bezogen und sind in Tabelle 2.6 aufgelistet.

Tabelle 2.6: Verwendete Oligonukleotide

Primer	Sequenz (5' → 3')
Rosa26 fw IMG	GCACTTGCTCTCCCAAAGTC

Material und Methoden

CMV rev	GGTCATGTACTGGGCATAATGC
CIR2 fwd	TGGTGTCCGACATGGAAATGAACG
Rosa26 rev IMG	GGCGGATCACAAGCAATAAT
Neo fw (IMG)	TGCTCCTGCCGAGAAAGTATCCATCATGGC
Neo Rv (IMG)	CGCCAAGCTCTTCAGCAATATCACGGGTAG
Neo fwd	GCTACCCGTGATATTGCTGAAGAG
CIR2 rev	AGTGGAGGACTCCTGGATTCTGTG
CIR2 Cre 1 fwd	TCTAGAGCCTCTGCTAACCA
CIR2 Cre 2 rev	ACCAGCTGCACTTGGGATCC
pcDNA 3.1 fwd	AGGCACAGTCGAGGCTG
pMOWs fwd	AGCCCTTTGTACACCCTAAGC
pcDNA 3.1 rev	AGGCACAGTCGAGGCTG
pMOWs fwd	AGCCCTTTGTACACCCTAAGC

2.1.10 Plasmide

Die in dieser Arbeit verwendeten Plasmide sind in Tabelle 2.7 aufgelistet.

Tabelle 2.7: Verwendete Plasmide

Name	Beschreibung	Referenz
pcDNA3.1(+)	Expressionsvektor für transiente und stabile Proteinexpression in Säugierzellen	Invitrogen (Carlsbad, California, USA)
pcDNA3.1-CIR1	pcDNA3.1(+), dessen Insert für den synthetischen CIR1 kodiert	Diese Arbeit
pcDNA3.1-CIR2	pcDNA3.1(+), dessen Insert für den synthetischen CIR2 kodiert	Diese Arbeit
pcDNA3.1-CIR3	pcDNA3.1(+), dessen Insert für den synthetischen CIR3 kodiert	Diese Arbeit
pMOWS-(puro)-GFP	Expressionsplasmid für retrovirale Transduktion von Säugierzellen. Enthält Resistenzgene für die Selektion mittels Ampicillin und Puromycin	(Ketteler <i>et al.</i> 2002)
pMOWS-CIR1	pMOWS, dessen Insert für den synthetischen CIR1 kodiert	Diese Arbeit
pMOWS-CIR2	pMOWS, dessen Insert für den synthetischen CIR2 kodiert	Diese Arbeit
pMOWS-CIR3	pMOWS, dessen Insert für den synthetischen CIR3 kodiert	Diese Arbeit

pZDonor-Bluerflirt	Expressionsvektor für die Generierung einer transgenen <i>Knock-in</i> Maus, dessen Insert für <i>Blue Fluorescent Protein</i> (BFP) kodiert	(Kasperek <i>et al.</i> 2014)
pZDonor-CIR2	Expressionsvektor für die Generierung einer transgenen <i>Knock-in</i> Maus, dessen Insert für CIR2 kodiert	Diese Arbeit

2.1.11 Programme und Internetseiten

In dieser Arbeit wurden folgende Programme und Internetseiten verwendet:

Amira Software (FEI, Thermo Fisher Scientific, Oregon, USA)

Biacore X100 Evaluation Software Version 2.0.1 (GE Healthcare, Freiburg)

Caliper Software (Caliper Life Science, Hopkinton, MA, USA)

ChemoStar Professional (INTAS, Göttingen)

EndNote X7 (Thomas Reuter, Carlsbad, CA, USA)

Expression Console Software (Affymetrix, Freiburg)

Flowing Software 2 (Turku Bioimaging, Turku, Finnland)

GraphPad Prism (GraphPad, La Jolla, CA, USA)

<http://www.genome.jp/tools/clustalw/>

Microsoft Office 2013

pDRAW32 DNA Analysis Software

PyMOL (Richardson Lab, Duke University, NC, USA)

Software FCS4Express (De Novo Software, CA, USA)

Transcriptome Analysis Console 3.0 (Affymetrix, Freiburg)

2.1.12 Puffer und Lösungen

In dieser Arbeit wurden folgende Puffer und Lösungen verwendet:

Blocking Puffer, Milch (Western Blot)	5% Milchpulver in TBS-T
------------------------------------------	-------------------------

Blocking Puffer, BSA (Western Blot)	5% BSA in TBS-T
----------------------------------------	-----------------

Blocking Puffer (ELISA)	5% Sucrose 1% BSA in PBS
----------------------------	--------------------------------

Material und Methoden

DNA-Probenpuffer 6x für Agarosegele	30% (m/V) Glycerol in TAE-Puffer 50 mM EDTA 0,25% Organge-G
FACS-Puffer Lämmli-Puffer 5x (SDS-PAGE)	0,5% BSA in TBS-T 10% (m/V) SDS 5% (m/V) β -Mercaptoethanol 50% (m/V) Glycerol 125 mM Tris-HCL (pH 6,8) 1 Spatelspitze Bromphenolblau
Gewebelysispuffer	50 mM Tris-HCl 150 mM NaCl 2 mM EDTA 2 mM NaF 1 mM Na_3VO_4 1% (V/V) Nonidet P40 1% (V/V) Triton X-100 1 Tablette Complete Protease Inhibitor Cocktail
HBS-P ⁺ Puffer	10 mM HEPES (pH 7,4) 150 mM NaCl 0,05% (V/V) <i>surfactant</i> P20
Mild Lysis Puffer	150 mM NaCl 2 mM EDTA 50 mM Tris-HCl (pH 7,4) 1% (m/V) Triton X-100 1% (m/V) NP-40 1 mM Na_3VO_4 1 mM NaF 1 Tablette Complete Protease Inhibitor Cocktail
Paraformaldehyd (PFA)	1% (m/V) Paraformaldehyd in PBS

Material und Methoden

Phosphate Buffered Saline (PBS)	1,5 mM KH_2PO_4 2,7 mM KCl 8,1 mM Na_2HPO_4 137 mM NaCl (pH 7,4)
PBS-T	0,05% (V/V) Tween-20 in PBS
Sammelgelpuffer	0,5 M Tris-HCl (pH 6,8) 0,4% (m/V) SDS
SDS-Laufpuffer (SDS-PAGE)	25 mM Tris-HCl (pH 8,3) 192 nM Glycin 0,1 % (m/V) SDS
S1-Puffer (DNA Mini-Präparation)	50 mM Glukose 25 mM Tris-HCl (pH 8,0) 100 mM EDTA (pH 8,0) 100 mM RNase Gelagert bei 4°C
S2-Puffer (DNA Mini-Präparation)	200 mM NaOH 1% (m/V) SDS
S3-Puffer (DNA Mini-Präparation)	60 ml 5 M Kaliumacetat 11,5 ml 99,9%ige Essigsäure 28,5 ml H_2O Gelagert bei 4°C
Stripping Puffer (Western Blot)	62,5 mM Tris-HCl (pH 6,8) 2% (m/V) SDS 0,1% β -Mercaptoethanol
TAE-Puffer	40 mM Tris-HCl (pH 8,0) 10 mM EDTA 0,2 M Essigsäure ad 1000 ml H_2O

Material und Methoden

Transferpuffer	250 mM Tris-HCl (pH 8,0) 192 mM Glycerin 0,01% (m/V) SDS 20% Methanol
Trenngelbuffer	1,5 M Tris-HCl (pH 8,0) 0,4% SDS
Tris Buffered Saline (TBS)	10 mM Tris-HCl (pH 8,0) 150 mM NaCl
TBS-T	0,05% (V/V) Tween-20 in PBS

2.1.13 Rekombinante Proteine

Die in dieser Arbeit verwendeten rekombinanten Proteine sind in Tabelle 2.8 aufgelistet.

Tabelle 2.8: Verwendete rekombinanten Proteine

Proteine	Herkunft
IL-6	Conaris Research Institute AG, Kiel
sIL-6R	Conaris Research Institute AG, Kiel
Hyper-IL-6	Conaris Research Institute AG, Kiel
Sgp130Fc	Conaris Research Institute AG, Kiel
GFP	Hergestellt im Institut für Biochemie und Molekularbiologie II, medizinische Fakultät, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (s. Abschnitt 2.2.2.4).
VHH6	Hergestellt im Institut für Biochemie und Molekularbiologie II, medizinische Fakultät, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf. Beschrieben in (Adams <i>et al.</i> 2017).

2.1.14 Verbrauchsmaterial

Die in dieser Arbeit verwendeten Verbrauchsmaterialien sind in Tabelle 2.9 aufgelistet.

Tabelle 2.9: Verwendete Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterial	Hersteller
5 mm Stahlkugel (Stainless Steel Beads)	Qiagen, Hilden
Aldehyde/Sulfate Latex-Beads 20 nm, 100 nm und 4 µm Durchmesser (4% w/v)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
BD Falcon 5ml Polystyrene Round-Bottom Tube	BD Bioscience Discovery Labware, Bedford, MA, USA
BD-Falcon Cell Strainer (Nylonsieb mit 40 µm Siebdurchmesser)	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
BD Vacutainer 6 ml Serum/CAT Blood Collection Tubes (13 x 100 mm)	BD Bioscience Discovery Labware, Bedford, MA, USA
Biacore Sensor Chip CM5	GE Healthcare, Freiburg
Einmalspitzen	B.Braun, Melsungen
Eppendorf Tubes (1,5 und 2 ml)	Eppendorf AG, Hamburg
Falcon Röhrchen (15 und 50 ml)	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
Handschuhe Nitra-Tex	Ansell Healthcare, Brüssel, Belgien
Kryoröhrchen	VWR, Randor, USA
Mikrotiterplatte ELISA (96-Well)	Nunc A/S, Roskilde, Dänemark
PCR-Reaktionsgefäße	Eppendorf AG, Hamburg
PVDF-Membran (Porengröße 0,45 µm)	Carl Roth GmbH + Co, KG, Karlsruhe
Safety-Multifly-Kanüle (0,8 x 19 mm)	Sarstedt AG & Co, KG, Nümbrecht
Sterilpipetten Costar Stripette	Corning Incorporated, Coming, USA
TC10 System Counting Slides Dual Chamber	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Zellkulturschalen	TPP, Trasadingen, Schweiz
Whatman-Papier	VWR International GmbH, Darmstadt

2.1.15 Zelllinien

Der in dieser Arbeit verwendete *E.coli*-Stamm ist in Tabelle 2.10 aufgelistet.

Tabelle 2.10: Verwendeter *E.coli*-Stamm

Stamm	Genotyp
XL-1 Blue	recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac [F'proAB lacIqZΔM15 Tn10 (TetR)]

Die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien sind in Tabelle 2.11 aufgelistet.

Tabelle 2.11: Verwendete Zelllinien

Zelllinie	Beschreibung
Ba/F3-gp130	Murine prä-B-Zelllinie, die mit der cDNA für humanes gp130 stabil transduziert wurde. Beschrieben in (Fischer <i>et al.</i> 1997). Die Proliferation der Zelllinie ist abhängig von humanem IL-6 und löslichem IL-6R bzw. Hyper-IL-6.
Ba/F3-gp130-IL-6R	Ba/F3-gp130-Zellen wurden stabil mit der cDNA für den humanen IL-6R transduziert. Beschrieben in Vollmer <i>et al.</i> , 1999. Können in Abhängigkeit von humanem IL-6 und löslichem IL-6R bzw. Hyper-IL-6 wachsen. Ursprung: Masterarbeit Paul Baran 2013.
Ba/F3-gp130-CIR1	Ba/F3-gp130 Zellen, die in dieser Arbeit stabil mit der cDNA für den synthetischen CIR1 Rezeptor transduziert wurden. Können in Abhängigkeit von humanem IL-6 und löslichem IL-6R bzw. Hyper-IL-6 wachsen.
Ba/F3-gp130-CIR2	Ba/F3-gp130 Zellen, die in dieser Arbeit stabil mit der cDNA für den synthetischen CIR2 Rezeptor transduziert wurden. Können in Abhängigkeit von humanem IL-6 und löslichem IL-6R bzw. Hyper-IL-6 wachsen.
Ba/F3-gp130-CIR3	Ba/F3-gp130 Zellen, die in dieser Arbeit stabil mit der cDNA für den synthetischen CIR3 Rezeptor transduziert wurden. Können in Abhängigkeit von humanem IL-6 und löslichem IL-6R bzw. Hyper-IL-6 wachsen.
COS-7	SV40-transformierte Nierenfibroblasten aus der grünen Meerkatze (<i>Cercopithecus aethiops</i> , ATCC-Nummer: CRL-1651).
CHO-K1	Ovarien Zellen, die aus einer Biopsie der Ovarien eines adulten chinesischen Hamsters aus dem Jahr 1957 stammen und immortalisiert wurden (DSMZ, Braunschweig, ACC 110).
CHO-K1-CIR1	CHO-K1 Zellen, die stabil mit der cDNA für den synthetischen CIR1 Rezeptor transfiziert wurden. Zur Verfügung gestellt von Pascal Bouvain (Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf).
CHO-K1-CIR2	CHO-K1 Zellen, die stabil mit der cDNA für den synthetischen CIR2 Rezeptor transfiziert wurden. Zur Verfügung gestellt von Pascal Bouvain (Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf).
CHO-K1-CIR3	CHO-K1 Zellen, die stabil mit der cDNA für den synthetischen CIR3 Rezeptor transfiziert wurden. Zur Verfügung gestellt von Pascal Bouvain (Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf).
Phönix-Eco	Verpackungszelllinie (HEK293T), stabil transfiziert mit einer cDNA die Antigen, Hüllenprotein und Polymerase für Ecotrope murine Retroviren kodiert (Ketteler <i>et al.</i> 2002). Zur Verfügung gestellt von Garry P. Nolan (Stanford University, Palo Alto, CA, USA).

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 Bakterienkultivierung

Bakterienzellen wurden bei 37°C in LB-Medium oder auf LB-Agar-Platten kultiviert. Zur entsprechenden Selektion der Bakterienzellen wurde dem LB-Medium bzw. Agar-Platten 100 µg/ml Ampicillin zugesetzt. Flüssigkulturen wurden auf einem Schüttler bei 900 rpm kultiviert, damit eine gute Sauerstoffversorgung gewährleistet wird. Die Kultivierung von LB-Agar-Platten erfolgte im Inkubator.

2.2.1.2 Bestimmung von DNA- und RNA-Konzentrationen

DNA- und RNA-Konzentrationen wurden spektrometrisch unter Verwendung eines NanoDrop ND-2000 bestimmt. Zur Reinheitsbestimmung der DNA wurde das Absorptionsverhältnis A260/280 und A230/260 bestimmt, wobei für eine saubere DNA-Probe die Werte zwischen 1,8 und 2,0 als angemessen galten. Bei RNA war das Verhältnis von ca. 2,0 angemessen.

2.2.1.3 DNA-Gelelektrophorese

DNA-Fragmente wurden unter Verwendung von Agarosegelen (1-2% in Abhängigkeit zur Größe der DNA-Fragmente) in horizontalen Elektrophoresekammern der Größe nach voneinander getrennt und nachgewiesen. 100 ml TAE-Puffer wurden mit der entsprechenden Menge Agarose in der Mikrowelle aufgekocht und mit 2,5 µl HD Green zugesetzt. Vor dem Laden der DNA auf Agarosegele, wurde die aufgekochte Agarose auf einen Schlitten gegossen, erkalten lassen und die Probe wurde mit DNA-Ladepuffer (6x) versetzt. Bei einer Spannung von 100 V wurde die Gelelektrophorese durchgeführt und die Dokumentation der Gele erfolgte unter Verwendung eines INTAS iX Imager.

2.2.1.4 DNA-Extraktion aus Agarosegelen

Zur Isolierung von DNA, die mittels Restriktionsenzyme fragmentiert wurde, wurde die verwendete Probe, wie in Abschnitt 2.2.1.3 beschrieben, mittels Gelelektrophorese der Größe nach voneinander getrennt und die entsprechenden DNA-Fragmente wurden auf einem UV-Tisch bei einer Wellenlänge von 365 nm visualisiert. Im Anschluss wurden die Fragmente sauber mit einem Skalpell aus dem Agarosegel isoliert und in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurden die DNA-Fragmente mit dem Kit NucleoSpin Extract II isoliert und gereinigt.

2.2.1.5 Dephosphorylierung von Plasmid-DNA

Der linearisierten Plasmid-DNA wurde 1 U Fast-AP im entsprechenden Puffer zugegeben, damit eine Ligation des 5'- und 3'-Endes vermieden wurde. Die Dephosphorylierung der

Plasmid-DNA erfolgte bei 37°C für 30 min. Die Reaktion wurde durch Zugabe von DNA-Ladepuffer (6x) abgestoppt.

2.2.1.6 Enzymatische Spaltung von DNA

Restriktionsenzyme wurden verwendet, um eine Spaltung bzw. Fragmentierung bei Plasmid-DNA und PCR-Produkten durchzuführen. 10 µg Plasmid-DNA wurden für Klonierungen verwendet und mit 10 U des entsprechenden Restriktionsenzym, im vorgegebenen Reaktionspuffer, versetzt und auf ein Gesamtvolumen von 50 µl mit dH₂O aufgefüllt. Hierbei erfolgte die Spaltung der DNA bei 37°C über Nacht und die Reaktion wurde am Folgetag durch Zugabe von DNA-Ladepuffer (6x) gestoppt. Wie in Abschnitt 2.2.1.3 und Abschnitt 2.2.1.4 beschrieben, wurde die DNA elektrophoretisch der Größe nach voneinander getrennt und isoliert. Bei PCR-Produkten, die für eine Ligation (s. Abschnitt 2.2.1.8) vorgesehen waren, wurde analog verfahren.

Für analytische Arbeiten wurde 1 µg Plasmid-DNA aus einer Mini-Präparation in einem Gesamtvolumen von 10 µl verwendet. Die Inkubation mit Restriktionsenzymen erfolgte für mindestens 2 h oder über Nacht bei 37°C. Wenn die Verwendung von zwei Restriktionsenzymen zeitgleich notwendig war, wurde der vom Hersteller empfohlene Puffer verwendet, bei dem die höchste Aktivität beider Restriktionsenzyme vorliegt.

2.2.1.7 Herstellung eines pMOWs-Vektors für retrovirale Transduktion

Für alle retroviralen Transduktionen von Ba/F3-gp130-Zellen mussten die entsprechenden cDNAs in pMOWs-Vektoren subkloniert werden. Hierzu wurden 10 µg Plasmid-DNA pMOWs-(Puromycin)-GFP oder pMOWs-(Hygromycin)-GFP (Ketteler *et al.* 2002) verwendet und mit 5 U BamHI und 5 U EcoNI, sowie mit der entsprechenden Menge BamHI-Puffer, versetzt und für 3 h bei 37°C inkubiert. Dieser Schritt war notwendig, um die in den Plasmiden enthaltene cDNA für GFP herauszuschneiden. Die Restriktionsenzyme wurden im Anschluss für 20 min bei 95°C hitzeinaktiviert. Die Spaltprodukte wurden mittels Gelelektrophorese (s. Abschnitt 2.2.1.3) auf einem 1%igen Agarosegel der Größe nach voneinander getrennt. Von den beiden visualisierten Fragmenten wurde das mit der Größe von 5721 bp isoliert und gereinigt. Darauffolgend wurde vom isolierten Fragment 25 µl mit 3 µl 10x Klenow-Puffer, 0,5 µl 2 mM dNTP-Mix und 5 U Klenow-Fragment versetzt und auf ein Gesamtvolumen von 30 µl mit dH₂O aufgefüllt. Die Reaktion mit dem Klenow-Fragment erfolgte für 10 min bei 37°C und anschließend erfolgte eine Hitzeinaktivierung für 10 min bei 95°C. Um eine Religation des Fragmentes zu verhindern, wurde eine Dephosphorylierung der 5'- und 3'-DNA-Enden durchgeführt (s. Abschnitt 2.2.1.5). Die für die Subklonierung entsprechenden Inserts wurden mittels PmeI (MssI) Behandlung enzymatisch gespalten. Dieser Vorgang, sowie die Verwendung des Klenow-Fragmentes für die linearisierten pMOWs-Vektoren, führt zu glatten Enden der DNA, sogenannte *blunt ends*, wodurch eine Ligation des Inserts in die pMOWs-

Vektoren ermöglicht wird (s. Abschnitt 2.2.1.8). Im Anschluss wurde eine Testspaltung mit einem Restriktionsenzym durchgeführt, damit die richtige Orientierung des Inserts überprüft werden konnte. Hierbei wurde darauf geachtet, dass das Restriktionsenzym jeweils einmal im Vektor und im Insert schneidet. Abschließend erfolgte die Sequenzierung der Plasmide bei SeqLab-Sequence Laboratories Göttingen GmbH. Hierzu wurden die Primer „pMOWS fwd oder rev“ verwendet (s. Abschnitt 2.1.9, Tabelle 2.6)

2.2.1.8 Ligation von DNA-Fragmenten

Um eine Ligation von *sticky-end*-Klonierungen durchzuführen, wurde das enzymatisch gespaltene Insert in einem 3:1 Verhältnis zum linearisierten und dephosphorylierten Zielvektor eingesetzt, zusammen mit 1 U T4 Ligase im entsprechenden Reaktionspuffer und mit dH₂O auf 20 µl aufgefüllt. Die Inkubation der Ligation erfolgte für 1 h bei Raumtemperatur. Bei *blunt-end* Ligationen wurde 2 U T4 Ligase und 2 µl einer 50%igen (m/v) PEG4000-Lösung eingesetzt. Die Inkubation der Reaktion erfolgte über Nacht bei 4°C.

2.2.1.9 Midi-Präparation von Plasmid-DNA

Für die Isolierung von größeren Mengen an Plasmid-DNA wurden 100 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzt und mit einer Einzelkolonie von einer LB-Agar-Platte angeimpft. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37°C bei 120 rpm in einem Schüttler. Am darauffolgenden Tag wurde die Bakterienkultur bei 4000 rpm, 4°C für 10 min pelletiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen und es erfolgte die Isolation der Plasmid-DNA unter Verwendung des Kits NucleoBond Xtra Midi, nach Herstellerangaben. Abschließend wurde die Plasmid-DNA in 100 µl gelöst und die DNA-Konzentration wurde, wie in Abschnitt 2.2.1.2 beschrieben, bestimmt.

2.2.1.10 Mini-Präparation von Plasmid-DNA

Für die Isolierung von kleineren Mengen von Plasmid-DNA wurden 2 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzt und mit einer Einzelkolonie von einer LB-Agar-Platte angeimpft. Die Inkubation erfolgte bei 900-1000 rpm über Nacht bei 37°C in einem Schüttler. Am darauffolgenden Tag wurde die Bakterienkultur mittels Zentrifugation pelletiert (13000 rpm, 5 min, 4°C) und der Überstand wurde verworfen. Das Bakterienpellet wurde im Anschluss in 100 µl S1-Puffer resuspendiert und im Anschluss wurden 200 µl S2-Puffer zugegeben. Nach vier bis sechsmaligen invertieren des Reaktionsgefäßes erfolgte die Zugabe von 150 µl eiskaltem S3-Puffer und eine Inkubation der Suspension für 10 min auf Eis. Die Suspension wurde im Anschluss bei 13000 rpm für 10 min und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues 2 ml Reaktionsgefäß überführt, mit 900 µl eiskaltem 100%igen Ethanol versetzt und gevortext. Nach anschließender Zentrifugation (13000 rpm, 15 min, 4°C) wurde die pelletierte DNA mit 500 µl 70%igen Ethanol gewaschen (13000 rpm, 5 min, 4°C), der Überstand wurde

verworfen, das DNA-Pellet bei 30°C getrocknet und zum Abschluss in 20 µl dH₂O resuspendiert. Die DNA-Konzentration wurde, wie in Abschnitt 2.2.1.2 beschrieben, bestimmt.

2.2.1.11 Polymerase-Kettenreaktion (PCR, *polymerase chain reaction*)

Um DNA-Sequenzen spezifisch zu amplifizieren, wurde die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) verwendet. Dies wurde unter Verwendung eines PCR-Thermal Cyclers durchgeführt. Für nachfolgende Klonierungen wurde die Pfu-Polymerase, aufgrund der 3' zu 5' Korrekturlesefunktion (*proof-reading*), verwendet. Für die PCR-Reaktion wurde zwischen 100-900 ng Plasmid-DNA als Template verwendet, zusammen mit jeweils 10 µM 5'- und 3'-Primer, 5 µl 10x Pfu-Polymerase-Puffer mit MgSO₄ (20 mM), 10 mM dNTP-Mix und 1 U Pfu-Polymerase.

Für die PCR wurde folgendes Programm verwendet:

	95°C	3 min	
Denaturierung	95°C	30 sec	} 35 Zyklen
Annealing	55°C	30 sec	
Elongation	72°C	2 min/kb	
	72°C	10 min	
	4°C	∞	

Die Annealing-Temperatur, als auch die Elongationszeit, wurde entsprechend des GC-Gehaltes der Primer und nach Länge des Fragmentes angepasst.

2.2.1.12 Sequenzierung von Plasmid-DNA

Um zu gewährleisten, dass die DNA-Sequenz von selbst klonierten und amplifizierten Plasmiden vollständig mit der geplanten Sequenz übereinstimmt, wurden eine Sequenzierung bei der Firma SeqLab-Sequence Laboratories Göttingen GmbH durchgeführt. Hierzu wurde für pcDNA.3.1-Plasmide die Primer „pcDNA3.1 fwd oder rev“ und für pMOWs-Plasmide die Primer „pMOWs fwd oder rev“ verwendet (s. Abschnitt 2.1.9, Tabelle 2.6).

2.2.1.13 Transformation von *E.coli*-Zellen mit Plasmid-DNA

Für die Transformation von Plasmid-DNA wurden 30 µl chemisch kompetente XL-1 Blue *E.coli* Zellen verwendet. Das Auftauen der Zellen erfolgte für 15 min auf Eis, mit anschließender Zugabe von 1 µl Plasmid-DNA bei Retransformationen oder mit 1-5 µl bei Ligationsansätzen und 5 min Inkubation auf Eis. Darauf erfolgte ein Hitzeschock für 45 sec bei 42°C, mit darauffolgender Zugabe von 500 µl aufgewärmten LB-Medium (ohne Antibiotikum) und eine Inkubation von 1 h bei 37°C im Thermoblock (900-1000 rpm). Zuletzt wurden 50-500 µl

Bakteriensuspension auf eine LB-Agar-Platte (mit entsprechendem Antibiotikum) ausplattiert und bei 37°C über Nacht inkubiert.

2.2.2 Proteinbiochemische Methoden

2.2.2.1 Bestimmung des Gesamtproteingehalts mittels BCA

Ein BCA Protein Assay Kit von Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) wurde laut Herstellerangaben für die Bestimmung des Gesamtproteingehalts von Zelllysaten verwendet. Dies erfolgte durch eine Doppelbestimmung von Proben die in einem 1:10 oder 1:20 Verhältnis mit Wasser verdünnt wurden. Jeweils 25 µl/Well Probe wurde auf eine 96-Well-Mikrotiterplatte aufgetragen. Verschiedene BSA-Konzentrationen wurden laut Herstellerangaben als Eichgerade verwendet. Nach Zugabe von Reagenz A und B, gemischt in einem 50:1 Verhältnis, erfolgte eine Inkubation für 30 min bei 37°C. Abschließend wurde die Absorption bei 562 nm mittels Infinite M200 PRO Reader bestimmt. Anhand der BSA Eichgerade wurde die Proteinkonzentration bestimmt.

2.2.2.2 Durchflusszytometrie

Um die Expression von Zelloberflächenproteinen, als auch die Bindung bzw. Internalisierung von GFP, nachzuweisen, wurde die Durchflusszytometrie verwendet. Der Nachweis der Oberflächenproteinexpression von Proteinen und der Bindung bzw. Internalisierung von GFP wurde mit transduzierten Ba/F3-gp130 Zellen (s. Abschnitt 2.2.3.6) und mit transient transfizierten COS-7 Zellen (s. Abschnitt 2.2.3.5) durchgeführt.

Adhärente COS-7 Zellen wurden mit PBS/2,5 mM EDTA abgelöst, zentrifugiert (1200 rpm, Raumtemperatur) und in PBS resuspendiert. Im Anschluss wurde die Zellzahl pro ml bestimmt (s. Abschnitt 2.2.3.8). Analog dazu wurden Ba/F3-gp130 Zellen zentrifugiert (1500 rpm, Raumtemperatur), in PBS resuspendiert und die Zellzahl pro ml wurde bestimmt (s. Abschnitt 2.2.3.8).

Für den Nachweis von Zelloberflächenproteinen wurden jeweils 5×10^5 Zellen eingesetzt, einmal in PBS gewaschen und zentrifugiert (1500 rpm, 5 min, Raumtemperatur). Folgend wurden die Zellen mit 500 µl FACS-Puffer gewaschen und zentrifugiert (300 g, 5 min, 4°C). Das Zellpellet wurde im Anschluss in 100 µl FACS-Puffer resuspendiert und mit dem entsprechenden α -Myc-Tag Primärantikörper (71D10) in einem 1:100 Verhältnis für 1 h auf Eis inkubiert. Um nicht gebundenen Primärantikörper zu entfernen, wurden die Proben anschließend dreimal mit 500 µl FACS-Puffer gewaschen und zentrifugiert (300 g, 5 min, 4°C). Das Zellpellet wurde wieder in 100 µl FACS-Puffer resuspendiert und unter Lichtausschluss mit 0,5 µg/ml sekundärem Antikörper (Alexa-Fluor 488, α -rabbit) für 1 h auf Eis inkubiert. Um tote Zellen bei der Analyse auszuschließen, wurden die Proben mit DAPI (Endkonzentration 1

$\mu\text{g/ml}$) gefärbt. Folgend wurden die Zellen dreimal mit 500 μl FACS-Puffer gewaschen (300 g, 5 min, 4°C), in 500 μl FACS-Puffer resuspendiert und in FACS-Röhrchen (BD Falcon 5 ml Polystyrene Round Bottom Tube) überführt.

Um die Bindung bzw. Internalisierung von GFP zu untersuchen, wurden 1×10^6 Zellen in 1ml DMEM/- mit 1 $\mu\text{g/ml}$ GFP für 5-180 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Proben zentrifugiert (300 g, 5 min, 4°C) und dreimal mit eiskaltem FACS-Puffer gewaschen. Das Zellpellet wurde in 500 μl FACS Puffer aufgenommen und in FACS-Röhrchen überführt. Die Analyse der Zellen wurde mit einem BD FACS Canto II durchgeführt und die Auswertung der Daten erfolgte mit der Flowing Software 2 oder FCS4Express.

2.2.2.3 Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (ELISA)

2.2.2.3.1 Interleukin-6 Rezeptor ELISA

Für die quantitative Bestimmung von rekombinatem sIL-6R, sowie endogenem sIL-6R, wurde ein sogenannter Sandwich ELISA verwendet. Hierzu wurde im ersten Schritt der Primärantikörper gegen den humanen IL-6R (4-11, Stocklösung 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) in PBS verdünnt (1:1000) und jeweils 50 $\mu\text{l}/\text{Well}$ wurden auf eine 96-Well-Mikrotiterplatte pipettiert. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei Raumtemperatur. Nicht gebundener Primärantikörper wurde am folgenden Tag durch dreimaliges Waschen mit je 200 $\mu\text{l}/\text{Well}$ PBS-T entfernt und über eine zweistündige Inkubation (Raumtemperatur) mit 200 $\mu\text{l}/\text{Well}$ Blocking Puffer wurden nicht besetzte Bindungsstellen abgesättigt. Anschließend wurden die entsprechenden Wells dreimal mit PBS-T gewaschen und Proben wurden direkt, oder in 1% BSA in PBS verdünnt, aufgetragen. Um eine Quantifizierung der Proben durchführen zu können, wurde ein Standard, bestehend aus rekombinatem sIL-6R, mit aufgetragen. Für die Standardreihe wurden Konzentrationen in einer Verdünnungsreihe von 1:1 (2000 pg/ml bis 31,25 pg/ml) verwendet. Proben wurden für 2 h bei Raumtemperatur auf der 96-Mikrotiterplatte inkubiert und nicht gebundenes Protein wurde im Anschluss durch drei Waschschrte mit 200 $\mu\text{l}/\text{Well}$ PBS-T entfernt. Anschließend erfolgte die Zugabe von 50 $\mu\text{l}/\text{Well}$ des Detektionsantikörpers BAF227 (Stocklösung 0,4 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 1:1000 verdünnt in 1% BSA in PBS) und eine Inkubation von 2 h bei Raumtemperatur. Nicht gebundener Detektionsantikörper wurde durch dreimaliges Waschen mit 200 $\mu\text{l}/\text{Well}$ PBS-T entfernt und 100 $\mu\text{l}/\text{Well}$ Streptavidin-POD Lösung (1:200 verdünnt in 1% BSA in PBS) wurde aufgetragen. Nach einer Inkubation von 30-45 min unter Lichtausschluss und bei Raumtemperatur erfolgte ein dreimaliges Waschen mit 200 $\mu\text{l}/\text{Well}$ PBS-T. Abschließend wurden 75 μl POD-Substrat pro Well aufgetragen und für maximal 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Durch Zugabe von 75 $\mu\text{l}/\text{Well}$ 1,8 M H_2SO_4 wurde die Reaktion gestoppt. Die Messung erfolgte kolorimetrisch an einem Infinite M200 PRO Reader bei 450 nm.

2.2.2.3.2 IL-6 ELISA

Die Quantifizierung von humanem IL-6 in Blutserum erfolgte unter Verwendung des IL-6 Human ELISA Kits (KHC0061) nach Herstellerangaben. Die Messung erfolgte kolorimetrisch an einem Infinite M200 PRO Reader bei 450 nm.

2.2.2.3.3 IL-6/sIL-6R Komplex-ELISA

Die Menge an humanen IL-6/sIL-6R Komplexen wurde unter Verwendung des Human IL-6/IL-6R α Complex DuoSet ELISA Kits (DY8139) nach Herstellerangaben quantifiziert. Das ELISA Kit wurde in Kombination mit dem DuoSet ELISA Ancillary Reagent Kit 2 (DY008) verwendet, indem die 96-Wells, sowie standardisierte Puffer für die Versuchsdurchführung enthalten waren. Entsprechende Mengen an rekombinantem IL-6 und sIL-6R wurden in 1 ml 1% BSA in PBS kombiniert und die Inkubation erfolgte für 1 h bei Raumtemperatur unter ständiger Durchmischung. Für die Analyse von IL-6/sIL-6R Komplexen, mit rekombinantem IL-6 und endogenem sIL-6R, wurden 500 μ l Serum mit einer entsprechenden Menge an IL-6 versetzt und für 1 h bei Raumtemperatur unter ständiger Durchmischung inkubiert. Anschließend wurde 100 μ l Proben pro Well aufgetragen und analysiert. Die Inkubation des Substrates erfolgte für maximal 20 min bei Raumtemperatur, bevor die Reaktion durch Zugabe der Stop-Solution gestoppt wurde. Die Messung erfolgte kolorimetrisch an einem Infinite M200 PRO Reader bei 450 nm.

2.2.2.3.4 Sgp130 ELISA

Für die Quantifizierung von humanem endogenen sgp130 wurde das Human sgp130 DuoSet ELISA Kit (DY228) nach Herstellerangaben verwendet. Das ELISA Kit wurde in Kombination mit dem DuoSet ELISA Ancillary Reagent Kit 2 (DY008) verwendet, indem die 96-Wells, sowie standardisierte Puffer für die Versuchsdurchführung enthalten waren. Die Messung erfolgte kolorimetrisch an einem Infinite M200 PRO Reader bei 450 nm.

2.2.2.4 Expression und Reinigung von GFP

Für die Expression von rekombinantem *Green Fluorescent Protein* (GFP) wurde der *E.coli* Stamm BL21-pLysS verwendet, der mit der pQE-GFP Plasmid-DNA transformiert (s. Abschnitt 2.2.1.13) wurde. Hierzu wurden zwei Liter LB-Medium (mit 100 μ g/ml Ampicilin und 34 μ g/ml Chloramphenicol) mit den transformierten BL21-pLysS *E.coli* angeimpft und unter 120 rpm bei 37°C inkubiert, bis eine OD_{600nm} von 0,6-0,9 vorlag. Anschließend wurden der Bakteriensuspension 1 mM IPTG hinzugefügt, wodurch die Proteinexpression induziert wurde. Die Bakterienzellen wurden nach 5 h Inkubation bei 37°C geerntet (5000 g, 30 min, 4°C). Der Überstand wurde verworfen, das Bakterienpellet wurde in PBS resuspendiert und der Zellaufschluss erfolgte mechanisch mittels M-110S Microfluidizer. Die Lysate wurden zentrifugiert (20000 g, 20 min, 4°C), um Zelltrümmer zu entfernen. Aus dem Überstand wurde

das GFP gereinigt. Aufgrund des Vorhandenseins einer C-terminalen Hexa-Histidine Sequenz im GFP wurde die Reinigung mittels Affinitätschromatographie (IMAC) durchgeführt.

2.2.2.5 Isolierung von humanem Blutserum

Für die Isolierung von humanem Blutserum wurde gesunden und freiwilligen Probanden Vollblut entnommen. Die Blutentnahme erfolgte durch ärztliches oder ärztlich geschultes Personal, indem eine Venenpunktion mit einer Safety-Multifly-Kanüle durchgeführt wurde. Die Isolierung des Serums erfolgte, indem das BD Vacutainer System mit CAT Blood Collection Röhrchen verwendet wurde. Nachdem das Vollblut in die Röhrchen eingeflossen war, wurde es fünf bis sechsmal invertiert und für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde der Serumanteil mittels Zentrifugation isoliert (1300 g, 10 min, 4°C), von den festen Blutbestandteilen (Erythrozyten, Leukozyten und Thrombozyten) isoliert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung des Serums erfolgte bei -80°C, bis es für Versuche verwendet wurde. Alle Probanden haben im Vorfeld eine Probandeninformation gelesen und eine Probandeneinwilligungserklärung unterschrieben. Die Isolierung und Verwendung von humanem Serum wurde zuvor von der Ethikkommission der medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität genehmigt (Studiennummer: 5829R; Registrierungs-ID: 2017-03-4162).

2.2.2.6 Isolierung von endogenem sgp130 aus humanen Serum

Für die Isolierung von endogenem sgp130 aus Serum wurde eine Immunpräzipitation durchgeführt. Hierzu wurden 20 ml Serum von einem gesunden Probanden isoliert (s. Abschnitt 2.2.2.5) und in je zwei Fraktionen von 10 ml aufgeteilt (s. Abbildung 3.8). Für die Präzipitation wurde pro ml Serum jeweils 50 µl Protein A-Agarose Beads (Gesamtvolumen 500 µl) eingesetzt, die am Vortag viermal in 1 ml PBS gewaschen (300 g, 5 min, 4°C) wurden. Der Überstand wurde anschließend verworfen und die Protein A-Agarose Beads wurden in 1,5 ml PBS resuspendiert. Dann erfolgte die Zugabe von 0,5 µg α -humaner-gp130 Antikörper (BR-3) pro 50 µl Beads und der Ansatz inkubierte über Nacht bei 4°C bei ständiger Durchmischung. Am folgenden Tag wurde ungebundener Antikörper durch viermaliges Waschen entfernt (300 g, 5 min, 4°C). Der Überstand wurde verworfen, die gekoppelten Protein A-Agarose Beads wurden in 10 ml Serum resuspendiert und für 4 h bei 4°C unter ständiger Durchmischung inkubiert, damit das endogene sgp130 an die gekoppelten Beads binden konnte. Abschließend wurde das Serum von den gekoppelten Protein A-Agarose Beads mittels Zentrifugation getrennt (300 g, 10 min, 4°C). Die Konzentrationen von sgp130 und sIL-6R wurden mittels ELISA im sgp130-depletierten und -enthaltenden Serum bestimmt (s. Abschnitt 2.2.2.3).

2.2.2.7 Kopplung von GFP an Latex-Beads

Aldehyd-Sulfate Latex-Beads mit unterschiedlichen Durchmessern von 20 nm, 100 nm und 4 µm, wurden für die Kopplung mit GFP verwendet. Hierzu wurden 40 µg GFP in 500 µl PBS mit 100 µl Latex-Beads über Nacht bei 4°C inkubiert. Am folgenden Tag wurde dem Reaktionsansatz 1 ml 5% BSA in PBS hinzugefügt und für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert, um reaktive Aldehydgruppen abzusättigen. Anschließend wurden die Beads zentrifugiert (20 nm: 16000 g, 30 min, 4°C; 100 nm: 16000 g, 20 min, 4°C; 4 µm: 2000 g, 5 min, 4°C) und der Überstand wurde verworfen. Die gekoppelten Latex-Beads wurden zweimal mit 1 ml 1% BSA in PBS und zweimal mit 1 ml PBS gewaschen und in 600 µl PBS aufgenommen. Die gekoppelten GFP-Latex-Beads (GFP-LBs) wurden anschließend mit einem *In Vivo Fluorescence Imaging* (IVIS) Lumina-II Imaging System auf ihre Fluoreszenz analysiert, um zu überprüfen, ob die Kopplung erfolgreich verlief. Hierzu wurden 10 µl der entsprechenden GFP-LB-Lösung auf eine Glasplatte pipettiert und mittels IVIS Spektrometer untersucht (FOV = A, GFP Excitation- und Emissions-Filter, 0,5 sec Excitation). Die Quantifizierung der Fluoreszenzintensität der GFP-LBs wurde mit der Caliper Software durchgeführt, indem die zu untersuchenden Bereiche (ROIs) der GFP-LB Lösung markiert und die *Mean Fluorescence Intensity* (MFI) gemessen wurde. Das Hintergrundsignal wurde von den gemessenen Werten der Proben subtrahiert.

2.2.2.8 Immunpräzipitation von sIL-6R mittels sgp130Fc

Für die Bestimmung der Bindekapazität von sIL-6R wurde eine Präzipitation mit IL-6, sIL-6R, sgp130Fc und Protein A-Agarose Beads durchgeführt. Je Probe wurden 50 µl Protein A-Agarose Beads verwendet, die dreimal in PBS gewaschen (300 g, 5 min, 4°C) wurden und anschließend für eine weitere Stunde in PBS inkubierten (1 h, 4°C, unter ständiger Durchmischung). Dann wurden die Protein-A-Agarose Beads pelletiert (300 g, 5 min, 4°C) und der zu untersuchenden Probe hinzugefügt. Für die Bestimmung der Bindekapazität von rekombinanten sIL-6R wurde eine Lösung mit einer Konzentration von 50 ng/ml sIL-6R erstellt und je Probe wurde 1 ml verwendet. Für die Bestimmung der Bindekapazität des endogenen sIL-6R wurden 500 µl Serum verwendet. Folgend wurde den Proben verschiedene Konzentrationen an IL-6 (1-1000 ng/ml), sowie 10 µg/ml sgp130Fc, hinzugefügt (s. Abschnitt 3.2.1 und 3.2.2) und die Proben wurden unter ständiger Durchmischung für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Zugabe der gewaschenen Protein A-Agarose Beads zu den Proben, folgte eine weitere Inkubation unter ständiger Durchmischung für 1 h bei Raumtemperatur. Danach wurde die Probe zentrifugiert (300 g, 5 min, Raumtemperatur), der Überstand wurde entnommen und die Menge an ungebundenem sIL-6R wurde mittels IL-6R ELISA bestimmt (s. Abschnitt 2.2.2.3).

2.2.2.9 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)

Eine diskontinuierliche SDS-PAGE wurde für die Trennung von Proteinen anhand ihres Molekulargewichtes verwendet. Hierzu wurden den Proben 5 x Lämmli zugesetzt. Bei 95°C für 10 min wurden die enthaltenen Proteine denaturiert. In dieser Arbeit wurden selbst gegossene Gele (Sammel- und 10%iges Trenngel), mit einer Dicke von 1,5 mm und 10 Probenkammern, verwendet. Über das Mini-PROTEAN Tetra System erfolgte die Größentrennung der Proteine bei einer Spannung zwischen 100-120 V und einem konstanten Ampere-Wert, bis die Lauffront das untere Ende des Trenngels erreicht hat. Als Größenmarker wurden 7,5 µl des PageRuler Prestained Protein Ladder verwendet.

2.2.2.10 Surface plasmon resonance (SPR) Analyse

Um die Interaktion zwischen rekombinantem IL-6 und sIL-6R zu bestimmen, wurden die gleichen Konditionen einer kürzlich publizierten Studie verwendet (Adams *et al.* 2017). Hierzu wurde rekombinantes IL-6 mittels eines Biacore X100 Plus Instruments auf einem CM5 Chip über eine Standard Amine Kopplung immobilisiert. Das Experiment wurde bei 25°C in HBS-P⁺ Puffer durchgeführt. Anschließend wurden ansteigende Konzentrationen (0-120 nM) des rekombinanten sIL-6R mit einer Flussrate von 30 µl/min auf den CM5 Chip injiziert. Hierzu wurde die Assoziation vom sIL-6R an das immobilisierte IL-6 für 180 sec beobachtet und die Dissoziation für 360 sec. Ein Einzelzyklus-Model (*single cycle model*) wurde verwendet, um die kinetischen Parameter der IL-6/sIL-6R Interaktion zu bestimmen. Die Daten wurden mit einem 1:1 Bindungsmodell, unter Verwendung der Biacore X100 Evaluation Software Version 2.0.1, berechnet. Jeder Messpunkt wurde mit einer Dreifachbestimmung ermittelt.

2.2.2.11 Western Blot

Der Nachweis von Proteinen, die mittels SDS-Page voneinander getrennt wurden, erfolgte mittels Western Blot. Hierzu wurden die Proteine vom SDS-Gel auf eine PVDF-Membran, unter Verwendung des Trans-Blot Turbo semidry Transfer Systeme, übertragen. Im Vorfeld wurde die PVDF-Membran für 1,5 min in Methanol inkubiert, in Transferpuffer gewaschen und auf drei Lagen Whatmann-Papier gelegt, welches für mindestens 5 min in Transferpuffer äquilibriert wurde. Um Rückstände des SDS-Laufpuffers vom SDS-Gel zu entfernen, wurde dieses ebenfalls in Transferpuffer gewaschen und dann auf die PVDF-Membran gelegt. Abschließend wurden drei Lagen des Whatmann-Papiers auf das SDS-Gel gelegt und Luftblasen wurden ausgestrichen. Der elektrophoretische Transfer der Proteine erfolgte bei einer konstanten Spannung von 25 V, bei 1 A für 40 min. Nach dem Transfer wurde die PVDF-Membran in ein 50 ml Falcon überführt, dreimal mit TBS-T für je 5 min gewaschen, um Rückstände des Transferpuffers zu entfernen, und mit Blocking Puffer für 2 h bei Raumtemperatur blockiert. Die Inkubation des jeweiligen Primärantikörpers erfolgte bei 4°C über Nacht. Um nicht gebundene Primärantikörper am folgenden Tag zu entfernen, wurde die

Membran dreimal für je 10 min mit TBS-T gewaschen. Die Inkubation des jeweiligen Sekundärantikörpers erfolgte für 1 h bei Raumtemperatur. Anschließend wurde die Membran dreimal für je 10 min mit TBS-T gewaschen und die Detektion der Proteine erfolgte mit Hilfe des Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate nach Herstellerangaben.

2.2.2.12 Zelllyse

Zellen wurden mit 1 ml eiskaltem PBS aus einer 6-Well Kulturschale abgelöst, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und pelletiert (13000 rpm, 15 sec, 4°C). Das Zellpellet wurde in 75 µl Mild Lysis Puffer resuspendiert und für 1 h bei 4°C unter ständiger Bewegung inkubiert. Anschließend wurde die Probe zentrifugiert (13000 rpm, 15 min, 4°C), um den Überstand von den Zellresten zu isolieren. Der Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Proben wurden bei -20°C gelagert und der Gesamtproteingehalt wurde bestimmt (s. Abschnitt 2.2.2.1).

2.2.2.13 Strippen von Western Blot-Membranen

Um eine gleichmäßige Beladung von Western Blots zu gewährleisten, wurde die Membran gestrippt und auf β -Aktin detektiert. Hierzu musste der zuvor gebundene Antikörper entfernt werden. Nach der ersten Detektion wurde die Membran für 5 min in TBS-T gewaschen und anschließend mit 50 ml Stripping-Puffer für 30 min bei 60°C inkubiert. Anschließend wurde die Membran dreimal für je 10 min TBS-T gewaschen, um Rückstände des Stripping-Puffers zu entfernen, und dann für 2 h bei Raumtemperatur in Blocking-Puffer inkubiert. Die Inkubation des jeweiligen Primärantikörpers erfolgte bei 4°C über Nacht.

2.2.3 Zellbiologische Methoden

2.2.3.1 Detektion von GFP-PFCs mittels $^1\text{H}/^{19}\text{F}$ Magnetresonanztomographie

Für die Aufnahme und Detektion von GFP-PFCs mittels Magnetresonanztomographie (MRT) wurden stabil transfizierte CHO-CIR1-3 Zellen verwendet, die eine 80%ige Konfluenz auf einer 10 cm Kulturschale aufwiesen. Die Zellen wurden über Nacht bei 37°C mit 75 µl GFP-PFCs auf einem Schüttler inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Zellen auf der 10 cm Kulturschale fünfmal mit PBS gewaschen (1200 rpm, 5 min, 4°C) und in 1 ml PBS aufgenommen. Die Zellsuspension wurde vorsichtig in einem 15 ml Falcon auf eine 2 ml hohe Percoll-Schicht geschichtet, bei 500 g für 20 min bei Raumtemperatur zentrifugiert und direkt in ein vertikales 9.4 T Bruker AVANCEIII Wide Bore NMR Spektrometer für die Messung überführt.

Das NMR Spektrometer arbeitete bei einer Frequenz von 400,21 MHz für die ^1H und bei 376,54 MHz für die ^{19}F Messungen, mit Einstellungen für Mikroabbildungseinheiten, die bereits beschrieben wurden (Flögel *et al.* 2008). Nachdem die morphologischen ^1H -Signale aufgenommen wurden, erfolgte die Detektion auf das ^{19}F -Signal. Hierzu erfolgte die Aufnahme

der ^1H -Bilder unter Verwendung einer *Rapid Acquisition and Relaxation Enhancement* (RARE: *Field of View* (FOV) = 2,56 x 2,56 cm², Matrix 256 x 256, 0,1 x 0,1 mm² in flacher Aufnahme, 1 mm Schichtdicke; TR = 3000 ms; RARE-Faktor = 128, 6 Durchschnittswerte, Scanzeit = 2 min). Die entsprechenden ^{19}F -Bilder wurden mit der gleichen FOV und einer ^{19}F -Sequenz aufgenommen (Matrix 32 x 32, 0,85 x 0,85 mm² in flacher Aufnahme, 3 mm Schichtdicke; TR = 2500 ms; RARE-Faktor = 32). In Zusammenarbeit mit Pascal Bouvain (Institut für Molekulare Kardiologie, medizinische Fakultät, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf).

2.2.3.2 Genexpressionsanalyse der CIR-vermittelten Aufnahme von GFP-PFCs

Um zu überprüfen, ob die Bindung und Internalisierung von GFP-PFCs an CIR-exprimierende Zellen die Aktivierung von Signalwegen induziert, wurde eine Genexpressionsanalyse mittels Microarray durchgeführt. Hierzu wurden stabil transduzierte Ba/F3-gp130-CIR1-3 Zellen viermal mit 10 ml PBS gewaschen (1500 rpm, 5 min, 4°C), die Zellzahl wurde bestimmt und für jeden Ansatz wurden 2×10^6 Zellen in 1 ml DMEM/- aufgenommen. Anschließend wurden die Zellen für 2 h bei 37°C und 5% CO₂ in einem Binder CO₂ Inkubator 150 (E2) Brutschrank gehungert und danach mit 75 µl GFP-PFCs oder mit 100 ng/ml Hyper-IL-6 für 1 h bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Unstimulierte Zellen der jeweiligen Zelllinie wurden als Negativkontrolle verwendet, um einen Vergleich in der Veränderung der Genexpression nach Stimulation zu ermöglichen. Nach Stimulation wurden die Proben zentrifugiert (1500 rpm, 5 min, 4°C) und die RNA wurde mittels RNeasy Mini Kit nach Herstellerangaben isoliert. Die Qualität der RNA wurde mittels Agilent 2100 Bioanalyser bestimmt. Nur RNA Proben mit einem RIN Wert > 8 wurden für die Genexpressionsanalyse verwendet. 150 ng RNA wurden mittels Ambion WT Expression Kit und dem WT Terminal Labelling Kit amplifiziert und die resultierende cDNA wurde auf einem Affymetrix Mouse Gene ST 1.0 Array hybridisiert. Die anschließende Färbung und das Scannen wurden nach Herstellerangaben durchgeführt. Für die Normalisierung und Qualitätskontrolle wurde die Expression Console Software und für die statistische Analyse die Transcriptome Analysis Console 3.0 Software verwendet. Der vollständige Datensatz der Genexpressionsanalyse wurde auf der Plattform „gene expression omnibus (GEO)“ hochgeladen (Projektnummer: GSE106215). Die Qualitätsbestimmung der RNA, die Amplifizierung der cDNA, die Hybridisierung auf dem Mouse Gene ST 1.0 Array sowie die Normalisierung der Daten wurde von Frau Dr. Knebel (Institut für klinische Biochemie und Pathobiochemie, Deutsches Diabetes Zentrum, Düsseldorf) durchgeführt.

2.2.3.3 Immunfluoreszenz

Um die Bindung und Internalisierung von GFP bzw. GBF-Latex Beads zu untersuchen, wurden Immunfluoreszenzbilder erstellt. Hierzu wurden COS-7 Zellen transfiziert (s. Abschnitt 2.2.3.5), nach 24 h in eine 6-Well Kulturschale mit Coverslips ausgesät und nach weiteren 24 h für das Experiment verwendet. Hierzu wurde das Medium abgesaugt, die Zellen wurden einmal mit

PBS gewaschen und 1 ml DMEM/- wurden den Zellen zugesetzt. Anschließend wurden die Zellen für 30 min mit 1 µg/ml GFP bei 4°C oder 37°C inkubiert, dann dreimal mit PBS gewaschen und mit 1 ml 0,5% PFA für 15 min bei Raumtemperatur fixiert. Für die Internalisierung von GFP-gekoppelten Latex-Beads wurden 50 µl GFP-LBs verwendet. Die Inkubation erfolgte für 1 h bei 37°C. Die Zellen wurden mit 1% Triton X-100 permeabilisiert. Nachfolgend wurden die Zellkerne mittels DAPI (Endkonzentration 1 µg/ml) angefärbt. Die Zellen wurden dreimal mit PBS gewaschen, der Coverslip wurde aus der 6-Well Kulturschale genommen, auf einen Objektträger überführt und mit einem Tropfen Mowiol auf dem Objektträger eingebettet. Die Lösung trocknete über Nacht bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss. Die Aufnahmen wurden mit einem Olympus BX61 Mikroskope gemacht.

Für die Erstellung der 3D Rekonstruktion von transfizierten CHO-CIR3 Zellen nach Inkubation mit 4 µM GFP-LBs, wurden diese nach der Fixierung mit PFA über Nacht bei 4°C in 1 ml 1% BSA in PBS mit einem α-MHC Klasse I Antikörper (W6/32, Verhältnis 1:10) inkubiert. Am folgenden Tag wurde der ungebundene Antikörper durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt. Die Inkubation des Sekundärantikörpers (α-mouse-Alexa594, Verhältnis 1:500 in 1%BSA in PBS) erfolgte für 1,5 h bei 4°C. Ungebundener Sekundärantikörper wurde durch dreimaliges Waschen mit PBS entfernt. Die Zellen wurden anschließend mit 1% Triton X-100 permeabilisiert, sowie die Zellkerne mittels DAPI (Endkonzentration 1 µg/ml) angefärbt. Der Coverslip wurde aus der 6-Well Kulturschale auf ein Objektträger überführt und mit einem Tropfen Mowiol eingebettet. Die Lösung trocknete über Nacht bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss. Für die 3D Rekonstruktion wurden verschiedene Z-Stapelaufnahmen mit einem Olympus BX61 Mikroskope gemacht und die Erstellung der 3D Rekonstruktion erfolgte mit der Amira Software.

2.2.3.4 Kultivierung von eukaryotischen Zellen

Alle adhärennten Zellen, die in dieser Arbeit verwendet wurden, sind in Abschnitt 2.1.15 beschrieben. Die Zelllinien wurden in 10 cm Kulturschalen mit 10 ml DMEM *High Glucose* (4,5 g/ml) mit 10% fötalem Kälberserum (FCS) und 1% Penicillin/Streptomycin bei 37°C und 5 % CO₂ in einer gesättigten Wasserdampf-atmosphäre kultiviert. Dies erfolgte in einem Binder CO₂ Inkubator 150 (E2) Brutschrank oder in einem Heracell VIOS 250i CO₂ Inkubator. Für die Subkultivierung wurden die adhärennten Zellen zweimal pro Woche in einem 1:20 Verhältnis (COS-7) bzw. in einem 1:100 Verhältnis (CHO-K1) gesplittet, indem zunächst das Medium entfernt und die Zellen einmal mit PBS gewaschen wurden. Die Ablösung der Zellen erfolgte durch Zugabe von 2 ml Trypsin/EDTA (5 min, 37°C). Die Wirkung von Trypsin/EDTA wurde anschließend durch Zugabe von 2 ml DMEM+/+ neutralisiert und die Zellen wurden in einem 15 ml Falcon bei 1200 rpm für 5 min bei Raumtemperatur pelletiert. Das Zellpellet wurde in 1 ml DMEM +/+ resuspendiert, um anschließend in einem entsprechenden Verhältnis auf eine neue 10 cm Schale mit 10 ml DMEM +/+ überführt zu werden.

Analog zu den adhärenenten Zellen wurden die Suspensionszellen Ba/F3-gp130 und die daraus generierten Zelllinien in 10 cm Kulturschalen mit 10 ml DMEM+/+ kultiviert. Hierzu wurde 1 µl Zellsuspension auf eine neue 10 cm Schale mit 10 ml DMEM+/+, das mit 10 ng/ml Hyper-IL-6 versetzt wurde, überführt.

2.2.3.5 Transfektion von adhärenenten Zellen

Für die transiente Transfektion von COS-7 Zellen wurden $1,5 \times 10^6$ Zellen auf eine 10 cm Kulturschale mit 10 ml DMEM+/+ ausgesät. Nach 24 h wurde die Transfektion durchgeführt, indem 10 µl Turbofect mit 5 µg Plasmid-DNA (pcDNA3.1 Plasmide, Abschnitt 2.1.10) in 1 ml DMEM/- vermisch und für 30 sec gevortext wurde. Nach 15 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde der Transfektionsansatz auf die Zellen pipettiert. Nach einer Inkubation von 6 h bei 37°C im Zellinkubator wurde das Medium ausgetauscht. 48 h nach Transfektion, wurden die transfizierten Zellen für Expressions- und Bindungsanalysen verwendet.

Für die Transfektion von Phoenix-Eco Zellen wurde 8×10^5 Zellen in eine 6-Well Kulturschale in 2 ml DMEM +/+ ausgesät. Nach 24 h wurde die Transfektion durchgeführt, indem 2 µl Turbofect mit 1 µg Plasmid DNA (pMOWS Plasmide, Abschnitt 2.1.10) in 200 µl ml DMEM/- vermisch und für 30 sec gevortext wurde. Der Transfektionsansatz wurde nach 15 min auf die Zellen pipettiert. Nach einer Inkubation von 6 h bei 37°C im Zellinkubator wurde das Medium gegen 2 ml DMEM mit 30% FCS und 1 % Penicillin/Streptomycin ausgetauscht. 24 h nach Transfektion, wurde der Überstand für die retrovirale Transfektion von Ba/F3-gp130 Zellen verwendet (s. Abschnitt 2.2.3.3).

2.2.3.6 Retrovirale Transduktion von Ba/F3-gp130 Zellen

Die Überstände von Phoenix-Eco Zellen, die mit pMOWs Plasmiden transfizierte wurden (s. Abschnitt 2.2.3.5), wurden für die retrovirale Transduktion von Ba/F3-gp130 Zellen nach Ketteler *et al.*, 2002 verwendet. Um Zellreste aus den Phoenix-Eco Überständen zu entfernen, wurden diese bei 13000 rpm für 5 min und 4°C zentrifugiert. Anschließend wurden 250 µl Phoenix-Eco Überstand mit 3 µl Polybrene (Stocklösung 800 µg/ml) und 50 µl Ba/F3-gp130 Zellsuspension (1×10^5 Zellen) vermisch. Folgend wurde die Probe bei 1800 rpm für 2 h und Raumtemperatur zentrifugiert und der Überstand im Anschluss verworfen. Die Ba/F3-gp130 Zellen wurden in 1 ml DMEM+/+ resuspendiert und in eine 6-Well Kulturschale mit 4 ml DMEM+/+ und 10 ng/ml Hyper-IL-6 überführt. Die Selektion der stabil transduzierten Zellen erfolgte nach einer Kultivierung von 48 h bei 37°C im Zellinkubator. Hierzu wurden die Zellen für mindestens 2 Wochen in Anwesenheit von 1,5 µg/ml Puromycin selektiert. Die stabil transduzierten Ba/F3-gp130 Zellen wurden in Anwesenheit von 10 ng/ml Hyper-IL-6 in 10 ml DMEM+/+ kultiviert.

2.2.3.7 Proliferationassay

Retroviral transduzierte Ba/F3-gp130 oder Ba/F3-gp130-IL-6R Zellen wurden pelletiert (1500 rpm, 5 min, Raumtemperatur), dreimal mit PBS gewaschen, damit die enthaltenen Zytokine entfernt werden, und in 1 ml DMEM+/+ resuspendiert. Anschließend wurde die Zellzahl bestimmt und eine Zellsuspension mit 5×10^3 Zellen/100 μ l wurde erstellt. Jeweils 100 μ l der Zellsuspension wurde in ein Well einer 96-Well Platte ausgesät, mit der entsprechenden Menge an Zytokinen versetzt (Negativkontrolle = ohne Zytokinzugabe) und für 72 h bei 37°C mit 5% CO₂ inkubiert. Anschließend erfolgte die Messung der Proliferation mit Hilfe des Kits CellTiter-Blue Cell Viability Assay. Hierzu wurden 20 μ l CellTiter-Blue pro Well hinzugefügt und die Proliferation an einem Tecan Infinite M200 PRO Reader (ex-Filter 530/25, em-Filter 590/35) gemessen. Der nach 60 min gemessene Wert wurde vom 0 min Wert subtrahiert und die Proliferation in *relative light units* (RLU) angegeben. Alle Messwerte wurden mit einer Dreifachbestimmung ermittelt.

2.2.3.8 Zellzahlbestimmung

Mit Hilfe des TC10 Automated Cell Counters wurde die Zellzahl von Zelllinien bestimmt. Dafür wurden 6 μ l Trypan Blue Dye zu 6 μ l Zellsuspension hinzugefügt und vermischt. Anschließend wurden 10 μ l des Gemisches in TC10 System Counting Slides Dual Chamber geladen, damit die Zellzahl im TC10 Automated Cell Counter bestimmt wurde.

2.2.4 Tierexperimentelle Methoden

Die geschilderten Tierexperimente, bezüglich der Isolierung von murinen Organen (Herz, Lunge, Leber und Milz), wurde gemeinsam mit Dr. Sebastian Temme oder mit Pascal Bouvain (Institut für Molekulare Kardiologie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) durchgeführt.

2.2.4.1 Tierhaltung

Pathogenfreie CIR2^{flox/flox} Mäuse wurden von der zentralen Einrichtung für Tierforschung und Tierschutzaufgaben (ZETT) erhalten. Des Weiteren wurden pathogenfreie CIR2^{Cre-Del} Mäuse aus dem Tierhaus des *Institute of Molecular Genetics of the ASCR* (Prag, Tschechische Republik) in das ZETT importiert und mindestens für zwei Wochen akklimatisiert. Alle Mäuse hatten einen C57BL/6N Hintergrund. Die Tiere hatten jederzeit unbegrenzten Zugang zu Futter und entkeimtem Trinkwasser. Die Mauslinien die im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurden, wurden genehmigt durch das Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz (LANUV), Nordrhein-Westfalen, Hauptsitz Recklinghausen entsprechend § 8 des Tierschutzgesetzes (Az: 84-02.04.2014.A047; Projektnummer: G47/14)

2.2.4.2 Isolierung von DNA aus Schwanzspitzen

Für die Isolierung von DNA aus dem Gewebe der Maus, wurde ein Gewebestück der Schwanzspitze einer Maus lysiert. Hierzu wurden in einem Reaktionsgefäß jeweils ein Gewebestück mit 200 µl Direkt PCR-Tail Lösung und 2 µl Proteinase K (0,2 mg/ml) versetzt. Mittels Proteinase K wurden die Zellen aufgeschlossen und somit die genomische DNA freigelegt. Die Probe inkubierte im Anschluss bei 55°C über Nacht im Thermoblock, unter ständigem Schütteln. Am folgenden Tag erfolgte die Hitzeinaktivierung der Proteinase K bei 85°C für 1 h im Thermoblock.

2.2.4.3 Bestimmung des Genotyps mittels PCR

Die Validierung des *Knock-in* des CIR2 Gens in den Mausstamm C57BL/6 (CIR2^{lox/lox}) wurde mittels PCR bestimmt. Hierzu wurden die Genotypen der untersuchten CIR2^{lox/lox} und CIR2^{Cre-Del} Mauslinien, unter Verwendung von bis zu fünf unterschiedlichen PCR-Reaktionen, untersucht. In Abbildung 2.1 A ist die Genotypisierung der CIR2^{lox/lox} Mauslinie dargestellt. Hierzu wurden vier PCR Reaktionen durchgeführt, bei denen analysiert wurde, ob die Insertion des pZDonor-CIR2 erfolgreich verlaufen war. Bei der PCR 1 wurde der linke Homologiebereich (LHB), bei PCR 2 die Neomycinresistenz (Neo), bei PCR 3 von Neomycin zum CIR2 (NtC) und bei PCR 4 der rechte Homologiebereich (RHB) erkannt. Bei dem CIR2^{Cre-Del} Mausstamm, resultierend durch die Verpaarung des CIR2^{lox/lox} Mausstamms mit dem ubiquitär exprimierenden Cre-Rekombinase Mausstamm ACTB-Cre-EGFP, wurde eine zusätzliche PCR Analyse durchgeführt. Hierbei wurde der Bereich vom CAG-Promotor zum CIR2 erkannt (PCR 5, Abbildung 2.1 B). In Tabelle 2.12 sind die Primer aufgelistet, die für die jeweiligen PCR Reaktionen verwendet wurden, sowie die Größe des erwarteten PCR-Produktes. Für alle PCR Ansätze wurden 2 µl DNA, jeweils 0,1 µl 5'- und 3'- Primer (100 pM), 10 µl TopTaq und 7,8 µl H₂O eingesetzt. In Tabelle 2.13 ist das verwendete PCR-Programm dargestellt, welches für die jeweilige Genotypisierung verwendet wurde.

Material und Methoden

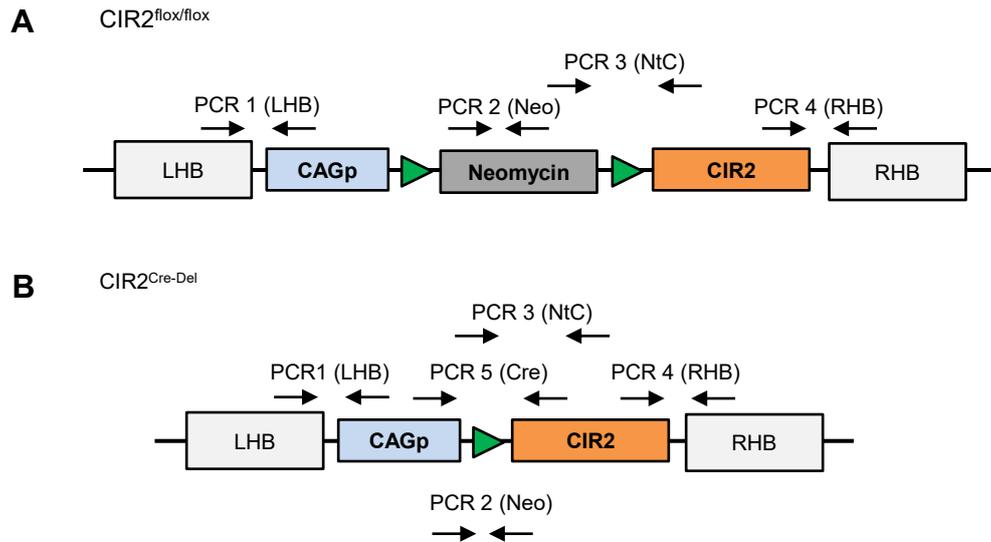


Abbildung 2.1: Schematische Darstellung zur Genotypisierung der CIR2^{fllox/fllox} und CIR2^{Cre-Del} Mäuslinien. Erläuterungen sind in Abschnitt 2.2.4.2 und Abschnitt 3.3.7 beschrieben. CAGp (CAG-Promotor bestehend aus: *Chicken* β -Aktin-Promotor mit Cytomegalievirus *Enhancer*), LHB (linker Homologiebereich), RHB (rechter Homologiebereich), Neo (Neomycinresistenz).

Tabelle 2.12: Übersicht der verwendeten Primer für die Genotypisierung der CIR2^{fllox/fllox} und CIR2^{Cre-Del} Mäuslinien. Die verschiedenen PCR-Reaktionen sind in Abbildung 2.1 dargestellt.

Reaktion	Primerpaare	Erwartete Größe des PCR-Produktes
PCR 1 (LHB)	Rosa26 fw IMG CMV rev	512 Basenpaare (CIR2 ^{fllox/fllox} und CIR2 ^{Cre-Del})
PCR 2 (Neo)	Neo fw (IMG) Neo Rv (IMG)	380 Basenpaar (CIR2 ^{fllox/fllox}) Kein PCR Produkt (CIR2 ^{Cre-Del})
PCR 3 (NtC)	Neo fwd CIR2 rev	908 Basenpaare (CIR2 ^{fllox/fllox}) Kein PCR Produkt (CIR2 ^{Cre-Del})
PCR 4 (RHB)	CIR2 fwd Rosa26 rev IMG	526 Basenpaare (CIR2 ^{fllox/fllox} und CIR2 ^{Cre-Del})
PCR 5 (Cre)	CIR2 Cre 1 fwd CIR2 Cre 2 rev	1201 Basenpaare (CIR2 ^{fllox/fllox}) 254 Basenpaare (CIR2 ^{Cre-Del})

Tabelle 2.13: Übersicht des verwendeten PCR-Programms für die Genotypisierung der CIR2^{flox/flox} und CIR2^{Cre-Del} Mäuslinien: Dargestellt ist das verwendete PCR-Programm (linke Seite), das für die fünf PCR Reaktionen verwendet wurde. Unterschiede bestehen nur in den Annealingtemperaturen der jeweiligen Primerpaare (Tabelle 2.12), und in der Anzahl der verwendeten Zyklen (dargestellt auf der rechten Seite).

	Zeit	Temperatur		Reaktion	Annealing (C°)	Zyklen
Denaturierung	5 min	95°C		PCR 1 (LHB)	60	43
Denaturierung	30 sek	95°C	} Zyklen	PCR 2 (Neo)	72	30
Annealing	30 sek			PCR 3 (NtC)	64,5	38
Elongation	1 min	72°C		PCR 4 (RHB)	58	43
Finale Elongation	5 min	72°C		PCR 5 (Cre)	60	38

2.2.4.4 Analyse der CIR2-Expression und GFP-Bindung mittels isolierten murinen Organen

Zu untersuchende Mäuse wurden für die Organentnahme mittels zervikaler Dislokation getötet. Herz, Lunge, Leber Niere und Milz wurden entnommen und in ein 15 ml Falcon mit 5 ml eiskaltem PBS aufgenommen. Für die Analyse der GFP-Bindung wurden Leber- und Milzzellen verwendet. Hierzu wurden die Organe auf einem Nygonsieb mit 40 µm Siebdurchmesser (BD Falcon Cell Strainer) vorsichtig vereinzelt und in 5 ml in PBS mit 1% BSA aufgenommen. Die Zellsuspensionen wurden zweimal gewaschen (PBS mit 1% BSA, 300 g, 5 min, 4°C) und in 5 ml PBS mit 1% BSA resuspendiert. Anschließend wurde 1 ml Zellsuspension entnommen, mit 1 µg GFP versetzt und für 30 min bei 37°C unter ständiger Durchmischung inkubiert. Dann wurde die Zellsuspensionen gewaschen (300 g, 5 min, 4°C), in 1 ml FACS Puffer aufgenommen und mittels Durchflusszytometrie untersucht.

Für die Analyse der CIR2-Expression mittels Western Blot wurden Herz, Lunge, Leber und Niere verwendet. Hierzu wurde je ein 2 mg Gewebestück entnommen, in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt und in flüssigen Stickstoff schockgefroren. Dann wurde eine 5 mm Stahlkugel in das Reaktionsgefäß überführt und das Gewebestück wurde mittels Schwingmühle MM 400 homogenisiert (Frequenz 25 (1/s); Zeit 1,5 min), mit 300 µl eiskaltem Gewebelysispuffer versetzt und für 2 h bei 4°C unter ständiger Rotation inkubiert. Nach Zentrifugation (13000 rpm, 15 min, 4°C) wurde der Überstand von den Zellresten isoliert. Jeweils 50 µg Gesamtprotein wurden pro Probe mittels Western Blot analysiert.

3. Ergebnisse

3.1 Bestimmung von humanen IL-6/löslichen IL-6R Komplexen

IL-6 kann über die membranständige Form des IL-6 Rezeptors (IL-6R) den klassischen Signalweg und zusätzlich im Komplex mit der löslichen Form des IL-6R (sIL-6R) den Trans-Signalweg induzieren. Allgemein ist beschrieben, dass der klassische Signalweg anti-inflammatorische und der Trans-Signalweg pro-inflammatorische Prozesse steuert (Scheller *et al.* 2011b). Unter pathophysiologischen Bedingungen kann sich die Menge des im Blut vorhandenen IL-6 und sIL-6R deutlich erhöhen, was zu einer verstärkten Aktivierung des Trans-Signalweges führt (Honda *et al.* 1992; Mitsuyama *et al.* 1995; Jones 2005). Dieser Signalweg ist sehr an der Entstehung von chronisch-entzündlichen Krankheiten und Autoimmunerkrankungen beteiligt (Chalaris *et al.* 2011). Daher ist es notwendig zu untersuchen, in welchen Mengen die IL-6/sIL-6R Komplex induzierte Signalweiterleitungen über den Trans-Signalweg erfolgen kann. Bis zum heutigen Zeitpunkt konnte jedoch kein quantitativer Nachweis durchgeführt werden, wie viel IL-6/sIL-6R Komplex unter bestimmten IL-6 und sIL-6R Konzentrationen entstehen kann. Diese Ergebnisse können allerdings hilfreiche Hinweise für die Behandlung von Krankheiten liefern, die über den Trans-Signalweg induziert werden. Erkenntnisse über die möglichen Mengen an IL-6/sIL-6R Komplexen können ebenso für die Dosierung von Inhibitoren des Trans-Signalweges, wie sgp130Fc, verwendet werden. Eine gängige Methode zum quantitativen Nachweis von Proteinen im Blutserum ist der *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay* (ELISA). Mittels ELISA wurde bereits in früheren Studien das Vorhandensein von IL-6/sIL-6R Komplexen im Serum von Patienten mit Rheumatoider Arthritis nachgewiesen. Es wurde zusätzlich gezeigt, dass im Serum von gesunden Menschen keine IL-6/sIL-6R Komplexe vorliegen. Erst nach Zugabe von rekombinantem IL-6 war es möglich, diese zu detektieren (De Benedetti *et al.* 1994). Aufgrund des Fehlens eines geeigneten Proteinstandards, konnte in dieser Studie nur ein qualitativer Nachweis von IL-6/sIL-6R Komplexen dargestellt werden, jedoch kein quantitativer Nachweis. Im Rahmen dieser Arbeit wurde erstmals ein ELISA verwendet, der die spezifische Detektion von IL-6/sIL-6R Komplexen und deren Quantifizierung ermöglicht. In einer anderen Studie von Gaillard *et al.*, wurde eine Gleichung beschrieben mit der es möglich ist, die Menge an IL-6/sIL-6R Komplexen mathematisch zu bestimmen (Gaillard *et al.* 1999). Diese Gleichung basiert auf den K_D -Werten von IL-6 zum sIL-6R, in Abhängigkeit zu den vorhandenen Konzentrationen. Dieser mathematische Ansatz soll dazu verwendet werden, die berechneten Mengen an IL-6/sIL-6R Komplexen mit denen im ELISA quantifizierten Werten zu vergleichen. Hierdurch sollen weitere Erkenntnisse über die Dynamik der Komplexbildung gewonnen werden.

3.1.1 Etablierung eines spezifischen IL-6/sIL-6R Komplex-ELISA

Um den IL-6/sIL-6R Komplex spezifisch zu detektieren, wurde ein sogenannter Sandwich ELISA verwendet. Hierzu wurden Vorarbeiten im Institut für Biochemie und Molekularbiologie II, von Dr. Christoph Garbers durchgeführt. Basierend auf den in Abschnitt 2.2.2.3.1 beschriebenen IL-6R ELISA, wurde der α -sIL-6R Coating Antikörper durch einen α -IL-6 Antikörper ersetzt, um zu untersuchen, ob eine spezifische Detektion des IL-6/sIL-6R Komplexes möglich war (Abbildung 3.1A). Das weitere methodische Vorgehen war gleich zum IL-6R ELISA. Als Äquivalent zum IL-6/sIL-6R Komplex wurde rekombinantes Hyper-IL-6 (HIL-6) verwendet. Hierbei handelt es sich um ein Designerzytokin, bei dem IL-6 über einen flexiblen Linker fest mit dem sIL-6R verbunden ist (Jostock *et al.* 2001).

Für die erste ELISA-gestützte Untersuchung wurde eine Konzentrationsreihe aus HIL-6 (0-2 ng/ml) sowie verschiedene Konzentrationen an rekombinatem IL-6 und sIL-6R eingesetzt. Hierdurch sollte kontrolliert werden, ob dieser ELISA spezifisch HIL-6 detektiert, oder IL-6 bzw. sIL-6R alleine zu einem Signal führen. In Abbildung 3.1B ist zu erkennen, dass spezifisch HIL-6 detektiert wurde (2 ng/ml HIL-6: OD_{450nm} von $0,4 \pm 0,004$). Bei einer gleichen Menge von rekombinatem IL-6 (2 ng/ml) wurde kein Signal detektiert, das deutlich höher war, als der Nullwert (0 ng/ml IL-6: OD_{450nm} von $0,096 \pm 0,002$; 2 ng/ml IL-6: OD_{450nm} von $0,1 \pm 0,002$). Auch beim rekombinanten sIL-6R konnte kein Signal detektiert werden. Selbst bei einer Konzentration von 30 ng/ml sIL-6R war die Absorption nicht höher, als der Nullwert (0 ng/ml sIL-6R: OD_{450nm} von $0,1 \pm 0,002$; 30 ng/ml sIL-6R: OD_{450nm} von $0,1 \pm 0,001$). Diese Daten belegen, dass ein spezifischer Nachweis des HIL-6 möglich war (Abbildung 3.1B). Aufbauend auf diesem Versuch, wurde im Anschluss untersucht, wie viel IL-6/sIL-6R Komplex gebildet wird, wenn physiologisch vorkommende Mengen an IL-6 und sIL-6R miteinander kombiniert werden. In weiteren Vorarbeiten, durchgeführt von Rana Sadiq (Institut für Biochemie und Molekularbiologie II, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf), wurden verschiedene Konzentrationen an rekombinatem IL-6 (1-100 ng/ml) mit 50 ng/ml rekombinatem sIL-6R miteinander versetzt (Abbildung 3.1C). Die Inkubation der Proben erfolgte für 30 min bei Raumtemperatur in einem Standardpuffer, bestehend aus PBS mit 1% BSA. Hierbei wurde festgestellt, dass aufgrund der Interaktion von monomerem IL-6 und sIL-6R, eine Detektion von IL-6/sIL-6R Komplexen möglich war. Durch die Zugabe von höheren IL-6 Konzentrationen konnte eine vermehrte Komplexbildung mittels ELISA nachgewiesen werden.

Anhand dieses methodischen Nachweises, der IL-6/sIL-6R Komplexbildung, wurde jedoch festgestellt, dass die Varianz von Experiment zu Experiment sehr hoch war, was anhand der Standardabweichungen zu erkennen ist. Darüber hinaus war der ELISA zu wenig sensitiv, um kleinste Mengen an IL-6/sIL-6R Komplexen zu detektieren (Abbildung 3.1C). Kurz nach diesen Experimenten wurde von R&D Systems ein ELISA angeboten, der ebenfalls den IL-6/sIL-6R

Ergebnisse

Komplex detektiert. Dieser ELISA wurde dahingehend getestet, ob dieser besser geeignet war, eine möglichst genaue Quantifizierung von IL-6/sIL-6R Komplexen zu ermöglichen.

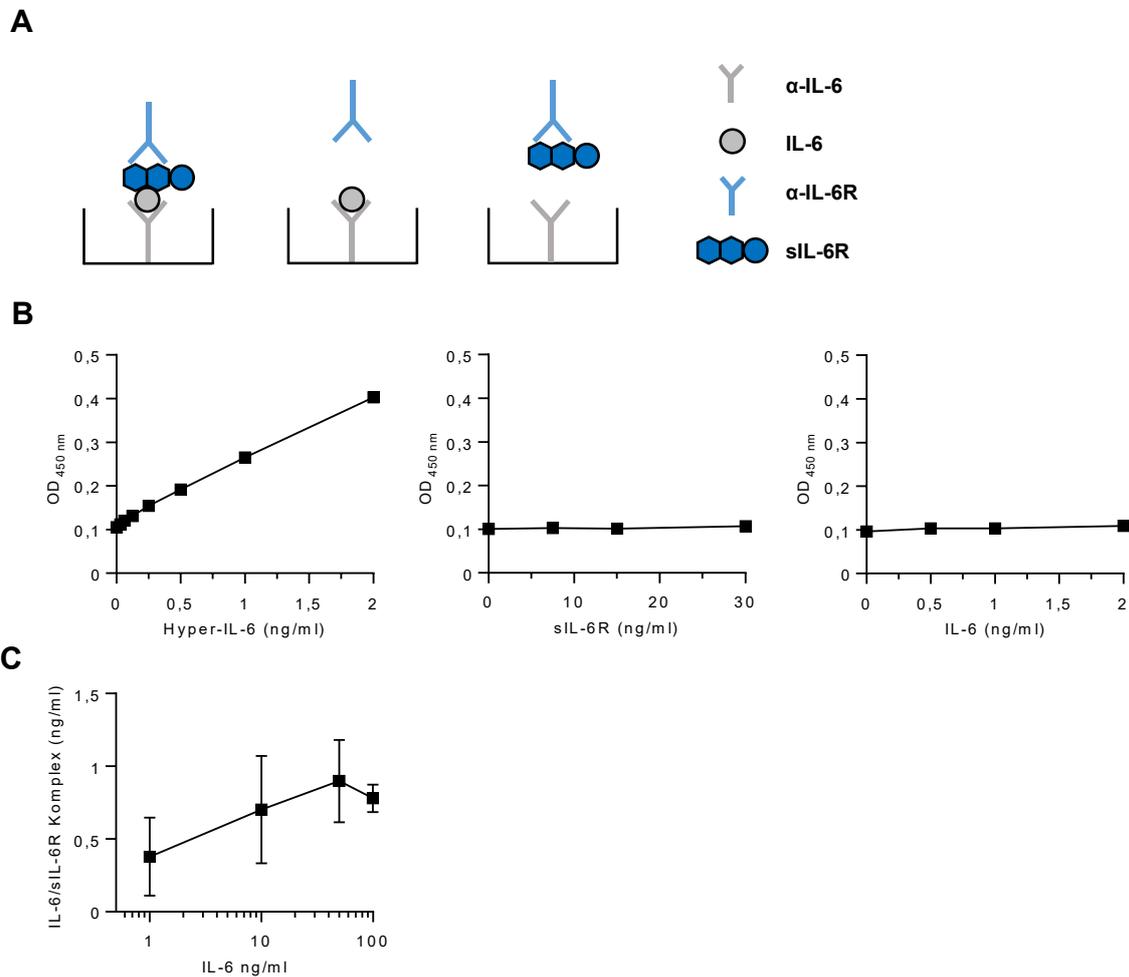


Abbildung 3.1: Spezifischer Nachweis von IL-6/sIL-6R Komplexen mittels ELISA. (A) Schematische Darstellung zur Funktion des entwickelten IL-6/sIL-6R Komplex-ELISA. Basierend auf den IL-6R ELISA, wurde der α -sIL-6R Coating Antikörper durch einen α -IL-6 Antikörper ersetzt. Das weitere methodische Vorgehen war gleich zum IL-6R ELISA, beschrieben in Abschnitt 2.2.2.3.1. Hierdurch wurde IL-6 auf der 96-Well Mikrotiterplatte immobilisiert. Für die Detektion des IL-6/sIL-6R Komplexes, wurde ein biotinylierter Antikörper gegen den sIL-6R verwendet. Nur bei dem Vorhandensein von IL-6/sIL-6R Komplexen sollte eine Detektion erfolgen. **(B)** Verschiedene Konzentrationen an HIL-6 (0-2 ng/ml), sIL-6R (0-30 ng/ml) und IL-6 (0-2 ng/ml) wurden mittels den in (A) beschriebenen ELISA analysiert. Ein Signal war nur gegeben, wenn IL-6 und sIL-6R in einem Komplex (HIL-6) vorlagen. Eine Detektion von IL-6 oder sIL-6R hat nicht stattgefunden (durchgeführt von Dr. Christoph Garbers, Institut für Biochemie und Molekularbiologie II, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf). **(C)** Verschiedene Konzentrationen von rekombinantem IL-6 (1-100 ng/ml) wurden mit 50 ng/ml rekombinantem sIL-6R in PBS mit 1% BSA kombiniert und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Quantifizierung von gebildeten IL-6/sIL-6R Komplexen erfolgte mittels ELISA. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SD von zwei unabhängigen Experimenten (durchgeführt von Rana Sadiq, Institut für Biochemie und Molekularbiologie II, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf).

3.1.2 Spezifischer Nachweis von IL-6/sIL-6R Komplexen über den IL-6/sIL-6R Komplex-ELISA von R&D Systems

Für alle nachfolgenden Analysen, zur Quantifizierung von IL-6/sIL-6R Komplexen, wurde ein kommerziell erwerblicher Sandwich ELISA von R&D System (Human IL-6/sIL-6R Alpha Complex DuoSet) verwendet. Zunächst wurde geprüft, ob dieser ELISA eine spezifische Detektion des IL-6/sIL-6R Komplexes ermöglicht und das keine Affinität zu ungebundenem IL-6 oder sIL-6R vorhanden ist. Dafür wurde der im Kit enthaltene IL-6/sIL-6R Komplexstandard, bei dem es sich um HIL-6 handelt, rekombinantes IL-6 und rekombinanter sIL-6R in verschiedenen Konzentrationen (0-5 ng/ml) nach Herstellerangaben aufgetragen und analysiert (s. Abschnitt 2.2.2.3.3). In Abbildung 3.2 ist zu erkennen, dass nur bei dem IL-6/sIL-6R Komplexstandard ein konzentrationsabhängiges ansteigendes Signal detektiert wurde. Dagegen wurde bei IL-6 und sIL-6R kein Signal im ELISA detektiert. Selbst bei der höchsten eingesetzten Konzentration von 5 ng/ml entsprach die $OD_{450\text{nm}}$ dem Wert der Negativkontrolle (ohne Zytokin). Dies belegt, dass der IL-6/sIL-6R Komplex-ELISA von R&D Systems spezifisch den IL-6/sIL-6R Komplex detektiert und geeignet für dessen Quantifizierung erscheint.

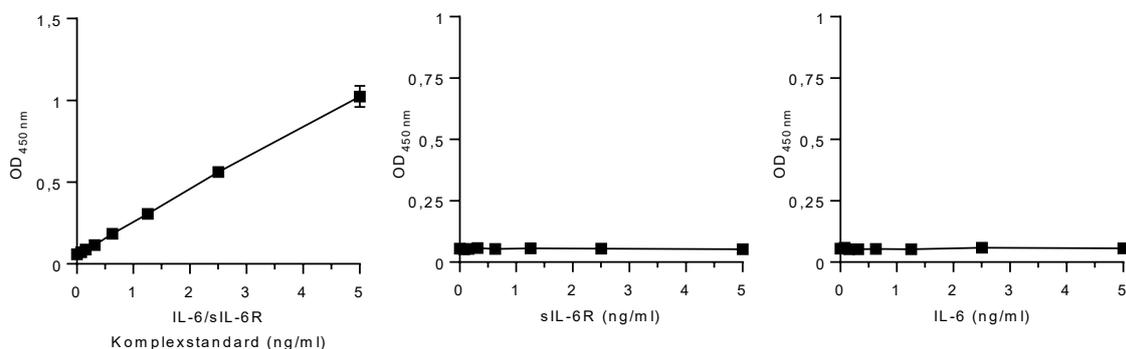


Abbildung 3.2: Spezifischer Nachweis von IL-6/sIL-6R Komplexen mittels R&D Systems IL-6/sIL-6R Komplex-ELISA. Zur Überprüfung, ob der „Human IL-6/sIL-6R Alpha Complex DuoSet ELISA“ von R&D Systems spezifisch den IL-6/sIL-6R Komplex detektiert, wurde der IL-6/sIL-6R Komplexstandard, bei dem es sich um HIL-6 handelt, rekombinantes IL-6 und sIL-6R in einer Konzentrationsreihe von 0-5 ng/ml aufgetragen und nach Herstellerangaben analysiert. Es wurde nachgewiesen, dass spezifisch der IL-6/sIL-6R Komplex detektiert wurde und keine Detektion von IL-6 oder sIL-6R erfolgte. Dargestellt ist eine repräsentative Auswertung von drei unabhängigen Experimenten.

3.1.3 Qualitätsanalyse von rekombinantem IL-6 und sIL-6R für die Quantifizierung von IL-6/sIL-6R Komplexen

Um eine möglichst genaue Quantifizierung von gebildeten IL-6/sIL-6R Komplexen zu ermöglichen, war die Qualität der verwendeten rekombinanten Proteine, IL-6 und sIL-6R, von entscheidender Bedeutung. Ein wichtiger Faktor für die Qualität eines Proteins ist dessen biologische Aktivität. Hierzu wurde die Aktivität des rekombinanten IL-6 in einem Proliferationsassay mit Ba/F3-gp130-IL-6R Zellen untersucht (s. Abschnitt 2.2.3.7). Die gemessene Proliferation ist in *relativ light units* (RLU) angegeben. Diese Zellen exprimieren zwei essentielle Rezeptoren, die für die IL-6-induzierte Zellproliferation notwendig sind, den α -Rezeptor IL-6R und den β -Rezeptor gp130. Über die Bildung des Signalkomplexes, bestehend aus IL-6/sIL-6R/gp130, wird die Zellproliferation induziert. Ba/F3-gp130-IL-6R Zellen wurden hierfür mit ansteigender Menge an IL-6 (0,005-10 ng/ml) für 72 h bei 37°C inkubiert. Es wurde festgestellt, dass eine halbmaximale Proliferation bei 8,4 pM vorlag (entspricht 0,2 ng/ml IL-6, Abbildung 3.3A). Aus früheren Studien ist bekannt, dass gp130 eine Affinität im Bereich von 10 pM zum membranständigen IL-6R aufweist, wenn IL-6 gebunden vorliegt (Hibi *et al.* 1990). Dies belegte, dass das verwendete rekombinante IL-6 eine ausreichende biologische Aktivität aufwies.

Um die Affinität zwischen den verwendeten rekombinanten Proteinen IL-6 und sIL-6R zu bestimmen, wurde eine *Surface Plasmon Resonance* (SPR) Analyse durchgeführt (s. Abschnitt 2.2.2.10). In einer publizierten Studie aus dem Jahr 2017 wurde eine K_D zwischen 15 nM und 34 nM, für die Interaktion zwischen IL-6 und sIL-6R beschrieben (Adams *et al.* 2017). Diese publizierten Werte wurden als Referenz, für die im Rahmen dieser Arbeit gemessene K_D der IL-6/sIL-6R Komplexbildung, verwendet, um eine Einordnung bezüglich der Qualität des genutzten rekombinanten IL-6 und sIL-6R zu ermöglichen. Für die SPR Analyse wurde IL-6 auf einem CM5 Chip über eine Standard Amine Kopplung immobilisiert. Anschließend wurde sIL-6R mit einer Flussrate von 30 μ l/min auf den CM5 Chip injiziert. Hierzu wurden folgende Konzentrationen des sIL-6R verwendet: 5 nM, 30 nM, 60 nM, 100 nM und 120 nM. Die Assoziation des sIL-6R an das immobilisierte IL-6 wurde für 180 sec und die Dissoziation für 360 sec beobachtet. Die ermittelte K_D für die Interaktion der verwendeten Proteine lag bei 22 nM (Abbildung 3.3B und C). Dieser Wert ist im Einklang mit den von Adams *et al.*, 2017 publizierten Werten, bei denen eine K_D von 34 nM (immobilisiertes IL-6) und 15 nM (immobilisierter sIL-6R) ermittelt wurde.

Diese Analysen belegten somit, dass das rekombinante IL-6 eine optimale biologische Aktivität aufwies. Für die Interaktion von IL-6 und sIL-6R wurde außerdem eine Affinität ermittelt, die übereinstimmend mit aktuell publizierten Werten ist. Basierend auf diesen Untersuchungen wurde geschlussfolgert, dass die Qualität des rekombinanten IL-6 und sIL-6R somit geeignet war, um eine quantitative Analyse von IL-6/sIL-6R Komplexen mittels ELISA durchzuführen.

Ergebnisse

Des Weiteren wurde die gemessene K_D von 22 nM für die Berechnung der theoretischen IL-6/sIL-6R Komplexmengen verwendet, um einen Vergleich mit den gemessenen Werten zu ermöglichen.

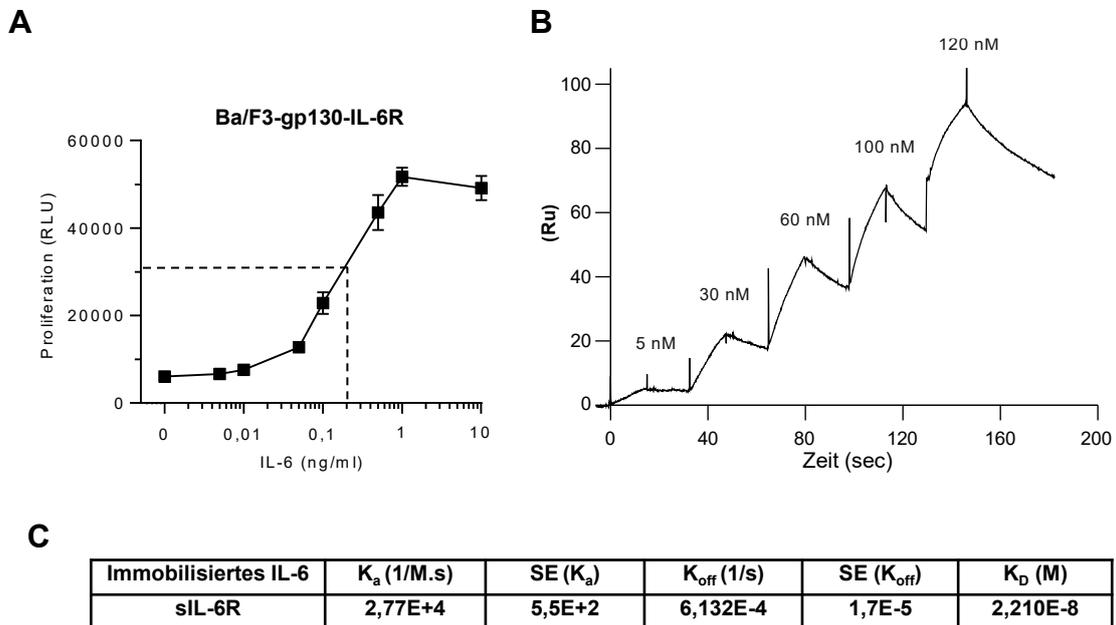


Abbildung 3.3: Qualitätsbestimmung des rekombinanten IL-6 und sIL6R mittels Proliferationsassay und Surface Plasmon Resonance (SPR) Analyse. (A) Proliferation von Ba/F3-gp130-IL-6R Zellen, die mit ansteigenden Mengen an IL-6 (0,005-10 ng/ml) für 72 h bei 37°C inkubiert wurden, um die halbmaximale Proliferation zu bestimmen (durchgeführt von Selina Hansen, Institut für Biochemie und Molekularbiologie II, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf). Die gestrichelte Linie stellt die IL-6-induzierte halbmaximale Proliferation der Zellen dar. (B) Die SPR Analyse wurde mit IL-6 durchgeführt, welches auf einem CM5 Chip immobilisiert wurde. sIL-6R (5-120 nM) wurde bei einer Flussrate von 30 μ l/min auf den CM5 Chip injiziert, um eine optimale Berechnung der Assoziations- sowie Dissoziationsrate zu ermöglichen. Ein Einzelzyklusmodell (*single cycle model*) wurde verwendet, um die kinetischen Parameter der IL-6/sIL-6R Interaktion zu bestimmen. Die Daten wurden mit einem 1:1 Bindungs-Modell berechnet (Y-Achse = RU; X-Achse: Zeit (s)). Jeder Messpunkt wurde mit einer Dreifachbestimmung ermittelt. (C) Dargestellt sind die ermittelten Werte der Assoziationsrate K_a (1/M.s), die Dissoziationsrate (K_{off} (1/s)), der Standardfehler (SE K_a und K_{off}) und die K_D der IL-6/sIL-6R Komplexbildung.

3.1.4 Berechnung der theoretischen IL-6/sIL-6R Komplexmenge unter definierten IL-6 und sIL-6R Konzentrationen

In einer Studie von Gaillard *et al.*, wurde eine Formel beschrieben, mit der die entstehende Menge an IL-6/sIL-6R Komplexen mathematisch berechnet werden kann (Gaillard *et al.* 1999). Diese Formel wurde von Monica Schliemann-Bullinger und Eric Bullinger (Institut für Automatisierungstechnik, Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg) adaptiert und optimiert, um eine Berechnung über die theoretische Menge an IL-6/sIL-6R Komplexen durchzuführen, wenn verschiedene IL-6 und sIL-6R Konzentrationen vorliegen.

Für die Berechnung der IL-6/sIL-6R Komplexmengen wurden die in Abbildung 3.4 dargestellten Formeln verwendet. Als Einheiten wurde die Menge an eingesetztem IL-6 ($[IL-6]_{total}$) bzw. sIL-6R ($[sIL-6R]_{total}$) und die K_D der IL-6/sIL-6R Komplexbildung (22 nM)

Ergebnisse

verwendet (Abbildung 3.3B und C). Zuerst wurden die verwendeten Konzentrationen von IL-6 und sIL-6R von ng/ml auf nM umgerechnet.

Als Beispielrechnungen für IL-6: 50 ng/ml IL-6 entsprechen 2,108 nM IL-6 (Molekulargewicht IL-6: 23.718 Da; $0,00005 \text{ mg/l IL-6} / 23.718 \text{ Da} = 2,108 \times 10^{-9} \text{ M}$, dies entspricht 2,108 nM).

Als Beispielrechnung für sIL-6R: 50 ng/ml sIL-6R entsprechen 0,969 nM sIL-6R (Molekulargewicht sIL-6R: 51.547 Da; $0,00005 \text{ mg/l sIL-6R} / 51.547 \text{ Da} = 0,969 \times 10^{-9} \text{ M}$, dies entspricht 0,969 nM).

Für [IL-6]_{total} wurde dementsprechend der Wert von 2,108 nM und für [sIL-6R]_{total} 0,969 nM in die Formel 1 eingesetzt (Abbildung 3.4). Dabei wurde der Wert von [IL-6]_{frei} (ungebundene Menge an IL-6) von 2,026 nM berechnet. Dies entspricht 48,052 ng/ml an freiem IL-6. Um die Menge an gebundenem IL-6 im IL-6/sIL-6R Komplex zu berechnen, wurde die Differenz von [IL-6]_{total} zu [IL-6]_{frei} ermittelt ($2,108 \text{ nM} - 2,026 \text{ nM} = 0,082 \text{ nM}$). Die Differenz von 0,082 nM wurde anschließend auf ng/ml umgerechnet. Dies entspricht 1,944 ng/ml an im Komplex gebundenem IL-6. Um die Menge an im Komplex gebundenem IL-6 in Prozent zu ermitteln, wurde die gebundene Menge IL-6 dividiert durch die eingesetzte Menge von IL-6 ($1,944 \text{ ng/ml} / 50 \text{ ng/ml IL-6} \times 100 = 3,88\%$ gebundenes IL-6 im Komplex). Hieraus ergibt sich, dass 3,88% des vorhandenen IL-6 gebunden im Komplex vorliegen sollten.

Anschließend wurde die Menge an IL-6/sIL-6R Komplexen mittels Formel 2 berechnet, angegeben als [IL-6:sIL-6R Komplex]. Hierzu wurde die eingesetzte Menge an [IL-6]_{total} (2,108 nM) subtrahiert von der berechneten Menge an [IL-6]_{frei} (2,026 nM) und für [IL-6:sIL-6R Komplex] wurde ein Wert von 0,082 nM berechnet. Um eine Umrechnung von 0,082 nM IL-6/sIL-6R Komplex auf ng/ml durchzuführen, wurde für den Komplex ein Molekulargewicht von 75.265 Da verwendet. 0,082 nM IL-6/sIL-6R Komplex entsprechen 6,171 ng/ml.

Formel 1:
$$[\text{IL-6}]_{\text{frei}} = -0,5 \times (K_D + [\text{sIL-6R}]_{\text{total}} - [\text{IL-6}]_{\text{total}}) + 0,5 \sqrt{\{(K_D + [\text{sIL-6R}]_{\text{total}} - [\text{IL-6}]_{\text{total}})^2 + 4 \times K_D \times [\text{IL-6}]_{\text{total}}\}}$$

Formel 2:
$$[\text{IL-6:sIL-6R Komplex}] = [\text{IL-6}]_{\text{total}} - [\text{IL-6}]_{\text{frei}}$$

Formel 3:
$$[\text{sIL-6R}]_{\text{frei}} = [\text{sIL-6R}]_{\text{total}} - [\text{IL-6:sIL-6R}]$$

Abbildung 3.4 Verwendete Formeln zur Berechnung von IL-6/sIL-6R Komplexmengen unter definierten IL-6 und sIL-6R Konzentrationen. Dargestellt sind die verwendeten Formeln zur Berechnung der IL-6/sIL-6R Komplexmengen (Formel 2), sowie die Menge an freiem IL-6 ([IL-6]_{frei}, Formel 1) und freiem sIL-6R ([sIL-6R]_{frei}, Formel 3). Erläuterungen sind in Abschnitt 3.1.4 beschrieben. Dieser Rechenweg wurde von Monica Schliemann-Bullinger und Eric Bullinger erstellt (Institut für Automatisierungstechnik, Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg).

Um die Menge an freiem sIL-6R, angeben in [sIL-6R]_{frei}, zu berechnen, wurde die Formel 3 verwendet. Die eingesetzte Menge an [sIL-6R]_{total} (0,969 nM, entspricht 50 ng/ml) wurde von der berechneten Menge an [IL-6:sIL-6R Komplex] (0,082 nM) subtrahiert. Für [sIL-6R]_{frei}

Ergebnisse

wurde ein Wert von 0,887 nM berechnet. Dies entspricht 45,722 ng/ml an nicht im Komplex gebundenem sIL-6R.

Abschließend wurde die Menge an gebundenem sIL-6R im IL-6/sIL-6R Komplex berechnet. Hierzu wurde [sIL-6R]_{total} (50 ng/ml) von [sIL-6R]_{frei} (45,722 ng/ml) subtrahiert und 4,278 ng/ml sIL-6R gebunden im Komplex wurde berechnet. Für die Umrechnung auf Prozent wurde die im Komplex gebundene Menge an sIL-6R dividiert durch die eingesetzte Menge an sIL-6R ($4,278 \text{ ng/ml} / 50 \text{ ng/ml sIL-6R} * 100 = 8,55\%$ gebundener sIL-6R im Komplex). Dies bedeutet, dass 8,55% des vorhandenen sIL-6R gebunden im Komplex vorliegen sollten.

Alle im Text beschriebenen Werte für die Beispielrechnung der IL-6/sIL-6R Komplexmenge sind zusammengefasst in Tabelle 3.1 dargestellt. Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wurden alle Berechnungen der IL-6/sIL-6R Komplexmengen nach diesem beschriebenen Schema durchgeführt.

Tabelle 3.1: Werte zur Berechnung der IL-6/sIL-6R Komplexmengen. Dargestellt sind die berechneten Werte der IL-6/sIL-6R Komplexmenge, anhand einer Beispielrechnung mit 50 ng/ml IL-6 und sIL-6R. Erläuterungen zum Rechenweg und zu den einzelnen Werten sind in Abschnitt 3.1.4 beschrieben.

IL-6 eingesetzt	sIL-6R eingesetzt	IL-6/sIL-6R Komplex	Freies IL-6 (ungebunden)	IL-6 im Komplex gebunden	Freier sIL-6R (ungebunden)	sIL-6R im Komplex gebunden
50 ng/ml	50 ng/ml	6,171 ng/ml	48,052 ng/ml	1,944 ng/ml	45,722 ng/ml	4,278 ng/ml
2,108 nM	0,969 nM	0,082 nM	2,026 nM	0,082 nM	0,887 nM	0,082 nM
			96,12%	3,88%	91,45%	8,55%

3.1.5 Quantifizierung von IL-6/sIL-6R Komplexen mit rekombinantem sIL-6R und IL-6

In dieser Arbeit wurde erstmals untersucht, zu welchen Mengen IL-6/sIL-6R Komplexe vorliegen, wenn unterschiedliche Mengen an IL-6 und sIL-6R vorhanden sind. Rekombinantes humanes IL-6 und rekombinanter humaner sIL-6R wurden in einem Standardpuffer (PBS mit 1% BSA) kombiniert und unter kontinuierlicher Durchmischung für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Proben mittels IL-6/sIL-6R Komplex-ELISA analysiert (s. Abschnitt 2.2.2.3.3). Es wurden verschiedene Konzentrationen von rekombinantem humanem IL-6 verwendet (1 ng/ml, 5 ng/ml, 10 ng/ml, 25 ng/ml, 50 ng/ml, 100 ng/ml, 200 ng/ml oder 1000 ng/ml). Diese IL-6 Konzentrationen entsprechen denen, die während milden bis sehr starken Entzündungsprozessen im Serum von Menschen nachgewiesen wurden (Jones 2005). Des Weiteren wurden drei Konzentrationen des rekombinanten humanen sIL-6R verwendet (25 ng/ml, 50 ng/ml und 75 ng/ml), welche ebenfalls physiologisch vorkommende sIL-6R Konzentrationen im Blutserum widerspiegeln (Mitsuyama *et al.* 1995; Gaillard *et al.* 1999; Montero-Julian 2001). In Abbildung 3.5A sind die Ergebnisse über die detektierten Mengen an IL-6/sIL-6R Komplexen dargestellt. In allen Messreihen wurden IL-6/sIL-6R

Ergebnisse

Komplexe ab einer IL-6 Konzentrationen von 5 ng/ml detektiert. Im Allgemeinen wurde beobachtet, dass höhere Mengen an IL-6/sIL-6R Komplexen vorlagen, je mehr IL-6 und sIL-6R vorhanden waren (Tabelle 3.2). Die höchsten Mengen an IL-6/sIL-6R Komplexen wurden bei 1000 ng/ml IL-6 nachgewiesen, d.h. $5 \pm 0,28$ ng/ml Komplex bei 25 ng/ml sIL-6R, $8,49 \pm 2,1$ ng/ml Komplex bei 50 ng/ml sIL-6R und $9,86 \pm 0,74$ ng/ml Komplex bei 75 ng/ml sIL-6R.

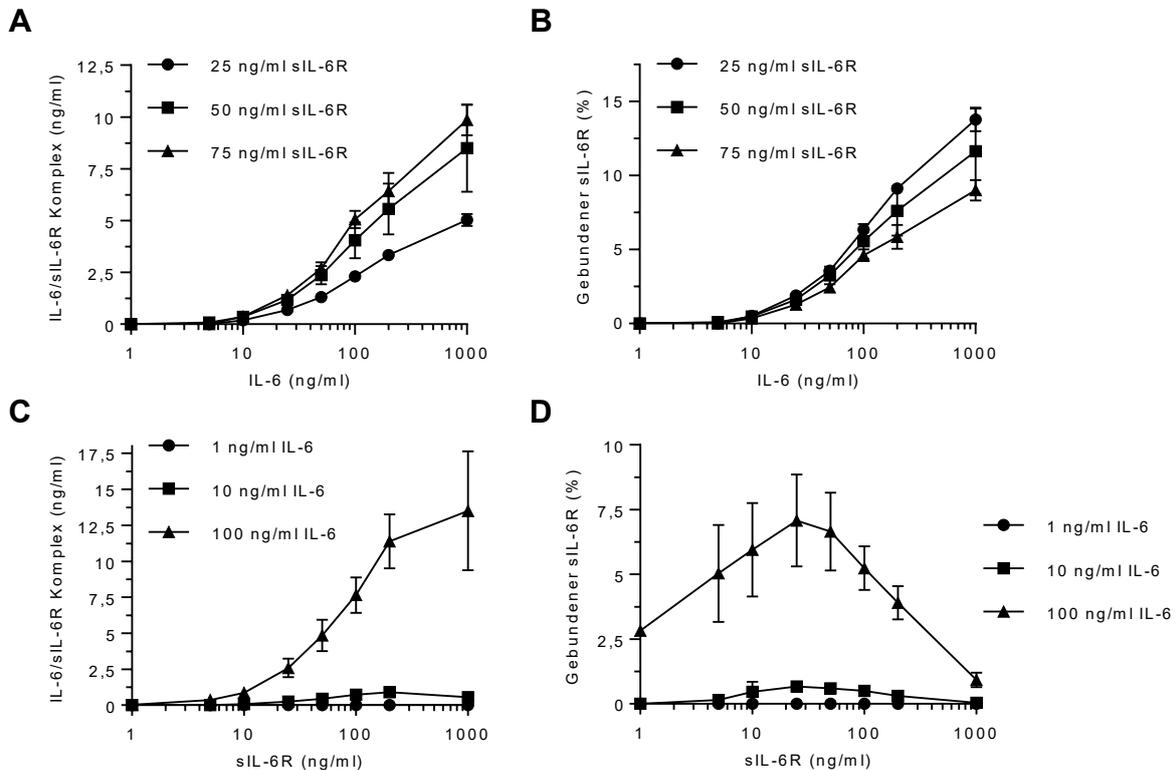


Abbildung 3.5 Quantifizierung von IL-6/sIL-6R Komplexen mit rekombinatem IL-6 und sIL-6R. (A) Rekombinantes humanes IL-6 (1-1000 ng/ml) und rekombinanter humaner sIL-6R (25, 50 oder 75 ng/ml) wurden in PBS mit 1% BSA für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die vorhandene Menge an IL-6/sIL-6R Komplexen mittels IL-6/sIL-6R Komplex-ELISA analysiert. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SD von drei unabhängigen Experimenten. (B) Die Menge an gebundenem sIL-6R im IL-6/sIL-6R Komplex, dargestellt in Prozent (%), wurde anhand der Werte aus Abbildung 3.5A berechnet (beschrieben in Abschnitt 3.1.5). (C) Rekombinanter humaner sIL-6R (1-1000 ng/ml) und rekombinantes humanes IL-6 (1, 10 oder 100 ng/ml) wurden in PBS mit 1% BSA für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die vorhandene Menge an IL-6/sIL-6R Komplexen mittels IL-6/sIL-6R Komplex-ELISA analysiert. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SD von drei unabhängigen Experimenten. (D) Die Menge an gebundenem sIL-6R im IL-6/sIL-6R Komplex, dargestellt in Prozent (%), wurde anhand der Werte aus Abbildung 3.5C berechnet.

Basierend auf den gemessenen Mengen an IL-6/sIL-6R Komplexen wurde berechnet, wie viel des sIL-6R gebunden im Komplex vorlag, um Rückschlüsse auf die Bindekapazität an IL-6 ziehen zu können (Abbildung 3.5B). Dies erfolgte unter Verwendung des Molekulargewichts vom IL-6, sIL-6R und dem IL-6/sIL-6R Komplex (IL-6: 23,7 kDa; sIL-6R: 51,5 kDa; IL-6/sIL-6R Komplex: 75,2 kDa).

Anhand einer Beispielrechnung, wird die Bestimmung des im Komplex gebundenen sIL-6R erläutert. 5,05 ng/ml IL-6/sIL-6R Komplex wurden bei einer eingesetzten Menge von 75 ng/ml sIL-6R und 100 ng/ml IL-6 detektiert (Verhältnisse basierend auf dem Molekulargewicht von

Ergebnisse

IL-6 und sIL-6R im Komplex: $\sim 1/3$ IL-6 [31,5%] und $\sim 2/3$ sIL-6R [68,5%]). 5,05 ng/ml IL-6/sIL-6R Komplex wurden hierzu mit 0,685 multipliziert, um den Anteil an sIL-6R im Komplex zu ermitteln. Dies bedeutet, dass 3,459 ng/ml sIL-6R, und somit 4,61% des vorhandenen sIL-6R, gebunden in IL-6/sIL-6R Komplexen vorlagen ($3,459 \text{ ng/ml [Menge des sIL-6R im Komplex]} / 75 \text{ ng/ml [eingesetzte Menge sIL-6R]} \times 100 = 4,61\%$ des eingesetzten sIL-6R gebunden im Komplex). Anhand der Berechnungen wurde deutlich, dass bei einem 87fachen molaren Überschuss von IL-6 (1000 ng/ml, 42,2 nM) zum sIL-6R (25 ng/ml, 0,485 nM), maximal 13% des vorhandenen sIL-6R gebunden in IL-6/sIL-6R Komplexen vorlagen (Tabelle 3.2). Zusätzlich wurde die Menge an im Komplex gebundenem IL-6 berechnet, indem der Umrechnungsfaktor 0,315 verwendet wurde. Hierbei wurde festgestellt, dass bei allen untersuchten Konzentrationen zwischen $\sim 0,16$ -2% des vorhandenen IL-6 gebunden im Komplex vorlag. Alle gemessenen und berechneten Daten, bezüglich der quantifizierten Mengen an IL-6/sIL-6R Komplexen und gebundenem IL-6, sowie sIL-6R, aus Abbildung 3.5A, sind in Tabelle 3.2 dargestellt.

Als nächstes wurde der Versuchsaufbau umgedreht, indem drei feste Konzentrationen an IL-6 (1, 10 oder 100 ng/ml) mit aufsteigenden Konzentrationen an sIL-6R (1-1000 ng/ml) kombiniert und für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert wurden. Die Komplexmenge wurde anschließend mittels IL-6/sIL-6R Komplex-ELISA untersucht. Bei IL-6 Konzentrationen von 1 ng/ml oder 10 ng/ml wurde nur eine äußerst geringe Menge an Komplex nachgewiesen, maximal $0,91 \pm 0,15$ ng/ml IL-6/sIL-6R Komplex mit 200 ng/ml sIL-6R. In den Messreihen mit 100 ng/ml IL-6 wurde in Abhängigkeit zur vorliegenden sIL-6R Konzentration eine höhere Menge an Komplexen beobachtet. Maximal lagen $13,51 \pm 4,12$ ng/ml IL-6/sIL-6R Komplex bei 1000 ng/ml sIL-6R vor (Abbildung 3.5C). Vergleichsweise zum vorherigen Versuchsaufbau war nur ein geringer Anteil des sIL-6R gebunden im Komplex, maximal 7% bei 25 ng/ml sIL-6R und 100 ng/ml IL-6 (Abbildung 3.5D). Interessanterweise konnte anhand dieses Versuches auch gesehen werden, dass selbst bei einem 4,5fachen molaren Überschuss vom sIL-6R (1000 ng/ml, 19,4 nM) zum IL-6 (100 ng/ml, 4,22 nM), nach wie vor nur ein geringer Anteil des vorhandenen IL-6 (4,25%) gebunden im Komplex vorlag (Tabelle 3.3).

Zusammenfassend lässt sich somit sagen, dass die Menge an IL-6/sIL-6R Komplexen konzentrationsabhängig zu der vorhandenen Menge an rekombinantem IL-6, sowie rekombinantem sIL-6R, ist. Hieraus ergibt sich ein Datensatz, der beschreibt, wie viel Komplex maximal vorliegen kann, wenn bestimmte Mengen an IL-6 und sIL-6R vorhanden sind. Zusätzlich ergibt sich, wie viel Prozent des IL-6 und sIL-6R gebunden im Komplex vorliegen kann. Dabei wurde festgestellt, dass nur ein geringer Anteil des vorhandenen IL-6, sowie des sIL-6R, gebunden im Komplex vorlagen. In dem folgenden Abschnitt wurde die entstehende Menge an IL-6/sIL-6R Komplexen in humanem Serum mit darin enthaltenem endogenem sIL-6R und rekombinantem IL-6 untersucht.

Tabelle 3.2: Zusammenfassung der Ergebnisse der IL-6/sIL-6R Komplexmengen mit drei Konzentrationen an rekombinantem sIL-6R und ansteigenden Mengen an rekombinantem IL-6 aus Abbildung 3.5A. Dargestellt sind die gemessenen Werte aus Abbildung 3.5A, bezüglich der IL-6/sIL-6R Komplexmengen mit rekombinantem IL-6 (1-1000 ng/ml) und sIL-6R (25, 50 oder 75 ng/ml). Die Berechnung des im Komplex gebundenem IL-6 und sIL-6R ist in Abschnitt 3.1.5 beschrieben (n.d. = nicht detektierbar). Dargestellt ist der Mittelwert \pm SD von drei unabhängigen Experimenten.

IL-6 (ng/ml)	Rekombinanter sIL-6R (25 ng/ml)			Rekombinanter sIL-6R (50 ng/ml)			Rekombinanter sIL-6R (75 ng/ml)		
	IL-6/sIL-6R Komplex (ng/ml)	Gebundenes IL-6 (%)	Gebundener sIL-6R (%)	IL-6/sIL-6R Komplex (ng/ml)	Gebundenes IL-6 (%)	Gebundener sIL-6R (%)	IL-6/sIL-6R Komplex (ng/ml)	Gebundenes IL-6 (%)	Gebundener sIL-6R (%)
1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
5	0,06 (\pm 0,03)	0,42 (\pm 0,22)	0,18 (\pm 0,09)	0,07 (\pm 0,07)	0,49 (\pm 0,48)	0,1 (\pm 0,1)	0,02 (\pm 0,04)	0,13 (\pm 0,25)	0,02 (\pm 0,03)
10	0,18 (\pm 0,01)	0,59 (\pm 0,04)	0,5 (\pm 0,03)	0,35 (\pm 0,08)	1,09 (\pm 0,26)	0,47 (\pm 0,11)	0,37 (\pm 0,08)	1,17 (\pm 0,27)	0,33 (\pm 0,07)
25	0,69 (\pm 0,05)	0,88 (\pm 0,07)	1,9 (\pm 0,15)	1,18 (\pm 0,22)	1,48 (\pm 0,28)	1,61 (\pm 0,3)	1,4 (\pm 0,23)	1,77 (\pm 0,3)	1,28 (\pm 0,21)
50	1,3 (\pm 0,008)	0,82 (\pm 0,01)	3,56 (\pm 0,02)	2,37 (\pm 0,44)	1,49 (\pm 0,28)	3,24 (\pm 0,59)	2,68 (\pm 0,3)	1,69 (\pm 0,19)	2,45 (\pm 0,27)
100	2,3 (\pm 0,13)	0,73 (\pm 0,04)	6,34 (\pm 0,36)	4,05 (\pm 0,86)	1,28 (\pm 0,27)	5,55 (\pm 1,17)	5,05 (\pm 0,42)	1,59 (\pm 0,13)	4,61 (\pm 0,36)
200	3,3 (\pm 0,04)	0,52 (\pm 0,01)	9,12 (\pm 0,12)	5,56 (\pm 1,22)	0,88 (\pm 0,19)	7,61 (\pm 1,67)	6,42 (\pm 0,88)	1,01 (\pm 0,14)	5,86 (\pm 0,8)
1000	5 (\pm 0,28)	0,16 (\pm 0,01)	13,78 (\pm 0,79)	8,49 (\pm 2,1)	0,27 (\pm 0,07)	11,6 (\pm 2,88)	9,86 (\pm 0,74)	0,31 (\pm 0,02)	9 (\pm 0,6)

Tabelle 3.3: Zusammenfassung der Ergebnisse der IL-6/sIL-6R Komplexmengen mit drei Konzentrationen an rekombinatem IL-6 und ansteigenden Mengen an rekombinatem sIL-6R aus Abbildung 3.5C. Dargestellt sind die gemessenen Werte aus Abbildung 3.5C, bezüglich der IL-6/sIL-6R Komplexmengen mit rekombinatem sIL-6R (1-1000 ng/ml) und IL-6 (1, 10 oder 100 ng/ml). Die Berechnung des im Komplex gebundenem IL-6 und sIL-6R ist in Abschnitt 3.1.5 beschrieben (n.d. = nicht detektierbar). Dargestellt ist der Mittelwert \pm SD von drei unabhängigen Experimenten.

Rekombinantes IL-6 (1 ng/ml)				Rekombinantes IL-6 (10 ng/ml)			Rekombinantes IL-6 (100 ng/ml)		
sIL-6R (ng/ml)	IL-6/sIL-6R Komplex (ng/ml)	Gebundenes IL-6 (%)	Gebundener sIL-6R (%)	IL-6/sIL-6R Komplex (ng/ml)	Gebundenes IL-6 (%)	Gebundener sIL-6R (%)	IL-6/sIL-6R Komplex (ng/ml)	Gebundenes IL-6 (%)	Gebundener sIL-6R (%)
1	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	0,04 (\pm 0,09)	0,01 (\pm 0,02)	2,83 (\pm 5,98)
5	n.d.	n.d.	n.d.	0,01 (\pm 0,01)	0,035 (\pm 0,028)	0,15 (\pm 0,12)	0,37 (\pm 0,14)	0,11 (\pm 0,04)	5 (\pm 1,87)
10	n.d.	n.d.	n.d.	0,07 (\pm 0,06)	0,21 (\pm 0,17)	0,46 (\pm 0,38)	0,87 (\pm 0,26)	0,27 (\pm 0,08)	5,95 (\pm 1,8)
25	n.d.	n.d.	n.d.	0,24 (\pm 0,07)	0,77 (\pm 0,21)	0,67 (\pm 0,18)	2,59 (\pm 0,64)	0,81 (\pm 0,2)	7,08 (\pm 1,77)
50	0,01 (\pm 0,01)	0,22 (\pm 0,19)	0,009 (\pm 0,008)	0,44 (\pm 0,07)	1,38 (\pm 0,21)	0,6 (\pm 0,09)	4,85 (\pm 1,09)	1,52 (\pm 0,34)	6,65 (\pm 1,5)
100	0,01 (\pm 0,01)	0,43 (\pm 0,35)	0,009 (\pm 0,007)	0,74 (\pm 0,07)	2,31 (\pm 0,21)	0,5 (\pm 0,04)	7,65 (\pm 1,23)	2,4 (\pm 0,38)	5,24 (\pm 0,84)
200	0,02 (\pm 0,01)	0,54 (\pm 0,42)	0,006 (\pm 0,004)	0,91 (\pm 0,15)	2,87 (\pm 0,47)	0,31 (\pm 0,05)	11,38 (\pm 1,87)	3,58 (\pm 0,59)	3,9 (\pm 0,64)
1000	0,003 (\pm 0,01)	0,09 (\pm 0,23)	0,0002 (\pm 0,005)	0,55 (\pm 0,16)	1,73 (\pm 0,5)	0,038 (\pm 0,011)	13,51 (\pm 4,12)	4,25 (\pm 1,29)	0,93 (\pm 0,28)

3.1.6 Quantifizierung der IL-6/sIL-6R Komplexmengen in humanem Blutserum mit endogenem sIL-6R und rekombinantem IL-6

Nachdem die vorliegenden IL-6/sIL-6R Komplexmengen in einem Standardpuffer (PBS mit 1% BSA) mit rekombinantem IL-6 und sIL-6R untersucht wurden, war der nächste Schritt die Quantifizierung von IL-6/sIL-6R Komplexen in humanem Blutserum, in dem endogener sIL-6R enthalten ist. Über die gezielte Zugabe von verschiedenen Mengen an rekombinantem IL-6 in humanes Serum, sollten milde bis sehr starke Entzündungsbedingungen simuliert werden, bei denen erhöhte Mengen an endogenem IL-6 im Serum gemessen wurde (Waage *et al.* 1989a; Nowell *et al.* 2003). Hierdurch sollten Erkenntnisse darüber gewonnen werden, zu welchen Mengen IL-6/sIL-6R Komplexe im Serum von Menschen vorliegen können.

Für diese Untersuchungen wurde 10 freiwilligen und gesunden Probanden venöses Blut in Serum/CAT Blutentnahmeröhrchen entnommen. Der Serumanteil wurde anschließend von den festen Blutbestandteilen (Erythrozyten, Leukozyten und Thrombozyten) isoliert (s. Abschnitt 2.2.2.5). Die Serumproben wurden im Anschluss auf die Mengen an IL-6, sIL-6R, sgp130 und IL-6/sIL-6R Komplexe (Abbildung 3.6A) mittels ELISA untersucht (s. Abschnitt 2.2.2.3). In allen Serumproben war die Konzentration von endogenem IL-6 und des endogenen IL-6/sIL-6R Komplexes unter dem Detektionsbereich des jeweiligen ELISAs (<2 pg/ml IL-6 ELISA; <78,1 pg/ml IL-6/sIL-6R Komplex-ELISA). Dies war zu erwarten, da in gesunden Menschen nur sehr geringe Mengen an IL-6 vorhanden sind (Akira *et al.* 1993; Kishimoto *et al.* 1995). Eine Serumprobe mit hohen Mengen an IL-6 wäre ausgeschlossen worden, um die detektierbare Menge an IL-6/sIL-6R Komplexen, durch die gezielte Zugabe von rekombinanten IL-6, nicht zu verfälschen. Für den sIL-6R wurden Serumkonzentrationen von 36-69 ng/ml (Mittelwert aller Proben: $52,9 \pm 16,3$) und für sgp130 wurden Serumkonzentrationen von 205-330 ng/ml (Mittelwert aller Proben: $243 \pm 38,9$ ng/ml) gemessen.

Um die Menge an IL-6/sIL-6R Komplexen im Serum zu quantifizieren, wurde das im IL-6/sIL-6R ELISA Kit gelieferte IL-6/sIL-6R Komplexstandardprotein laut Herstellerangaben in dem mitgelieferten Puffer (R&D Diluent) verdünnt. Äquivalent hierzu wurde das IL-6/sIL-6R Komplexstandardprotein im Serum von drei Probanden verdünnt (Abbildung 3.6B). Durch diesen Versuch wurde festgestellt, dass der in Serum verdünnte IL-6/sIL-6R Komplexstandard um den Faktor 8,3 schwächer zu detektieren war, als der Standard, der in dem mitgelieferten Puffer (R&D Diluent) verdünnt wurde. Daraus wurde geschlossen, dass aufgrund von Serumbestandteilen, die Detektion von IL-6/sIL-6R Komplexen im Serum deutlich reduziert sein würde. Für die darauffolgenden Quantifizierungen von IL-6/sIL-6R Komplexen im Serum, wurden deswegen alle gemessenen Werte mit dem Korrekturfaktor 8,3 multipliziert, um die serumbedingte Beeinträchtigung der Komplexdetektion zu normalisieren.

Ergebnisse

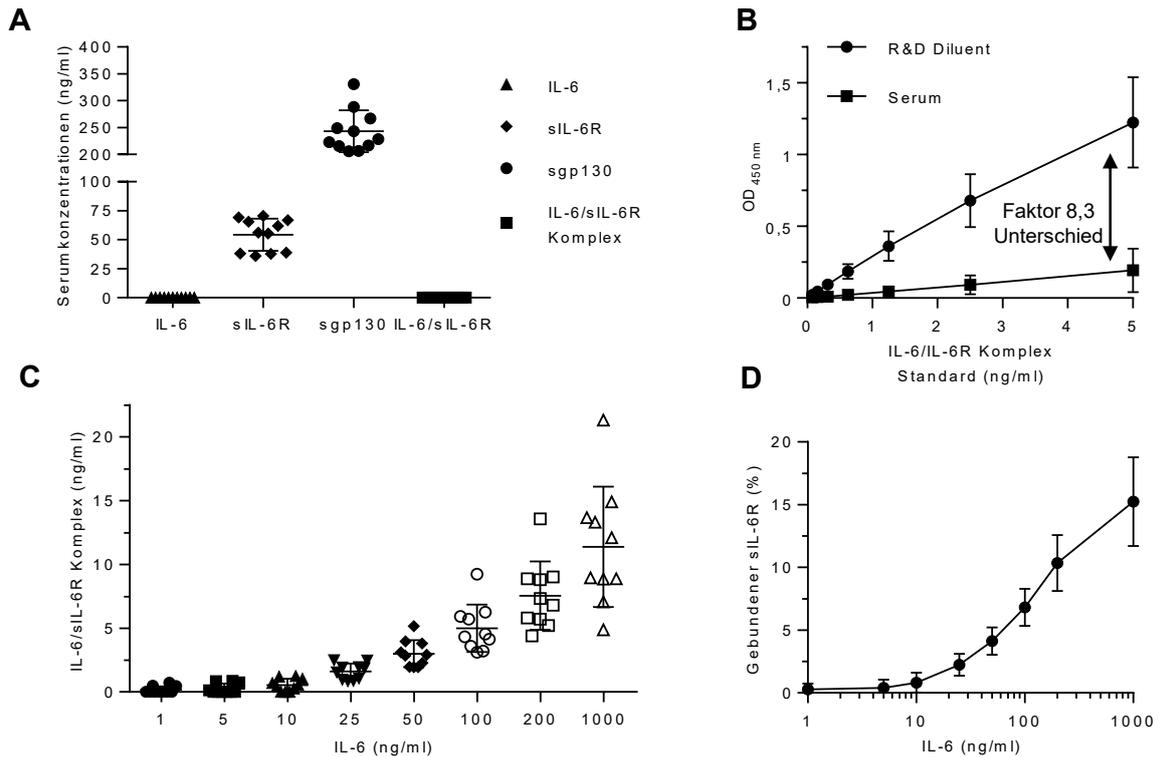


Abbildung 3.6: IL-6/sIL-6R Komplexmengen in humanem Blutserum mit endogenem sIL-6R und rekombinantem IL-6. (A) Serumkonzentrationen von IL-6, sIL-6R, sgp130 und IL-6/sIL-6R Komplex von 10 gesunden Probanden, dessen Serum für die Untersuchung der IL-6/sIL-6R Komplexbestimmung mit endogenem sIL-6R verwendet wurde. Alle Werte wurden mittels entsprechendem ELISAs quantifiziert. Die mittlere Linie stellt den Mittelwert und die Fehlerbalken (obere und untere Linie) die Standardabweichung dar. (B) IL-6/sIL-6R Komplexstandardprotein wurde gleichmäßig in dem vom Hersteller gelieferten Puffer (R&D Diluent) oder in humanem Serum verdünnt (Konzentrationsreihe von 0-5 ng/ml) und mittels IL-6/sIL-6R Komplex-ELISA detektiert. Das im Serum verdünnte Standardprotein wurde um den Faktor 8,3 schwächer detektiert, als der Standard, verdünnt in R&D Diluent. Die im Serum gemessenen Menge an IL-6/sIL-6R Komplexen wurden mit dem Korrekturfaktor 8,3 multipliziert, um eine Normalisierung der Daten vorzunehmen. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SD von drei unabhängigen Experimenten. (C) Humanes Serum wurden mit der entsprechenden Menge an rekombinantem IL-6 (1-1000 ng/ml) versetzt und für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert, bevor die Menge an IL-6/sIL-6R Komplexen mittels ELISA quantifiziert wurde. Dargestellt sind die Ergebnisse der IL-6/sIL-6R Komplexmengen im Serum von 10 gesunden Probanden. Die mittlere Linie stellt den Mittelwert und die Fehlerbalken (obere und untere Linie) die Standardabweichung dar. (D) Die Menge an gebundenem sIL-6R im IL-6/sIL-6R Komplex, dargestellt in Prozent (%), wurde anhand der Werte aus Abbildung 3.6C berechnet (beschrieben in Abschnitt 3.1.5). Dargestellt ist der Mittelwert \pm SD von 10 unabhängigen Experimenten.

In Abbildung 3.6C sind die Ergebnisse der Titrations von rekombinantem IL-6 zu endogenem sIL-6R im Serum von 10 Probanden dargestellt. Um die Menge an IL-6/sIL-6R Komplexen in humanem Serum zu untersuchen, wurden 500 μ l Serum mit einer definierten Menge an IL-6 versetzt (1-1000 ng/ml) und unter kontinuierlicher Durchmischung für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Durch die Zugabe von niedrigeren Mengen an IL-6 (1-50 ng/ml) wurden mittlere bis starke und durch die Zugabe von höheren IL-6 Mengen (100-1000 ng/ml) sehr starke Entzündungsbedingungen simuliert. Die Proben wurden anschließend mittels IL-6/sIL-6R Komplex-ELISA analysiert. Wie bereits in Abschnitt 3.1.5 dargestellt, wurde beobachtet, dass konzentrationsabhängig zur eingesetzten Menge an IL-6, eine einsteigende Menge an IL-6/sIL-6R Komplexen detektiert wurde. Bereits durch die Zugabe von 1 ng/ml IL-6 wurde eine geringe Menge von $0,16 \pm 0,27$ ng/ml IL-6/sIL-6R Komplex detektiert. Maximal wurden $11,3 \pm$

Ergebnisse

4,71 ng/ml an IL-6/sIL-6R Komplexen gemessen, nach Zugabe von 1000 ng/ml IL-6 (Abbildung 3.6C und Tabelle 3.4). Basierend auf den ermittelten Daten aus Abbildung 3.6C wurde die im IL-6/sIL-6R Komplex gebundene Menge an IL-6, sowie von gebundenem sIL-6R, berechnet (beschrieben in Abschnitt 3.1.5). Nur ein geringer Anteil des eingesetzten rekombinanten IL-6 lag gebunden mit dem endogenen sIL-6R im Komplex vor (Tabelle 3.4). Unter äquimolaren Verhältnissen von IL-6 (25 ng/ml, 1,05 nM) zum endogenen sIL-6R ($52,9 \pm 16,3$ ng/ml, 1,03 nM), lag maximal $2,01 \pm 0,8\%$ des vorhandenen IL-6 gebunden in IL-6/sIL-6R Komplexen vor. Selbst bei einem 5fachen molaren Überschuss vom endogenem sIL-6R zu IL-6 (5 ng/ml, 0,21 nM) lag nur ein geringer Anteil des vorhandenen IL-6 gebunden im Komplex vor ($1,64 \pm 2,4\%$). Die Menge an im Komplex gebundenen endogenen sIL-6R stieg konzentrationsabhängig zu der Menge des vorhandenen IL-6 an (Abbildung 3.6D, Tabelle 3.4). Unter äquimolaren Verhältnissen befanden sich $2,24 \pm 0,87\%$ des endogenen sIL-6R im Komplex mit IL-6. Maximal lag $15,24 \pm 3,54\%$ des vorhandenen endogenen sIL-6R gebunden in IL-6/sIL-6R Komplexen vor. Dies wurde bei einem 42fachen molaren Überschuss von IL-6 (1000 ng/ml; 42,2 nM) zum endogenen sIL-6R nachgewiesen. Die Ergebnisse der IL-6/sIL-6R Komplexmengen in humanem Serum, sowie die im Komplex gebundene Menge an IL-6 und sIL-6R, sind in Tabelle 3.4 zusammengefasst dargestellt.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die Menge an IL-6/sIL-6R Komplexen, mittels des im Blutserum enthaltenen endogenen sIL-6R, konzentrationsabhängig zur eingesetzten Menge an IL-6 ist und nur geringe Mengen des vorhandenen sIL-6R bzw. IL-6 gebunden im Komplex vorliegen. Die entstehende Menge an IL-6/sIL-6R Komplexen im humanen Serum war vergleichbar, zu der im Abschnitt 3.1.5 dargestellten Komplexmengen in Standardpuffer mit rekombinanten sIL-6R.

Tabelle 3.4: Zusammenfassung der Ergebnisse der IL-6/sIL-6R Komplexmengen in humanem Serum mit endogenem sIL-6R und rekombinatem IL-6. Dargestellt sind die gemessenen Werte aus Abbildung 3.6C, bezüglich der IL-6/sIL-6R Komplexmengen in humanem Serum mit rekombinatem IL-6. Die Berechnung des im Komplex gebundenem IL-6 und sIL-6R (beschrieben in Abschnitt 3.1.5) basiert auf die gemessenen Mengen an IL-6/sIL-6R Komplexen im Serum. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SD von den Messungen mit dem Serum von 10 gesunden Probanden.

Endogener sIL-6R (52,9 \pm 16,3 ng/ml)			
IL-6 (ng/ml)	IL-6/sIL-6R Komplex (ng/ml)	Gebundenes IL-6 (%)	Gebundener sIL-6R (%)
1	0,16 (\pm 0,27)	5,32 (\pm 8,7)	0,27 (\pm 0,48)
5	0,26 (\pm 0,39)	1,64 (\pm 2,4)	0,4 (\pm 0,65)
10	0,54 (\pm 0,49)	1,71 (\pm 1,5)	0,81 (\pm 0,81)
25	1,59 (\pm 0,63)	2,01 (\pm 0,8)	2,24 (\pm 0,87)
50	2,99 (\pm 1,05)	1,89 (\pm 0,67)	4,14 (\pm 1,09)
100	5 (\pm 1,85)	1,58 (\pm 0,58)	6,82 (\pm 1,48)
200	7,55 (\pm 2,67)	1,19 (\pm 0,42)	10,35 (\pm 2,22)
1000	11,3 (\pm 4,71)	0,36 (\pm 0,15)	15,24 (\pm 3,54)

3.1.7 Die experimentell bestimmte Menge an IL-6/sIL-6R Komplexen ist deutlich geringer als die berechnete Menge

Um weitere Erkenntnisse über die IL-6/sIL-6R Komplexmengen zu erlangen, wurde die theoretisch vorliegenden Komplexmengen berechnet (Abschnitt 3.1.4), damit ein Vergleich mit den gemessenen Daten erfolgen kann. Für die Berechnung der IL-6/sIL-6R Komplexmengen wurde der in Abschnitt 3.1.3 ermittelte K_D -Wert von 22 nM verwendet. Hierbei wurde vor allem verglichen, wie viel des vorhandenen IL-6 bzw. sIL-6R gebunden in Komplexen vorlag. In Tabelle 3.5 ist die berechnete Menge (K_D Rechnung) und die gemessene Menge (ELISA) an in IL-6/sIL-6R Komplexen gebundenem sIL-6R in Prozent (%) dargestellt. Im Allgemeinen zeigten die Ergebnisse, dass ein deutlicher Unterschied zwischen berechneter und gemessener Menge vorhanden war (Tabelle 3.5). In den Versuchen mit rekombinantem sIL-6R (Abbildung 3.5A und B) war die berechnete Menge an im Komplex gebundenem sIL-6R durchschnittlich um den Faktor 4,4 höher, als die gemessene Menge. Bei 1000 ng/ml IL-6, dies entspricht einem 29 bis 87fachen molaren Überschuss zum sIL-6R (25-75 ng/ml), sollten anhand der Berechnung ~65% aller sIL-6R Moleküle gebunden in Komplexen vorliegen. Jedoch wurde anhand der ELISA-gemessenen Werte ersichtlich, dass nur maximal 13% des rekombinanten sIL-6R gebunden in IL-6/sIL-6R Komplexen vorlag. Ein geringerer Unterschied war bei den Messungen mit dem endogenen sIL-6R im Blutserum vorhanden. Hier war die berechnete Menge an im Komplex gebundenem sIL-6R um den Faktor 2,5 höher, als die gemessene Menge. Auch hier sollten anhand der Berechnung bei 1000 ng/ml IL-6 65% des endogenen sIL-6R im Komplex vorliegen. Allerdings lagen tatsächlich nur maximal 15% des endogenen sIL-6R gebunden im Komplex vor. Zusätzlich wurde ermittelt, wie hoch die Unterschiede an im Komplex gebundenem IL-6 waren. Anhand der Ergebnisse aus Abbildung 3.5A wurde ermittelt, dass die berechnete Menge an im Komplex gebundenem IL-6, mit rekombinanten sIL-6R, durchschnittlich um den Faktor 4 höher war, als die gemessene Menge (Tabelle 3.6). Anhand der Berechnung sollten maximal 6% des IL-6 im Komplex vorliegen (25 ng/ml IL-6 und 75 ng/ml sIL-6R), allerdings befanden sich tatsächlich nur 1,7% des IL-6 im Komplex. Ein geringerer Unterschied war in der Messreihe mit Serum, d.h. mit dem endogenen sIL-6R, zu beobachten. In dieser Messreihe war die berechnete Menge an gebundenem IL-6 um den Faktor 2,7 höher, als die gemessene Menge an gebundenem IL-6 in IL-6/sIL-6R Komplexen. Ein deutlicher Unterschied zwischen berechneter und gemessener Menge an im Komplex gebundenem IL-6 war vor allem anhand des Vergleiches der Werte aus Abbildung 3.5C zu erkennen. Innerhalb dieser Versuchsreihe wurden drei Konzentrationen an IL-6 verwendet (1, 10 oder 100 ng/ml) mit ansteigenden Mengen an sIL-6R (1-1000 ng/ml). Bei einem 4,6 bzw. 46fachen molaren Überschuss vom sIL-6R (1000 ng/ml, 19,4 nM) zum IL-6 (10 ng/ml, 0,422 nM bzw. 100 ng/ml, 4,22 nM) sollten anhand der berechneten Komplexbildung ~45% des vorhandenen IL-6 im Komplex gebunden sein. Anhand der Messung war allerdings

Ergebnisse

ersichtlich, dass bei 10 ng/ml IL-6 maximal 1,7% und bei 100 ng/ml IL-6 maximal 4,25% des vorhandenen IL-6 gebunden in IL-6/sIL-6R Komplexen war (Tabelle 3.7).

Zusammenfassend wurde festgestellt, dass die berechnete Menge an in IL-6/sIL-6R Komplexen gebundenem IL-6 und sIL-6R, sich deutlich von den gemessenen Werten unterscheidet. Basierend auf diesem Vergleich wurden weitere Versuche durchgeführt, um zu untersuchen, welche Faktoren die Detektion oder die Bildung von IL-6/sIL-6R Komplexen beeinflussen könnten.

Tabelle 3.5: Vergleich von berechneter zu gemessener Menge an sIL-6R, gebunden in IL-6/sIL-6R Komplexen, aus Abbildung 3.5A. Für die Berechnung der IL-6/sIL-6R Komplexmengen wurde der in Abschnitt 3.1.3 ermittelte K_D -Wert von 22 nM verwendet (K_D Rechnung) und die Menge an theoretisch gebundenem sIL-6R im Komplex wurde berechnet. Anhand der mittels ELISA gemessenen Werte an IL-6/sIL-6R Komplexen wurde die Menge an gebundenem sIL-6R bestimmt. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SD von drei unabhängigen Experimenten (rekombinantes IL-6 und sIL-6R, Abbildung 3.5B, Tabelle 3.2), sowie der Mittelwert \pm SD von den Messungen mit dem Serum von 10 Probanden (rekombinantes IL-6 und endogener sIL-6R, Abbildung 3.6D, Tabelle 3.4). n.d. = nicht detektierbar.

Titration	Rekombinanter sIL-6R (25 ng/ml)		Rekombinanter sIL-6R (50 ng/ml)		Rekombinanter sIL-6R (75 ng/ml)		Endogener sIL-6R (52,9 \pm 16,3 ng/ml)	
	K_D Rechnung (gebundener sIL-6R, %)	ELISA (gebundener sIL-6R, %)						
1	0,2	n.d.	0,2	n.d.	0,2	n.d.	0,2	0,27 (\pm 0,48)
5	0,9	0,18 (\pm 0,09)	0,9	0,1 (\pm 0,1)	0,9	0,02 (\pm 0,03)	0,9	0,4 (\pm 0,65)
10	1,8	0,16 (\pm 0,03)	1,8	0,47 (\pm 0,11)	1,8	0,33 (\pm 0,07)	1,8	0,81 (\pm 0,81)
25	4,5	1,53 (\pm 0,15)	4,4	1,61 (\pm 0,3)	4,3	1,28 (\pm 0,21)	4,4	2,24 (\pm 0,87)
50	8,6	3,29 (\pm 0,02)	8,4	3,24 (\pm 0,59)	8,3	2,45 (\pm 0,27)	8,4	4,14 (\pm 1,09)
100	15,8	5,79 (\pm 0,36)	15,6	5,55 (\pm 1,17)	15,4	4,61 (\pm 0,36)	15,6	6,82 (\pm 1,48)
200	27,4	9,08 (\pm 0,12)	27,1	7,61 (\pm 1,67)	26,8	5,86 (\pm 0,8)	27	10,35 (\pm 2,22)
1000	65,5	12,83 (\pm 0,79)	65,4	11,6 (\pm 2,88)	65,2	9 (\pm 0,6)	65,4	15,24 (\pm 3,54)

Tabelle 3.6: Vergleich von berechneter zu gemessener Menge an IL-6, gebunden in IL-6/sIL-6R Komplexen, aus Abbildung 3.5A. Für die Berechnung der IL-6/sIL-6R Komplexmengen wurde der in Abschnitt 3.1.3 ermittelte K_D -Wert von 22 nM verwendet (K_D Rechnung) und die Menge an theoretisch gebundenem IL-6 im Komplex wurde berechnet. Anhand der mittels ELISA gemessenen Werte an IL-6/sIL-6R Komplexen wurde die Menge an gebundenem IL-6 bestimmt. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SD von drei unabhängigen Experimenten (rekombinantes IL-6 und sIL-6R, Abbildung 3.5A, Tabelle 3.2), sowie der Mittelwert \pm SD von den Messungen mit dem Serum von 10 Probanden (rekombinantes IL-6 und endogener sIL-6R, Abbildung 3.6C, Tabelle 3.4). n.d. = nicht detektierbar.

Titration	Rekombinanter sIL-6R (25 ng/ml)		Rekombinanter sIL-6R (50 ng/ml)		Rekombinanter sIL-6R (75 ng/ml)		Endogener sIL-6R (52,9 \pm 16,3 ng/ml)	
	K_D Rechnung (gebundenes IL-6, %)	ELISA (gebundenes IL-6, %)	K_D Rechnung (gebundenes IL-6, %)	ELISA (gebundenes IL-6, %)	K_D Rechnung (gebundenes IL-6, %)	ELISA (gebundenes IL-6, %)	K_D Rechnung (gebundenes IL-6, %)	ELISA (gebundenes IL-6, %)
1	2,2	n.d.	4,2	n.d.	6,2	n.d.	4,5	5,32 (\pm 8,7)
5	2,1	0,42 (\pm 0,22)	4,2	0,49 (\pm 0,48)	6,2	0,13 (\pm 0,25)	4,4	1,64 (\pm 2,4)
10	2,1	0,59 (\pm 0,04)	4,2	1,09 (\pm 0,26)	6,1	1,17 (\pm 0,27)	4,4	1,71 (\pm 1,5)
25	2,1	0,88 (\pm 0,07)	4	1,48 (\pm 0,28)	6	1,77 (\pm 0,3)	4,3	2,01 (\pm 0,8)
50	2	0,82 (\pm 0,01)	3,9	1,49 (\pm 0,28)	4,7	1,69 (\pm 0,19)	4,1	1,89 (\pm 0,67)
100	1,8	0,73 (\pm 0,04)	3,6	1,28 (\pm 0,27)	5,3	1,59 (\pm 0,13)	3,8	1,58 (\pm 0,58)
200	1,6	0,52 (\pm 0,01)	3,1	0,88 (\pm 0,19)	4,6	1,01 (\pm 0,14)	3,3	1,19 (\pm 0,42)
1000	0,8	0,16 (\pm 0,01)	1,5	0,27 (\pm 0,07)	2,2	0,31 (\pm 0,02)	1,6	0,36 (\pm 0,15)

Ergebnisse

Tabelle 3.7: Vergleich von berechneter zu gemessener Menge an IL-6, gebunden in IL-6/sIL-6R Komplexen, aus Abbildung 3.5C. Für die Berechnung der IL-6/sIL-6R Komplexmengen wurde der in Abschnitt 3.1.3 ermittelte K_D -Wert von 22 nM verwendet (K_D Rechnung) und die Menge an theoretisch gebundenem IL-6 im Komplex wurde berechnet. Anhand der mittels ELISA gemessenen Werte an IL-6/sIL-6R Komplexen, aus Abbildung 3.5C, wurde die Menge an gebundenem IL-6 bestimmt. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SD von drei unabhängigen Experimenten (rekombinantes IL-6 und sIL-6R, Abbildung 3.5C, Tabelle 3.3). n.d. = nicht detektierbar.

Titration	Rekombinantes IL-6 (1 ng/ml)		Rekombinantes IL-6 (10 ng/ml)		Rekombinantes IL-6 (100 ng/ml)	
	K_D Rechnung (gebundenes IL-6, %)	ELISA (gebundenes IL-6, %)	K_D Rechnung (gebundenes IL-6, %)	ELISA (gebundenes IL-6, %)	K_D Rechnung (gebundenes IL-6, %)	ELISA (gebundenes IL-6, %)
1	0,1	n.d.	0,1	n.d.	0,1	0,01 (\pm 0,02)
5	0,4	n.d.	0,4	0,03 (\pm 0,02)	0,4	0,11 (\pm 0,04)
10	0,9	n.d.	0,9	0,21 (\pm 0,17)	0,7	0,27 (\pm 0,08)
25	2,2	n.d.	2,1	0,77 (\pm 0,21)	1,8	0,81 (\pm 0,2)
50	4,2	0,22 (\pm 0,19)	4,2	1,38 (\pm 0,21)	3,6	1,52 (\pm 0,34)
100	8,1	0,43 (\pm 0,35)	8	2,31 (\pm 0,21)	7	2,4 (\pm 0,38)
200	15	0,54 (\pm 0,42)	14,8	2,87 (\pm 0,47)	13,1	3,58 (\pm 0,59)
1000	46,8	0,09 (\pm 0,23)	46,6	1,73 (\pm 0,5)	44,4	4,25 (\pm 1,29)

3.1.8 Einfluss von sgp130 auf die Detektion von IL-6/sIL-6R Komplexen

In humanem Blutserum liegen sgp130 Konzentrationen im Bereich zwischen 100-400 ng/ml vor (Gaillard *et al.* 1999). Es wurde in früheren Studien bereits gezeigt, dass endogenes sgp130 spezifisch an den IL-6/sIL-6R Komplex bindet und den Trans-Signalweg inhibiert. Der klassische Signalweg wird nicht gehemmt, da sgp130 keine Affinität zu IL-6 oder zum sIL-6R alleine aufweist (Jostock *et al.* 2001; Garbers *et al.* 2011b). In Bezug auf die Quantifizierung von IL-6/sIL-6R Komplexen wurde daher untersucht, inwiefern endogenes sgp130 die Detektion des Komplexes beeinträchtigen kann. Dies soll dabei helfen zu untersuchen, wie stark endogenes sgp130 an IL-6/sIL-6R Komplexe bindet, um dessen Signalweiterleitung zu blockieren. Für die ersten Untersuchungen wurde rekombinantes sgp130Fc mit rekombinantem IL-6 und sIL-6R verwendet. Bei sgp130Fc handelt es sich um ein Fusionsprotein, bei dem die extrazellulären Domänen von zwei sgp130 Molekülen über den Fc-Teil eines IgG1 Antikörpers dimerisieren. Sgp130Fc hat eine 10fach höhere Affinität zum IL-6/sIL-6R Komplex, als monomeres endogenes sgp130 (Jostock *et al.* 2001).

In Abbildung 3.7A ist der Einfluss von sgp130Fc auf die Detektion von IL-6/sIL-6R Komplexen dargestellt. Hierzu wurde 50 ng/ml rekombinanter sIL-6R mit verschiedenen Konzentrationen an rekombinantem IL-6 (1-1000 ng/ml) und 1 μ g/ml sgp130Fc versetzt. Als Kontrolle wurde eine Versuchsreihe ohne sgp130Fc erstellt. Die Proben wurden für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend mittels ELISA analysiert. In der Messreihe ohne sgp130Fc wurde

Ergebnisse

eine IL-6 konzentrationsabhängige ansteigende Menge an IL-6/sIL-6R Komplexen detektiert, wie in Abschnitt 3.1.5. Durch die Zugabe von 1 µg/ml sgp130Fc wurde die Detektion des IL-6/sIL-6R Komplex allerdings vollständig inhibiert.

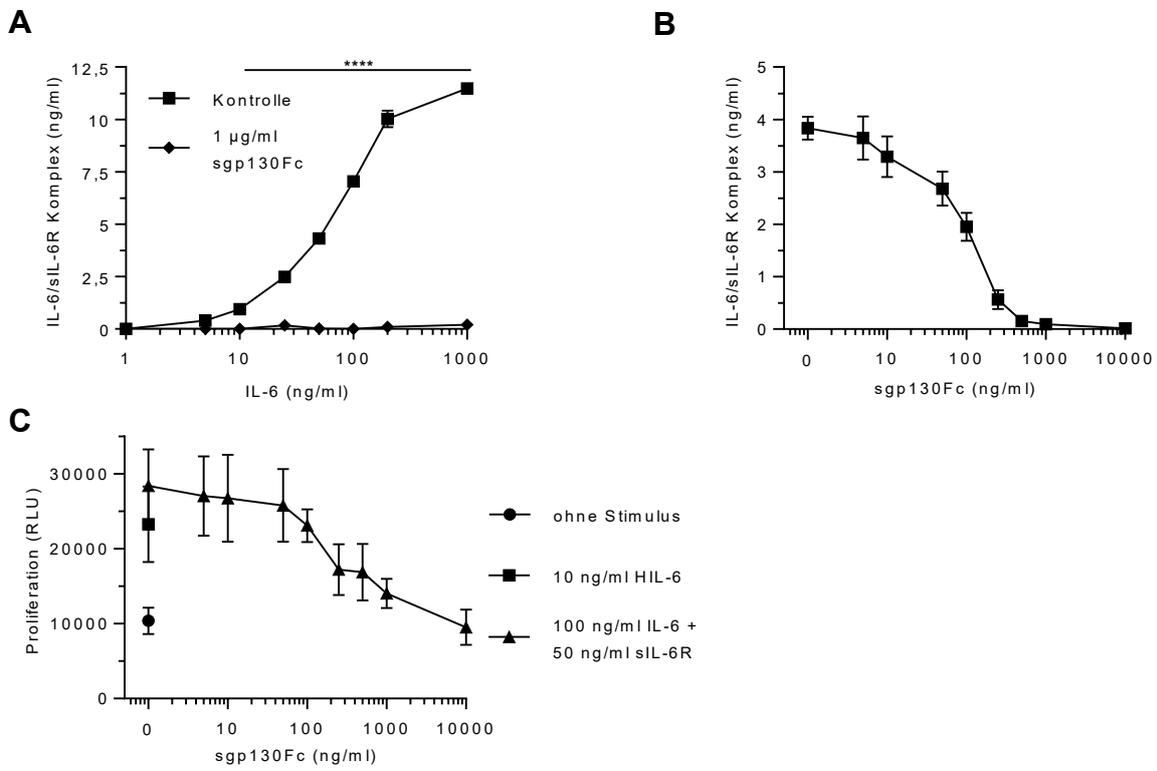


Abbildung 3.7: Konzentrationsabhängiger Einfluss von sgp130Fc auf die Quantifizierung von IL-6/sIL-6R Komplexen mit rekombinantem IL-6 und sIL-6R. (A) IL-6 (1-1000 ng/ml) wurde mit 50 ng/ml sIL-6R und sgp130Fc (0 oder 1 µg/ml) für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Menge an IL-6/sIL-6R Komplexen wurde mittels ELISA quantifiziert. Dargestellt ist eine repräsentative Auswertung von drei unabhängigen Experimenten. **(B)** 100 ng/ml IL-6 wurden mit 50 ng/ml sIL-6R und aufsteigenden Konzentrationen an sgp130Fc (5-10.000 ng/ml) kombiniert und für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Menge an IL-6/sIL-6R Komplexen wurde mittels ELISA detektiert. Dargestellt ist der Mittelwert ± SD von drei unabhängigen Experimenten. **(C)** Proliferation von Ba/F3-gp130 Zellen nach 72 h bei 37°C mit 10 ng/ml HIL-6 oder 100 ng/ml IL-6 kombiniert mit 50 ng/ml sIL-6R und aufsteigenden Konzentrationen an sgp130Fc (5-10.000 ng/ml). Dargestellt ist eine repräsentative Auswertung von drei unabhängigen Experimenten. Die Berechnung der Signifikanz wurde unter Verwendung eines *two-way* ANOVA-Test mit anschließendem Bonferroni-Test durchgeführt ($p \leq 0,05 = *$, $p \leq 0,01 = **$, $p \leq 0,001 = ***$, $p \leq 0,0001 = ****$).

Anschließend wurde der inhibitorische Effekt von ansteigenden sgp130Fc Konzentrationen auf die Detektion des IL-6/sIL-6R Komplexes mittels ELISA und auf zelluläre Proliferation, induziert über den Trans-Signalweg, untersucht. Hierzu wurden definierte Konzentrationen von rekombinantem IL-6 (100 ng/ml) und sIL-6R (50 ng/ml) mit einsteigenden Mengen an sgp130Fc (5-10.000 ng/ml) verwendet. In Abbildung 3.7B ist der konzentrationsabhängige Einfluss von sgp130Fc auf die Detektion von IL-6/sIL-6R Komplexen mittels ELISA dargestellt. Ohne sgp130Fc wurde $3,83 \pm 0,21$ ng/ml IL-6/sIL-6R Komplex detektiert und über die Zugabe von 100 ng/ml sgp130Fc wurde die detektierbare Menge auf 50% reduziert ($1,95 \pm 0,26$ ng/ml). Ab 1000 ng/ml sgp130Fc wurde die Detektion von IL-6/sIL-6R Komplexen vollständig blockiert. In Abbildung 3.7C ist der konzentrationsabhängige inhibitorische Effekt von sgp130Fc auf die Trans-Signalweg-induzierte Zellproliferation, über den IL-6/sIL-6R Komplex, dargestellt. Dies

Ergebnisse

erfolgte über einen Proliferationsassay (s. Abschnitt 2.2.3.7), bei dem Ba/F3-gp130 Zellen mit 100 ng/ml IL-6, 50 ng/ml sIL-6R und ansteigenden sgp130Fc Konzentrationen (5-10.000 ng/ml) für 72 h bei 37°C inkubiert wurden. Als Kontrolle für induzierte Proliferation über den Trans-Signalweg wurden 10 ng/ml HIL-6 und als Negativkontrolle wurden unstimulierte Zellen verwendet. Die HIL-6-induzierte Zellproliferation war hierbei in einem vergleichbaren Bereich zu der Proliferation, induziert durch 100 ng/ml IL-6 kombiniert mit 50 ng/ml sIL-6R. Sgp130Fc reduzierte die IL-6/sIL-6R Komplex-induzierte Proliferation konzentrationsabhängig. Eine halbmaximale Inhibition der Zellproliferation erfolgte bei 200 ng/ml sgp130Fc. Durch Zugabe von 10.000 ng/ml sgp130Fc wurde die Zellproliferation vollständig inhibiert (Abbildung 3.7C). Diese Daten verdeutlichen, dass bereits 100-200 ng/ml sgp130Fc einen vergleichbaren Einfluss auf die Detektion von IL-6/sIL-6R Komplexen und auf die Zellproliferation, induziert über den Trans-Signalweg, ausübten.

Im humanen Serum liegen sgp130 Konzentrationen von 100-400 ng/ml vor (Gaillard *et al.* 1999). Um einen Vergleich zwischen dem Einfluss von endogenem sgp130 und sgp130Fc durchzuführen, musste beachtet werden, dass sgp130Fc eine 10fach höhere Affinität zum IL-6/sIL-6R Komplex aufweist, als endogenes sgp130. Anhand Abbildung 3.7B ist ersichtlich, dass bereits bei 10 ng/ml sgp130Fc (entspricht 100 ng/ml sgp130) und 40 ng/ml sgp130Fc (entspricht 400 ng/ml sgp130), die Detektion von IL-6/sIL-6R Komplexen um 14% bzw. 23% verringert wurde. Aufgrund dieser Tatsache wurde als nächstes der Einfluss von endogenem sgp130 auf die Quantifizierung von IL-6/sIL-6R Komplexen untersucht. Hierzu wurde aus dem Serum eines gesunden Probanden endogenes sgp130 mittels Immunpräzipitation depletiert. Dafür wurden Protein-A Agarose Beads verwendet, die mit einem humanen α -sgp130 Antikörper gekoppelt wurden (s. Abschnitt 2.2.2.6). In Abbildung 3.8A ist zu erkennen, dass in dem unbehandelten Serum eine sgp130 Konzentration von 388 ± 23 ng/ml (sgp130-enthaltendes Serum) vorlag. Nach Immunpräzipitation wurde die sgp130 Konzentration auf $7,4 \pm 0,21$ ng/ml (sgp130-depletiertes Serum) reduziert. Dies entspricht einer 98%igen Reduzierung des endogenen sgp130 im Serum. Des Weiteren wurde überprüft, ob die Immunpräzipitation mittels Protein A-Agarose Beads einen Einfluss auf die Konzentration des endogenen sIL-6R hatte. Hierzu wurde das sgp130-enthaltende und -depletierte Serum mittels IL-6R ELISA untersucht (s. Abschnitt 2.2.2.3.1). Es wurde festgestellt, dass endogener sIL-6R nur zu einem geringen Anteil unspezifisch an Protein A-Agarose Beads gebunden hat. Im sgp130-enthaltenden Serum betrug die sIL-6R Konzentration 40,5 ng/ml und im sgp130-depletierten Serum 39,6 ng/ml (siehe Tabelle 3.8).

Anschließend wurden dem sgp130-enthaltenden und -depletierten Serum rekombinantes IL-6 zugesetzt (50, 100, 200 oder 1000 ng/ml) und für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurden die Proben auf die Mengen an IL-6/sIL-6R Komplexen mittels ELISA untersucht

Ergebnisse

(Abbildung 3.8B). Nach Zugabe von 50 ng/ml oder 100 ng/ml IL-6 wurde zwischen sgp130-enhaltenen und sgp130-depletierten Serum kein signifikanter Unterschied in der Menge an IL-6/sIL-6R Komplexen festgestellt. Im sgp130-enhaltenen Serum wurden $3 \pm 0,4$ ng/ml (50 ng/ml IL-6) bzw. $4,88 \pm 0,43$ ng/ml (100 ng/ml IL-6) und im sgp130-depletierten Serum $3 \pm 0,3$ ng/ml bzw. $5,3 \pm 0,34$ ng/ml IL-6/sIL-6R Komplex detektiert. Dagegen wurde nach Zugabe von hohen IL-6 Konzentrationen (200 ng/ml oder 1000 ng/ml) ein signifikanter Unterschied in der Menge an IL-6/sIL-6R Komplexen nachgewiesen. Im sgp130-depletierten Serum wurde eine 17% bzw. 21% erhöhte Menge an IL-6/sIL-6R Komplexen detektiert, als im Serum mit sgp130. Im sgp130-enhaltenem Serum wurde $6,83 \pm 0,73$ ng/ml (200 ng/ml IL-6) bzw. $11,12 \pm 0,94$ ng/ml (1000 ng/ml IL-6) und im sgp130-depletierten Serum $7,99 \pm 0,81$ ng/ml bzw. $13,4 \pm 1,46$ ng/ml IL-6/sIL-6R Komplex nachgewiesen. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass das endogene sgp130 nur zu einem geringen Anteil an IL-6/sIL-6R Komplexe bindet. Erst bei hohen IL-6 Konzentrationen war ein signifikant höherer Anteil von IL-6/sIL-6R Komplexen durch endogenes sgp130 gebunden, wodurch die Detektion im ELISA reduziert wurde. Die erhobenen Daten, aus Abbildung 3.8B, sind in Tabelle 3.8 dargestellt.

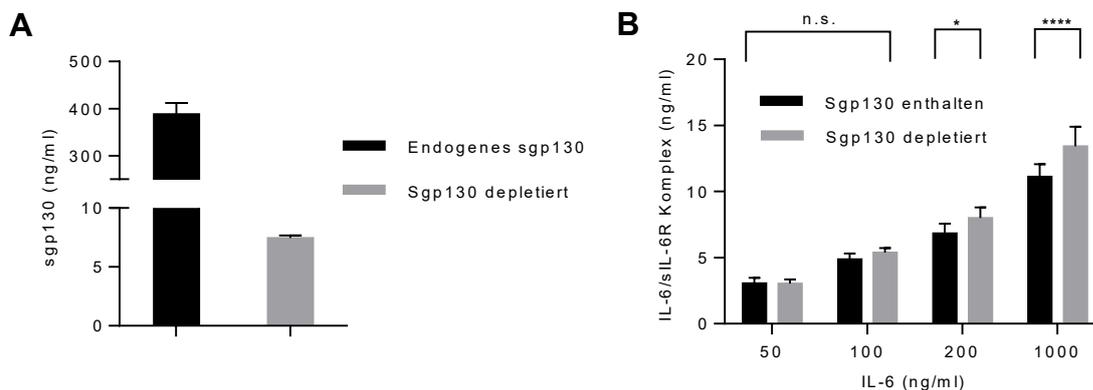


Abbildung 3.8: Einfluss von endogenem sgp130 auf die Quantifizierung von IL-6/sIL-6R Komplexen. (A) Isolierung des endogenen sgp130 aus dem Serum eines gesunden Probanden mittels Immunpräzipitation mit α -sgp130 Antikörper-gekoppelten Protein A-Agarose Beads, beschrieben in Abschnitt 2.2.2.6. Die Konzentration an endogenen sgp130 im Serum wurde vor (schwarzer Balken) und nach (grauer Balken) Immunpräzipitation mittels humanem sgp130 ELISA quantifiziert. **(B)** Verschiedene Konzentrationen an rekombinantem IL-6 (50-1000 ng/ml) wurden mit sgp130-enhaltenen und sgp130-depletierten Serum für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Menge an IL-6/sIL-6R Komplexen wurde mittels ELISA quantifiziert. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SD von drei unabhängigen Experimenten. Die Berechnung der Signifikanz wurde unter Verwendung eines *two-way* ANOVA-Test mit anschließendem Bonferroni-Test durchgeführt ($p \leq 0,05 = *$, $p \leq 0,01 = **$, $p \leq 0,001 = ***$, $p \leq 0,0001 = ****$, n.s. = nicht signifikant).

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass 100-200 ng/ml sgp130Fc sowohl die Trans-Signalweg induzierte Zellproliferation, als auch die Detektion des IL-6/sIL-6R Komplexes, zu 50% inhibiert. Sgp130Fc Konzentrationen (10-40 ng/ml), die den physiologischen sgp130 Konzentrationen entsprechen, weisen bereits einen geringen Einfluss auf die Quantifizierung des IL-6/sIL-6R Komplexes auf. Die Ergebnisse mit sgp130-enhaltenen und -depletierten

Ergebnisse

Serum belegen, dass endogenes sgp130 einen Einfluss auf die Detektion von IL-6/sIL-6R Komplexen hat, allerdings erst bei sehr hohen IL-6 Konzentrationen (200-1000 ng/ml).

Tabelle 3.8: Zusammengefasste Daten der IL-6/sIL-6R Komplexmengen in sgp130-enthaltenen und sgp130 depletierten-Serum. Der prozentuale Anteil an gebundenem sIL-6R im IL-6/sIL-6R Komplex in sgp130 enthaltenen und depletierten Serum wurde berechnet anhand der gemessenen IL-6/sIL-6R Komplexmengen aus Abbildung 3.8. Erläuterungen zur Rechnung sind in Abschnitt 3.1.5 beschrieben. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SD von drei unabhängigen Experimenten mit dem Serum eines Probanden.

Titration	Sgp130-enthaltene Serum (388 ng/ml)		Sgp130-depletiertes Serum (7,5 ng/ml)	
	IL-6/sIL-6R Komplex (ng/ml)	Gebundener sIL-6R (%) (40,5 ng/ml sIL-6R im Serum)	IL-6/sIL-6R Komplex (ng/ml)	Gebundener sIL-6R (%) (39,6 ng/ml sIL-6R im Serum)
50	3 (\pm 0,4)	5,18 (\pm 0,68)	3,0 (\pm 0,3)	5,27 (\pm 0,53)
100	4,88 (\pm 0,43)	8,26 (\pm 0,73)	5,3 (\pm 0,34)	9,3 (\pm 0,6)
200	6,83 (\pm 0,73)	11,56 (\pm 1,24)	7,99 (\pm 0,81)	13,83 (\pm 1,4)
1000	11,12 (\pm 0,94)	18,81 (\pm 1,6)	13,4 (\pm 1,46)	23,24 (\pm 2,54)

3.1.9 Stabilisierung von IL-6/sIL-6R Komplexen durch den Nanobody VHH6

Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wurde untersucht, inwiefern eine Stabilisierung des IL-6/sIL-6R Komplexes vorgenommen werden kann, um höhere Komplexmengen zu erhalten. In Bezug auf IL-6 und sIL-6R wurde vor kurzem ein Nanobody, namens VHH6, beschrieben, der spezifisch an den IL-6/sIL-6R Komplex bindet, somit den Protein-Komplex stabilisiert, und die Dissoziation beider Proteine stark reduziert. Verschiedene Aminosäuren der CDR1 und CDR3 des VHH6 interagieren mit IL-6, sowie dem sIL-6R, und CDR2 nur mit sIL-6R (Abbildung 3.9A). Aufgrund der geringen Größe des VHH6 wird die Interaktion des IL-6/sIL-6R Komplexes mit gp130 nicht blockiert und über die Stabilisierung wird eine stärkere Aktivierung des Trans-Signalweges induziert (Abbildung 3.9B) (Adams *et al.* 2017). Der VHH6 kann daher als Hilfsmittel zur Bestimmung von IL-6/sIL-6R Komplexmengen verwendet werden, um zu analysieren, wie viel des Komplexes maximal vorliegen kann.

In Zusammenarbeit mit Selina Hansen, die im Rahmen Ihrer medizinischen Dissertation im Institut für Biochemie und Molekularbiologie II den VHH6 Nanobody in *E.coli* exprimiert und reinigte, wurden die Versuche bezüglich der Stabilisierung von IL-6/sIL-6R Komplexen, mit rekombinantem IL-6 und sIL-6R, durchgeführt (Abbildung 3.10A-C). Zuerst wurde untersucht, ob der VHH6 eine Kreuzreaktivität in dem verwendeten IL-6/sIL-6R Komplex-ELISA aufwies. Hierzu wurden VHH6 (1 oder 10 μ g/ml) einzeln, oder in Kombination mit IL-6 (50 ng/ml) bzw. sIL-6R (50 ng/ml), auf dem IL-6/sIL-6R Komplex-ELISA aufgetragen (Abbildung 3.10A). In keiner dieser Bedingungen wurde ein Signal detektiert, was darauf hindeutete, dass der VHH6 kein unspezifisches Signal im ELISA verursachte. Zusätzlich wurde untersucht, ob erhöhte Mengen an IL-6/sIL-6R Komplexen nachgewiesen werden konnten, wenn der VHH6

Ergebnisse

vorhanden war. Dazu wurden 50 ng/ml sIL-6R und 5 ng/ml IL-6, jeweils ohne oder mit VHH6 (0,1 µg/ml) für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert und mittels ELISA untersucht (Abbildung 3.10A). Ohne VHH6 wurde $0,43 \pm 0,01$ ng/ml und mit 0,1 µg/ml VHH6 $5,05 \pm 0,12$ ng/ml IL-6/sIL-6R Komplex nachgewiesen. Dies zeigte, dass aufgrund der stabilisierenden Funktion des VHH6, höhere Mengen an IL-6/sIL-6R Komplexen mittels ELISA detektiert wurden. Anschließend wurde die optimale Konzentration des VHH6 bestimmt, die für die Stabilisierung und Detektion von IL-6/sIL-6R Komplexen mit rekombinantem IL-6 und sIL-6R notwendig war. Hierzu wurde 50 ng/ml sIL-6R, zusammen mit verschiedenen Konzentrationen an IL-6 (5-50 ng/ml) und VHH6 (0,1-10 µg/ml), für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Als Kontrolle wurden 50 ng/ml sIL-6R und 5-50 ng/ml IL-6 ohne VHH6 verwendet. Anschließend wurden die Proben auf die Menge an IL-6/sIL-6R Komplexen mittels ELISA untersucht. Bei allen VHH6 Konzentrationen wurde eine höhere Menge an IL-6/sIL-6R Komplexen detektiert, als in der Kontrolle ohne VHH6. Eine maximale Stabilisierung von IL-6/sIL-6R Komplexen erfolgte ab einer VHH6 Konzentration von 0,5 µg/ml (Abbildung 3.10B).

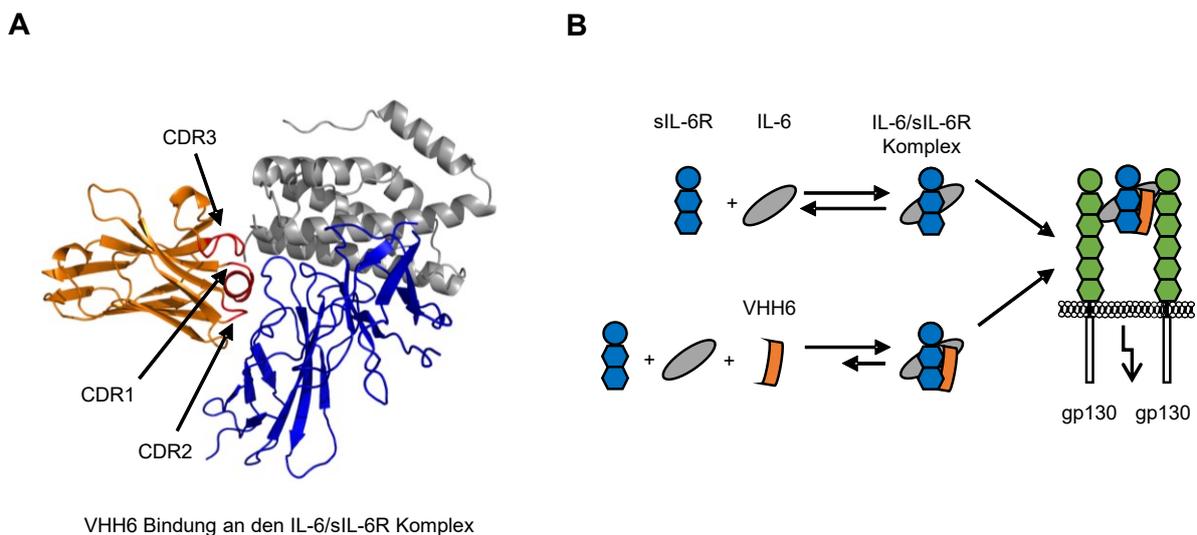


Abbildung 3.9: Bindung des VHH6 Nanobodies an den IL-6/sIL-6R Komplex. (A) Struktur der VHH6-Bindung an den IL-6/sIL-6R Komplex (PDB 5FUC). CDR1 und CD3 interagieren mit IL-6 (grau) und sIL-6R (blau) und CDR2 nur mit dem sIL-6R. Die CDR-Regionen des VHH6 (orange) sind in Rot, IL-6 in grau und der sIL-6R in blau dargestellt. Die Proteinstruktur wurde mithilfe von PyMOL erstellt. (B) Schematische Darstellung zur stabilisierenden Funktion des VHH6 auf den IL-6/sIL-6R Komplex. Durch die spezifische Bindung des VHH6 an den IL-6/sIL-6R Komplex wird die Dissoziation stark reduziert. Der stabilisierte IL-6/sIL-6R Komplex kann weiterhin an den signaltransduzierenden gp130 Rezeptor binden und eine Signaltransduktion in Zielzellen induzieren.

In Abschnitt 3.1.5 wurde bereits dargestellt, dass IL-6/sIL-6R Komplexe erst ab einer IL-6 Konzentration von 5 ng/ml detektiert werden konnten. Deswegen wurde untersucht, ob in Anwesenheit des VHH6, eine Detektion von IL-6/sIL-6R Komplexen möglich ist, wenn geringere Mengen an IL-6 vorliegen. Hierzu wurden 0,1 ng/ml, 0,25 ng/ml, 0,5 ng/ml oder 1 ng/ml IL-6 mit 50 ng/ml sIL-6R für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Dies erfolgte in Abwesenheit oder mit VHH6 (0,1 oder 0,5 µg/ml) und die Menge an IL-6/sIL-6R Komplexen wurden mittels ELISA quantifiziert (Abbildung 3.10C). In den Kontrollen ohne VHH6 wurde bei keiner der vorliegenden niedrigen IL-6 Konzentrationen IL-6/sIL-6R Komplex nachgewiesen.

Ergebnisse

Im Gegensatz dazu erfolgte nach Zugaben von 0,1 µg/ml, oder 0,5 µg/ml VHH6, bei allen IL-6 Konzentrationen eine Detektion von IL-6/sIL-6R Komplexen. Mit 0,5 µg/ml VHH6 erfolgte eine signifikant stärkere Detektion von IL-6/sIL-6R Komplexen, als mit 0,1 µg/ml VHH6 (Abbildung 3.10C und Tabelle 3.9).

Aufbauend auf die zuvor erhaltenen Ergebnisse mit rekombinanten Proteinen wurde der Einfluss des VHH6 auf die Stabilisierung des IL-6/sIL-6R Komplexes in humanem Serum mit endogenem sIL-6R und niedrigen IL-6 Konzentrationen untersucht (Abbildung 3.10D). Hierzu wurde das Serum von drei gesunden Probanden verwendet. Dem im Serum enthaltenen endogenen sIL-6R wurde 0,1 ng/ml, 0,25 ng/ml, 0,5 ng/ml oder 1 ng/ml IL-6 zugesetzt (25-250facher molarer Überschuss von endogenem sIL-6R zu rekombinatem IL-6). Die Inkubation der Proben erfolgte für 1 h bei Raumtemperatur ohne oder mit VHH6 (1 µg/ml) und die Menge an IL-6/sIL-6R Komplexen wurden mittels ELISA quantifiziert. Bei allen IL-6 Konzentrationen ohne VHH6 erfolgte keine Detektion von IL-6/sIL-6R Komplexen. Mit 1 µg/ml VHH6 wurden IL-6/sIL-6R Komplexen nachgewiesen, in Abhängigkeit zur eingesetzten Menge an IL-6 (Abbildung 3.10D, Tabelle 3.9). Wie bereits in Abschnitt 3.1.6 beschrieben, wurde ohne Verwendung des VHH6, in der Messreihe mit dem Serum von 10 gesunden Probanden, bei 1 ng/ml IL-6 mit endogenem sIL-6R $0,16 \pm 0,27$ ng/ml IL-6/sIL-6R Komplex detektiert. Dagegen wurde in diesem Experiment mit 1 µg/ml VHH6 $4,22 \pm 0,37$ ng/ml IL-6/sIL-6R Komplex detektiert. Dies deutet darauf hin, dass praktisch alle vorhandenen IL-6 Moleküle im Komplex mit dem endogenen sIL-6R stabilisiert wurden.

Basierend auf dieser Beobachtung wurde anschließend untersucht, wie hoch der Anteil des endogenen sIL-6R ist, der mit rekombinatem IL-6 einen Komplex bilden kann. Hierzu wurde das Serum von drei gesunden Probanden mit PBS auf sIL-6R Konzentrationen von 0,5 ng/ml, 1 ng/ml, 2,5 ng/ml oder 5 ng/ml verdünnt. Anschließend wurde den verdünnten Serumproben 10 ng/ml oder 1000 ng/ml IL-6 (4-43facher bzw. 435-4350facher molarer Überschuss an IL-6 zum sIL-6R) mit 1 µg/ml VHH6 zugesetzt und die Proben wurden für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert, bevor die Menge an IL-6/sIL-6R Komplexen mittels ELISA quantifiziert wurde. Wie in Abbildung 3.10E zu erkennen ist, besteht kaum ein Unterschied zwischen der Menge an IL-6/sIL-6R Komplexen nach Inkubation mit 10 ng/ml oder 1000 ng/ml IL-6. Wie in Abschnitt 3.1.5 beschrieben, wurde die Menge an gebundenem endogenem sIL-6R im Komplex berechnet. Hierbei wurde festgestellt, dass 89% des endogenen sIL-6R (5 ng/ml) einen Komplex mit IL-6 bildete, wenn eine Stabilisierung über den VHH6 vorlag. Bei allen anderen verdünnten Serumproben (0,5 ng/ml, 1 ng/ml oder 2,5 ng/ml) lagen alle endogenen sIL-6R Moleküle gebunden im Komplex mit IL-6 vor.

Ergebnisse

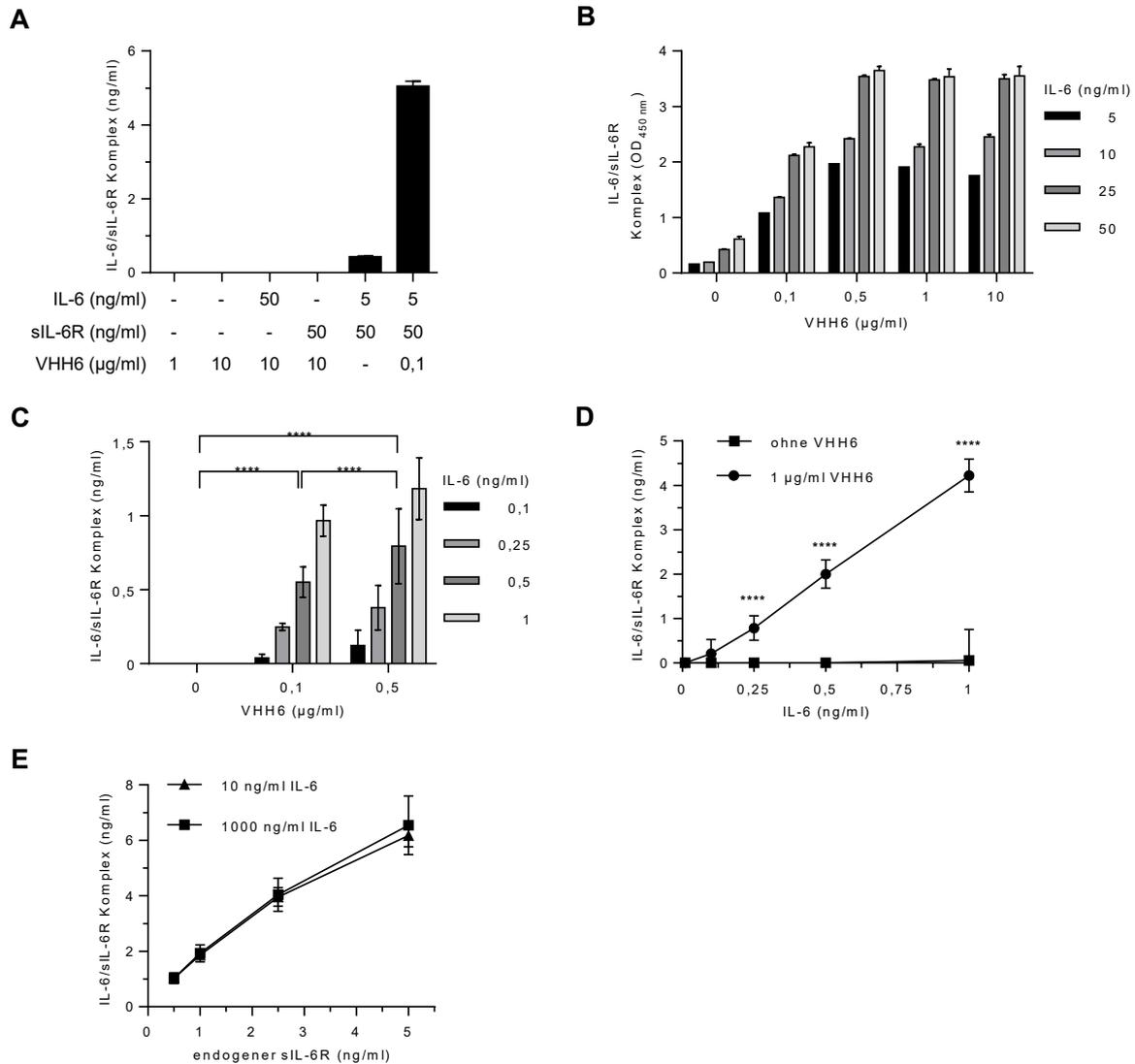


Abbildung 3.10: Stabilisierende Funktion des VHH6 auf den IL-6/sIL-6R Komplex. (A) VHH6 (1 oder 10 µg/ml) wurde in PBS mit 1% BSA ohne bzw. mit 50 ng/ml IL-6 oder sIL-6R für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Zusätzlich wurden 5 ng/ml IL-6 und 50 ng/ml sIL-6R ohne oder mit 0,1 µg/ml VHH6 für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Menge an IL-6/sIL-6R Komplexen wurde mittels ELISA quantifiziert. Dargestellt ist eine repräsentative Auswertung von drei unabhängigen Experimenten. **(B)** Rekombinantes IL-6 (5-50 ng/ml) wurde mit 50 ng/ml rekombinatem sIL-6R und ansteigenden Konzentrationen an VHH6 (0-10 µg/ml) für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Menge an IL-6/sIL-6R Komplexen wurde mittels ELISA analysiert. Dargestellt ist eine repräsentative Auswertung von drei unabhängigen Experimenten. **(C)** Rekombinantes IL-6 (0,1-1 ng/ml) wurde mit 50 ng/ml rekombinatem sIL-6R, sowie VHH6 (0, 0,1 oder 0,5 µg/ml) kombiniert, für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert und mittels IL-6/sIL-6R Komplex-ELISA quantifiziert. Dargestellt ist der Mittelwert ± SD von drei unabhängigen Experimenten. **(D)** Rekombinantes IL-6 (0,1-1 ng/ml) und VHH6 (0 oder 1 µg/ml) wurden dem Serum von drei gesunden Probanden hinzugefügt, für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert und mittels IL-6/sIL-6R Komplex-ELISA quantifiziert. Dargestellt ist der Mittelwert ± SD von drei unabhängigen Experimenten. **(E)** Rekombinantes IL-6 (10 oder 1000 ng/ml), VHH6 (1 µg/ml) und im Serum enthaltender endogener sIL-6R (verdünnt in PBS auf 0,5, 1, 2,5 oder 5 ng/ml) wurden kombiniert und für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Menge an IL-6/sIL-6R Komplexen wurde mittels ELISA analysiert. Dargestellt ist der Mittelwert ± SD von den Messungen mit dem Serum von drei gesunden Probanden. Die Berechnung der Signifikanz wurde unter Verwendung eines *two-way* ANOVA-Test mit anschließendem Bonferroni-Test durchgeführt ($P \leq 0,05 = *$, $P \leq 0,01 = **$, $P \leq 0,001 = ***$, $P \leq 0,0001 = ****$, n.s. = nicht signifikant).

Zusammenfassend wurde gezeigt, dass der von Adams *et al.* publizierte VHH6 Nanobody keine Kreuzreaktivität mit dem IL-6/sIL-6R Komplex-ELISA aufweist und dass durch die stabilisierende Eigenschaft auf den IL-6/sIL-6R Komplex eine deutlich größere Menge an Komplex detektiert werden kann. Dies gilt sowohl für die Quantifizierung von IL-6/sIL-6R

Ergebnisse

Komplexen, unter Verwendung von rekombinantem IL-6 und sIL-6R, als auch für die Quantifizierung mit rekombinantem IL-6 und endogenem sIL-6R. Des Weiteren konnte festgestellt werden, dass über den VHH6 alle IL-6 Moleküle im Komplex stabilisiert werden, wenn ein hoher molarer Überschuss von endogenem sIL-6R zum rekombinantem IL-6 vorhanden ist. Auch alle endogenen sIL-6R Moleküle können im Komplex stabilisiert werden, wenn ein hoher molarer Überschuss an rekombinantem IL-6 vorhanden ist.

Tabelle 3.9: Zusammengefasste Daten der stabilisierenden Funktion des VHH6 auf die Detektion von IL-6/sIL-6R Komplexen. Erläuterungen sind in Abschnitt 3.1.9 beschrieben. Dargestellt sind die zusammengefassten Daten von drei unabhängigen Experimenten mit rekombinanten sIL-6R. Bei endogenem sIL-6R wurde das Serum von drei gesunden Probanden verwendet. n.d. = nicht detektierbar.

Rekombinanter sIL-6R				Endogener sIL-6R			
IL-6 (ng/ml)	sIL-6R (ng/ml)	IL-6/sIL-6R Komplex (ohne VHH6, ng/ml)	IL-6/sIL-6R Komplex (mit VHH6, ng/ml)	IL-6 (ng/ml)	sIL-6R (ng/ml)	IL-6/sIL-6R Komplex (ohne VHH6, ng/ml)	IL-6/sIL-6R Komplex (mit VHH6, ng/ml)
0,1	50	n.d.	0,12 (\pm 0,1)	0,1	54 (\pm 16)	n.d.	0,2 (\pm 0,32)
0,25	50	n.d.	0,37 (\pm 0,15)	0,25	54 (\pm 16)	n.d.	0,78 (\pm 0,27)
0,5	50	n.d.	0,79 (\pm 0,25)	0,5	54 (\pm 16)	n.d.	2 (\pm 0,31)
1	50	n.d.	1,18 (\pm 0,2)	1	54 (\pm 16)	n.d.	4,22 (\pm 0,37)

3.2 Quantifizierung von IL-6/sIL-6R/sgp130 Komplexen

In vielen Studien wird vermutet, dass der sIL-6R und sgp130 einen systemischen Puffer für IL-6 bilden. Auf der einen Seite, um die Serumhalbwertszeit von IL-6 über die Bindung an den sIL-6R zu erhöhen und auf der anderen Seite, um systemische IL-6 Signale zu inhibieren, über die Bindung von sgp130 an den IL-6/sIL-6R Komplex (Rose-John 2017). Allerdings wurde bis zum heutigen Zeitpunkt nicht beschrieben, in welchem Ausmaß IL-6/sIL-6R/sgp130 Komplexe vorliegen. Aufgrund der Tatsache, dass sgp130 bzw. sgp130Fc die Detektion des IL-6/sIL-6R Komplexes mittels ELISA inhibiert, wurde im Rahmen dieser Arbeit eine andere Methode entwickelt, mit der es möglich ist, die Komplexbildung von IL-6, sIL-6R und sgp130 zu analysieren (s. Abschnitt 2.2.2.8). Hierdurch soll die Bindekapazität des sIL-6R an IL-6 bestimmt werden, da sgp130Fc die Dissoziation des IL-6/sIL-6R Komplexes stark reduziert. Wie in Abbildung 3.11 dargestellt, wurde rekombinanter sIL-6R bzw. der im Blutserum enthaltene endogene sIL-6R mit rekombinantem IL-6 und sgp130Fc versetzt. Anschließend erfolgte eine Inkubation, bei der sich IL-6/sIL-6R Komplexe bildeten. Diese wurden wiederum von sgp130Fc gebunden, wodurch ein Komplex, bestehend aus IL-6/sIL-6R/sgp130Fc, entstanden ist. Anschließend erfolgte die Zugabe von Protein A-Agarose Beads. Sgp130Fc bindet aufgrund seines Fc-Teils eines IgG1 Antikörpers an die Protein A-Agarose Beads. Nach Zentrifugation der Probe lagen alle IL-6/sIL-6R/sgp130Fc Komplexe gebunden an der Protein A-Agarose Beads, im Pellet, vor. Anschließend wurde der Überstand entnommen und die

Ergebnisse

Menge an ungebundenem sIL-6R (freier sIL-6R oder im IL-6/sIL-6R Komplex gebunden) wurde mittels IL-6R ELISA quantifiziert (s. Abschnitt 2.2.2.3.1). Aufgrund des Vergleiches zwischen eingesetztem sIL-6R und nicht gebundenem sIL-6R (Überstand), vor und nach Präzipitation, war es möglich zu bestimmen, wie viel des vorhandenen sIL-6R einen Komplex mit IL-6 und sgp130Fc bilden konnte. Eine Präzipitation von IL-6/sIL-6R/sgp130Fc Komplexen kann nur aufgrund der initialen Bindung vom sIL-6R an IL-6 erfolgen. Über die im Überstand verbliebende Menge an sIL-6R können daher Rückschlüsse gezogen werden, wie hoch die Bindekapazität des sIL-6R an IL-6 ist.

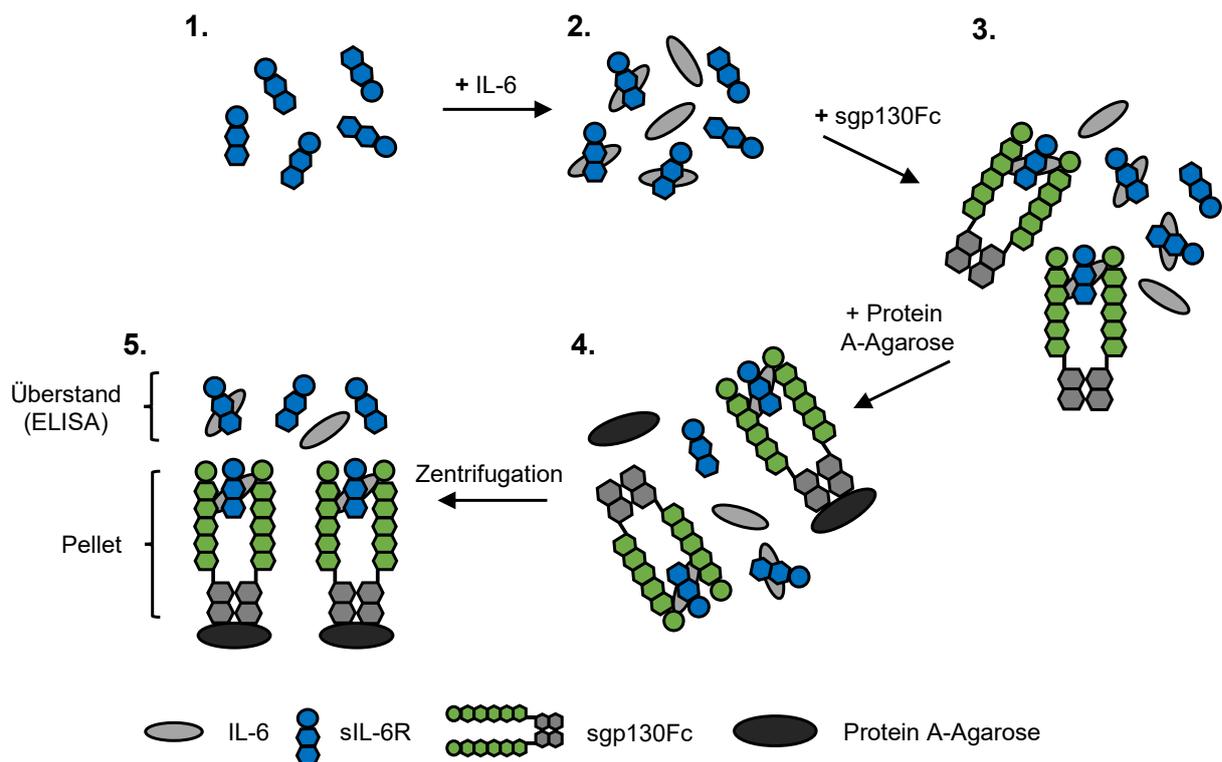


Abbildung 3.11: Schematische Darstellung zur Präzipitation von IL-6/sIL-6R/sgp130Fc Komplexen mittels Protein A-Agarose. Nach Präzipitation der IL-6/sIL-6R/sgp130Fc Komplexe erfolgte die Quantifizierung des im Überstand vorhandenen sIL-6R (freier sIL-6R oder im IL-6/sIL-6R Komplex gebunden) mittels IL-6R ELISA. Darüber war es möglich zu bestimmen, wie hoch die Bindekapazität des sIL-6R an IL-6 ist. Erläuterungen sind in Abschnitt 3.2 beschrieben.

3.2.1 Bindekapazität von rekombinanten sIL-6R an rekombinantes IL-6

Wie zuvor beschrieben, wurde über die IL-6/sIL-6R/sgp130 Komplexbildung die maximale Bindekapazität von rekombinantem sIL-6R an IL-6 bestimmt (s. Abschnitt 2.2.2.8). Hierzu wurde 50 ng/ml sIL-6R (0,97 nM) und ansteigende Konzentrationen an rekombinantem IL-6 (1-200 ng/ml, 0,0422-8,4 nM) zusammen mit 10 µg/ml sgp130Fc (38,5 nM) in 1 ml PBS mit 1% BSA für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 50 µl Protein A-Agarose Beads und eine weitere Inkubation von 1 h bei Raumtemperatur. Nach

Ergebnisse

Zentrifugation der Proben (300 g, 5 min, Raumtemperatur), wurde die Menge an ungebundenem sIL-6R im Überstand mittels IL-6R ELISA bestimmt. Für die genaue Berechnung des Unterschiedes zwischen eingesetztem und im IL-6/sIL-6R/sgp130Fc Komplex gebundenem sIL-6R, wurde die verwendete sIL-6R Stammlösung (50 ng/ml) mittels IL-6R ELISA auf die tatsächlich eingesetzte Menge an sIL-6R analysiert ($47,8 \pm 7$ ng/ml, Abbildung 3.12A). Als zusätzliche Kontrolle wurden 50 ng/ml sIL-6R zusammen mit 10 µg/ml sgp130Fc und 50 µl Protein A-Agarose Beads inkubiert, um die unspezifische Bindung vom sIL-6R an die Protein A-Agarose Beads zu ermitteln. $10,89 \pm 6,76$ ng/ml des vorhandenen rekombinanten sIL-6R banden hierbei unspezifisch an die Protein A-Agarose Beads (Tabelle 3.10). Allgemein wurde festgestellt, dass bei ansteigenden IL-6 Konzentrationen die Menge an sIL-6R im Überstand nach Präzipitation abnahm, was darauf hindeutete, dass vermehrt IL-6/sIL-6R/sgp130Fc Komplexe gebildet wurde (Abbildung 3.12A).

Basierend auf den Daten in Abbildung 3.12A wurde berechnet, zu welchem Anteil der sIL-6R gebunden in IL-6/sIL-6R/sgp130Fc Komplexen vorlag (ungebundener sIL-6R [ng/ml] / eingesetzte Menge sIL-6R [ng/ml] * 100 = Im Komplex gebundener sIL-6R in %). Unter äquimolaren Verhältnissen von IL-6 zum sIL-6R (25 ng/ml IL-6 = 1,05 nM; 50 ng/ml sIL-6R = 0,97 nM) lagen ~60% des sIL-6R gebunden in IL-6/sIL-6R/sgp130Fc Komplexen vor. Bei einem zweifachen molaren Überschuss von IL-6 (50 ng/ml = 2,1 nM) zum sIL-6R, waren 90% des sIL-6R gebunden in IL-6/sIL-6R/sgp130Fc Komplexen. Selbst bei einem achtfachen molaren Überschuss von IL-6 (200 ng/ml = 8,4 nM) wurde keine signifikant höhere Menge an gebundenem sIL-6R nachgewiesen (Abbildung 3.12B). Alle Ergebnisse bezüglich der gebundenen Mengen an rekombinanten sIL-6R im IL-6/sIL-6R/sgp130Fc Komplex sind in Tabelle 3.10 zusammengefasst dargestellt.

In einem weiteren Versuch wurde untersucht, wie stark die Bindekapazität des sIL-6R, und somit die IL-6/sIL-6R/sgp130Fc Komplexbildung, bei geringeren sgp130Fc Konzentrationen ist. Für diese Untersuchung wurden 50 ng/ml sIL-6R mit IL-6 (10 ng/ml, 50 ng/ml, 200 ng/ml oder 1000 ng/ml) und verschiedenen sgp130Fc Konzentrationen (0,04 µg/ml, 0,4 µg/ml oder 10 µg/ml) für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. IL-6/sIL-6R/sgp130Fc Komplexe wurden mittels Protein A-Agarose Beads präzipitiert (s. Abschnitt 2.2.2.8). Die Menge an ungebundenem rekombinanten sIL-6R wurde mittels IL-6R ELISA quantifiziert. Es wurde festgestellt, dass mit 0,4 µg/ml sgp130Fc, IL-6/sIL-6R Komplexe genauso effizient gebunden wurden, wie mit 10 µg/ml sgp130Fc. Bei hohen IL-6 Konzentrationen (50-1000 ng/ml) waren bei beiden sgp130Fc Konzentrationen 84-94% des rekombinanten sIL-6R im Komplex gebunden. Bei niedrigen IL-6 Konzentrationen (10 ng/ml) lagen allerdings nur 29-35% des rekombinanten sIL-6R gebunden in IL-6/sIL-6R/sgp130Fc Komplexen vor. Mit 40 ng/ml sgp130Fc, dies entspricht ~400 ng/ml von endogenem sgp130, lagen maximal 30% des rekombinanten sIL-6R gebunden vor (1000 ng/ml IL-6).

Ergebnisse

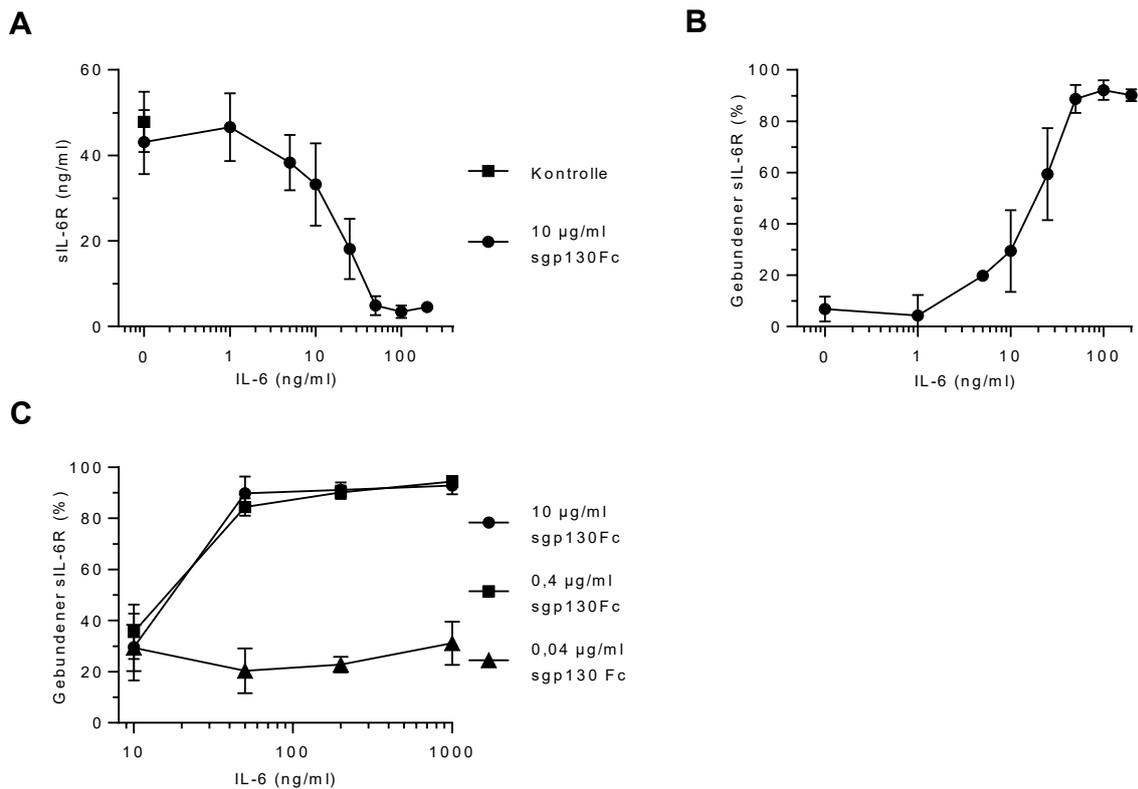


Abbildung 3.12: Quantifizierung von IL-6/sIL-6R/sgp130Fc Komplexen mit rekombinantem sIL-6R. (A) Rekombinantes IL-6 (1-200 ng/ml), sIL-6R (50 ng/ml) und sgp130Fc (10 µg/ml) wurden in 1 ml PBS mit 1% BSA für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. IL-6/sIL-6R/sgp130Fc Komplexe wurden anschließend mit 50 µl Protein A-Agarose präzipitiert (1 h, Raumtemperatur). Nach Präzipitation wurde die Menge an ungebundenem sIL-6R im Überstand mittels IL-6R ELISA quantifiziert. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SD von fünf unabhängigen Experimenten. (B) Die Menge an gebundenem sIL-6R, dargestellt in Prozent (%), in IL-6/sIL-6R/sgp130Fc Komplexen, wurde berechnet aus den Werten in Abbildung 3.12A und ist in Abschnitt 3.2.1 beschrieben. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SD von fünf unabhängigen Experimenten. (C) Rekombinantes IL-6 (50-1000 ng/ml), sIL-6R (50 ng/ml) und sgp130Fc (0,04-10 µg/ml) wurden in 1 ml PBS mit 1% BSA für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. IL-6/sIL-6R/sgp130Fc Komplexe wurden anschließend mit 50 µl Protein A-Agarose präzipitiert (1 h, Raumtemperatur). Nach Präzipitation wurde die Menge an ungebundenem sIL-6R im Überstand mittels IL-6R ELISA quantifiziert und die Menge an gebundenem sIL-6R berechnet. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SD von drei unabhängigen Experimenten.

Über die Bindekapazität von rekombinantem sIL-6R zu IL-6 und sgp130 lässt sich zusammenfassend sagen, dass bei einem hohen molaren Überschuss von sgp130Fc und IL-6 zum rekombinantem sIL-6R, bis zu 90% des sIL-6R gebunden in IL-6/sIL-6R/sgp130Fc Komplexen vorliegt. Bei sgp130Fc Konzentrationen (40 ng/ml), die dem physiologischen Wert von 400 ng/ml an endogenem sgp130 entsprechen, liegen maximal 30% des vorhandenen sIL-6R gebunden in Komplexen vor. In Übereinstimmung mit dieser Beobachtung sind die Daten aus Abschnitt 3.1.8 (Abbildung 3.8B), anhand derer festgestellt wurde, dass endogenes sgp130 (388 ± 23 ng/ml) die Detektion von IL-6/sIL-6R Komplexen um bis zu 21% reduziert.

3.2.2 Bindekapazität von endogenem sIL-6R an rekombinantes IL-6

Um die physiologische Bindekapazität des endogenen sIL-6R zu bestimmen, wurde das Serum von 10 gesunden Probanden verwendet und die Menge an endogenem sIL-6R im Vorfeld quantifiziert (Abbildung 3.6A). Äquivalent zu Abschnitt 3.2.1, wurden ansteigende Konzentrationen an rekombinatem IL-6 (1-1000 ng/ml, 0,0422-42,1 nM) mit 10 µg/ml sgp130 (38,5 nM) und 500 µl Serum kombiniert. IL-6/sIL-6R/sgp130Fc Komplexe wurden mittels Protein A-Agarose präzipitiert, um die Bindekapazität von endogenem sIL-6R an rekombinantes IL-6 zu analysieren.

Allgemein wurde nachgewiesen, dass bei ansteigenden IL-6 Konzentrationen die Menge an endogenem sIL-6R im Überstand reduziert wurde, was dafür spricht, dass vermehrt IL-6/sIL-6R/sgp130Fc Komplexe gebildet wurden (Abbildung 3.13A). Basierend auf den Daten aus Abbildung 3.14A, wurde berechnet, wie viel des endogenen sIL-6R gebunden in IL-6/sIL-6R/sgp130Fc Komplexen vorlag (Abbildung 3.13B). Um die unspezifische Bindung des endogenen sIL-6R an Protein A-Agarose Beads zu bestimmen, wurden 500 µl Serum mit 10 µg/ml sgp130Fc und 50 µl Protein A-Agarose Beads für 1 h inkubiert. Dabei wurde ermittelt, dass $12,13 \pm 9,64\%$ des endogenen sIL-6R unspezifisch an die Protein A-Agarose Beads gebunden hat (Tabelle 3.10). Unter nahezu äquimolaren Verhältnissen von IL-6 zum endogenem sIL-6R (25 ng/ml IL-6 = 1,05 nM; $52,9 \pm 16,3$ ng/ml endogener sIL-6R = $1,03 \pm 0,31$ nM) lagen $51 \pm 19\%$ des sIL-6R gebunden in IL-6/sIL-6R/sgp130Fc Komplexen vor. Bei einem achtfachen molaren Überschuss von IL-6 (200 ng/ml = 8,4 nM) lagen $66 \pm 10\%$ des endogenen sIL-6R gebunden vor. Maximal wurden $69 \pm 8\%$ des endogenen sIL-6R in IL-6/sIL-6R/sgp130 Komplexen gebunden, bei einem 40fachen molaren Überschuss von IL-6 (1000 ng/ml = 42,1 nM). Dies stellt einen großen Unterschied zu den ermittelten Werten aus Abschnitt 3.2.1 dar, anhand derer gezeigt wurde, dass bereits bei einem zweifachen molaren Überschuss von IL-6, ~90% des rekombinatem sIL-6R gebunden in IL-6/sIL-6R/sgp130Fc Komplexen vorlag. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass nur ein gewisser Anteil des endogenen sIL-6R in der Lage ist mit IL-6 zu interagieren, um mittels sgp130Fc einen IL-6/sIL-6R/sgp130Fc Komplex zu bilden. Alle Ergebnisse sind in Tabelle 3.10 zusammengefasst dargestellt, zusammen mit den Werten der Bindekapazität des rekombinanten sIL-6R aus Abschnitt 3.2.1.

Aufgrund der stabilisierenden Funktion des VHH6, wurde in einem weiteren Experiment überprüft, ob die Bindekapazität des endogenen sIL-6R an IL-6 erhöht werden konnte. Hierzu wurden verschiedene Konzentrationen an IL-6 (10 ng/ml, 100 ng/ml oder 1000 ng/ml), mit 500 µl Serum und 1 µg/ml VHH6 für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert und nach Zugabe von 10 µg/ml sgp130Fc erfolgte eine weitere Inkubation (1 h, Raumtemperatur). IL-6/sIL-6R/sgp130 Komplexe wurden mit 50 µl Protein A-Agarose präzipitiert und die im Überstand vorhandene Menge des sIL-6R wurde mittels ELISA bestimmt. Durch die Zugabe

Ergebnisse

von VHH6 wurde die maximal gebundene Menge an endogenem sIL-6R nicht signifikant erhöht. Ohne VHH6 waren maximal $\sim 65 \pm 7,3\%$ und mit VHH6 $\sim 69 \pm 1\%$ des endogenen sIL-6R gebunden in IL-6/sIL-6R/sgp130Fc Komplexen (Abbildung 3.13C).

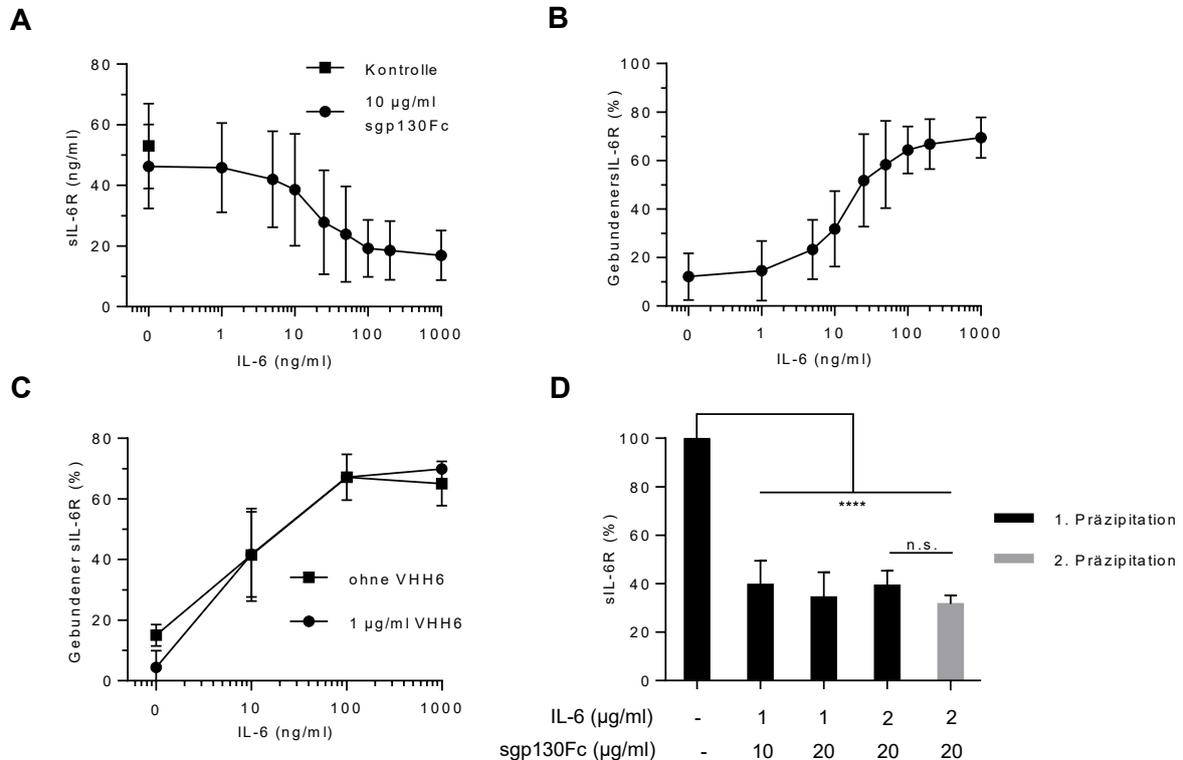


Abbildung 3.13: Quantifizierung von IL-6/sIL-6R/sgp130Fc Komplexen mit endogenem sIL-6R. (A) Rekombinantes IL-6 (1-1000 ng/ml), endogener sIL-6R (im Serum enthalten) und sgp130Fc (10 µg/ml) wurden für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. IL-6/sIL-6R/sgp130Fc Komplexe wurden anschließend mit 50 µl Protein A-Agarose präzipitiert (1 h, Raumtemperatur). Nach Präzipitation wurde die Menge an ungebundenem sIL-6R im Überstand mittels IL-6R ELISA quantifiziert. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SD von den Experimenten mit dem Serum von 10 gesunden Probanden. (B) Die Menge an gebundenem sIL-6R, dargestellt in Prozent (%), in IL-6/sIL-6R/sgp130Fc Komplexen wurde berechnet anhand den Werten aus Abbildung 3.13A und ist in Abschnitt 3.2.1 beschrieben. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SD von den Experimenten mit dem Serum von 10 gesunden Probanden. (C) Rekombinantes IL-6 (1-1000 ng/ml), endogener sIL-6R (im Serum enthalten), sgp130Fc (10 µg/ml) und VHH6 (10 µg/ml) wurden für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. IL-6/sIL-6R/sgp130Fc Komplexe wurden anschließend mit 50 µl Protein A-Agarose präzipitiert (1 h, Raumtemperatur). Nach Präzipitation wurde die Menge an ungebundenem sIL-6R im Überstand mittels IL-6R ELISA quantifiziert und die Menge an gebundenem sIL-6R wurde berechnet. Das Serum von drei gesunden Probanden wurde verwendet. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SD von drei unabhängigen Experimenten. (D) Rekombinantes IL-6 (1 oder 2 µg/ml), endogener sIL-6R (im Serum enthalten) und sgp130Fc (10 oder 20 µg/ml) wurden für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert. IL-6/sIL-6R/sgp130Fc Komplexe wurden anschließend mit 50 µl Protein A-Agarose präzipitiert (1 h, Raumtemperatur). Die Präzipitation mit 2 µg/ml IL-6 und 20 µg/ml sgp130Fc wurde durch eine zusätzliche Zugabe von 2 µg/ml IL-6 und 20 µg/ml sgp130Fc mit der gleichen Probe wiederholt (2. Präzipitation). Nach Präzipitation wurde die Menge an ungebundenem sIL-6R im Überstand mittels IL-6R ELISA quantifiziert. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SD von den Experimenten mit dem Serum von drei gesunden Probanden. Die Berechnung der Signifikanz wurde unter Verwendung eines *two-way* ANOVA-Test mit anschließendem Bonferroni-Test durchgeführt ($p \leq 0,05 = *$, $p \leq 0,01 = **$, $p \leq 0,001 = ***$, $p \leq 0,0001 = ****$, n.s. = nicht signifikant).

Um sicherzustellen, dass die maximale Bindekapazität des endogenen sIL-6R an IL-6 erreicht wurde, wurde dem Serum von drei Probanden deutlich höhere Mengen an IL-6, sowie sgp130Fc hinzugefügt und mittels Protein A-Agarose präzipitiert (Abbildung 3.13D). Hierzu wurde IL-6 in einem 260fachen molaren Überschuss zum endogenen sIL-6R ($65,3 \pm 3,41$ ng/ml, 1,26 nM), eingesetzt und die Konzentration von sgp130Fc wurde von 10 µg/ml ($38,5$ nM) auf bis zu 20 µg/ml (77 nM) erhöht. In dieser Messreihe lagen bei 1000 ng/ml IL-6

Ergebnisse

(65facher molarer Überschuss) und 10 µg/ml sgp130, $58 \pm 11,8\%$ des endogenen sIL-6R gebunden vor. Selbst bei einem 130fachen molaren IL-6 Überschuss (2000 ng/ml, 84,2 nM) und 20 µg/ml sgp130 (77 nM) betrug die Menge an gebundenem endogenem sIL-6R $61,4 \pm 6,1\%$. Darauffolgend wurde den selben Proben, mit gebundenem sIL-6R Anteil von 61,4%, nach der ersten Präzipitation weitere 2000 ng/ml IL-6 (260facher molarer Überschuss) sowie 20 µg/ml sgp130Fc zugesetzt und mittels Protein A-Agarose präzipitiert. Hierdurch wurden insgesamt $67,5 \pm 3,85\%$ des endogenen sIL-6R präzipitiert, was allerdings keinen signifikanten Unterschied zur 1. Präzipitation darstellte.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass bei dem endogenen sIL-6R, ein Anteil von maximal ~70% in der Lage ist, einen Komplex mit IL-6 und darauf folgend mit sgp130Fc zu bilden. Selbst bei einem bis zu 260fachen molaren Überschuss von IL-6 (84,2 nM) zum endogenem sIL-6R (1,26 nM), und einen hohen molaren Überschuss an sgp130Fc (77 nM), wird keine signifikant höhere Menge an endogenem sIL-6R in den IL-6/sIL-6R/sgp130 Komplex gezwungen.

Tabelle 3.10: Zusammenfassung der IL-6/sIL-6/sgp130Fc Komplexexperimente und der Bindekapazität von rekombinantem und endogenem sIL-6R an IL-6. Dargestellt sind die zusammengefassten Daten aus Abschnitt 3.2.1 und 3.2.2 bezüglich des im Überstand ungebundenen sIL-6R (rekombinant und endogen) in ng/ml, sowie die berechnete Menge an gebundenem sIL-6R in % (beschrieben in Abschnitt 3.2.1) in IL-6/sIL-6R/sgp130Fc Komplexen.

Titration	Rekombinanter sIL-6R (50 ng/ml)		Endogener sIL-6R (52,9 ± 16,3 ng/ml)	
	sIL-6R (ng/ml)	Gebundener sIL-6R (%)	sIL-6R (ng/ml)	Gebundener sIL-6R (%)
0 (Kontrolle)	43,11 (± 7,49)	10,89 (± 6,76)	46,25 (± 13,85)	12,13 (± 9,64)
1	46,60 (± 7,93)	4,33 (± 7,96)	45,84 (± 14,75)	14,54 (± 12,28)
5	38,30 (± 6,45)	19,78 (± 1,79)	42,01 (± 15,86)	23,29 (± 12,23)
10	33,20 (± 9,61)	29,43 (± 15,8)	38,57 (± 18,45)	31,8 (± 15,54)
25	18,12 (± 7,02)	59,37 (± 17,9)	27,86 (± 17,11)	51,78 (± 19,08)
50	4,88 (± 2,22)	88,69 (± 5,47)	23,89 (± 15,73)	58,33 (± 18)
100	3,45 (± 1,45)	92,12 (± 3,8)	19,24 (± 9,37)	64,31 (± 9,69)
200	4,54 (± 0,66)	90,12 (± 2,33)	18,53 (± 9,67)	66,8 (± 10,28)
1000	-	-	16,92 (± 8,16)	69,47 (± 8,36)

3.3 Zelltypspezifisches Targeting und Tracking durch synthetische Cargo-Internalisierungsrezeptoren

Das *in vivo* Tracking von spezifischen Zelltypen ist eine wichtige Methode, um ein besseres Verständnis über den zeitlichen Ablauf von zellulären Prozessen zu erlangen. Ein wichtiger Aspekt ist hierbei die Migration von verschiedenen Immunzelltypen, z.B. während Entzündungs-assoziierten Erkrankungen. Der zeitliche Ablauf der Immunzellmigration ist ein entscheidender Prozess, bei dem die Vorgänge noch nicht vollständig entschlüsselt sind. Aufgrund dessen ist in der Grundlagenforschung, sowie in klinischen Anwendungen, das spezifische Zelltracking von essentieller Bedeutung.

In bereits publizierten Studien wurde die Magnetresonanztomographie (MRT) für das Tracking von Monozyten und Makrophagen, in verschiedenen Krankheitsmodellen in der Maus, verwendet. Hierzu wurden den zu untersuchenden Tieren Perfluorkarbon-Nanoemulsionspartikel (PFC-NE) injiziert, welche über Phagozytose von Monozyten und Makrophagen aufgenommen werden. Die Migration von Monozyten und Makrophagen in inflammatorische Bereiche konnte so anschließend mittels ^{19}F -MRT detektiert werden (Temme *et al.* 2012; Ahrens & Bulte 2013b). Nicht-phagozytierende Immunzellen können mit dieser Methode allerdings nicht nachgewiesen werden, da keine unspezifische Aufnahme von PFC-NEs erfolgt. Ein zelltypspezifisches Targeting anderer Zelltypen mit funktionalisierten PFC-NEs ist schwierig aufgrund der Tatsache, dass Oberflächenrezeptoren oft nicht zelltypspezifisch exprimiert werden. Des Weiteren könnten über die Bindung von funktionalisierten PFC-NEs an Rezeptoren der Zielzellen Signalkaskaden induziert werden, welche zu einer Veränderung der Zelleigenschaften führen könnten.

Um ein spezifisches Targeting von diversen Immunzellentypen zu ermöglichen, wurden im Rahmen dieser Arbeit drei synthetische Cargo-Internalisierungsrezeptoren (CIR) generiert. Diese wurden mit einem Nanobody versehen, der spezifisch GFP bindet (Kubala *et al.* 2010), um eine Internalisierung des GFP in CIR-exprimierende Zellen zu induzieren. Für die spezifische Detektion von CIR-exprimierenden Zellen mittels ^{19}F -MRT, wurden GFP-gekoppelte PFC-NEs (GFP-PFCs) verwendet. CIRs besitzen verschiedene intrazelluläre Domänen, assoziiert mit unterschiedlichen Internalisierungseigenschaften. Im Folgenden werden die Ergebnisse bezüglich der Charakterisierung der CIRs dargestellt, die im Rahmen dieser Arbeit ermittelt wurden.

3.3.1 Generierung und Aufbau der CIRs

Um ein spezifisches Targeting von Zellen zu ermöglichen, wurden im Rahmen dieser Arbeit drei synthetische Cargo-Internalisierungsrezeptoren (CIRs) generiert. In Abbildung 3.14 ist die Aminosäuresequenz (A) und der Aufbau (B) der drei unterschiedlichen CIRs dargestellt. Alle Rezeptoren besitzen ein N-terminales Signalpeptid (Aminosäure 1-24), welches aus dem humanem IL-11 Rezeptor stammt. Darauf folgt ein Myc-Tag (AS 25-34) und der GFP-Nanobody (AS 35-148), für die spezifische Bindung von GFP und GFP-PFCs. Im Anschluss ist ein fünf Aminosäure langer Linker (AS 149-153) enthalten. In der Transmembrandomäne und der intrazellulären Domäne (IZD) unterscheiden sich alle CIRs voneinander. CIR1 und CIR2 haben im folgendem eine sechs Aminosäure-lange Stalk-Region (AS 154-159) des humanen IL-6R (hIL-6R) der Deletionsvariante Δ A323-F367, damit das ADAM10 bzw. ADAM17 induzierte Shedding des IL-6R nahezu vollständig verhindert wird (Baran *et al.* 2013). Die Transmembranregion stammt ebenfalls aus dem hIL-6R (AS 160-182). CIR1 besitzt die vollständige IZD des hIL-6R (AS 183-262), wohingegen CIR2 die vollständige IZD des Endo180 Rezeptors beinhaltet (AS 183-224), welcher ein Mitglied der Mannose-Rezeptor-Familie ist. CIR3 besitzt vom Linker aus, Richtung C-Terminus, die Stalk-Region (AS 154-162), die Transmembrandomäne (AS 163-187) und die IZD des Phagozytose-assoziierten Fc γ RIIA Rezeptors.

Die IZDs aller CIRs unterscheiden sich bezüglich der Anzahl und der Eigenschaften der vorhandenen Proteinmotive, die für die Rezeptorinternalisierung nach Ligandenbindung verantwortlich sind. Die IZD von CIR1 (hIL-6R) weist keine bekannten Endozytosemotive auf. Es ist allerdings bekannt, dass 30 min nach Ligandenbindung ~50% aller IL-6R Moleküle von der Zelloberfläche internalisiert werden (Dittrich *et al.* 1996). Die IZD von CIR2 (Endo180) besitzt zwei Motive, die für eine schnelle Internalisierung über Endozytose essentiell sind. Ein Tyrosin-basiertes Motiv (FEGARY) und ein Dihydrophobisches Motiv (EKNILV). Die IZD von Endo180 ist für eine schnelle Internalisierung des Rezeptors verantwortlich. Nach Ligandenbindung werden 60% des Oberflächenrezeptors innerhalb von 2 min internalisiert. (Howard & Isacke 2002). Die IZD des Fc γ RIIA Rezeptors weist keine klassischen Internalisierungsmotive auf, jedoch zwei Tyrosinaktivierungsmotive (TAMs), die für die Phagozytose-assoziierte Internalisierung notwendig sind (Greenberg *et al.* 1993).

Die Klonierung der CIRs wurde, wie in Abbildung 3.15 schematisch dargestellt, durchgeführt. Die Nukleotidsequenz von CIR1 und CIR2 wurde von GeneArt (Regensburg, Deutschland) synthetisiert. Die Nukleotidsequenz von CIR1 wurde über die Restriktionsenzyme KpnI und NotI aus der synthetisierten Nukleotidsequenz isoliert und in ein mittels KpnI und NotI linearisiertes und dephosphoryliertes pcDNA3.1 Plasmid ligiert (s. Abschnitt 2.2.1.5, 2.2.1.6. und 2.2.1.8).

Ergebnisse

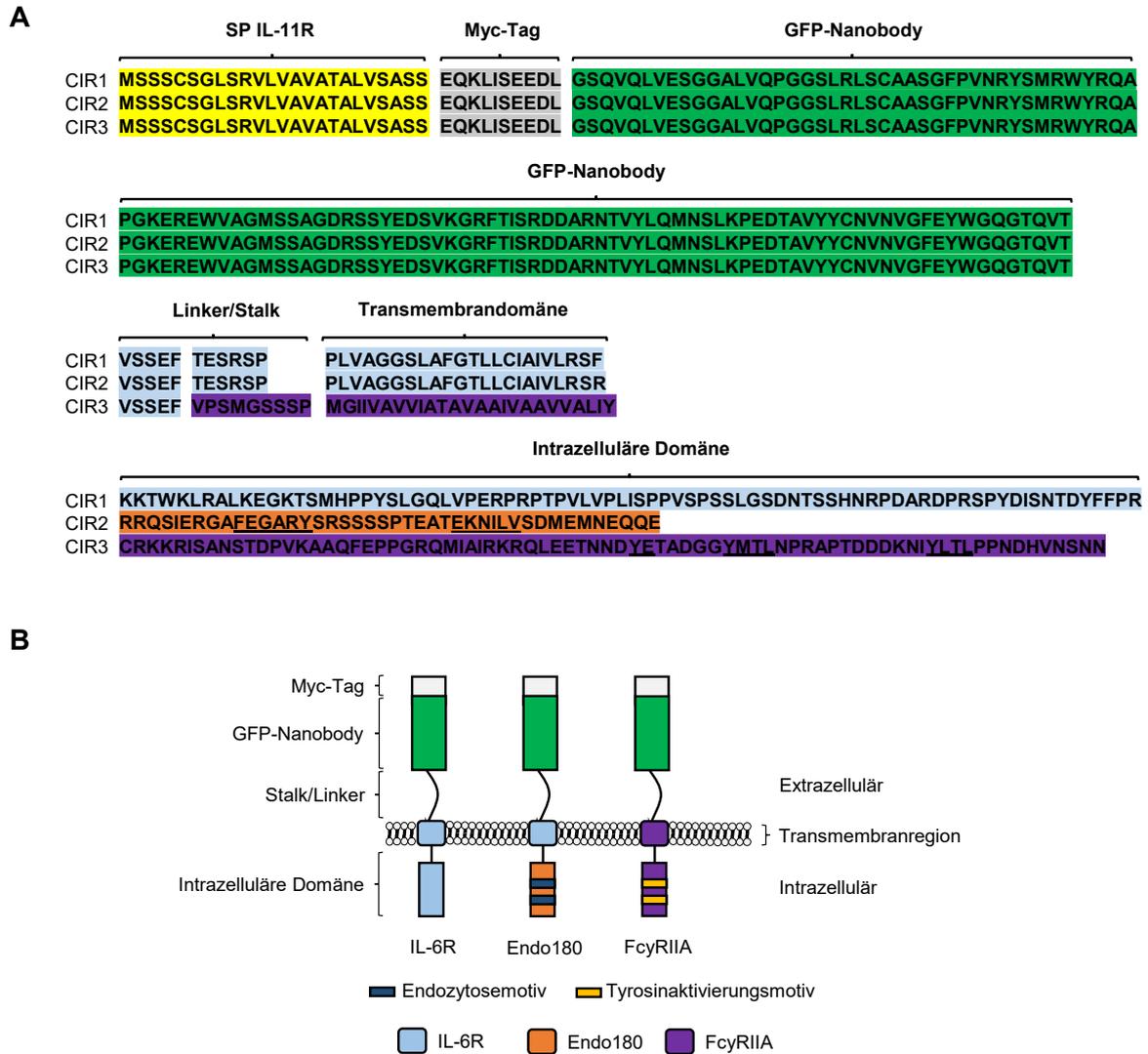


Abbildung 3.14: Aufbau der Cargo-Internalisierungsrezeptoren. (A) Darstellung sind die Aminosäuresequenzen, von den drei synthetischen CIRs. Erläuterungen zu den einzelnen Domänen sind in Abschnitt 3.3.1 beschrieben. Signalpeptide (SP). (B) Schematischer Aufbau der CIRs, bestehend aus einem N-terminalen Myc-Tag (weiß), GFP-Nanobody (grün), einem Linker (schwarz), der Transmembranregion und der intrazellulären Domäne. CIR1 und CIR2 besitzen die Transmembranregion aus dem humanem IL-6R (hellblau) und CIR3 die Transmembranregion aus dem FcγRIIA Rezeptor (lila). Die intrazelluläre Domäne hat bei allen CIRs einen unterschiedlichen Ursprung (CIR1 = humaner IL-6 Rezeptor, hellblau; CIR2 = Endo180 Rezeptor, orange; CIR3 = FcγRIIA Rezeptor, lila).

Basierend auf dem pcDNA3.1-CIR1 Plasmid wurden die Klonierungen für den CIR2 und CIR3 durchgeführt. Für die Klonierung des CIR2, wurde die Sequenz der IZD von CIR2 mit den Restriktionsenzymen BglII und NotI aus der synthetisierten Nukleotidsequenz isoliert und in das mittels KpnI und NotI linearisierte und dephosphorylierte pcDNA.3.1-CIR1 Plasmid ligiert. Dies war notwendig, um die IZD des CIR1 zu entfernen und durch die IZD des CIR2 zu ersetzen. Für die Klonierung des CIR3 wurde die entsprechende Nukleotidsequenz des FcγRIIA Rezeptors aus der cDNA von Jurkat-Zellen mittels PCR amplifiziert. Das amplifizierte PCR-Produkt des CIR3 war mit einer 5'-EcoRI- und 3'-NotI-Restriktionsschnittstelle flankiert. Der Zielvektor pcDNA.3.1-CIR1 wurde im Vorfeld mit den Restriktionsenzymen EcoRI und NotI linearisiert und dephosphoryliert. Hierdurch wurde der gesamte C-terminale Bereich des CIR1,

Ergebnisse

von der Stalk-Region bis hin zum Ende der IZD, entfernt. Anschließend wurde das entsprechende Insert des CIR3 in das linearisierte pcDNA3.1-CIR1 Plasmid ligiert.

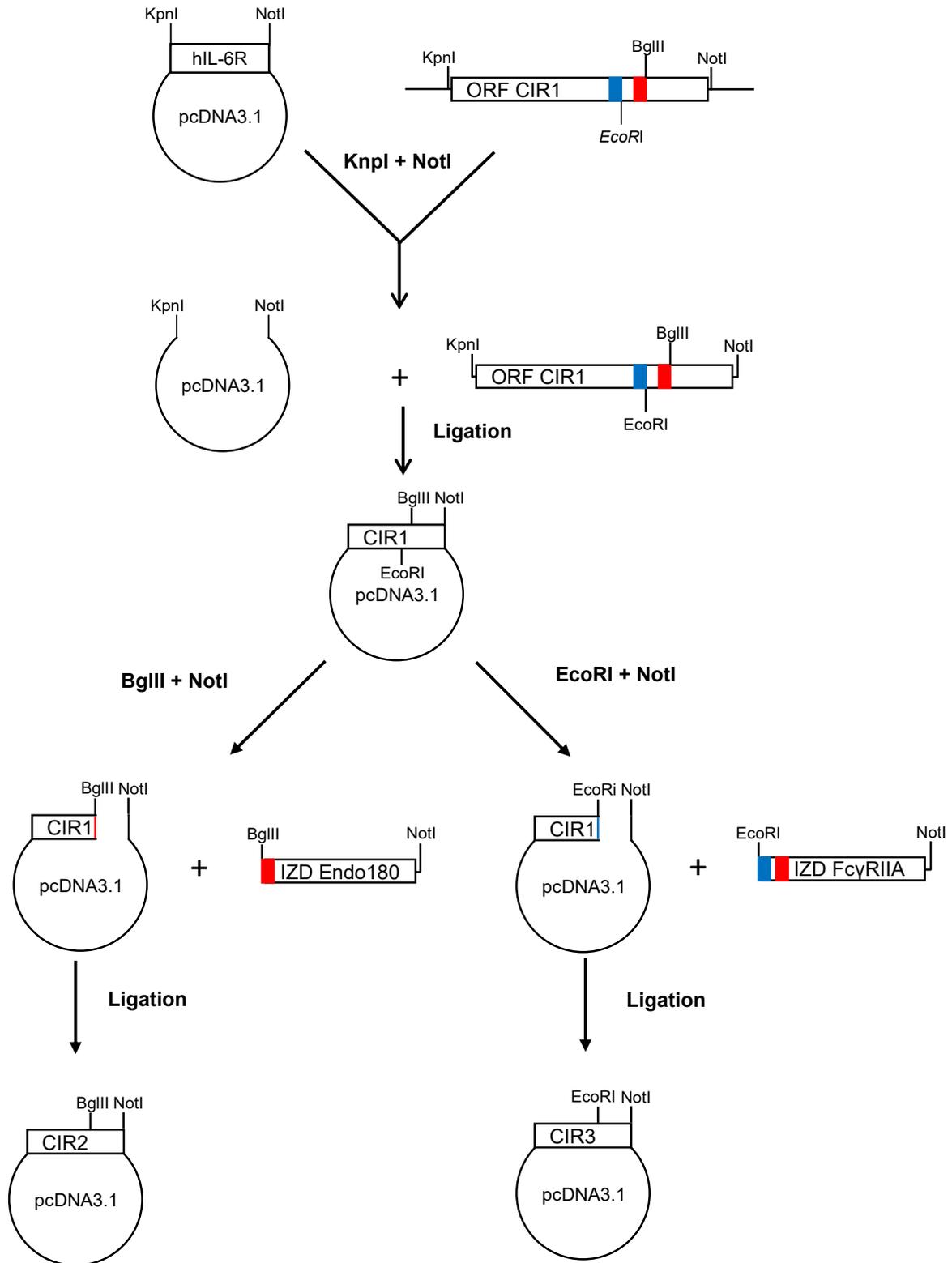


Abbildung 3.15: Klonierungsschema zur Generierung der verschiedenen Cargo-Internalisierungsrezeptoren. Dargestellt ist die Klonierungsstrategie, die zur Generierung der pcDNA3.1-CIR1-3 Plasmide verwendet wurde. Blau markierte Bereiche stellen die Stalk-Region und rot markierte Bereiche die Transmembranregion dar. Erläuterungen sind in Abschnitt 3.3.1 beschrieben.

3.3.2 Molekularbiologische Charakterisierung von CIRs in eukaryotischen Zellen

Nach der Klonierung der CIR-Plasmide wurde eine erste Charakterisierung der CIRs, bezüglich des Molekulargewichtes und der Zelloberflächenexpression, durchgeführt. Dies erfolgte mittels Western Blot und Durchflusszytometrie (s. Abschnitt 2.2.2.2 und 2.2.2.11). Als Erstes wurde das Molekulargewicht der CIRs analysiert. Hierzu wurden COS-7 Zellen mit den cDNAs für CIR1-3 transfiziert, nach 48 h lysiert (s. Abschnitt 2.2.3.5 und 2.2.2.12) und mittels Western Blot untersucht. Zusätzlich wurden Zellysate von stabil transfizierten CHO-CIR1-3 Zellen untersucht. Als Kontrolle wurden untransfizierte COS-7 oder CHO Zellen verwendet. Die Detektion im Western Blot erfolgte über den N-terminalen Myc-Tag der CIR1-3 Rezeptoren, durch einen Myc-Tag spezifischen Antikörper. Basierend auf der Aminosäuresequenz wurde für CIR1, sowie für CIR3, ein Molekulargewicht von jeweils 28,5 kDa und für CIR2 von 24,3 kDa berechnet. In den Zellysaten wurde CIR1 und CIR3 bei einem Molekulargewicht von ~29 kDa und CIR2 bei ~24 kDa detektiert, was in Übereinstimmung mit den berechneten Molekulargewichten ist (Abbildung 3.16A). Mittels Western Blot war es jedoch nicht möglich zu bestimmen, ob alle CIRs auf der Zelloberfläche vorliegen. Für diese Analyse wurden transfizierte COS-7 und transduzierte Ba/F3-gp130 Zellen (s. Abschnitt 2.2.3.6) auf die Oberflächenexpression von CIR1-3 mittels Durchflusszytometrie untersucht. Hierzu wurden die CIR-exprimierenden Zellen mit einem Primärantikörper gegen den Myc-Tag markiert und anschließend mit einem sekundären Alexa-488 gekoppelten Antikörper für die Detektion im Durchflusszytometer. In Abbildung 3.16B sind die Ergebnisse der Analyse dargestellt. Die grau markierten Bereiche stellen untransfizierte Kontrollzellen dar, bei denen keine Detektion des Myc-Tags nachgewiesen wurde. Schraffierte Histogramme stellen die Oberflächenexpression des jeweiligen CIRs dar. In den transfizierten COS-7 Zellen wurde nur eine geringe Oberflächenexpression von allen CIRs nachgewiesen. CIR1 wurde im Vergleich zu CIR2 und CIR3, am Schwächsten auf der Zelloberfläche exprimiert. In stabil transduzierten Ba/F3-gp130-CIR1-3 Zellen konnte die Oberflächenexpression aller CIRs deutlicher nachgewiesen werden. Auch hierbei wurde festgestellt, dass CIR1 am schwächsten auf der Zelloberfläche exprimiert wurde. Die Oberflächenexpression von CIR2 und CIR3 war deutlich stärker, zu erkennen in den entsprechenden Histogrammen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass alle generierten CIRs exprimiert werden und auf der Zelloberfläche vorliegen. Diese Voraussetzungen waren notwendig, damit eine Charakterisierung der GFP-Bindung vorgenommen werden konnte, welche im folgenden Abschnitt dargestellt ist.

Ergebnisse

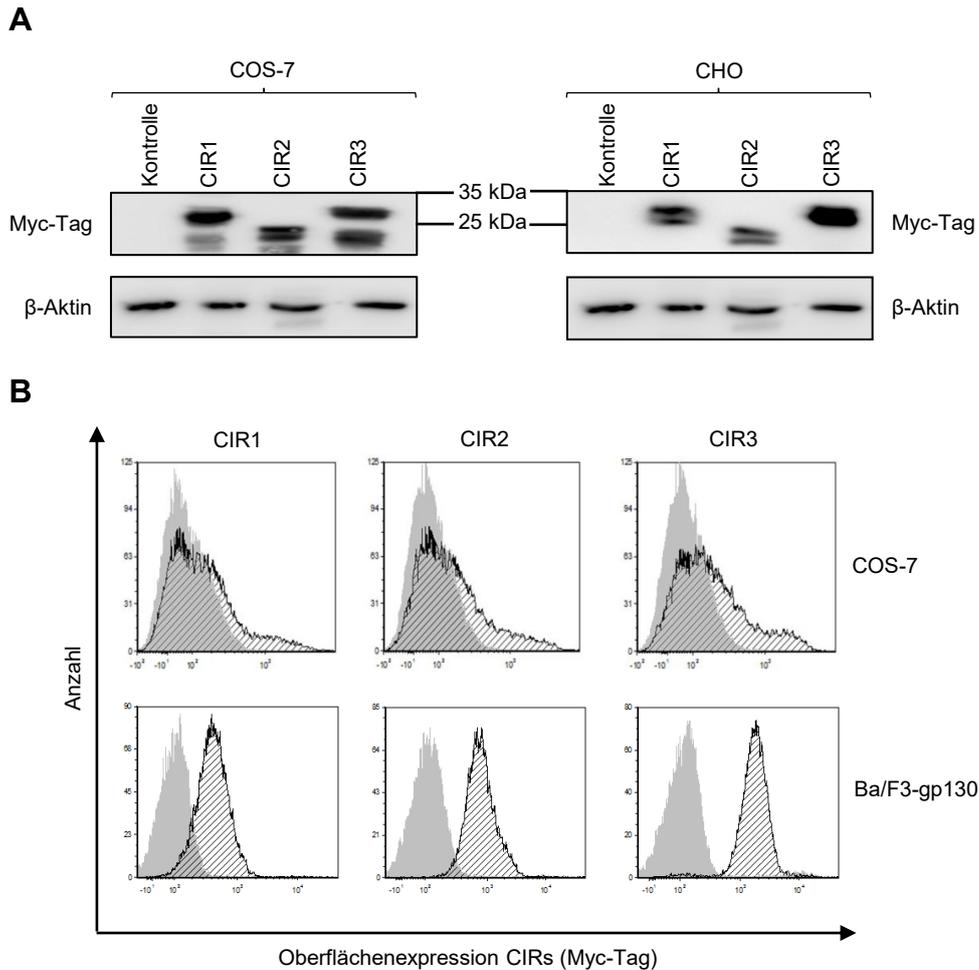


Abbildung 3.16: Charakterisierung von CIRs in transient transfizierten COS-7, stabil transfizierten CHO und transduzierten Ba/F3-gp130 Zellen. (A) COS-7 Zellen wurden mit der cDNA für CIR1-3 transfiziert und nach 48 h lysiert. Das Molekulargewicht von CIR1-3 wurde mittels Western Blot analysiert. Es wurden je 50 µg Gesamtprotein aufgetragen. Der Nachweis der CIR1-3 Expression erfolgte über die Detektion des Myc-Tags. Anschließend wurde die Membran gestrippt und es wurde gegen β-Aktin detektiert, welches als Ladekontrolle fungierte. Äquivalent hierzu wurden die Zellysate von stabil transfizierten CHO-CIR1-3 Zellen analysiert. Dargestellt ist jeweils ein repräsentativer Blot aus zwei unabhängigen Experimenten. **(B)** Oberflächenexpression von CIR1-3 in transfizierten COS-7-CIR1-3 und in transduzierten Ba/F3-gp130-CIR1-3 Zellen, die mit Hilfe eines primären α-Myc-Tag Antikörpers und einem Alexa-488 gekoppelten sekundären α-Kaninchen Antikörpers detektiert wurde (schwarz schraffiertes Histogramm). Als Kontrolle wurden untransfizierte COS-7 bzw. Ba/F3-gp130 Zellen verwendet (graues Histogramm). Dargestellt ist eine repräsentative Auswertung von drei unabhängigen Experimenten.

3.3.3 Bindung und Internalisierung von GFP in eukaryotischen Zellen durch CIRs

Nachdem festgestellt wurde, alle drei CIRs auf der Zelloberfläche vorlagen, wurde überprüft, ob eine Bindung von GFP an die CIRs stattfand. Für diese Untersuchung, wurden Ba/F3-gp130-CIR1-3 Zellen für 30 min bei 37°C mit 1 µg/ml GFP in 1 ml DMEM -/- Medium inkubiert. Als Kontrolle wurden Ba/F3-gp130 Zellen verwendet, da hier keine Bindung von GFP erfolgen sollte. Die Bindung von GFP an die CIRs wurde mittels Durchflusszytometrie analysiert (grün gestrichelte Histogramme, s. Abschnitt 2.2.2.2). Als weitere Kontrolle wurden Ba/F3-gp130-CIR1-3 Zellen verwendet, die nicht mit GFP inkubiert wurden (graues Histogramm). In Ba/F3-gp130 Zellen wurde nach einer Inkubation von 180 min keine Bindung von GFP nachgewiesen. Dagegen wurde in Ba/F3-gp130-CIR1-3 Zellen eine deutliche Bindung von GFP detektiert (Abbildung 3.17A). Es wurde beobachtet, dass Ba/F3-gp130-CIR1 Zellen die geringste Menge an GFP gebunden hatten. In Ba/F3-gp130-CIR2 und -CIR3 Zellen wurde das stärkste GFP Signal detektiert.

Anschließend wurde die zeitliche Bindungskinetik von GFP an die CIRs untersucht. Hierzu wurden Ba/F3-gp130-CIR1-3 Zellen mit 1 µg/ml GFP bei 37°C inkubiert und nach verschiedenen Zeitpunkten (0, 5, 10, 20, 30, 60, 120 oder 180 min) mittels Durchflusszytometrie analysiert (Abbildung 3.17B). Die Intensität der GFP-Bindung ist als *Mean Fluorescence Intensity* (MFI) angegeben. Als Kontrolle wurden Ba/F3-gp130 verwendet, die für 180 min mit GFP inkubiert wurden. In diesen Zellen wurde kein GFP-Signal detektiert. In Ba/F3-gp130-CIR1 Zellen wurde allgemein die schwächste GFP-Bindung nachgewiesen. Selbst nach längeren Inkubationszeiten mit GFP wurde nur eine geringe Zunahme der GFP-Bindung festgestellt (5 min: 133 ± 28 MFI; 180 min: 307 ± 39 MFI). Eine stärkere GFP-Bindung wurde in Ba/F3-gp130-CIR3 Zellen nachgewiesen. Beim CIR3 wurde eine zeitlich abhängige Zunahme der GFP-Bindung festgestellt. Hierbei wurde beobachtet, dass CIR3 innerhalb von 5 min (630 ± 106 MFI) eine größere Menge an GFP gebunden hat, als CIR1 nach 180 min (307 ± 39 MFI). Die stärkste Bindung von GFP erfolgte an CIR2. Hierbei wurde festgestellt, dass innerhalb der ersten 60 min die stärkste GFP-Bindung (5 min: 648 ± 214 MFI bis 60 min: 1444 ± 390 MFI) von allen CIRs detektiert wurde. Nach 60 min lag die GFP-Bindung in einem nahezu gesättigten Bereich vor und bei längeren Inkubationszeiten wurde nur noch ein geringer Anstieg der GFP-Bindung gemessen (120 min: 1550 ± 380 MFI und 180 min: 1610 ± 290 MFI). Anhand der untersuchten zeitlichen Bindungskinetik von GFP an CIR1-3 und dessen Analyse mittels Durchflusszytometrie war es allerdings nicht möglich zu bestimmen, ob GFP gebunden auf der Zelloberfläche vorlag, oder nach Bindung an die CIRs in die Zelle internalisiert wurde. Aufgrund dessen wurde die Internalisierung von GFP mikroskopisch mittels Immunfluoreszenz untersucht. Hierzu wurden adhärente COS-7 Zellen transient mit der cDNA für CIR1-3 transfiziert und für 30 min mit 1 µg/ml GFP in 1 ml DMEM -/- Medium bei 4°C

Ergebnisse

inkubiert. Hierdurch konnte das GFP lediglich an die Rezeptoren binden, aber aufgrund der niedrigen Temperatur von 4°C wurde die Internalisierung der Rezeptoren deutlich reduziert. Alternativ wurden transfizierte COS-7-CIR1-3 Zellen für 30 min bei 4°C und anschließend für 30 min bei 37°C inkubiert, damit die Internalisierung des gebundenen GFP von der Zelloberfläche in das Zytoplasma ermöglicht wird. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen, um nicht gebundenes GFP zu entfernen, und die Zellen wurden mittels Paraformaldehyd fixiert. Zusätzlich wurde der Zellkern mittels DAPI blau angefärbt, wodurch zeitgleich untransfizierte Zellen zu erkennen sind, an denen keine Bindung von GFP nachgewiesen wurde. Anhand der Inkubation bei 4°C ist deutlich zu erkennen, dass in transfizierten COS-7-CIR1-3 Zellen eine deutliche Lokalisation von GFP an der Zelloberfläche vorlag. Nach der Inkubation bei 37°C ist dagegen eine schwächere Lokalisation des GFP an der Zelloberfläche zu erkennen und eine deutliche Akkumulation von GFP in vesikulären Strukturen innerhalb der Zellen. (Abbildung 3.17C). Dies spricht für eine Internalisierung des an der Zelloberfläche gebundenen GFP in endosomalen Vesikeln. Vor allem bei CIR1 und CIR2 wurde die Bildung von vesikulären GFP-Strukturen im Zytoplasma, hauptsächlich im perinukleären Bereich, nachgewiesen. Bei der CIR3-vermittelten Aufnahme von GFP ist eine gleichmäßige Verteilung von vesikulären Strukturen innerhalb der Zelle zu erkennen, jedoch nicht im perinukleären Bereich.

Zusammenfassend wurde bei der Charakterisierung von CIR1-3 in verschiedenen Zelllinien (Ba/F3-gp130 und COS-7 Zellen) festgestellt, dass eine Bindung von GFP an alle CIRs erfolgt. Beim CIR2 und CIR3 konnte die stärkste Bindung von GFP nachgewiesen werden und beim CIR 1 die schwächste Bindung. Zusätzlich konnte beobachtet werden, dass durch die CIRs eine Internalisierung von GFP in die Zelle erfolgt und dass vesikuläre GFP-haltige Strukturen im Zytoplasma vorliegen.

Ergebnisse

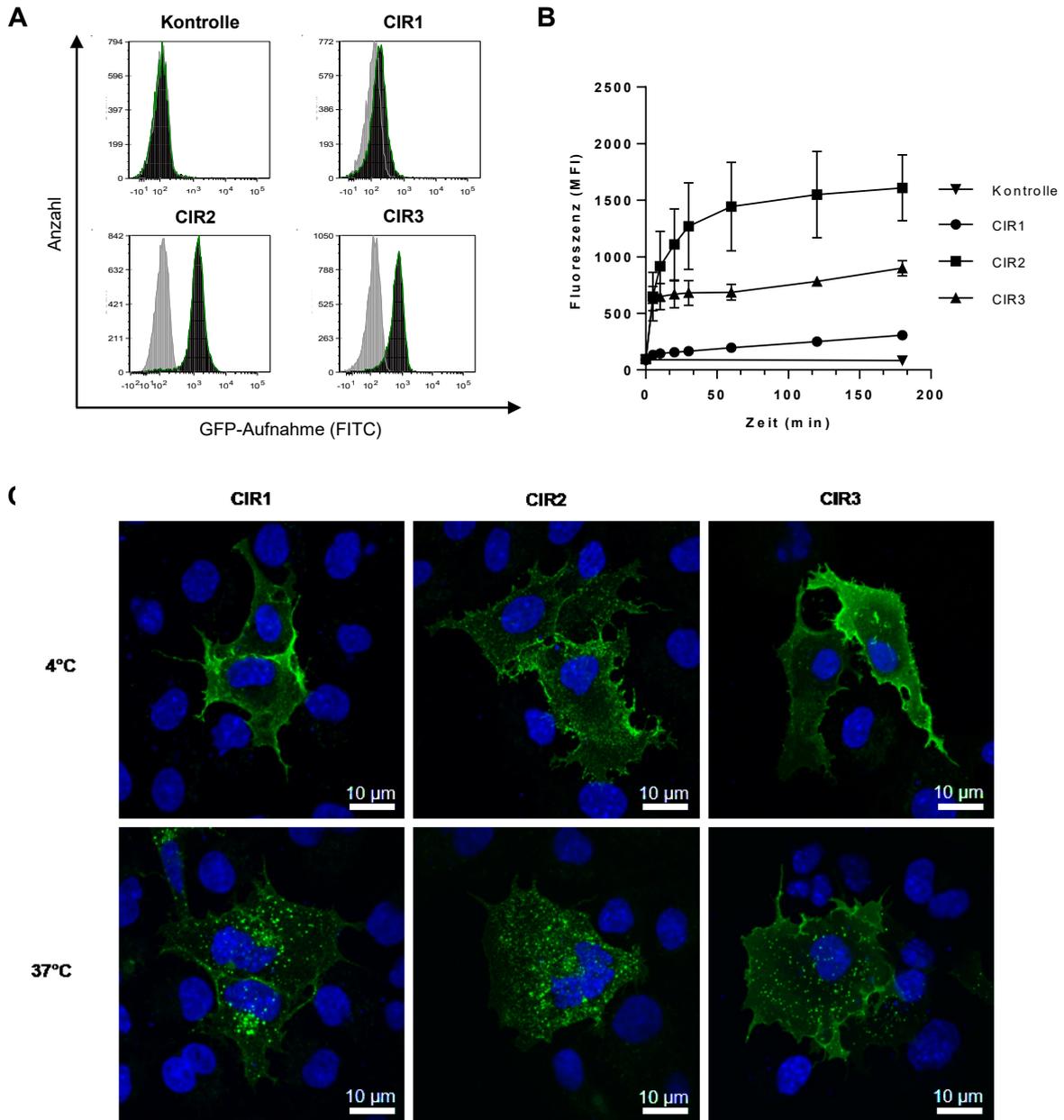


Abbildung 3.17: Bindung und Internalisierung von GFP in CIR1-3-exprimierenden Zellen. (A) Bindung von GFP an transduzierte Ba/F3-gp130-CIR1-3 Zellen, die mit 1 $\mu\text{g/ml}$ GFP für 30 min bei 37°C inkubiert wurden. Die Bindung von GFP an CIR1-3 wurde mittels Durchflusszytometrie analysiert. Als Kontrolle wurden Ba/F3-gp130 Zellen verwendet, die für 180 min mit 1 $\mu\text{g/ml}$ GFP inkubiert wurden. Dargestellt sind die entsprechenden unbehandelten Kontrollzellen (graues Histogramm), sowie die mit GFP inkubierten Zellen (grünes Histogramm). Dargestellt ist ein repräsentatives Experiment aus drei unabhängigen Experimenten. **(B)** Zeitliche Bindungskinetik von GFP an Ba/F3-gp130-CIR1-3 Zellen, welche mit 1 $\mu\text{g/ml}$ GFP bei 37°C inkubiert wurden. Nach den entsprechenden Zeitpunkten (0-180 min) wurde die GFP-Bindung mittels Durchflusszytometrie untersucht. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SD von drei unabhängigen Experimenten. Als Kontrolle wurden Ba/F3-gp130 Zellen verwendet, die für 180 min mit 1 $\mu\text{g/ml}$ GFP inkubiert wurden. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SD von zwei unabhängigen Experimenten. **(C)** Untersuchung zur Bindung und Internalisierung von GFP in transfizierten COS-7-CIR1-3 Zellen mittels Immunfluoreszenz. Dargestellt ist Bindung von GFP an die Zelloberfläche von CIR1-3 Zellen nach Inkubation mit 1 $\mu\text{g/ml}$ GFP für 30 min bei 4°C (obere Reihe, 4°C) und die anschließende Internalisierung von GFP in das Zytoplasma nach 30 min Inkubation bei 37°C (untere Reihe, 37°C). Zellkerne wurden mit Hilfe von DAPI blau angefärbt. Hierdurch sind andere Zellen zu erkennen, an denen keine Bindung von GFP erfolgte, da es sich um untransfizierte COS-7 Zellen handelt. Dargestellt sind repräsentative Bilder aus drei unabhängigen Experimenten (in Zusammenarbeit mit Dr. Sebastian Temme, Institut für Molekulare Kardiologie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf).

3.3.4 Bindung und Internalisierung von GFP gekoppelten Latex-Beads

Im weiteren Verlauf dieser Arbeit wurde untersucht, inwiefern GFP-gekoppelte Nanopartikel von den CIRs gebunden und internalisiert werden. Dafür wurden Latex-Beads unterschiedlicher Größe (20 nm, 100 nm oder 4 µm im Durchmesser) mit GFP gekoppelt (s. Abschnitt 2.2.2.7). Auf den Latex-Beads befinden sich reaktive Aldehydgruppen, die in Lage sind, mit freien Lysinen des GFP zu reagieren, wodurch das GFP kovalent an die Oberfläche der Latex-Beads gebunden wird. Jeweils 40 µg GFP in 500 µl PBS wurden bei 4°C über Nacht mit 100 µl der jeweiligen Latex-Bead Lösung inkubiert, am folgenden Tag mit 5% BSA in PBS abgesättigt und mehrmals mit PBS gewaschen, um ungebundenes GFP zu entfernen. Um die Kopplung des GFP an die Latex-Beads zu verifizieren, wurden die GFP-gekoppelten Latex-Beads (GFP-LBs) mit einem IVIS Lumina-II Imaging System auf das GFP-Fluoreszenzsignal analysiert (Abbildung 3.18A). Hierbei wurde festgestellt, dass die Kopplung des GFPs an die Latex-Beads erfolgreich verlief. Bei den GFP-LBs wurde ein starkes GFP-Fluoreszenzsignal nachgewiesen (obere Darstellung: Rote Bereiche; untere Darstellung: GFP-Fluoreszenzintensität angeben als MFI). Als Kontrolle wurden ungekoppelte Latex-Beads verwendet, bei denen nur eine geringe Hintergrundfluoreszenz festgestellt wurde.

Im Anschluss wurde die Bindung der unterschiedlichen GFP-LBs an die CIRs in transfizierten COS-7-CIR1-3 Zellen untersucht. Als Kontrolle wurden untransfizierte COS-7 Zellen verwendet. Hierzu wurden COS-7 Zellen in 1 ml DMEM/- mit 50 µl GFP-LBs für 1 h bei 37°C inkubiert und anschließend dreimal mit PBS gewaschen, um nicht gebundene GFP-LBs zu entfernen. Die Bindung der GFP-LBs, an transfizierte COS-7-CIR1-3 Zellen, wurde mittels Durchflusszytometrie quantifiziert (angegeben als MFI, Abbildung 3.18B). Bei dieser Analyse wurde festgestellt, dass die 20 nm GFP-LBs, die stärkste Bindung an die CIRs aufwiesen. Mit zunehmender Größe der GFP-LBs, nahm die Stärke des GFP-Signals ab. Somit lag eine schwächere Bindung der GFP-LBs an den CIRs vor. Wie in den vorherigen Experimenten, wies CIR1 die schwächste Bindung an GFP-LBs auf. Die stärkste Bindung von GFP-LBs erfolgte durch CIR3.

Wie in Abschnitt 3.3.3 beschrieben, konnte mit der Analyse mittels Durchflusszytometrie jedoch nicht differenziert werden, ob die GFP-LBs gebunden auf der Zelloberfläche vorlagen, oder nach Bindung an die CIRs internalisiert wurden. Analog zu der Detektion der GFP-LBs Bindung mittels Durchflusszytometrie, wurden transfizierte COS-7-CIR1-3 Zellen für 1 h bei 37°C mit 50 µl GFP-LBs inkubiert und mikroskopisch mittels Immunfluoreszenz untersucht (Abbildung 3.19A). Zellkerne wurden mit Hilfe von DAPI blau angefärbt. Eine Internalisierung von GFP-LBs, mit den Durchmessern von 20 nm und 100 nm, erfolgte durch alle CIRs. Dies ist anhand der Akkumulation von vesikulären Strukturen im Zytoplasma und im perinukleären Bereich zu erkennen. An untransfizierte Zellen, die anhand der angefärbten Zellkerne zu erkennen sind, erfolgte allerdings keine Bindung von GFP-LBs. Die 4 µm GFP-LBs wurden

Ergebnisse

nur von CIR3-exprimierenden Zellen internalisiert, zu erkennen anhand der runden Strukturen in der Zelle. In den CIR1- und CIR2-exprimierenden COS-7 Zellen war nach der Inkubation mit den 4 μm GFP-LBs ein GFP-Signal zu erkennen, jedoch keine runden Strukturen der 4 μm Latex-Beads. Dies deutet darauf hin, dass die GFP Moleküle, nach der Bindung an den CIR1 oder CIR2, von der GFP-LB-Oberfläche abgelöst wurden und somit keine Internalisierung der 4 μm GFP-LBs erfolgte, sondern nur des GFP.

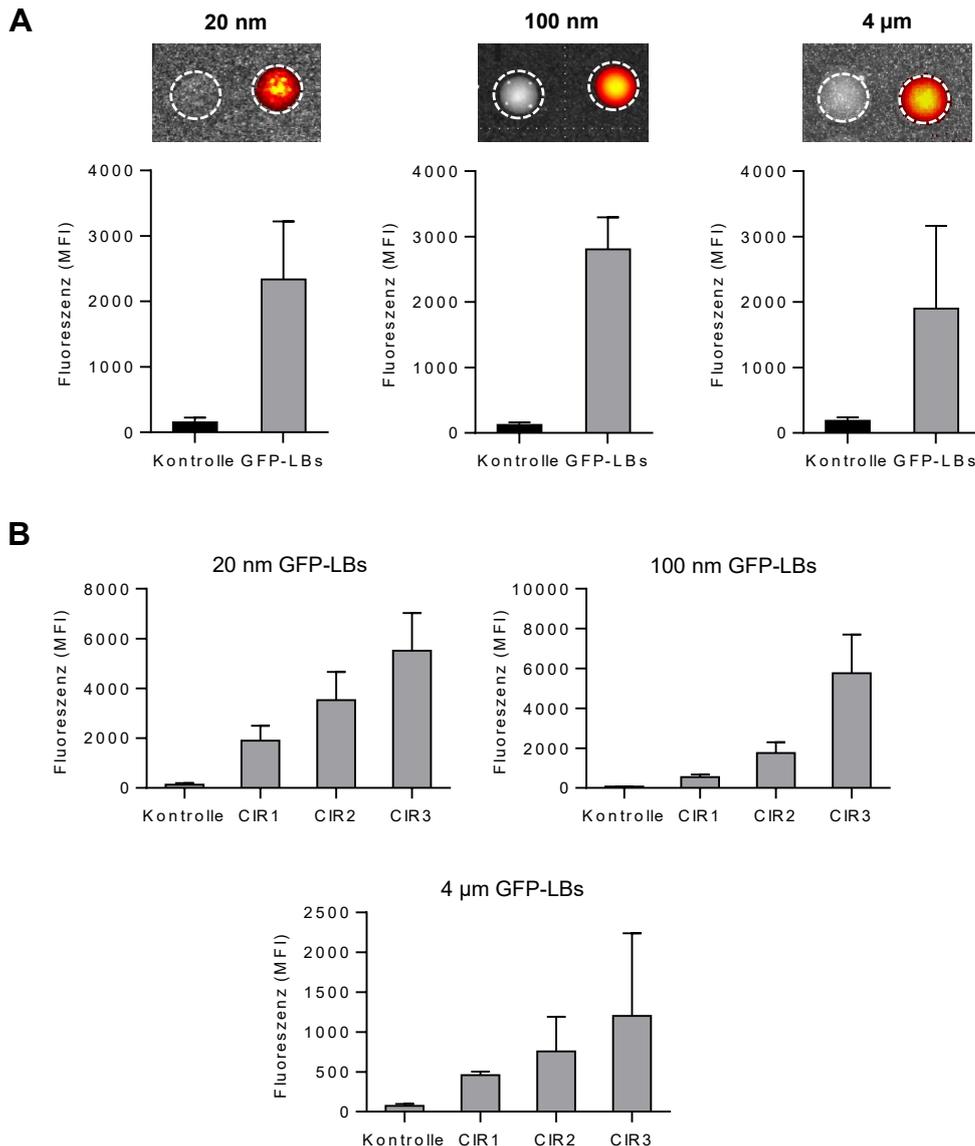


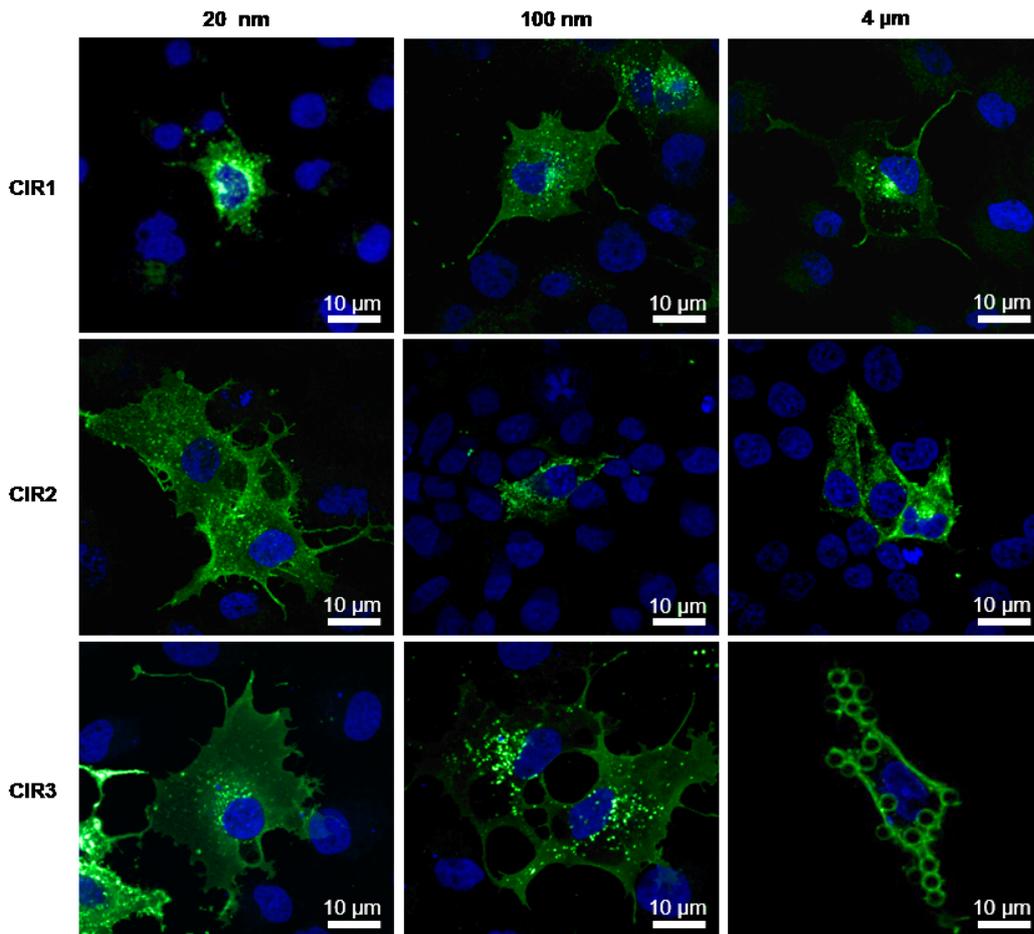
Abbildung 3.18: Charakterisierung und CIR-vermittelte Bindung von GFP-Latex-Beads. (A) Latex-Beads mit unterschiedlichen Durchmessern (20 nm, 100 nm oder 4 μm), wurden über Nacht bei 4°C mit 40 μg GFP gekoppelt. Am folgenden Tag wurde ungebundenes GFP durch mehrmaliges Waschen entfernt. Im oberen Teil der Abbildung, ist die qualitative Analyse der GFP-LBs dargestellt, bei der das Hellfeldbild der Proben mit dem Fluoreszenzbild der GFP-Intensität aufeinander gelegt wurde. Die Quantifizierung des GFP-Fluoreszenzsignals (MFI) der GFP-LBs erfolgte mit einem IVIS Lumina-II Imaging System und ist in den entsprechenden Graphen zu erkennen. Als Kontrolle wurden ungekoppelte Latex-Beads verwendet. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SD aus drei unabhängigen Experimenten. (B) Transfizierte COS-7-CIR1-3 Zellen, sowie untransfizierte Kontrollzellen, wurden für 1 h bei 37°C mit 50 μl GFP-LBs (20 nm, 100 nm oder 4 μm Durchmesser) inkubiert. Die Intensität der GFP-LB Bindung (angegeben als MFI) an die CIR-exprimierenden Zellen wurde mittels Durchflusszytometrie analysiert. Dargestellt sind die Mittelwerte \pm SD aus drei unabhängigen Versuchen.

Ergebnisse

Um zu gewährleisten, dass die 4 μm GFP-LBs tatsächlich mittels CIR3 in die Zelle internalisiert wurden, wurde die Zelloberfläche mit einem α -MHC Klasse I Antikörper markiert und über einen α -Maus-Alexa594 Antikörper sichtbar gemacht (graue Färbung, s. Abschnitt 2.2.3.3). Die Aufnahme der 4 μm GFP-LBs in COS-7-CIR3 Zellen wurde mit verschiedenen Z-Stapelaufnahmen mikroskopisch untersucht. Basierend auf den Z-Stapelaufnahmen wurde eine 3D-Rekonstruktion der Zelle erstellt (Abbildung 3.19B), anhand derer deutlich zu erkennen ist, dass die 4 μm GFP-LBs durch den CIR3 in die Zelle internalisiert wurden.

Zusammenfassend kann in Bezug auf die Bindung und Internalisierung von GFP-gekoppelten Nanopartikeln festgestellt werden, dass durch alle CIRs eine Bindung und Internalisierung von GFP-LBs, bis zu einer Größe von 100 nm, stattfinden kann. Die Bindung und Internalisierung von 4 μm großen GFP-LBs erfolgt allerdings nur durch CIR3.

Ergebnisse



B

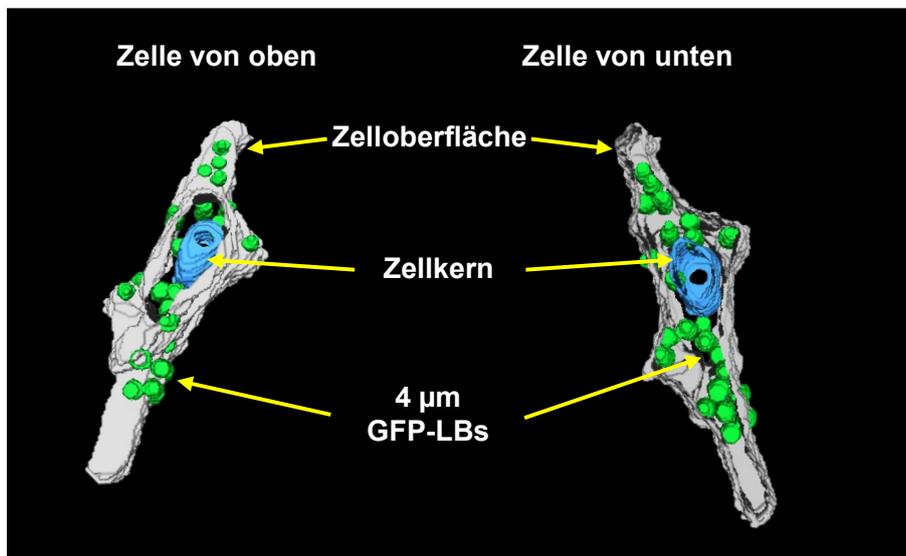


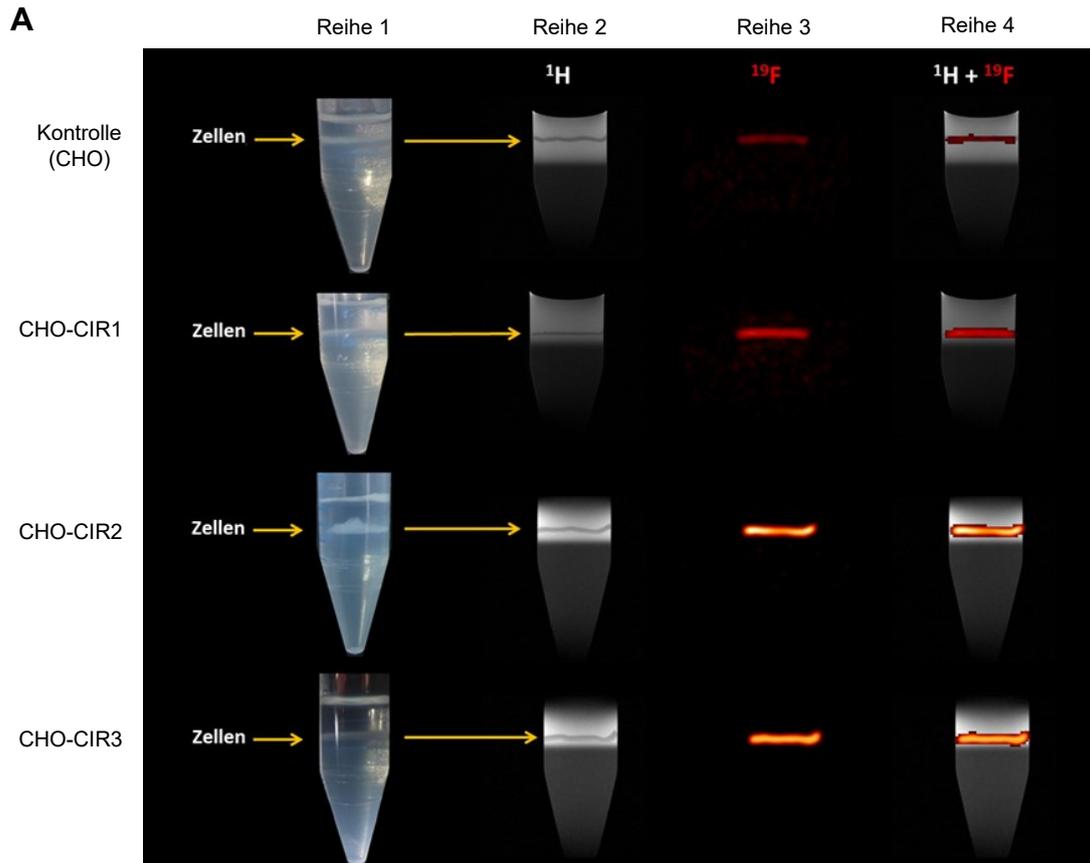
Abbildung 3.19: Internalisierung von GFP-gekoppelten Latex-Beads in transfizierten COS-7-CIR1-3 Zellen. (A) Dargestellt sind Immunfluoreszenzbilder der internalisierten GFP-LBs (20 nm, 100 nm oder 4 µm) nach 1 h Inkubation bei 37°C in transfizierten COS-7-CIR1-3 Zellen. Zellkerne wurden mit Hilfe von DAPI blau angefärbt. Die weiße Maßstabsleiste entspricht 10 µm. Dargestellt sind repräsentative Bilder aus drei unabhängigen Experimenten. (B) 3D-Rekonstruktion von verschiedenen Z-Stapelaufnahmen einer CIR3 transfizierten COS-7 Zelle, nach 1 h Inkubation mit 50 µl 4 µm GFP-LBs bei 37°C. Die Zellwand wurde mit Hilfe eines primären α-MHC Klasse I Antikörpers markiert und mit einem sekundären α-Maus-Alexa594 Antikörper sichtbar gemacht (graue Färbung). Der Zellkern wurde mittels DAPI blau angefärbt. Die Erstellung des Bildes erfolgte mit der Software Amira (FEI, Thermo Fisher Scientific, Oregon, USA). Das Experiment wurde in Zusammenarbeit mit Dr. Sebastian Temme (Institut für Molekulare Kardiologie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) durchgeführt.

3.3.5 Visualisierung der CIR-vermittelten GFP-PFC Aufnahme mittels $^1\text{H}/^{19}\text{F}$ Magnetresonanztomographie

Im folgenden Abschnitt dieser Arbeit werden Ergebnisse dargestellt, die in Kooperation mit dem Institut für Molekulare Kardiologie der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf erhoben wurden und in Absprache, zum besseren Verständnis des Projektes, in diese Arbeit integriert wurden. Aufgrund der spezifischen Bindung von GFP an CIRs, wurde im weiteren Verlauf dieses Projektes eine Detektion von CIR-exprimierenden Zellen mittels $^1\text{H}/^{19}\text{F}$ Magnetresonanztomographie (MRT) durchgeführt. Hierfür wurden PFC-NE verwendet, die mit GFP gekoppelt (GFP-PFCs) waren. Bei PFC-NEs handelt es sich um emulgierte Nanopartikel, die einen hohen Anteil an Fluor aufweisen (^{19}F) (Krafft & Riess 2009; Grapentin *et al.* 2014). Aufgrund des Fehlens von Fluor im biologischen Gewebe, können ^{19}F -Signale sehr spezifisch und sensitiv detektiert werden. Des Weiteren erzeugt ^{19}F -MRT einen eindeutigen Kontrast gegenüber den ^1H Messungen. Aufgrund dessen ist es möglich, mit überlagerten ^1H - und ^{19}F -Bildern, eine präzise Lokalisation zwischen umliegendem Gewebe (^1H -Signal) und Zellen mit aufgenommenen PFC-NEs (^{19}F -Signal) zu ermöglichen (Flögel *et al.* 2008). Durch Verwendung von GFP-PFCs soll ein spezifisches Targeting von CIR-exprimierende Zellen mittels MRT Detektion ermöglicht werden. So soll eine Methode entwickelt werden, bei der verschiedene murine Immunzelltypen, z.B. unterschiedliche T-Zell-Subpopulationen, CIRs exprimieren, damit das zeitliche Migrationsverhalten dieser Zellen in Entzündungs-assoziierten Krankheiten untersucht werden kann.

Um die CIR-vermittelte Aufnahme von GFP-PFCs in Zellen initial zu untersuchen, wurden untransfizierte CHO Zellen und stabil transfizierte CHO-CIR1-3 Zellen nach Inkubation mit GFP-PFCs mittels MRT untersucht (s. Abschnitt 2.2.3.1). CHO-CIR1-3 Zellen wurden hierfür mit 75 μl GFP-PFC Emulsion über Nacht bei 37°C auf einem Schüttler inkubiert. Am folgenden Tag wurden die behandelten Zellen mit PBS gewaschen und mit Trypsin abgelöst. Die Zellen wurden in PBS aufgenommen und anschließend auf einen Percoll-Gradienten zentrifugiert. Mittels Zentrifugation wurden, auf dem Percoll-Gradienten, die Zellen von ungebundenen GFP-PFCs separiert. Die behandelten Zellen waren auf dem Percoll-Gradienten als eine dünne Schicht zu erkennen (Abbildung 3.20A, Reihe 1). Anschließend wurden die Zellen mittels ^1H -MRT visualisiert. Dies ist zu erkennen anhand der dunklen Bande zwischen PBS und dem Percoll-Gradienten (Reihe 2). Anschließend wurde die in den Zellen aufgenommene Menge an GFP-PFCs mittels ^{19}F -MRT detektiert, zu erkennen anhand der roten Bande (Reihe 3). Die ^1H - und ^{19}F -Signale wurden anschließend überlagert und die von den Zellen aufgenommene Menge an GFP-PFC wurde quantifiziert (Abbildung 3.20A, Reihe 4).

Ergebnisse



B

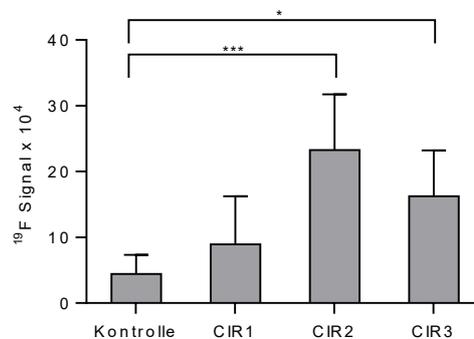


Abbildung 3.20: ^{19}F -MRT von CIR1-3-exprimierenden Zellen. (A) Stabil transfizierte CHO-CIR1-3 Zellen wurden mit 75 μl GFP-PFCs über Nacht bei 37°C inkubiert. Über einen Percoll-Gradienten wurden die Zellen (Reihe 1, weiße Linie) von nicht gebundenen GFP-PFCs separiert. Als Kontrolle wurden untransfizierte CHO Zellen verwendet. In Reihe 2 sind die zu untersuchenden Zellen zu erkennen, welche mittels ^1H -MRT visualisiert wurden, zu erkennen anhand der dunklen Schicht. In Reihe 3 ist die von den Zellen aufgenommene Menge an GFP-PFCs dargestellt, welche mittels ^{19}F -MRT sichtbar gemacht wurde. In Reihe 4 wurde das ^1H -Signal der Zellen und das ^{19}F -Signal der GFP-PFCs überlagert, um die aufgenommene Menge an GFP-PFCs zu bestimmen. Weitere Erläuterungen sind in Abschnitt 3.3.5 beschrieben. (B) Quantifizierung des ^{19}F -Signals, aus Abbildung 3.20A, in stabil transfizierten CHO-CIR1-3 Zellen. Dargestellt ist der Mittelwert \pm SD von sechs unabhängigen Experimenten. Die Berechnung der Signifikanz wurde unter Verwendung eines *two-way* ANOVA Test mit anschließendem Bonferroni Test durchgeführt ($p \leq 0,05 = *$, $p \leq 0,01 = **$, $p \leq 0,001 = ***$, n.s. = nicht signifikant). Die dargestellten Experimente wurden in Zusammenarbeit mit Pascal Bouvain (Institut für Molekulare Kardiologie, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) durchgeführt.

Hierbei wurde festgestellt, dass in CHO Zellen die keinen CIR exprimieren, nur ein schwaches ^{19}F -Signal detektiert wurde, zurückzuführen auf unspezifische Bindungen (Abbildung 3.20B). Durch CIR1 erfolgte nur eine geringe Aufnahme bzw. Bindung von GFP-PFCs in CHO Zellen.

Im Vergleich zu den CHO Kontrollzellen wurde nur ein geringer Anstieg des ^{19}F -Signals detektiert. Eine eindeutigere Bindung bzw. Internalisierung von GFP-PFCs erfolgte durch CIR2 und CIR3. Im Vergleich zu den Kontrollzellen wurde in den CHO-CIR2 und -CIR3 Zellen, ein vier- bis fünffach stärkeres ^{19}F -Signal detektiert (Abbildung 3.20B). Das stärkste ^{19}F -Signal wurde in CHO-CIR2 Zellen gemessen.

Über das spezifische Targeting von Zellen lässt sich zusammenfassend sagen, dass die CIRs *in vitro* ein geeignetes Werkzeug darstellen, um Zellen spezifisch mit GFP-PFCs zu markieren und mittels $^1\text{H}/^{19}\text{F}$ -MRT zu visualisieren. Durch den CIR1 erfolgt die schwächste Bindung und Internalisierung von GFP-PFCs, zu erkennen anhand der Stärke des ^{19}F -Signals. CIR2 und CIR3 weisen stärkere Bindungs- bzw. Internalisierungseigenschaften auf. Die stärkste Bindung und Internalisierung erfolgt allerdings durch den CIR2.

3.3.6 CIR-vermittelte Aufnahme von GFP-PFCs führt zu keiner Aktivierung von zellulären Signalwegen

Ein wichtiger Aspekt bei der Verwendung der CIRs mit GFP bzw. mit GFP-gekoppelten Nanopartikeln ist, dass nach deren Bindung und Internalisierung an den Rezeptor, keine Aktivierung von Signalwegen in den Zielzellen erfolgen darf. Vor allem für eine *in vivo* Anwendung der CIRs, z.B. in Entzündungs-assoziierten Krankheitsmodellen, wäre dies entscheidender Bedeutung. Aufgrund der Bindung von GFP- bzw. GFP-PFCs könnten Signalwege in den CIR-exprimierenden Zellen aktiviert werden, wodurch Zelleigenschaften verändert werden könnten. Um dies zu überprüfen, wurde die Genexpression von Ba/F3-gp130 und Ba/F3-gp130-CIR1-3 Zellen, nach Inkubation mit GFP-PFCs, mittels Microarray-Analyse untersucht (s. Abschnitt 2.2.3.2, in Zusammenarbeit mit Frau Dr. Knebel, Institut für klinische Biochemie und Pathobiochemie, Deutsches Diabetes-Zentrum, Düsseldorf). Hierbei wurde eine Veränderung der Genexpressionen des gesamten murinen Transkriptom untersucht (~30000 Gene). Es wurden jeweils 2×10^6 Zellen der entsprechenden Zelllinie für 2 h bei 37°C in serumfreien DMEM -/- inkubiert, damit über den Zytokin- und FCS-Entzug alle mitogenen Signale ausgeschaltet werden, und anschließend für 1 h bei 37°C stimuliert. Als Positivkontrolle, für die Stimulation von Ba/F3-gp130 Zellen über den Trans-Signalweg wurde 100 ng/ml HIL-6 verwendet. Ba/F3-gp130-CIR1-3 Zellen wurden mit 50 $\mu\text{l/ml}$ GFP-PFC Emulsion stimuliert (Abbildung 3.21A). Nach Stimulation wurde die Gesamt-RNA der Zellen isoliert und auf dessen Qualität getestet. Für die Genexpressionsanalyse wurde nur RNA mit einem RIN-Faktor > 8 verwendet. In Abbildung 3.21B sind die differentiell exprimierten Gene nach Stimulation mittels Volcano-Plot dargestellt (Schwellenwert: $\pm 1,5$ fache Veränderung der Genexpression, p-Wert $\leq 0,05$). Für die Analyse wurde die Genexpression von unstimulierten Zellen mit der von stimulierten Zellen verglichen. Bei der Stimulation von Ba/F3-gp130 Zellen mit HIL-6 wurde eine signifikante Veränderung in der Expression von 151 Genen festgestellt.

Ergebnisse

Hierbei wurden, wie erwartet, vor allem Gene hochreguliert, die in der Aktivierung des JAK/STAT Signalweges involviert sind, wie z.B. *Socs* (8,9fach), *Fos* (5fach) und *Jun* (2,1fach).

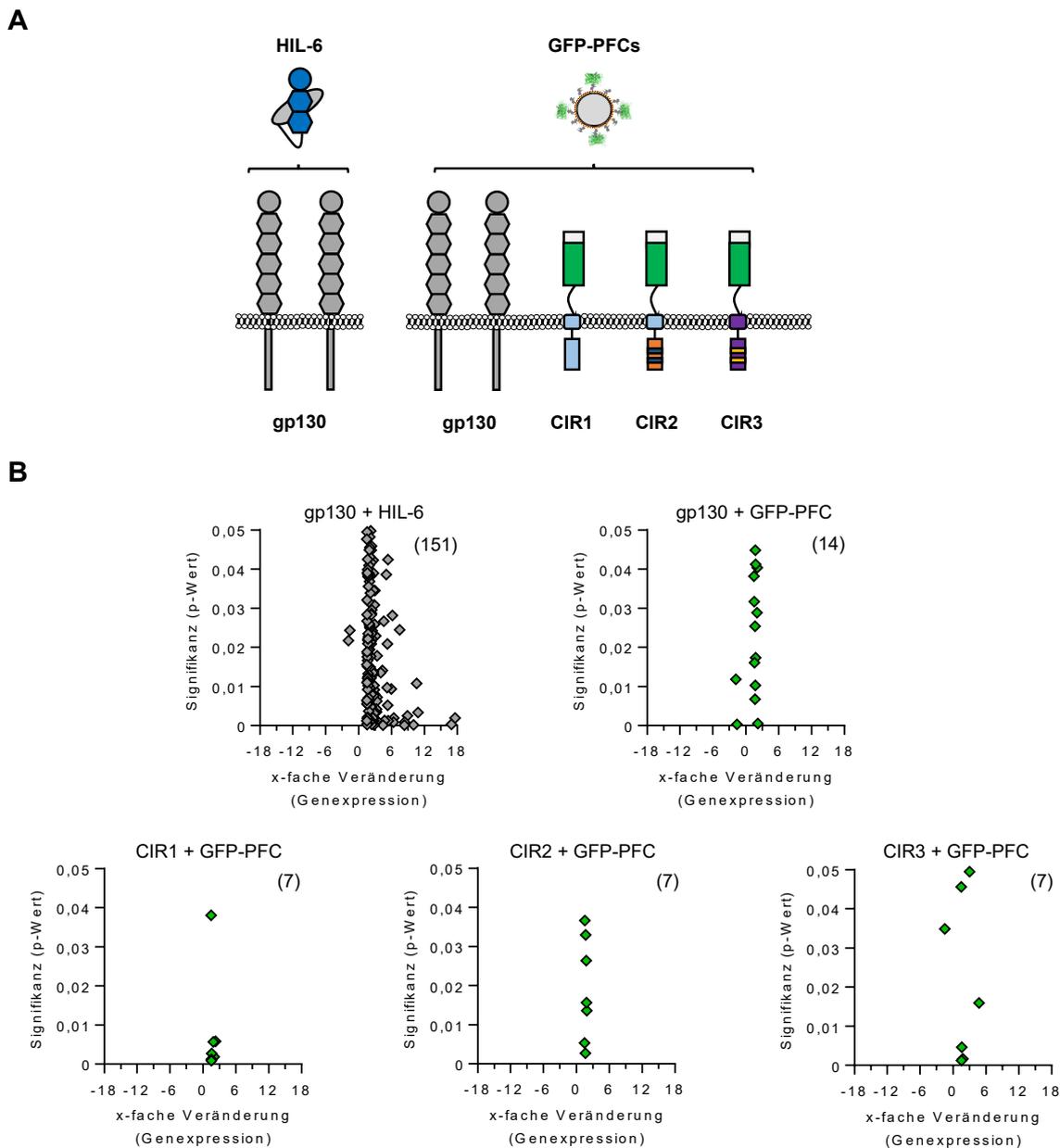


Abbildung 3.21: Genexpressionsanalyse nach Stimulation von Ba/F3-gp130-CIR1-3 Zellen mit GFP-PFCs.

(A) Schematische Darstellung des experimentellen Aufbaus für die Genexpressionsanalyse von Ba/F3-gp130 und Ba/F3-gp130-CIR1-3 Zellen. Jeweils 2×10^6 Zellen wurden für 2 h in Serum- und Zytokin-freiem DMEM Medium bei 37°C inkubiert und anschließend mit $50 \mu\text{l/ml}$ GFP-PFCs für 1 h bei 37°C inkubiert. Als Positivkontrolle für die Stimulation von Ba/F3-gp130 Zellen wurde 100 ng/ml HIL-6 eingesetzt. Unstimulierte Zellen, der jeweiligen Zelllinie, wurden als Negativkontrolle verwendet, um einen Vergleich in der Veränderung der Genexpression nach HIL-6 bzw. GFP-PFC Stimulation zu ermöglichen. **(B)** Volcano-Plot Analyse über die Veränderung der Genexpression nach Stimulation mit HIL-6 oder GFP-PFCs (Schwellenwert: $\pm 1,5$ -fache Veränderung in Genexpression, p -Wert $\leq 0,05$). Dargestellt sind die differentiell exprimierte Gene nach Stimulation mit HIL-6 oder GFP-PFCs. Erläuterungen sind in Abschnitt 3.3.6 beschrieben. Dargestellt sind die zusammengefassten Daten aus drei unabhängigen Experimenten.

Eine Übersicht aller HIL-6-induzierten Signalwege in Ba/F3-gp130 Zellen ist in Tabelle 8.1. (Anhang) dargestellt. HIL-6 wurde für die Stimulation von Ba/F3-gp130 Zellen als Positivkontrolle verwendet, um sicherzustellen, dass die Stimulationszeit in Ba/F3-gp130-CIR1-3 Zellen ausreichend ist, um einen potentiellen Effekt der GFP-PFC-Stimulation nachzuweisen. Allerdings wurde, nach Stimulation von Ba/F3-gp130-CIR1-3 Zellen mit GFP-PFCs, nur eine geringe Änderung in der differentiellen Expression von Genen nachgewiesen. In jeder Zelllinie wurden lediglich 7 Gene differentiell exprimiert. Des Weiteren wurde keine spezifische Aktivierung von Signalwegen festgestellt, obwohl CIR1 die IZD des IL-6R, CIR2 die IZD von Endo180 und CIR3 die IZD von FcγRIIA besitzt.

Basierend auf den Daten der Genexpressionsanalyse von Ba/F3-gp130-CIR1-3 Zellen lässt sich zusammenfassend sagen, dass die Bindung bzw. Internalisierung von GFP-PFCs durch CIRs zu keiner Aktivierung von Signalwegen in den murinen prä-B-Zellen führt. Somit scheint das CIR/GFP-PFC System eine geeignete Methode für das Targeting von Zellen zu sein, da es auf der transkriptionellen Ebene zu keiner Veränderung des Genexpressionsmusters nach Bindung von GFP-PFCs an die CIRs kommt.

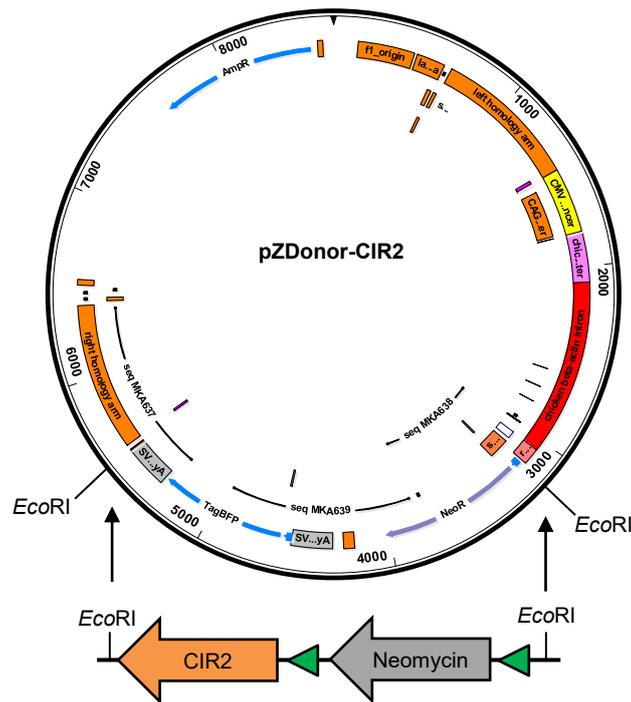
3.3.7 Versuch zur Generierung einer CIR2 *Knock-in* Maus

Bei verschiedenen inflammatorischen Krankheitsmodellen in Mäusen wurde das Tracking von Monozyten und Makrophagen mittels ¹⁹F-MRT erfolgreich angewandt. Hierzu wurden PFCs intravenös injiziert und aufgrund der unspezifischen Aufnahme von Monozyten und Makrophagen, über Phagozytose, konnten diese mittels ¹⁹F-MRT detektiert werden (Temme *et al.* 2012; Ahrens & Bulte 2013a). Ein spezifisches Tracking von nicht-phagozytierenden Zellen, z.B. T-Zellen, wäre für das Verständnis von zellulären Vorgängen, wie z.B. die Migration verschiedener Immunzelltypen in Entzündungs-assoziierten Krankheitsmodellen, von großer Nützlichkeit. Hierzu soll eine Methode entwickelt werden, mit der *in vivo* das spezifische Tracking von CIR-exprimierenden Zellen mittels ¹⁹F-MRT ermöglicht wird.

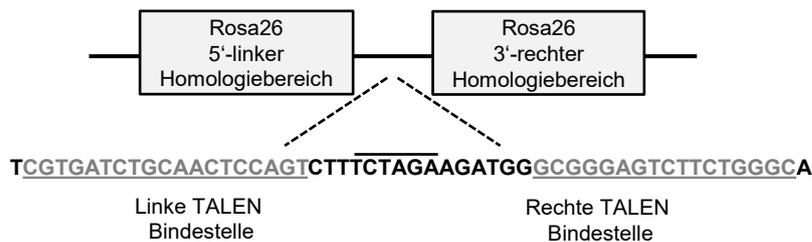
In Kooperation mit dem *Institute of Molecular Genetics of the ASCR* (Prof. Dr. Radislav Sedlacek, Prag, Tschechische Republik) wurde eine transgene *Knock-in* Maus generiert, um die CIR-vermittelte spezifische Aufnahme von GFP bzw. GFP-PFCs zum molekularen Zelltracking, mittels ¹⁹F-MRT, *in vivo* zu untersuchen. Aufgrund der vorherigen Ergebnisse wurde festgestellt, dass CIR2 und CIR3 die stärkste Bindung und Internalisierung von GFP bzw. GFP-PFCs aufwiesen. Für die Erstellung der transgenen Maus wurde CIR2 ausgewählt, aufgrund der Endozytose-vermittelten Internalisierung von Liganden (Ghazizadeh & Fleit 1994), anstatt der vom CIR3 beschriebenen Internalisierung mittels Phagozytose (Greenberg *et al.* 1993). Zusätzlich wurde mit CIR2 die stärkste Aufnahme von GFP und GFP-PCFs nachgewiesen (Abbildung 3.17B und Abbildung 3.20B).

Ergebnisse

A



B



C

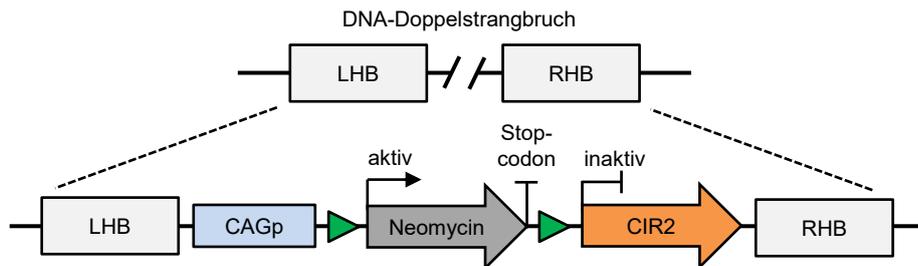


Abbildung 3.22: Schematische Darstellung der TALEN-vermittelten Insertion des CIR2 Gens in den Rosa26 Lokus. (A) Schematische Darstellung der Klonierung des pZDonor-CIR2 Plasmides, für die Insertion des CIR2 Gens in den Rosa26 Lokus. Erläuterungen sind in Abschnitt 3.3.7 beschrieben. (B) Dargestellt sind die spezifischen Bindungstellen (grau, unterstrichen) der TALEN^{Rosa26} Konstrukte im murinen Rosa26 Lokus. Bei der schwarzen Linie, über der dargestellten DNA-Sequenz, handelt es sich um die Region, in der der DNA-Doppelstrangbruch induziert wird (modifizierte Abbildung entnommen aus (Kaspárek *et al.* 2014)). (C) Schematische Darstellung der homologen Rekombination des Rosa26 Lokus mit pZDonor-CIR2 Konstrukt. Für die transgene Expression wurde ein CAG-Promotor (CAGp) verwendet, bestehend aus einem chicken β -Aktin-Promotor mit einem Cytomegalievirus (CMV) Enhancer. Nach Insertion des Zielvektors, über den linken und rechten Homologiebereich (LHB und RHB), wird das Neomycinresistenzgen (Neomycin) transkribiert und exprimiert. Die Neomycinresistenz dient zur positiven Selektion von Zygoten (Hintergrund C57BL/6N), die mittels DNA-Mikroinjektion des pZDonor-CIR2 Plasmides transfiziert wurden. Das Neomycinresistenzgen ist von zwei loxP sites (grüne Pfeile) flankiert. Diese werden von der Cre-Rekombinase erkannt, wodurch eine Exzision des loxP-flankierten DNA-Bereiches induziert wird. Die Expression des CIR2 Gens wird somit erst nach Kreuzung mit einem Cre-exprimierendem Mausstamm induziert. Die DNA-Mikroinjektionen in die Zygoten des Mausstamm C57BL/6N, sowie die Zucht der Mäuse, wurde von Jana Kopkanova und Inken Beck durchgeführt (Institute of Molecular Genetics, Prag, Tschechische Republik).

Ergebnisse

Der *Knock-in* der CIR2 cDNA in C57BL/6N Mäuse erfolgte über homologe Rekombination, mittels *Transcription Activator-Like Effector Nucleases* (TALEN). Bei TALEN handelt es sich um multiple Domänen, bestehend auf je 33-35 Aminosäuren. Jede dieser repetitiven Domänen ist dazu in der Lage, spezifisch eine DNA-Base zu erkennen und zu binden (Moscou & Bogdanove 2009). Durch die Kombination von verschiedenen Domänen kann die Spezifität der TALENs dahingehend moduliert werden, dass eine spezifische DNA-Sequenz gebunden wird (Cermak *et al.* 2011). Des Weiteren wurde die katalytische Domäne der FokI Endonuklease an den C-Terminus der TALENs fusioniert. Um einen Doppelstrangbruch der DNA, über FokI Endonukleasen, zu induzieren, müssen beide TALENs in räumlicher Nähe zueinander binden. Nach DNA-Doppelstrangbruch kann die Insertion von Genen über homologe Rekombination erfolgen (Christian *et al.* 2010; Stoddard 2011).

Von Prof. Sedlacek wurde ein Plasmid (pZDonor-Bluerflirt) zur Verfügung gestellt, das bereits für den *Knock-in* des *Blue Fluorescent Protein* (BFP) in Mäuse verwendet wurde (Kasperek *et al.* 2014). Für die Klonierung des CIRs in das pZDonor-Bluerflirt Plasmid, wurde die DNA-Sequenz für BFP, sowie das Neomycinresistenzgen mit dem Restriktionsenzym EcoRI entfernt und das 5'- und 3'-Ende des linearisierten Plasmides wurde dephosphoryliert. Die DNA-Sequenz des CIR2, sowie ein Neomycinresistenzgen (flankiert von *loxP sites*), wurde von GeneArt (Regensburg) synthetisiert und mittels EcoRI-Restriktion in das linearisierte pZDonor Plasmid kloniert (Abbildung 3.22A). Dabei wurde beachtet, dass die DNA-Sequenzen für die Transkription in der Maus Codon-optimiert wurden.

Bei der von Prof. Sedlacek beschriebenen Methode, für den TALEN-vermittelten *Knock-in* von Genen in Mäuse (Kasperek *et al.* 2014), wurden TALENs verwendet, die spezifisch an die DNA-Sequenz des ersten Introns des murinen *Rosa26* Locus (TALEN^{Rosa26}) binden und einen DNA-Doppelstrangbruch induzieren (Abbildung 3.22B). Der *Rosa26* Locus wurde für die Erstellung der CIR2 *Knock-in* Maus gewählt, da es sich um einen Locus handelt, bei dem eine konstitutive und ubiquitäre Expression von inserierten Genen gewährleistet ist. Bereits über 130 *Knock-in* Mauslinien wurden unter Verwendung dieses Locus erstellt (Friedrich & Soriano 1991; Casola 2010). Für eine effiziente homologe Rekombination, nach DNA-Doppelstrangbruch, ist im Plasmid pZDonor der jeweilige 5'-linke Homologiebereich (LHB) und der 3'-rechte Homologiebereich (RHB) des murinen *Rosa26* Locus vorhanden. Das pZDonor-CIR2 Plasmid wurde zusammen mit der TALEN^{Rosa26} mRNA in Zygoten mittels DNA-Mikroinjektion injiziert. Im Anschluss wurden die Zygoten in pseudoschwangere Mäuse des Maushintergrundes C57BL/6N injiziert (durchgeführt von Jana Kopkanova und Inken Beck, *Institute of Molecular Genetics of the ASCR*, Prag, Tschechische Republik). Für diesem Mausstamm wird im weiteren Verlauf die Bezeichnung CIR2^{lox/lox} verwendet. In CIR2^{lox/lox} Mäusen wird das Gen für CIR2 nicht transkribiert, aufgrund eines Stop-Codons hinter dem Neomycinresistenzgen (Abbildung 3.22C). Das Neomycinresistenzgen ist von zwei *loxP sites*

Ergebnisse

flankiert, welche eine 5'- nach 3'-Orientierung aufweisen. Cre-Rekombinasen erkennen wiederum die *loxP sites*, wodurch eine Exzision des entsprechenden DNA-Abschnittes induziert wird. Erst nach Exzision des Neomycinresistenzgens sollte die Expression des CIR2 Gens induziert werden.

Um zu gewährleisten, dass die genetische Insertion des pZDonor-CIR2 Konstruktes in den *Rosa26* Locus der Gründerlinie erfolgreich verlief, wurden diese Tiere und die Nachkommen des CIR2^{flx/flx} Mausstamms analysiert. Für die Analyse wurden vier unterschiedliche PCRs durchgeführt (s. Abschnitt 2.2.4.4). In Abbildung 3.23 sind die Ergebnisse der Analyse dargestellt, anhand eines repräsentativen Beispiels einer wildtypischen C57BL/6N (Negativkontrolle) und einer CIR2^{flx/flx} Maus. In PCR1 (LHB) banden die Primer im linken Homologiebereich (LHB) und im CAG-Promotor. Bei erfolgreicher Insertion wurde ein 512 bp DNA-Fragment detektiert. In PCR 2 (Neo) banden beide Primer im Neomycinrestistenzgen und in CIR2^{flx/flx} Mäusen wurde ein 380 bp DNA-Fragment detektiert. In PCR 3 (RHB) wurde bei erfolgreicher CIR2 Insertion ein 526 bp DNA-Fragment nachgewiesen, durch Primer, die im CIR2 Gen und im rechten Homologiebereich (RHB) banden. In PCR 4 (NtC) wurden Primer verwendet, die im Neomycinresistenzgen und im CIR2 Gen banden, und in CIR2^{flx/flx} Mäusen wurde ein 908 bp DNA-Fragment detektiert. Die genetische Insertion des pZDonor-CIR2 Konstruktes in C57BL/6N Mäuse wurde erst als erfolgreich angesehen, wenn alle vier PCR Reaktionen positiv waren.

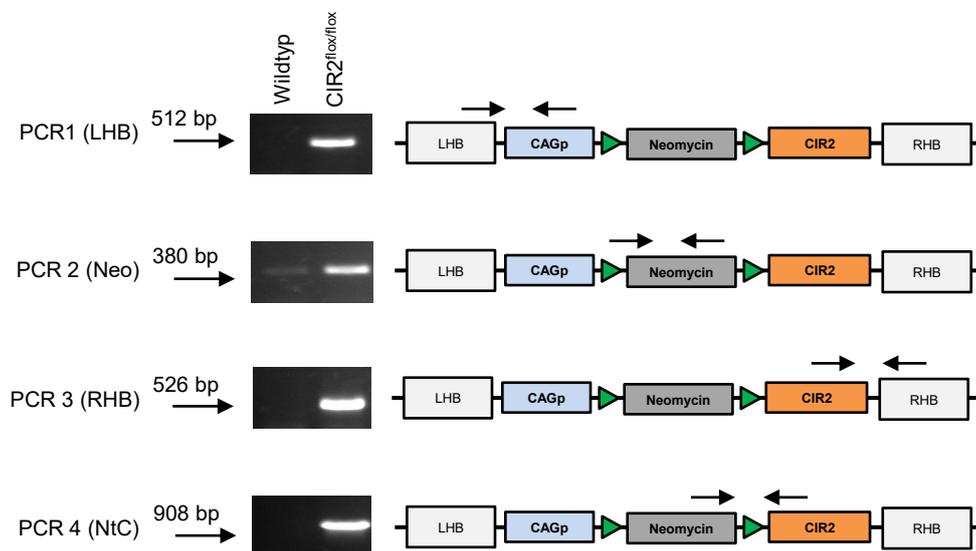


Abbildung 3.23: Genomischer Nachweis der CIR2 Insertion in den *Rosa26* Locus von C57BL/6N Mäusen. Darstellung der PCR Analysen, die verwendet wurden, um die Insertion der CIR2 cDNA in den *Rosa26* Locus von C57BL/6N Mäuse nachzuweisen. Schwarze Pfeile stellen die Bereiche dar, in denen die verwendeten Primer gebunden haben. Weitere Erläuterungen sind in Abschnitt 3.3.7 und Abschnitt 2.2.4.3 beschrieben. CAGp (CAG-Promotor bestehend aus: *Chicken* β -Aktin-Promotor mit Cytomegalievirus *Enhancer*), LHB (linker Homologiebereich), RHB (rechter Homologiebereich), Neomycin (Neomycinresistenzgen).

Ergebnisse

Wie bereits beschrieben, wurde in den CIR2^{flox/flox} Mäusen das CIR2 Gen nicht aktiviert bzw. transkribiert. Um eine Expression des CIR2 Gens zu induzieren, wurden positiv identifizierte CIR2^{flox/flox} Mäuse mit einem ACTB-Cre-Deleter-Stamm (Hintergrund C57BL/6N) verpaart (durchgeführt von Jana Kopkanova und Inken Beck, *Institute of Molecular Genetics of the ASCR*, Prag, Tschechische Republik). In dem Mausstamm ACTB-Cre wird die Cre-Rekombinase ubiquitär exprimiert und steht unter der Kontrolle des humanen β -Aktin-Promotors. Nach Exzision des loxP-markierten Neomycinresistenzgens in CIR2^{flox/flox} Mäusen sollte die Expression des CIR2 somit ubiquitär stattfinden (Abbildung 3.24A).

Um die Cre-vermittelte Rekombination in CIR2^{Cre-Del} Mäuse zu überprüfen, wurden diese ebenfalls mittels PCR analysiert. In Abbildung 3.24B sind die Ergebnisse der Analyse dargestellt, anhand eines repräsentativen Beispiels einer wildtypischen C57BL/6N Maus (Negativkontrolle), einer CIR2^{flox/flox} Maus (Positivkontrolle) und einer CIR2^{Cre-Del} Maus. Mittels PCR 1 und 3 wurde analysiert, ob nach Cre-vermittelter Rekombination die LHB und RHB Bereiche detektiert werden konnten. Wie bei den CIR2^{flox/flox} Mäusen, wurde ein 512 und 526 bp DNA-Fragment detektiert. Um zu gewährleisten, dass die Cre-induzierte Exzision des Neomycinresistenzgens vollständig verlief, wurden drei weitere PCR Reaktionen durchgeführt. In PCR 2 banden beide Primer im Neomycinresistenzgen. Nach erfolgreicher Exzision wurde dementsprechend in den CIR2^{Cre-Del} Mäusen kein 380 bp DNA-Fragment detektiert, anders als in der Positivkontrolle. In PCR 4 hat der 5'-Primer im Neomycinresistenzgen und der 3'-Primer im CIR2 Gen gebunden. Demzufolge wurde in CIR2^{Cre-Del} Mäusen kein DNA-Fragment und in der Positivkontrolle ein 908 bp DNA-Fragment detektiert. Zuletzt wurde die Exzision des Neomycinresistenzgens mittels PCR 5 analysiert. Hierbei band ein Primer im CAG-Promotor und der andere im CIR2 Gen. In CIR2^{flox/flox} Mäusen wurde ein 1201 bp DNA-Fragment detektiert, wohingegen nach erfolgreicher Exzision des Neomycinresistenzgens ein 254 bp DNA-Fragment in den CIR2^{Cre-Del} Mäusen nachgewiesen wurde.

Über die Generierung einer transgenen CIR2 *Knock-in* Maus lässt sich somit zusammenfassend sagen, dass die TALEN-vermittelte genetische Insertion der CIR2 cDNA in den *Rosa26* Locus erfolgreich verlief. Des Weiteren konnte auf genomischer Ebene gezeigt werden, dass nach Verpaarung der CIR2^{flox/flox} Mäuse, mit einem ACTB-Cre-Deleter-Stamm, die Exzision des loxP-flankierten Neomycinresistenzgens stattgefunden hat, wodurch die ubiquitäre Expression des CIR2 Gens im *Rosa26* Locus aktiviert werden sollte.

Ergebnisse

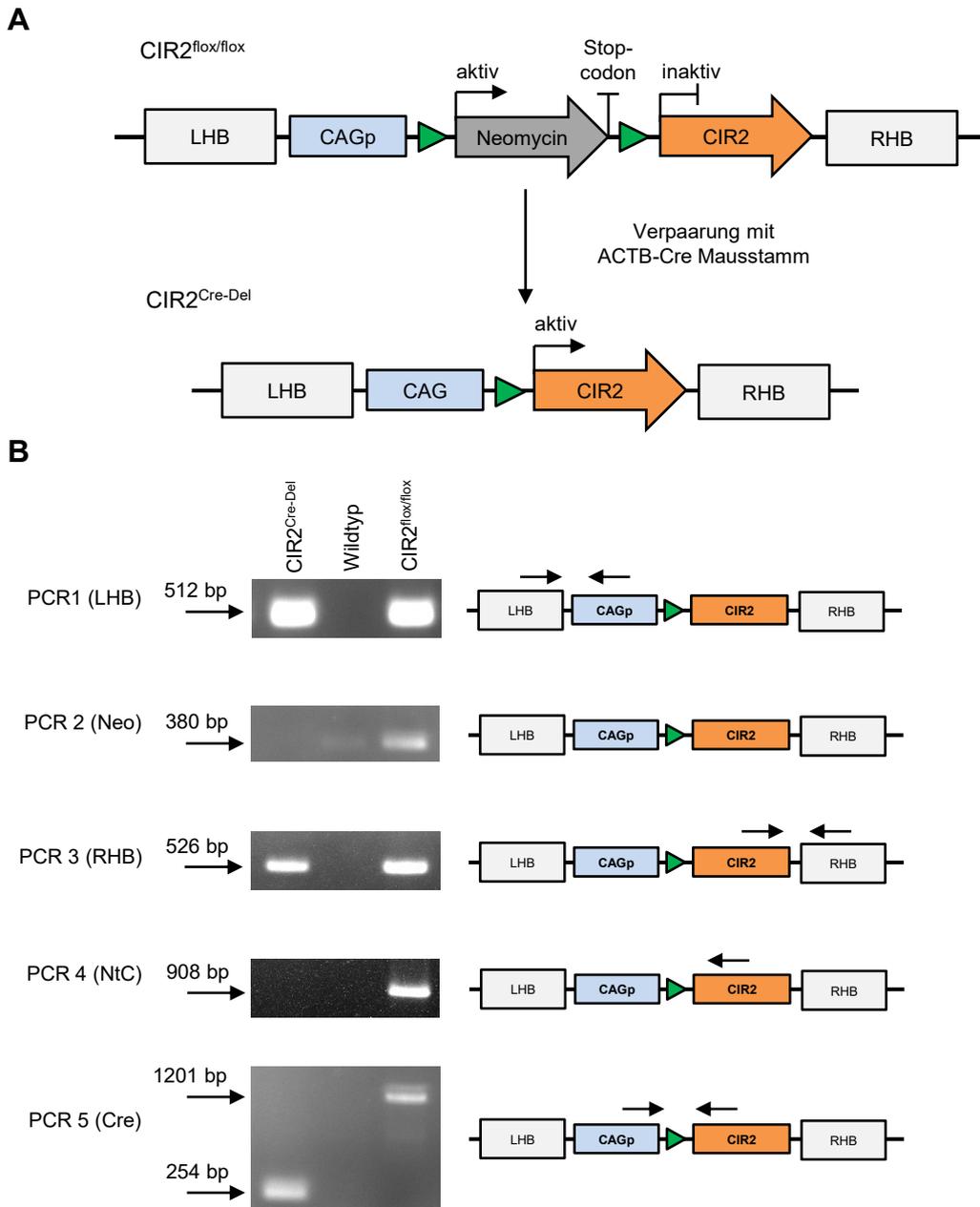


Abbildung 3.24: Schematische Darstellung zur Aktivierung des CIR2 Gens durch die Verpaarung von CIR2^{flox/flox} Mäusen mit einem ACTB-Cre-Deleter-Mausstamm. (A) CIR2^{flox/flox} Mäuse wurden mit einem ACTB-Cre-Deleter-Mausstamm verpaart, bei dem die Cre-Rekombinase unter Kontrolle des humanen β -Aktin-Promotors steht. Die Cre-Rekombinase wird ubiquitär exprimiert. Nach Kreuzung beider Mausstämmen wird in dem resultierenden CIR2^{Cre-Del} Mausstamm das Neomycinresistenzgen (von loxP sites flankiert, grüne Pfeile) durch die Cre-Rekombinase-vermittelte Exzision entfernt. Hierdurch sollte die Expression des CIR2 Gens in allen Geweben induziert werden. **(B)** Darstellung der PCR Analysen, die verwendet wurden, um die Exzision des Neomycinresistenzgens in CIR2^{Cre-Del} Mäusen zu untersuchen. Genomische DNA von CIR2^{flox/flox} Mäusen wurde als Positivkontrolle und als Negativkontrolle wurde genomische DNA von wildtypischen C57BL/6N Mäusen verwendet. Schwarze Pfeile stellen die Bereiche dar, in denen die verwendeten Primer gebunden haben. Weitere Erläuterungen sind in Abschnitt 3.3.7 und Abschnitt 2.2.4.2 beschrieben. CAGp (CAG-Promotor bestehend aus: *Chicken* β -Aktin-Promotor mit Cytomegalievirus *Enhancer*), LHB (linker Homologiebereich), RHB (rechter Homologiebereich), Neomycin (Neomycinresistenz).

3.3.8 Charakterisierung des CIR2^{Cre-Del} Mausstamms bezüglich der CIR2-Expression und der GFP-Bindung

Im vorherigen Abschnitt wurde gezeigt, dass auf genomischer Ebene die Insertion des CIR2 Gens in den *Rosa26* Lokus von C57BL/6N Mäusen erfolgreich verlief. Nach der Verpaarung von CIR2^{flox/flox} Mäusen mit einem ACTB-Cre-Deleter-Stamm konnte gezeigt werden, dass die Exzision des Neomycinresistenzgens stattgefunden hat. Hierdurch sollte die Expression des CIR2 Gens ubiquitär aktiviert werden. Um die CIR2-Expression im CIR2^{Cre-Del} Mausstamm zu untersuchen, wurden Organe aus der Maus isoliert und die Bindung von GFP wurde *ex vivo* mittels Durchflusszytometrie untersucht (s. Abschnitt 2.2.4.4). Für die Analyse wurden Milz- und Leberzellen aus CIR2^{flox/flox} und aus CIR2^{Cre-Del} Mäusen verwendet. Isolierte Milz- und Leberzellen wurden mit 1 µg/ml GFP versetzt und für 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Proben einmal mit FACS-Puffer gewaschen und mittels Durchflusszytometrie analysiert. In Abbildung 3.25A sind die Ergebnisse der Analyse dargestellt. Bei den grauen Histogrammen handelt es sich um unbehandelte Milz- und Leberzellen. Diese wurden als Kontrolle verwendet. Milz- und Leberzellen, die mit GFP inkubiert wurden, sind als grün gestrichelte Histogramme dargestellt. Zusätzlich wurden Ba/F3-gp130-CIR2 Zellen mit 1 µg/ml GFP für 30 min bei 37°C inkubiert und analysiert. Diese wurden als Positivkontrolle verwendet, für die Bindung von GFP an CIR2 exprimierende Zellen. Hierbei wurde, wie in den vorherigen Experimenten (Abschnitt 3.3.3, Abbildung 3.17A), eine Bindung von GFP an Ba/F3-gp130-CIR2 Zellen nachgewiesen. An Milz- und Leberzellen der CIR2^{flox/flox} Mäuse wurde keine Bindung von GFP detektiert. Dies war zu erwarten, da erst nach Cre-vermittelter Rekombination die CIR2-Expression aktiviert werden sollte. Allerdings wurde auch an den isolierten Milz- und Leberzellen der CIR2^{Cre-Del} Mäuse keine Bindung von GFP festgestellt. Aufgrund der nicht detektierbaren Bindung von GFP an Leber- und Milzzellen wurde untersucht, ob eine Expression des CIR2 in CIR2^{Cre-Del} Mäusen vorlag. Dies erfolgte über die Detektion des Myc-Tags des CIR2 mittels Western Blot. Für dieses Analyse wurden Herz, Lunge, Leber und Nieren isoliert und Zelllysate erstellt (s. Abschnitt 2.2.4.4). Als Positivkontrolle, für die Detektion des CIR2 über den Myc-Tag, wurden Zelllysate von Ba/F3-gp130-CIR2 Zellen verwendet. Als Negativkontrolle wurden Lysate von CIR2^{flox/flox} Mäusen untersucht, bei denen keine Expression des CIR2 vorliegen sollte. Wie in Abbildung 3.25B dargestellt, wurde in der Positivkontrolle eine ~24 kDa Bande des CIR2 detektiert. In den untersuchten Organen der CIR2^{flox/flox} Mäuse wurde, wie erwartet, keine Expression des CIR2 nachgewiesen, allerdings auch nicht in den Organen der CIR2^{Cre-Del} Mäuse. Diese Ergebnisse deuten somit darauf hin, dass die in den CIR2^{Cre-Del} Mäusen vermittelte Aktivierung der CIR2-Expression nicht erfolgreich verlief. Eine Bindung von GFP an isolierte Milz- und Leberzellen des CIR2^{Cre-Del} Mausstammes, sowie die Expression des CIR2 in verschiedenen Organen, konnte nicht nachgewiesen werden.

Ergebnisse

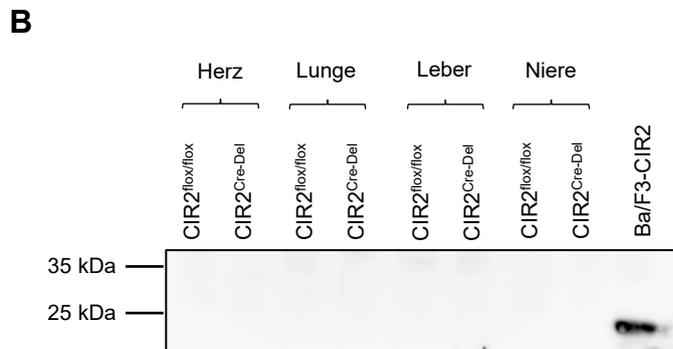
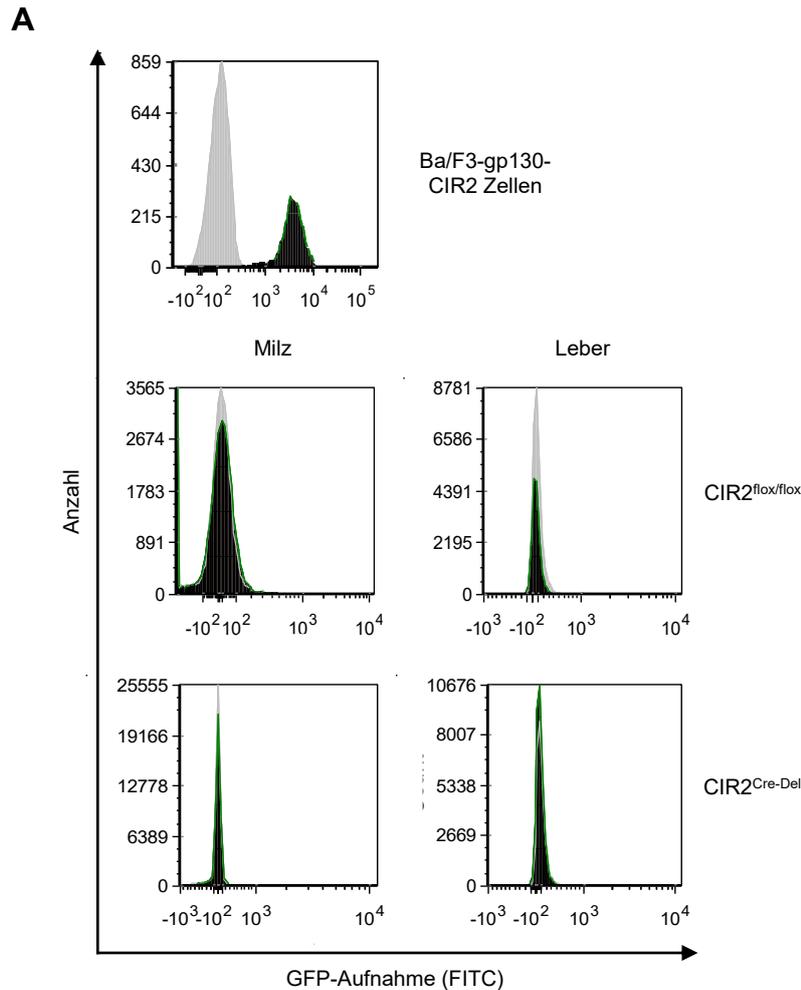


Abbildung 3.25: Analyse der GFP-Bindung und CIR2-Expression in isolierten Organen aus CIR2^{Cre-Del} Mäusen mittels Durchflusszytometrie und Western Blot. (A) Milz- und Leberzellen wurden, wie in Abschnitt 2.2.4.4 beschrieben, aus CIR2^{flox/flox} und CIR2^{Cre-Del} Mäusen isoliert und anschließend mit 1 µg/ml GFP für 30 min bei 37°C inkubiert. Als Positivkontrolle wurden Ba/F3-gp130-CIR2 Zellen verwendet. Die GFP-Bindung wurde mittels Durchflusszytometrie analysiert. Dargestellt ist ein repräsentatives Histogramm von vier untersuchten CIR2^{flox/flox} und CIR2^{Cre-Del} Mäusen. **(B)** Aus CIR2^{flox/flox} und CIR2^{Cre-Del} Mäusen wurden, wie in Abschnitt 2.2.4.4 beschrieben, Herz, Lunge, Leber und Nieren isoliert und Zelllysate erstellt. Zelllysate von Ba/F3-gp130-CIR2 Zellen wurden als Positivkontrolle eingesetzt. Von jedem Lysat wurden 50 µg Gesamtprotein aufgetragen und mittels Western Blot auf die Expression des CIR2 untersucht. Dies erfolgte über die Detektion des Myc-Tags des CIR2. Dargestellt ist ein repräsentativer Western Blot von vier untersuchten CIR2^{flox/flox} und CIR2^{Cre-Del} Mäusen.

4. Diskussion

4.1 Die Mengen an natürlich gebildeten IL-6/sIL-6R Komplexen sind deutlicher geringer als die berechneten Mengen

IL-6 kann über zwei Formen des IL-6R eine Signaltransduktion in Zellen induzieren. Der klassische Signalweg wird über den membranständigen IL-6R aktiviert und steuert anti-inflammatorische Prozesse. Diese Form der Signalweiterleitung ist nur auf eine geringe Anzahl an Zelltypen beschränkt, wie z.B. Makrophagen, Neutrophile, B-Zellen, T-Zell-Subpopulationen und Hepatozyten. Bei dem Trans-Signalweg bindet IL-6 an die lösliche Form des IL-6R (sIL-6R). Über diesen Proteinkomplex werden vor allem pro-inflammatorische Prozesse gefördert. Da der signaltransduzierende Rezeptor gp130 ubiquitär exprimiert wird, erhöht der IL-6/sIL-6R Komplex somit die Anzahl an Zielzellen, die über IL-6 stimuliert werden können (Scheller *et al.* 2011b). In gesunden Menschen liegt IL-6 in kaum detektierbaren Mengen vor (1-10 pg/ml) und der sIL-6R in Konzentrationen von 30-75 ng/ml. Unter Entzündungsbedingungen kann sich die Menge an IL-6 deutlich erhöhen, bis hin zu hohen ng/ml Bereichen, und die Menge vom sIL-6R um einen Faktor von 2-3 ansteigen (Honda *et al.* 1992; Akira *et al.* 1993; Scambia *et al.* 1994; Mitsuyama *et al.* 1995; Montero-Julian 2001). Dieses führt zu einer verstärkten Aktivierung des Trans-Signalweges. Dieser ist unter pathophysiologischen Bedingungen an der Entstehung von chronisch-entzündlichen und Autoimmunerkrankungen beteiligt, wie z.B. Rheumatoider Arthritis, Morbus Crohn, sowie die Förderung der Tumorgenese in entzündlichen Krebserkrankungen (Heikkila *et al.* 2008; Chalaris *et al.* 2011). In einer Studie von De Benedetti *et al.*, konnte das Vorhandensein von IL-6/sIL-6R Komplexen in Patienten mit Rheumatoider Arthritis im Serum, sowie in der Synovialflüssigkeit, gezeigt werden (De Benedetti *et al.* 1994). Allerdings war es zu dem damaligen Zeitpunkt nicht möglich, quantitativ zu bestimmen, wie viel IL-6/sIL-6R Komplex vorlag. Für das molekulare Verständnis über die Entstehung und den Verlauf von IL-6-assoziierten Erkrankungen über den Trans-Signalweg ist es daher wichtig in Erfahrung zu bringen, welche Mengen an IL-6/sIL-6R Komplexen unter bestimmten IL-6 und sIL-6R Konzentrationen vorliegen.

Dieses wurde im Rahmen dieser Arbeit zum ersten Mal experimentell untersucht. Hierfür wurde ein ELISA verwendet, der spezifisch den IL-6/sIL-6R Komplex detektiert und keine Affinität zu IL-6 oder dem sIL-6R aufweist (Abschnitt 3.2). Für die initiale Untersuchung wurden physiologisch vorkommende Konzentrationen an rekombinantem IL-6 und sIL-6R verwendet, um Entzündungsbedingungen zu simulieren, bei denen geringe bis sehr hohe IL-6 Konzentrationen im Menschen beschrieben wurden (Waage *et al.* 1989a; Nowell *et al.* 2003). Dabei konnte gezeigt werden, dass bei niedrigen bis sehr hohen IL-6 Konzentrationen (1-1000

ng/ml), im Verhältnis zur vorhandenen Menge an IL-6 und sIL-6R, nur sehr geringe Mengen an Komplexen vorhanden waren (Abschnitt 3.1.5). Um zu untersuchen, ob diese Komplexmengen auch im Menschen physiologisch vorliegen könnten, sollte ein möglichst natürliches Reaktionsumfeld geschaffen werden. Die gebildete Menge an Komplexen wurde hierzu in humanem Serum untersucht, in dem sIL-6R endogen vorliegt. Dem Serum wurde rekombinantes IL-6 hinzutitriert, um Entzündungsbedingungen zu simulieren. Auch hierbei wurde festgestellt, dass nur geringe Mengen an IL-6/sIL-6R Komplexen nachzuweisen waren (Abschnitt 3.1.6). Basierend auf früheren Studien wurde vermutet, dass während Entzündungen mit IL-6 Konzentrationen von 1-10 ng/ml und physiologischen Mengen an sIL-6R (50 ng/ml), umgerechnet 60-65% des IL-6 gebunden im Komplex vorliegen sollten. Im Gegenzug sollten bei sehr hohen IL-6 Konzentrationen (200-1000 ng/ml) ~95-99% aller sIL-6R Moleküle gebunden im Komplex sein (Abschnitt 3.1.7). Diese Vermutung beruht auf der Berechnung der Komplexmengen, mit einer zuvor beschriebenen Affinität von 0,5-0,8 nM von IL-6 zum sIL-6R (Zohlnhöfer *et al.* 1992; Gaillard *et al.* 1999). Dieses würde bedeuten, dass vor allem der Trans-Signalweg induziert wird und nur zu einem geringeren Anteil der klassische Signalweg. Die Berechnung der IL-6/sIL-6R Komplexmengen ist natürlich abhängig von der vorhandenen Affinität beider Proteine. Die erwähnten geringen K_D -Werte konnten jedoch in keiner weiteren Studien reproduziert werden und in neueren Studien wurde eine K_D zwischen 14-34 nM beschrieben (Adams *et al.* 2017). In dieser Arbeit wurde eine K_D von 22 nM für die Komplexbildung bestimmt (Abschnitt 3.1.3). Dies weist eine gute Übereinstimmung zu den von Adams *et al.*, publizierten Werten auf. Basierend auf diesem K_D -Wert sollte bei 10 ng/ml IL-6 und 50 ng/ml sIL-6R ~4% des IL-6 gebunden in Komplexen sein und zwischen 1-1,7% an in Komplexen gebundenem IL-6 wurde gemessen (rekombinanter und endogener sIL-6R). Interessanterweise sollte anhand der Berechnung, bei sehr hohen IL-6 Konzentrationen (1000 ng/ml), bis zu 65% des sIL-6R gebunden in Komplexen vorliegen, aber maximal wurden 15% bestimmt (Abschnitt 3.1.7). Die geringe Menge an IL-6/sIL-6R Komplexen kann allerdings nicht auf die Qualität der verwendeten Proteine zurückgeführt werden. In der Stimulation von Ba/F3-gp130-IL-6R Zellen zeigte sich, dass das rekombinante IL-6 eine exzellente biologische Aktivität besaß, in dem es eine halbmaximale Proliferation der Zellen bei 8,4 pM IL-6 (0,2 ng/ml) induzierte (Abschnitt 3.1.3). Dies ist in guter Übereinstimmung zu der publizierten Affinität von 10 pM vom membranständigen IL-6/IL-6R Komplex zum membranständigen gp130 (Hibi *et al.* 1990). Im Vergleich zu den berechneten Komplexmengen kann somit geschlussfolgert werden, dass die natürliche Bildung des IL-6/sIL-6R Komplexes deutlich geringer ausfällt, als bis bisher angenommen. Dies bedeutet auch, dass im Gegensatz zu früheren Vermutungen, weniger IL-6 im Komplex gebunden vorliegt und somit mehr freies IL-6 vorhanden ist, um über den klassischen Signalweg anti-inflammatorische Prozesse zu induzieren (Scheller *et al.* 2011b). In anderen Studien mit

Ba/F3-gp130 Zellen konnte auch gezeigt werden, dass über die Zugabe von IL-6 und sIL-6R, die Zellproliferation um den Faktor 100-1000 schwächer induziert wird und eine geringere Phosphorylierung von STAT3 stattfindet, als mit HIL-6 (Fischer *et al.* 1997). Dieses wird durch die Beobachtung in dieser Arbeit bestätigt, da nur geringe Mengen an IL-6/sIL-6R Komplexen vorliegen, um physiologischen Effekte zu induzieren. Um dies weiter zu bestätigen kann nun zukünftig das Serum von Probanden mit Entzündungskrankheiten untersucht werden, bei denen erhöhte Mengen an IL-6 vorliegen. Anhand dessen könnte festgestellt werden, zu welchen Mengen IL-6/sIL-6R Komplexe unter inflammatorischen Bedingungen bei bestimmten Erkrankungen im Organismus vorliegen.

In weiterführenden Untersuchungen aus der Arbeitsgruppe wurde zusätzlich festgestellt, dass durch die Kombination von IL-6 und sIL-6R über den Trans-Signalweg eine halbmaximale Proliferation von Ba/F3-gp130 Zellen bei 126 pM IL-6 (3 ng/ml) und 194 pM sIL-6R (10 ng/ml) vorlag (Baran *et al.* 2018). Ba/F3-gp130-IL-6R Zellen wurden zur Untersuchung des klassischen Signalweges genutzt und bei diesen wurde eine halbmaximale Proliferation bei 8,4 pM IL-6 (0,2 ng/ml) nachgewiesen. Dies bedeutet, dass der klassische Signalweg bedeutend effizienter aktiviert wird, als der Trans-Signalweg, obwohl IL-6 die gleiche Affinität zum membranständigen und zum löslichen IL-6R hat (Müller-Newen *et al.* 1996). Der entscheidende Faktor für die IL-6-induzierte Signalweiterleitung ist allerdings gp130, welches eine 100-200fach höhere Affinität zum IL-6/IL-6R Komplex hat (membranständig und löslich), als IL-6 zum sIL-6R (Hibi *et al.* 1990; Zohlnhöfer *et al.* 1992; Adams *et al.* 2017). Basierend auf der Affinität von IL-6 zum IL-6R müsste somit auch eine schwächere Aktivierung des klassischen Signalweges erfolgen, da IL-6 nach der Bindung an den IL-6R wieder davon abdissoziieren könnte, bevor eine Interaktion mit zwei gp130 Rezeptoren stattfindet. Bezüglich gp130 wurde gezeigt, dass es auf der Zelloberfläche als präformierter Komplex vorliegt (Tenhumberg *et al.* 2006). Daten aus der Arbeitsgruppe deuten des Weiteren darauf hin, dass auch der IL-6R in diesen präformierten Komplex vorhanden ist, was in zukünftigen Experimenten untersucht werden soll. Daher kann angenommen werden, dass beim klassischen Signalweg, nach der initialen Bindung von IL-6 an den IL-6R, eine hohe Affinitätsbindung an präformierte gp130 Komplexe erfolgt und der membranständige IL-6/IL-6R Komplex direkt von zwei gp130 Molekülen gebunden wird. Dies würde bedeuten, dass die zwei Bindungsschritte gleichzeitig erfolgen und der Bindungsvorgang zusammengefasst einem Ein-Bindungsschritt-Modell entspricht (Abbildung 4.1). In Bezug auf den Trans-Signalweg muss allerdings ein Zwei-Bindungsschritt-Modell angenommen werden. Hierbei erfolgt im ersten Schritt eine niedrige Affinitätsbindung von IL-6 an den sIL-6R, zur Bildung des IL-6/sIL-6R Komplexes. Dieser kann jedoch wieder voneinander abdissoziieren und erst über einen zweiten Schritt, über die Bindung an membranständiges gp130, stabilisiert werden. Dies führt zur Aktivierung des Trans-Signalweges. Somit limitiert die niedrige Affinität

des ersten Schrittes die Rate der Signalweiterleitung über den Trans-Signalweg (Abbildung 4.1). Dies würde auch zusätzlich erklären, warum der Trans-Signalweg zu einem geringeren Ausmaß aktiviert wird, als der klassische Signalweg. Des Weiteren wird vermutet, dass hohe IL-6 Konzentrationen zur Bildung eines hexameren IL-6₂/sIL-6R₂/gp130₂ Komplexes führen, der eine antagonistische Wirkung auf die Aktivierung des Trans-Signalweg haben könnte, was eine zusätzliche Limitierung darstellen würde (Schroers *et al.* 2005).

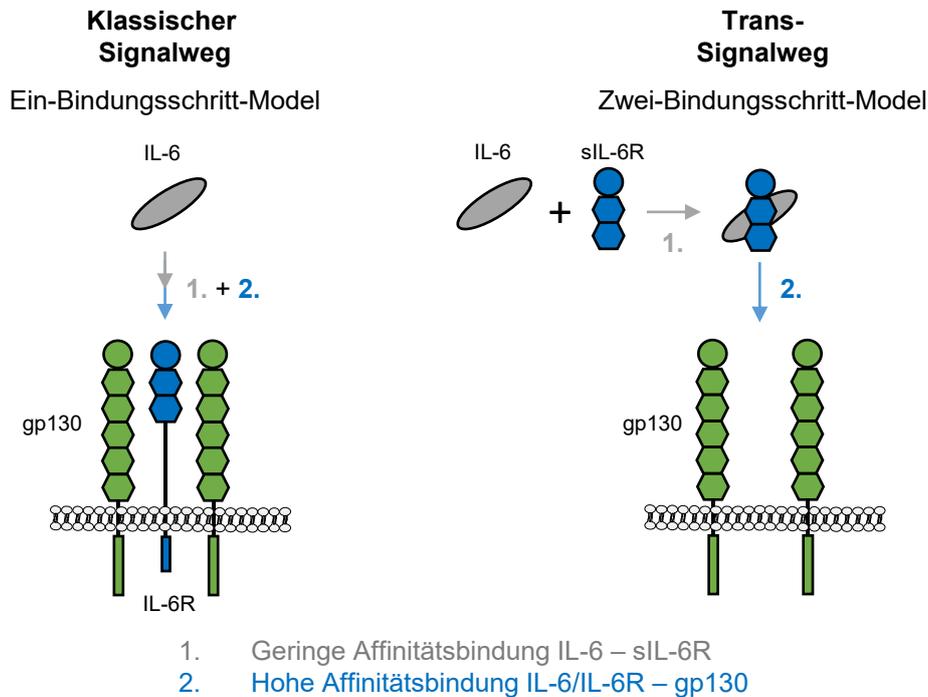


Abbildung 4.1: Hypothese zum Bindungsschritt-Modell von IL-6 für die Aktivierung des klassischen und des Trans-Signalweges. Über den klassischen Signalweg erfolgt die Aktivierung von gp130 durch IL-6 vermutlich in einem Bindungsschritt. Die geringe 1. Affinitätsbindung von IL-6 an den IL-6R geht ineinander über mit der hohen Affinitätsbindung an präformierte gp130 Moleküle, wodurch direkt ein signaltransduzierender IL-6/IL-6R/gp130 Komplex entsteht, bevor IL-6 vom IL-6R abdissoziieren kann. Die Aktivierungsrate des klassischen Signalweges ist somit limitiert aufgrund der Anzahl an IL-6R Molekülen auf der Zelloberfläche. Die Aktivierung des Trans-Signalweges erfolgt über zwei Bindungsschritte und ist limitiert aufgrund der geringen Affinität von IL-6 an den sIL-6R. Zusätzlich kann der IL-6/sIL-6R Komplex wieder voneinander abdissoziieren, bevor eine Interaktion mit gp130 stattfindet, wodurch die Rate der Trans-Signalweg-Aktivierung zusätzlich limitiert wird. Erst über die hohe Affinitätsbindung des IL-6/sIL-6R Komplexes an gp130 kann der Trans-Signalweg aktiviert werden. Weiter Erläuterungen sind in Abschnitt 4.1 beschrieben.

Andere Studien zeigen allerdings auch, dass sich die Qualität der IL-6-induzierten Signalweiterleitung zwischen dem klassischen und Trans-Signalweg unterscheidet. So verläuft die Internalisierung von IL-6/sIL-6R Komplexen, nach Bindung an gp130, deutlich langsamer, als von IL-6 das an den membranständigen IL-6R bindet. Dies führt zu einer längeren Stimulationszeit von Zellen, über den IL-6/sIL-6R Komplex, als mit IL-6 über den klassischen Signalweg (Peters *et al.* 2000). Des Weiteren ist bekannt, dass z.B. Hepatozyten eine ca. 10fach höhere Menge an gp130 auf der Zelloberfläche exprimieren als den membranständigen IL-6R (Rose-John *et al.* 1990). Somit ist die Signaltransduktion über den klassischen Signalweg aufgrund der Anzahl an membranständigen IL-6 Rezeptoren limitiert, wodurch nur eine geringe Menge an gp130 Rezeptoren eine Signalweiterleitung in die Zelle

induzieren kann. IL-6/sIL-6R Komplexe können wiederum zu einer Aktivierung von aller gp130 Moleküle führen, einhergehend mit einer stärkeren Signalweiterleitung in die Zelle (Rose-John 2017). Dieses erklärt auch, warum bereits geringe Mengen an IL-6/sIL-6R Komplexen ausreichen würden, um eine Induktion von pro-inflammatorische Prozessen im Organismus zu induzieren.

4.2 Stabilisierung von IL-6/sIL-6R Komplexen durch den Nanobody VHH6 führt zu einer höheren Menge an Komplexen

Um auszuschließen, dass das verwendete IL-6 und sIL-6R zu gewissen Anteilen inaktiv und somit nicht mehr in der Lage war, einen Komplex zu bilden, wurden Untersuchungen mit dem Nanobody VHH6 durchgeführt, welcher einen stabilisierenden Effekt auf IL-6/sIL-6R Komplexe hat (Adams *et al.* 2017). Hierbei wurde ersichtlich, dass selbst bei niedrigen IL-6 Konzentrationen (0,1-1 ng/ml) IL-6/sIL-6R Komplexe nachgewiesen wurden, wohingegen ohne VHH6 keine Detektion im ELISA möglich war. Des Weiteren lagen alle IL-6 Moleküle gebunden im Komplex vor, da durch den VHH6 die Dissoziation des IL-6 vom sIL-6R stark reduziert wird (Abschnitt 3.1.9). Anhand der Experimente mit dem endogenen sIL-6R konnte gezeigt werden, dass nach Verdünnung des im Serum enthaltenden endogenen sIL-6R in fast jeder Kondition sämtliche sIL-6R Moleküle gebunden im Komplex vorlagen. Interessanterweise wurde in der Verdünnung mit dem höchstem Serumanteil (5 ng/ml endogener sIL-6R) beobachtet, dass maximal 89% aller sIL-6R Moleküle gebunden im Komplex vorlagen, obwohl ein hoher molarer Überschuss an IL-6 vorlag. Dies deutet darauf hin, dass im humanen Serum Faktoren vorhanden sein könnten, die die Interaktion mit IL-6 blockieren, damit mehr freies IL-6 vorhanden ist, um eine Aktivierung des klassischen Signalweges zu induzieren. In weiterführenden Untersuchungen wurde zusätzlich gezeigt, dass die Stabilisierung des IL-6/sIL-6R Komplexes durch den VHH6 auch zu einer signifikant stärkeren Phosphorylierung von STAT3 in Ba/F3-gp130 Zellen führt, einhergehend mit einer höheren Zellproliferation (Baran *et al.* 2018). In einer Studie aus dem Jahr 2017 wurde auch ein physiologisch vorkommendes Protein beschrieben, bei dem vermutet wird, dass es einen stabilisierenden Effekt auf den IL-6/sIL-6R Komplex hat (Larsen & Petersen 2017). Dabei handelt es sich um die lösliche Form des Rezeptors SorLA (sSorLA), die über Ektodomänen-Shedding durch die Matrixmetalloprotease ADAM17 generiert wird (Hermey *et al.* 2006). *In vitro* Studien belegen, dass sSorLA an IL-6 bindet, die Komplexbildung mit sIL-6R nicht beeinträchtigt und vermutlich auch direkt an den IL-6/sIL-6R Komplex binden kann. Anhand der Stimulation von Ba/F3-gp130 Zellen mit IL-6, welches mit sSorLA vorinkubiert wurde, und sIL-6R konnte unter anderem gezeigt werden, dass eine dreifach stärkere Phosphorylierung von STAT3 über den Trans-Signalweg vorhanden war, als in Stimulationen ohne sSorLA.

Daher wird vermutet, dass sSorLA im physiologischen Rahmen einen stabilisierenden Effekt auf IL-6 und den IL-6/sIL-6R Komplex hat, indem es als Trägerprotein dient und über die Bindung die Degradation verzögert, wodurch die Serumhalbwertszeit erhöht wird (Larsen & Petersen 2017). Somit kann auch im physiologischen Rahmen ein Faktor vorhanden sein, der den IL-6/sIL-6R Komplex stabilisiert und zu einer höheren Menge an Komplexen führt. Interessanterweise erfolgt unter pathophysiologischen Bedingungen die Aktivierung von ADAM17, wodurch das Shedding des membranständigen IL-6R und SorLA verstärkt induziert wird (Müllberg *et al.* 1994; Hermey *et al.* 2006; Scheller *et al.* 2011a). Vor allem während Entzündungsprozessen könnte somit eine erhöhte Stabilisierung des IL-6/sIL-6R Komplexes durch sSorLA stattfinden, was zusätzlich die Aktivierung des Trans-Signalweges fördern würde.

4.3 Pufferkapazität von endogenem sIL-6R und sgp130 zu IL-6 ist geringer als bisher vermutet

Anhand von früheren Studien wurde vermutet, dass sIL-6R und sgp130 ein Puffersystem für IL-6 bilden, damit auf der einen Seite die Serumhalbwertszeit von IL-6 erhöht und auf der anderen Seite der Trans-Signalweg inhibiert wird (Peters *et al.* 1996; Rose-John 2017). Diese Hypothese beruhte auf einem K_D Wert von ~ 1 nM von IL-6 zum sIL-6R und 10 pM vom IL-6/sIL-6R Komplex zu sgp130. Deswegen wird vermutet, dass dieses Puffersystem IL-6 Konzentrationen von bis zu 100-150 ng/ml neutralisieren könnte (Garbers *et al.* 2015). Während Infektionen und Entzündungen bleibt die Menge an sgp130 im Blut nahezu gleich, allerdings kann sich die sIL-6R Konzentrationen soweit erhöhen, dass mehr sIL-6R Moleküle vorhanden sind, als sgp130 Moleküle. Erst unter diesen Bedingungen sollte laut dieser Hypothese eine Stimulation von Zellen über den Trans-Signalweg möglich sein (Rose-John 2017).

Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde untersucht, zu welchen Anteilen sgp130 bzw. sgp130Fc an IL-6/sIL-6R Komplexe binden kann. Der IL-6/sIL-6R Komplex-ELISA von R&D Systems ist nicht in der Lage, IL-6/sIL-6R Komplexe zu detektieren, wenn sgp130 bzw. sgp130Fc an diese gebunden hat (Abschnitt 3.1.8). Daher konnten in dieser Arbeit Rückschlüsse darauf gezogen werden, zu welchen Anteilen endogenes sgp130 an IL-6/sIL-6R Komplexe bindet und somit wie stark dessen Pufferkapazität ist. Um einen Vergleich zwischen endogenem und rekombinantem sgp130Fc vorzunehmen, muss beachtet werden, dass rekombinantes sgp130Fc eine 10fach höhere Affinität zum IL-6/sIL-6R Komplex aufweist, als endogenes sgp130 (Jostock *et al.* 2001). Bei sgp130Fc Konzentrationen von 10-40 ng/ml, dies entspricht aufgrund der molekularen Affinitätsunterschiede an 100-400 ng/ml an endogenem sgp130, war die Detektion von IL-6/sIL-6R Komplexen zwischen 14-23% reduziert. Um die Bindungsstärke von endogenem sgp130 an IL-6/sIL-6R Komplexe zu

untersuchen, wurde dieses aus dem humanen Serum zu 98% isoliert und ein Vergleich mit sgp130-enthaltenem Serum durchgeführt. Interessanterweise wurde bei IL-6 Konzentrationen von 50 oder 100 ng/ml kein Unterschied in der Menge an IL-6/sIL-6R Komplexen festgestellt. Erst bei hohen IL-6 Konzentrationen (200 oder 1000 ng/ml) wurden 17% bzw. 21% mehr Komplexe im sgp130-depletierten Serum detektiert (Abschnitt 3.1.8). Dies deutete darauf hin, dass endogenes sgp130 nur zu einem geringen Anteil an IL-6/sIL-6R Komplexe bindet und somit die Pufferkapazität vom sIL-6R und sgp130 nicht der vermuteten Kapazität entspricht. Zusätzlich kann angenommen werden, dass dieses Puffersystem nur bei hohen IL-6 Mengen eine physiologisch relevante Wirkung aufweist. Solche hohen IL-6 Konzentrationen liegen im Menschen allerdings nur unter extremen Entzündungsbedingungen vor (Waage *et al.* 1989a). Allerdings könnten lokale IL-6 Konzentrationen bei Entzündungsherden diesen Werten entsprechen. Somit würde dieses Puffersystem lokal zu einer Reduzierung der Trans-Signalwegaktivierung führen und hätte somit keinen starken Einfluss auf den gesamten Organismus. Allerdings beziehen sich die im Rahmen dieser Arbeit ermittelten Werte auf systemische sIL-6R (~40 ng/ml) und sgp130 (~390 ng/ml) Konzentrationen. Während Entzündungen können diese Konzentrationen lokal in den entzündeten Bereichen allerdings ansteigen. Dies erfolgt unter anderem durch Neutrophile Granulozyten, welche große Mengen an sIL-6R während der Apoptose generieren (Chalaris *et al.* 2007). Membranständiges gp130 kann auch über die proteolytische Spaltung von der Zellmembran entfernt werden, so dass vermehrt sgp130 in lokalen Entzündungen vorhanden sein kann (Müllberg *et al.* 1993a; Wolf *et al.* 2016). Anhand von Studien mit humanen mononukleären Zellen des peripheren Blutes, konnte belegt werden, dass diese nach der Stimulation mit LPS eine erhöhte Mengen an membranständigem gp130, als auch sgp130 vorhanden ist (Memoli *et al.* 2005). Dies könnte zu einer verstärkten Pufferwirkung des sIL-6R und sgp130 gegenüber IL-6 führen. Eine vollständige physiologische Inhibierung von IL-6 wäre für den Organismus nicht förderlich, da über den Trans-Signalweg auch die Auflösung von Entzündungsprozessen gesteuert wird. Dies wäre nicht möglich, wenn endogenes sgp130 sehr effizient an IL-6/sIL-6R Komplexe binden würde. So werden z.B. Endothelzellen über den IL-6/sIL-6R Komplex stimuliert, was zur Produktion des Chemokines MCP1 führt. Folglich kommt es zur Einwanderung von mononukleären Zellen zum Ort der Entzündung. Dies ist ein wichtiger Schritt für die Auflösung von Entzündungen und wird über den sIL-6R gesteuert (Rabe *et al.* 2008; Scheller *et al.* 2011b). Wenn die Pufferwirkung von sIL-6R und sgp130 der vermuteten entsprechen würde, dürfte dieser Prozess somit gar nicht stattfinden. Allerdings ist auch beschrieben, dass die Menge an vorhandenem sIL-6R essentiell für die antagonistische Wirkung von sgp130 ist (Müllberg *et al.* 1993a). In *in vitro* Studien mit rekombinantem sgp130Fc konnte gezeigt werden, dass dieses den IL-6-induzierten klassischen und auch den Trans-Signalweg inhibieren kann, wenn ein hoher molarer Überschuss vom sIL-6R zum IL-6 vorhanden ist

(Garbers *et al.* 2011a). Bis zum heutigen Zeitpunkt wurde jedoch noch nicht beschrieben, zu welchen Anteilen sIL-6R an IL-6 binden kann. Für diese Untersuchung wurde in dieser Arbeit die Bindekapazität vom sIL-6R an IL-6 bestimmt (Abschnitt 3.2). Hierzu wurde sgp130Fc verwendet, um IL-6/sIL-6R Komplexe in IL-6/sIL-6R/sgp130Fc Komplexen zu stabilisieren, um die Dissoziation des sIL-6R von IL-6 zu blockieren. Interessanterweise wurde dabei beobachtet, dass bis zu 90% des rekombinanten sIL-6R im Komplex vorlagen, aus unbekanntem Gründen allerdings nur 70% des endogenen sIL-6R in humanem Serum (Abschnitt 3.2.1 und 3.2.2). Auch über die Stabilisierung des IL-6/sIL-6R Komplexes durch den Nanobody VHH6 oder über einen 260fachen molaren Überschuss an IL-6, sowie einen ~60fachen molaren Überschuss an sgp130Fc, lagen nicht mehr als 70% des endogenen sIL-6R gebunden in IL-6/sIL-6R/sgp130Fc Komplexen vor. Diese Daten deuten somit darauf hin, dass die Bindung von IL-6/sIL-6R Komplexen an sgp130Fc im humanen Serum durch andere Faktoren beeinträchtigt werden kann. Wie im vorherigen Abschnitt beschrieben, konnten in Proben mit höherem Serumanteil (5 ng/ml endogener sIL-6R, Abschnitt 3.1.9) maximal 89% aller sIL-6R Moleküle eine Bindung mit IL-6 eingehen und in Proben mit geringerem Serumanteil (0,5-2,5 ng/ml endogener sIL-6R) alle sIL-6R Moleküle. In einer Studie aus dem Jahr 2003 wurde bereits vermutet, dass im humanen Serum von Patienten mit juveniler idiopathischer Arthritis Faktoren vorhanden sein könnten, die die Bindung von gp130 an den IL-6/sIL-6R Komplex blockieren. Dabei konnte auch gezeigt werden, dass je höher der Serumanteil mit endogenem sIL-6R war, desto ineffizienter war die Bindung von IL-6/sIL-6R Komplexen an membranständiges gp130 (Pignatti *et al.* 2003). Dies würde somit darauf hindeuten, dass IL-6/sIL-6R/sgp130Fc Komplexe sich ineffizienter formieren, als bisher angenommen. Die positiven Eigenschaften beider Signalwege würden somit nicht vollständig inhibiert werden, z.B. die Induktion der Akute-Phase-Reaktion während Infektionen über den klassischen Signalweg oder die Regeneration von Hepatozyten über den Trans-Signalweg (Gauldie *et al.* 1987; Peters *et al.* 2000). Bisher konnte gezeigt werden, dass unter pathophysiologischen Bedingungen die Inhibierung des Trans-Signalweges mittels sgp130Fc positive Effekte auf den Verlauf von Krankheiten in präklinischen Modellen aufweist, welche mit dem Trans-Signalweg assoziiert sind. Des Weiteren wird in einer klinischen Studie die Effektivität von sgp130Fc für die Behandlung von Colitis Ulcerosa im Menschen untersucht. In Übereinstimmung mit den Daten dieser Arbeit ist auch die Beobachtung, dass sgp130Fc den Trans-Signalweg unter normalen gesunden physiologischen Bedingungen nicht beeinträchtigt (Rose-John 2017).

4.4 Spezifische Bindung von GFP an CIRs zur zelltypspezifischen Markierung von eukaryotischen Zellen

Für die Untersuchung von verschiedenen Zelltypen in ihrem nativen Umfeld sind nicht-invasive bildgebende Verfahren von großer Nützlichkeit. Eine geeignete Methode zum Nachweis von verschiedenen Zelltypen ist die Magnetresonanztomographie (MRT). Allerdings ist es hiermit alleine nicht möglich, spezifisch bestimmte Zelltypen zu visualisieren. Hierfür werden Kontrastmittel gebraucht, mit denen ein Kontrast zwischen Gewebe und den zu nachweisenden Zelltypen erzeugt wird, um eine präzise anatomische Lokalisierung vorzunehmen (Temme *et al.* 2012). Für die Visualisierung von phagozytierenden Immunzellen, dazu gehören Neutrophile Granulozyten, Monozyten und Makrophagen, werden unter anderem emulgierte Perfluorkarbon-Nanoemulsionspartikel (PFC-NEs) verwendet. Nach intravenöser Applikation in Mäuse werden PFC-NEs von diesen Immunzellen aufgenommen. Hierdurch kann das Migrationsverhalten von phagozytierenden Zellen in Entzündungsbereiche über das Fluorsignal mittels ^{19}F -MRT visualisiert werden. Diese Methode wurde bereits erfolgreich für die Untersuchung von verschiedenen präklinischen Krankheitsmodellen eingesetzt (Ebner *et al.* 2010; Balducci *et al.* 2012; Temme *et al.* 2014). Allerdings ist es mit dieser Methode nicht möglich zwischen einzelnen Immunzelltypen zu unterscheiden. Um das Migrationsverhalten von nicht-phagozytierenden Immunzellen in entzündete Bereiche mittels ^{19}F -MRT zu untersuchen, müssen die entsprechenden Immunzelltypen aus der Maus isoliert, *ex vivo* mit Kontrastmitteln markiert und den Versuchstieren wieder injiziert werden (Bulte *et al.* 1993; Arbab *et al.* 2003; Frank *et al.* 2003). Um eine Aufnahme von Kontrastmitteln in nicht-phagozytierenden Zellen effizienter zu gestalten, werden hierfür *ex vivo* zum Teil Transfektionsreagenzien verwendet, wodurch allerdings die Funktionalität, das Differenzierungspotential, die Viabilität und die Proliferation der Zellen verändert werden kann (Youn & Hong 2012).

Um eine Methode zu etablieren, über das spezifische Targeting von unterschiedlichen Immunzelltypen mittels GFP-gekoppelten PFC-NEs (GFP-PFCs) und der Detektion über MRT direkt möglich ist, wurden im Rahmen dieser Arbeit drei synthetische Cargo-Internalisierungsrezeptoren (CIRs) generiert. Die drei CIRs unterscheiden sich in ihrer Transmembranregion und der intrazellulären Domäne (IZD), welche die Rate der Rezeptorinternalisierung nach GFP-Bindung steuert (Abschnitt 3.3.1). Damit ein spezifisches Targeting von CIR-exprimierenden Zellen möglich ist, besitzen sie einen extrazellulär vorhandenen GFP-Nanobody, der mit einer hohen Affinität spezifisch GFP bindet (Kubala *et al.* 2010). Um die Funktionalität der CIRs zu untersuchen, wurde *in vitro* die Bindung von GFP an Ba/F3-gp130-CIR1-3 Zellen untersucht (Abschnitt 3.3.3). Dabei wurde festgestellt, dass an Ba/F3-gp130 Zellen, welche als Kontrolle verwendet wurden, kein GFP gebunden hat. Im Gegensatz hierzu, erfolgte eine Bindung von GFP und dessen Internalisierung über alle drei

CIRs. Dies wurde vor allem anhand der zeitlichen Bindungskinetik von GFP deutlich, bei der Ba/F3-gp130-CIR1-3 Zellen für bis zu 180 min mit GFP inkubiert wurden (Abschnitt 3.3.3). Durch CIR1 erfolgte die geringste Bindung an GFP und nur eine geringe Zunahme des GFP-Signals in Abhängigkeit zur Inkubationszeit. Dies wurde erwartet, da CIR1 die IZD des humanen IL-6R besitzt, welche keine bekannten Endozytose-assoziierten Proteinmotive beinhaltet und ohne die Interaktion mit gp130 eine sehr langsame Internalisierung aufweist (Dittrich *et al.* 1994). Selbst nach Interaktion von IL-6 an den IL-6R und der anschließenden Komplexbildung mit zwei gp130 Rezeptoren dauert es ~30 min bis 50% aller IL-6R Moleküle von der Zelloberfläche internalisiert werden (Dittrich *et al.* 1996). Die geringe Menge an gebundenem GFP über CIR1 ist zusätzlich zurückzuführen auf eine sehr geringe Oberflächenexpression, wodurch die maximale Menge an GFP, welches an den Rezeptor binden kann, limitiert ist. CIR2 und CIR3 weisen deutlich höhere Zelloberflächenexpressionen auf, einhergehend mit einer deutlich höheren Menge an gebundenem GFP (Abschnitt 3.3.3). So war bereits nach 5 min ein stärkeres GFP-Signal vorhanden, als beim CIR1 nach 180 min. Im direkten Vergleich von allen CIRs, wies CIR2 nach 180 min das größte GFP-Signal auf, was belegt, dass über diesen Rezeptor die höchste Menge an GFP gebunden und aufgenommen wird. Eine effektive Bindung und Aufnahme von GFP war über den CIR2 geplant, da dieser die IZD des Rezeptors Endo180 beinhaltet, ein Mitglied der Mannose-Rezeptor-Familie. In dieser IZD sind zwei Proteinmotive vorhanden, die essentiell für eine schnelle Internalisierung über das endosomale System sind. Dadurch wird innerhalb von 2 min bis zu 60% des Oberflächenrezeptors nach Ligandenbindung in die Zelle internalisiert (Howard & Isacke 2002). CIR3 wies eine schwächere Bindung und Aufnahme von GFP auf, als CIR2. Für die Generierung des CIR3 wurde die IZD des FcγRIIA Rezeptors verwendet, welche keine klassischen Internalisierungsmotive aufweist, jedoch zwei Tyrosinaktivierungsmotive (TAMs), die für eine Internalisierung über Phagozytose wichtig sind (Greenberg *et al.* 1993). Im Rahmen dieser Arbeit ist CIR3 vor allem für die Aufnahme von GFP-gekoppelten Nanopartikeln generiert worden. Dies wird in Abschnitt 4.5 genauer erläutert.

Die Daten dieser Arbeit zeigen, dass diese Methode mit dem GFP/GFP-Nanobody-System, über die CIRs, eine spezifische Liganden-Rezeptor-Interaktion ermöglicht und keine unspezifische Bindung von GFP an Kontrollzellen vorhanden ist. Dies deckt sich mit den von GFP beschriebenen Vorteilen für die Untersuchung von zellulären Prozessen, da nicht bekannt ist, dass GFP an endogene Rezeptoren bindet und den weiteren Vorteil hat, keine zytotoxischen Eigenschaften aufzuweisen (Okabe *et al.* 1997; Fink *et al.* 2010). Um die Funktionalität dieser Methode *in vivo* zu überprüfen, wurde in Kooperation mit dem *Institute of Molecular Genetics of the ASCR* (Prof. Dr. Radislav Sedlacek, Prag, Tschechische Republik) versucht eine *Knock-In* Mauslinie mit dem CIR2 zu generieren (Abschnitt 3.3.7). CIR2 wurde ausgewählt, da in den *in vitro* Untersuchungen dieser die höchste Aufnahme von GFP bzw.

GFP-PFCs und eine hohe Zelloberflächenexpression aufwies. Allerdings konnte in dem Mausstamm CIR2^{Cre-Del}, indem CIR2 ubiquitär exprimiert werden sollte, keine Bindung von GFP an isolierten Milz- und Leberzellen nachgewiesen werden (Abschnitt 3.3.8). Dies ist darauf zurückzuführen, dass allgemein keine Expression des CIR2 vorlag, obwohl auf genomischer Ebene eine Integration der CIR2 cDNA in den *Rosa26* Locus stattgefunden hat und im Vorfeld eine Codon-Optimierung der CIR2 cDNA vorgenommen wurde. Ein möglicher Grund hierfür könnte eine geringe CIR2 mRNA Stabilität sein oder dass es nach der homologen Rekombination und der Exzision des Neomycinresistenzgens ein *Frame-Shift* stattgefunden hat. Dadurch würde das Leseraster des CIR2 so verändert werden, dass kein funktionelles Transkript mehr vorhanden war, um eine Translation von CIR2 zu ermöglichen. Da keine Expression vorhanden war, wurde der Ursache auch nicht weiter nachgegangen. Für die weitere Untersuchung der Funktionalität des CIR2 *in vivo* wird daher eine neue transgene Mauslinie erstellt, bei dem die Expression des CIR2 unter Kontrolle des CD4 Promotors steht. Dies wird in Abschnitt 4.5 genauer beschrieben.

4.5 Bindung und Internalisierung von GFP-gekoppelten Nanopartikeln durch CIRs

Ein wichtiger Aspekt für die Entwicklung der Methode zum Nachweis von spezifischen nicht-phagozytierenden Immunzellen ist die Bindung und Aufnahme von GFP-gekoppelten Nanopartikeln durch die CIRs. Dabei ist zu beachten, dass die zelluläre Aufnahme von Partikeln vor allem über Endozytose- oder Phagozytose-assoziierte Rezeptoren ablaufen kann. Über Phagozytose können Nanopartikel mit einer Größe von $>0,5 \mu\text{m}$ Durchmesser effektiv in die Zelle aufgenommen werden und über Endozytose Partikel mit einer Größe von bis zu $\sim 200 \text{ nm}$ Durchmesser (Rejman *et al.* 2004; Paul *et al.* 2013). Um eine funktionelle Bildgebung mit GFP-PFCs zu ermöglichen, war es daher notwendig zu untersuchen, ob diese durch CIRs in Zellen aufgenommen werden können, da diese einen Durchmesser von 100-120 nm haben (Krafft & Riess 2009; Grapentin *et al.* 2014). Zuerst wurde die Aufnahme von Nanopartikeln mit GFP-gekoppelten Latex-Beads (GFP-LBs) untersucht. Allgemein erfolgte durch die CIRs die stärkste Bindung und Internalisierung von 20 nm und 100 nm GFP-LBs. Mit den $4 \mu\text{m}$ GFP-LBs wurde über alle CIRs eine Bindung und Internalisierung des GFP festgestellt, allerdings wurden die $4 \mu\text{m}$ GFP-LBs nur durch CIR3 in die Zelle internalisiert (Abschnitt 3.3.4). Dies spricht dafür, dass durch CIR3 eine Aufnahme von größeren Partikeln über das Phagozytosesystem erfolgt und durch CIR1 und CIR2 von kleineren Partikeln über Endozytose. Diese Beobachtung wurde bereits bei der Generierung der CIRs erwartet. Für die Aufnahme von Nanopartikeln über Phagozytose wurde die IZD des Fc γ RIIA Rezeptors gewählt. Dieser ist im physiologischen Kontext unter anderem in der Aufnahme von IgG-

opsonisierten Pathogenen über Phagozytose involviert (Arman & Krauel 2015). Die IZD enthält zwei TAMs, die wichtig für die Rekrutierung und Bindung von Signalmolekülen sind, wie z.B. die Syk-Kinase oder des GTP-Bindeproteins Rho. Dabei handelt es sich um wichtige Mediatoren der FcγRIIA-vermittelten Phagozytose (Matsuda *et al.* 1996; Hackam *et al.* 1997; Worth *et al.* 2001). Die IZD des CIR1 weist keine bekannten Proteinmotive auf, die für die Internalisierung des Rezeptors über Endozytose verantwortlich sind, im Gegensatz zur IZD des CIR2 aus dem Rezeptor Endo180. Endo180 bindet im physiologischen Kontext natives oder partiell degradiertes Kollagen, um dieses über Endozytose in die Zelle zu internalisieren (Engelholm *et al.* 2003; Wienke *et al.* 2003). Das gebundene Kollagen wird über Clathrin-umhüllte-Vesikel in endosomale und lysosomale Kompartimente der Zelle transportiert, wo es anschließend über Cysteinproteasen degradiert wird (Kjoller *et al.* 2004). Dies wird vor allem durch zwei Proteinmotive gesteuert (Howard & Isacke 2002). An das Tyrosin-basiertes-Motiv FxNxxY (FEGARY) binden Adapterproteine, z.B. der AP-2 Komplex, über den eine Clathrin-abhängige Internalisierung über Endosomen erfolgt. Zusätzlich ist ein Dihydrophobisches Motiv mit einer sauren Aminosäure ExxxLV (EKNILV) vorhanden, welches essentiell für die Internalisierung und den Transport in frühe Endosomen ist (Pond *et al.* 1995; Heilker *et al.* 1999; Howard & Isacke 2002).

Anschließend wurde die Funktionalität der CIRs für den spezifischen Nachweis von Zellen mittels MRT untersucht. Hierzu wurden GFP-PFCs verwendet. Dabei konnte in CIR-exprimierenden Zellen ein deutliches ¹⁹F-Signal detektiert werden, im Gegensatz zu den Kontrollzellen (Abschnitt 3.3.5). Über diese Methode können vor allem CIR2 und CIR3-exprimierende Zellen effektiv mit GFP-PFCs beladen werden, um eine Visualisierung dieser Zellen über das ¹⁹F-Signal mittels MRT zu ermöglichen. Eine Aufnahme von GFP-PFCs durch CIRs konnte auch in anderen Zelltypen belegt werden, wie in COS-7 und in murinen Ba/F3 Zellen. Dies zeigt, dass die Funktionalität dieser Methode *in vitro* in adhärenenten und auch in Suspensionszellen vorhanden ist (nicht publizierte Experimente von Dr. Sebastian Temme und Pascal Bouvain). Anhand der Kokultivierung von CHO-CIR2 und -CIR3 Zellen mit isolierten murinen Immunzellen konnte auch verdeutlicht werden, dass durch CIRs eine deutlich stärkere Beladung von Zellen mit GFP-PFCs möglich ist, als über die Phagozytose von murinen Immunzellen aus dem Blut (nicht publizierte Experimente von Dr. Sebastian Temme). Dies erfolgt zum einem über die spezifische und hochaffine Bindung von GFP an den GFP-Nanobody (Kubala *et al.* 2010). Zum anderen liegen PEGylierungen auf der PFC-NE-Oberfläche vor. Hierüber ist bekannt, dass die PEGylierung von Nanopartikeln, deren Aufnahme über Phagozytose deutlich beeinträchtigt, vor allem in Monozyten und Makrophagen (Owens & Peppas 2006; Temme *et al.* 2015). Daher wäre für eine *in vivo* Anwendung auch ein deutlich höheres ¹⁹F-Signal in CIR-exprimierenden Zellen zu erwarten, als in phagozytierenden Zellen. Für die Anwendung *in vivo* ist des Weiteren ein wichtiger

Aspekt, dass die Bindung und Aufnahme von GFP-PFCs an die CIRs *in vitro* zu keiner Aktivierung von zellulären Signalwegen führt und es somit zu keiner Veränderung von Zelleigenschaften kommen sollte (Abschnitt 3.3.6). In anderen Targeting-Verfahren über markierte Liganden, welche an endogen vorkommende Rezeptoren binden, ist zum Teil bekannt, dass dies zu einer Aktivierung von Signalwegen führen kann, einhergehend mit einer veränderten Genexpression (Liang *et al.* 2001). Ein weiteres Problem in Bezug auf den Nachweis bestimmter Zelltypen ist, dass Rezeptoren oft nicht zelltypspezifisch exprimiert werden und somit die Aufnahme von funktionalisierten Nanopartikeln oder Liganden zum Teil über andere Zelltypen erfolgt, was die Interpretation der Daten erschwert (Amenta *et al.* 2000; Winnard *et al.* 2007). Das CIR-System könnte somit *in vivo* in Mäusen für die spezifische Detektion von verschiedenen Immunzelltypen verwendet werden, z.B. indem die Expression des CIR2 unter Kontrolle des CD4-Promotors steht. Hierdurch würden nicht-phagozytierende Immunzellen, wie Th1, Th2 und regulatorische T-Zellen den CIR2 exprimieren (Luckheeram *et al.* 2012). Das Migrationsverhalten dieser Immunzelltypen könnte somit spezifisch *in vivo* in verschiedenen Krankheitsmodellen in Mäusen mittels GFP-PFCs und anschließenden ¹⁹F-MRT-Messungen visualisiert werden. Eine weitere Anwendungsmöglichkeit besteht in der zielgerichteten Aufnahme von GFP-gekoppelten Nanopartikeln oder Proteinen. Um den Einfluss von bestimmten Zelltypen in Krankheitsmodellen zu untersuchen, könnten diese z.B. mit GFP-gekoppelten-Toxinen, wie mit der katalytischen Domäne des *Pseudomonas* Exotoxins PE38, spezifisch zu definierten Zeitpunkten ausgeschaltet werden. PE38 inaktiviert den Elongationsfaktor-2 (eEF2) wodurch die ribosomale Proteinsynthese inhibiert wird und dies zur Apoptose der Zelle führt (Siegall *et al.* 1989; Weldon *et al.* 2009). Die Wirksamkeit von PE38-gekoppelten Liganden oder Antikörpern gegen verschiedene Krebsarten konnte bereits in präklinischen Untersuchungen in Mäusen, als auch im Menschen in klinischen Studien gezeigt werden (Weldon & Pastan 2011; Li *et al.* 2017; Lim *et al.* 2017). Darüber hinaus könnte das CIR-System dafür genutzt werden, Zellen mit Wirkstoff-gefüllten GFP-gekoppelten Nanopartikeln zu beladen, z.B. damit der eingeschlossene Wirkstoff erst intrazellulär freigesetzt wird, nachdem diese in die Zelle internalisiert wurden (Mamot *et al.* 2006; Müller & Landfester 2015). Dies hätte den Vorteil, dass Wirkstoffe zielgerichtet zu bestimmten Zelltypen transportiert werden könnten, die CIRs exprimieren. Damit könnten bestimmte intrazelluläre Effekte von Wirkstoffen auf einzelne Zelltypen genauer untersucht werden oder dazu verwendet werden, Zellfunktion spezifisch zu modulieren (Hu *et al.* 2017). Die CIRs sind des Weiteren ein modulares System. Je nach Anwendungsbereich können sie mit unterschiedlichsten intrazellulären Domänen oder Nanobodys versehen werden, um die Internalisierungsrate sowie die Aufnahme von Nanopartikeln mit verschiedensten Durchmessern zu optimieren und je nach wissenschaftlicher Fragestellung anzupassen. Damit

Diskussion

kann ermöglicht werden, dass eine effiziente Beladung von unterschiedlichsten Zelltypen mit Nanopartikeln oder Kontrastmittel erfolgen kann.

5. Zusammenfassung

Das pleiotrope Zytokin IL-6 ist ein wichtiger Mediator der Immunantwort und hat wichtige Funktionen in vielen physiologischen und pathophysiologischen Prozessen. Der klassische Signalweg wird von IL-6 über den membranständigen IL-6R und gp130 aktiviert und steht im Zusammenhang mit regenerativen und anti-inflammatorischen Prozessen. Der IL-6 Trans-Signalweg erfolgt über den löslichen IL-6R, sowie gp130, und reguliert pro-inflammatorische Prozesse in chronisch-entzündlichen und Autoimmunerkrankungen. Im Serum von gesunden Menschen sind kaum detektierbare Mengen an IL-6 vorhanden (1-10 pg/ml), sowie mittlere bis hohe ng/ml Mengen an sIL-6R und sgp130. Bei Entzündungen kann sich die Menge an IL-6 im Serum allerdings drastisch erhöhen, bis in den hohen ng/ml Bereich, und die Menge an sIL-6R kann um den Faktor 2-3 ansteigen. Entzündungs-bedingte Mengen von IL-6 führen zur Bildung von IL-6/sIL-6R Komplexen, einhergehend mit einer verstärkten Aktivierung des Trans-Signalweges. Bis zum heutigen Zeitpunkt war es allerdings nicht möglich, die Menge an IL-6/sIL-6R Komplexen experimentell zu bestimmen und Schätzungen darüber beruhten bisher auf Affinitäts-basierten Berechnungen.

In ersten Teil dieser Arbeit wurde ein neuer ELISA verwendet, der spezifisch den IL-6/sIL-6R Komplex detektiert. Als erstes zeigt die ELISA-gestützte Quantifizierung, dass die Menge an IL-6/sIL-6R Komplexen direkt abhängig zu der vorhandenen Konzentration an IL-6 und sIL-6R ist. Zudem sind die ELISA-ermittelten Mengen von IL-6/sIL-6R Komplexen mit rekombinanten IL-6 und sIL-6R, oder endogenem sIL-6R in humanem Serum, deutlich geringer, als die Mengen der Affinitäts-basierten Berechnungen. Diese Daten zeigen, dass deutlich mehr freies IL-6 vorhanden ist, um den klassischen Signalweg zu induzieren, als bisher erwartet. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass alle IL-6 und in humanem Serum nahezu alle sIL-6R Moleküle im Komplex vorliegen können, über die Stabilisierung mit dem Nanobody VHH6. VHH6 bindet spezifisch an den IL-6/sIL-6R Komplex und nicht an IL-6 oder sIL-6R alleine. Des Weiteren wurde bisher vermutet, dass endogenes sgp130 zusammen mit sIL-6R ein Puffersystem bildet, um eine erhöhte systemische IL-6-induzierte Signalweiterleitung während Entzündungen zu begrenzen. In dieser Arbeit wurde zudem gezeigt, dass endogenes sgp130 auch nur zu einem geringeren Anteil an IL-6/sIL-6R Komplexe bindet, als bisher vermutet. Es kann daher angenommen werden, dass sgp130 nicht dazu in der Lage ist, eine erhöhte systemische IL-6-induzierte Signalweiterleitung während Entzündungen zu inhibieren. Sgp130 bildet daher offenbar nur transiente IL-6/sIL-6R/sgp130 Komplexe, um so die Serumhalbwertszeit von IL-6 zu erhöhen.

Bildgebende Verfahren sind ein wichtiges Hilfsmittel, um die Mechanismen von Entzündungen zu erforschen und die zeitlichen Abläufe von Immunzellinfiltrationen zu untersuchen.

Zusammenfassung

Magnetresonanztomographie (MRT) ist eine geeignete Methode um Entzündungsvorgänge zu analysieren, da es in tiefliegenden Gewebeschichten präzise anatomische Bilder erzeugen kann. Um spezifische Gewebebereiche oder Zellen zu detektieren, sind Kontrastmittel von großer Wichtigkeit. Um präzise Bilder von Zielstrukturen zu erzeugen, werden unter anderem Perfluorkarbon-Nanoemulsionspartikel (PFC-NEs) verwendet. In präklinischen murinen Krankheitsmodellen konnte hiermit die zeitliche Migration von phagozytierenden Immunzellen, wie Monozyten und Makrophagen, sehr detailliert untersucht werden. Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde ein synthetisches Cargo-Internalisierungsrezeptor (CIR)-System generiert, um auch nicht-phagozytierende Immunzellen, wie T-Zellen oder andere Immunzelltypen, spezifisch mittels PFC-NEs zu detektieren. Für diesen Zweck beinhalten alle drei CIRs einen extrazellulär vorhandenen GFP-Nanobody, welcher spezifisch GFP bindet. Des Weiteren besitzen die CIRs verschiedene intrazelluläre Domänen, welche die Internalisierungsrate von GFP bzw. GFP-gekoppelten Nanopartikeln steuern. Eine effiziente Internalisierung von kleineren Nanopartikeln ($< 0,5 \mu\text{M}$) erfolgt über Endozytose (CIR1 und CIR2) und von größeren Nanopartikeln ($> 0,5 \mu\text{M}$) über Phagozytose (CIR3). CIR-exprimierende Zellen können auch mit GFP-PFCs spezifisch mittels MRT detektiert werden. Die Detektion dieser Zellen war über das ^{19}F -Signal sogar deutlich höher, als die Detektion von isolierten murinen phagozytierenden Immunzellen aus dem Blut. Ein weiterer wichtiger Aspekt des GFP/CIR-Systems ist, dass die Bindung von GFP-PFCs zu keiner Aktivierung von intrazellulären Signalwegen führt, wodurch sonst Zelleigenschaften beeinflusst werden könnten. Abschließend wurde untersucht, ob dieses System *in vivo* in transgenen Mäusen funktioniert. Für diesen Zweck sollte CIR2 in transgenen Mäusen exprimiert werden. Allerdings lag keine Expression des CIR2-Proteins in dieser Mauslinie vor. Für weitere Untersuchung dieses Systems *in vivo* wird daher eine weitere transgene Mauslinie erstellt, bei dem die Expression von CIR2 unter Kontrolle des CD4-Promotors steht. Dies soll Untersuchungen zur Verteilung von T-Zellen in Mäusen in entzündlichen Krankheitsmodellen mittels MRT ermöglichen.

6. Summary

The pleiotropic cytokine IL-6 is an important mediator of the immune response and plays a critical role in many physiological and pathophysiological processes. Classic signaling mediated by IL-6 via the membrane-bound IL-6R and gp130 is associated with regenerative and anti-inflammatory processes. IL-6 trans-signaling mediated by IL-6 via the soluble IL-6R and gp130 regulates pro-inflammatory processes in chronic inflammatory and autoimmune diseases. In healthy individuals serum levels of IL-6 are hardly detectable (1-10 ng/ml), sIL-6R and sgp130 are present in the medium to upper ng/ml range, respectively. During inflammation, the serum level of IL-6 can rise dramatically (up to higher ng/ml) and serum levels of sIL-6R can increase 2-3 fold. Inflammatory IL-6 levels result also in the formation of IL-6/sIL-6R complexes, accompanied by an increased activation of the trans-signaling pathway. Until now, it was not possible to experimentally quantify IL-6/sIL-6R complexes, thereby estimations were based on affinity-based calculations.

In the first part of this work, a novel ELISA was used which specifically detect IL-6/sIL-6R complexes. First of all, ELISA-based quantification demonstrates that the amounts of IL-6/sIL-6R complexes are directly dependent on the concentrations of IL-6 and sIL-6R. Importantly, the amounts of IL-6/sIL-6R complexes determined by ELISA with recombinant IL-6 and sIL-6R or endogenous sIL-6R from human serum were much lower as those calculated by affinity-based calculations. These data show that considerably more IL-6 is available to induce classic signaling than expected. Additionally it could be shown that all IL-6 and almost all sIL-6R molecules can be forced into IL-6/sIL-6R-complexes, by stabilization with the nanobody VHH6. VHH6 specifically binds to IL-6/sIL-6R complexes but not to IL-6 or sIL-6R alone. Moreover, it has been suggested that endogenous sgp130 together with sIL-6R forms a buffer system to restrict overshooting systemic IL-6 induced-signaling during inflammation. In this work it is shown that the ability of endogenous sgp130 to bind to IL-6/sIL-6R complexes is also much lower as predicted. This strongly suggests that sgp130 is not able to inhibit overshooting systemic IL-6 signaling during inflammation because it only forms transient IL-6/sIL-6R/sgp130 complexes which might function to prolong the serum half-life of IL-6.

Imaging techniques are important tools to study the mechanisms of inflammation and to investigate the timing of immune cell infiltration. Magnetic resonance imaging (MRI) is a suitable method for analyzing inflammatory processes because it can produce precise anatomical images in deep tissue layers. For this reason, contrast agents are of great importance for the detection of specific tissues or cells. To produce precise images of target structures, perfluorocarbon-nanoemulsions (PFC-NEs) are used. In preclinical murine inflammatory disease models the timing of phagocytic immune cell migration, like monocytes

Summary

and macrophages, has been investigated in great detail by this method. In the second part of this work, a synthetic Cargo-Internalization-Receptor (CIR)-system was generated in order to detect non-phagocytic immune cells, like T-cells and other types of immune cells, by PFC-NEs. For this purpose three synthetic CIRs contain an extracellular GFP-nanobody that specifically binds to GFP. Furthermore the CIRs have different intracellular domains which regulate the rates of internalization of GFP or GFP-coupled nanoparticles. An efficient internalization of smaller nanoparticles ($< 0.5 \mu\text{M}$) is carried out by endocytosis (CIR1 and CIR2) and of larger nanoparticles ($> 0.5 \mu\text{M}$) by phagocytosis (CIR3). CIR-expressing cells could also be detected specifically with GFP-PFCs by MRI. The detection of these cells by ^{19}F -signal was actually significantly higher than the detection of murine phagocytic cells isolated from blood. Another important aspect of the GFP/CIR-system is that the binding of GFP-PFCs did not lead to an activation of intracellular signaling pathways, which could otherwise affect cell properties. Finally it was investigated whether this systems functions *in vivo* in transgenic mice. For this purpose CIR2 should be expressed in transgenic mice. However there was no expression of the CIR2-protein in this mouse line. For further investigations of this system *in vivo* another transgenic mouse line will be generated, in which the expression of the CIR2 is under the control of the CD4-promotor. This will allow the investigation of T-cell distribution in mice in inflammatory disease models through MRI.

7. Literaturverzeichnis

- Adams, R., R. Burnley, C. Valenzano, O. Qureshi, C. Doyle, S. Lumb, M. Del Carmen Lopez, R. Griffin, D. McMillan, R. Taylor, C. Meier, P. Mori, L. Griffin, U. Wernery, J. Kinne, S. Rapecki, T. Baker, A. Lawson, M. Wright and A. Ettore (2017). "Discovery of a junctional epitope antibody that stabilizes IL-6 and gp80 protein:protein interaction and modulates its downstream signaling." Sci Rep **7**: 37716.
- Ahrens, E. T. and J. W. Bulte (2013a). "Tracking immune cells in vivo using magnetic resonance imaging." Nat Rev Immunol **13**(10): 755-763.
- Ahrens, E. T. and J. W. M. Bulte (2013b). "Tracking immune cells in vivo using magnetic resonance imaging." Nature Reviews Immunology **13**(10): 755-763.
- Ahrens, E. T. and J. Zhong (2013). "In vivo MRI cell tracking using perfluorocarbon probes and fluorine-19 detection." Nmr in Biomedicine **26**(7): 860-871.
- Akira, S., T. Taga and T. Kishimoto (1993). "Interleukin-6 in biology and medicine." Adv Immunol **54**: 1-78.
- Amenta, F., P. Barili, E. Bronzetti, L. Felici, F. Mignini and A. Ricci (2000). "Localization of dopamine receptor subtypes in systemic arteries." Clin Exp Hypertens **22**(3): 277-288.
- Ara, T. and Y. A. Declerck (2010). "Interleukin-6 in bone metastasis and cancer progression." Eur J Cancer **46**(7): 1223-1231.
- Arbab, A. S., L. A. Bashaw, B. R. Miller, E. K. Jordan, B. K. Lewis, H. Kalish and J. A. Frank (2003). "Characterization of biophysical and metabolic properties of cells labeled with superparamagnetic iron oxide nanoparticles and transfection agent for cellular MR imaging." Radiology **229**(3): 838-846.
- Arman, M. and K. Krauel (2015). "Human platelet IgG Fc receptor FcγRIIA in immunity and thrombosis." J Thromb Haemost **13**(6): 893-908.
- Ataie-Kachoie, P., M. H. Pourgholami and D. L. Morris (2012). "Inhibition of the IL-6 signaling pathway: a strategy to combat chronic inflammatory diseases and cancer." Cytokine Growth Factor Rev **24**(2): 163-173.
- Atreya, R., J. Mudter, S. Finotto, J. Mullberg, T. Jostock, S. Wirtz, M. Schutz, B. Bartsch, M. Holtmann, C. Becker, D. Strand, J. Czaja, J. F. Schlaak, H. A. Lehr, F. Autschbach, G. Schurmann, N. Nishimoto, K. Yoshizaki, H. Ito, T. Kishimoto, P. R. Galle, S. Rose-John and M. F. Neurath (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.
- Audet, J., C. L. Miller, S. Rose-John, J. M. Piret and C. J. Eaves (2001). "Distinct role of gp130 activation in promoting self-renewal divisions by mitogenically stimulated murine hematopoietic stem cells." P Natl Acad Sci USA **98**(4): 1757-1762.
- Bae, P. K., J. Jung, S. J. Lim, D. Kim, S. K. Kim and B. H. Chung (2013). "Bimodal perfluorocarbon nanoemulsions for nasopharyngeal carcinoma targeting." Mol Imaging Biol **15**(4): 401-410.
- Balducci, A., B. M. Helfer, E. T. Ahrens, C. F. O'Hanlon, 3rd and A. K. Wesa (2012). "Visualizing arthritic inflammation and therapeutic response by fluorine-19 magnetic resonance imaging (19F MRI)." J Inflamm (Lond) **9**(1): 24.
- Baran, P., S. Hansen, G. H. Waetzig, M. Akbarzadeh, L. Lamertz, H. J. Huber, M. R. Ahmadian, J. M. Moll and J. Scheller (2018). "The balance of interleukin (IL)-6, IL-6 soluble IL-6 receptor (sIL-6R), and IL-6.sIL-6R.sgp130 complexes allows simultaneous classic and trans-signaling." J Biol Chem **293**(18): 6762-6775.
- Baran, P., R. Nitz, J. Grotzinger, J. Scheller and C. Garbers (2013). "Minimal interleukin 6 (IL-6) receptor stalk composition for IL-6 receptor shedding and IL-6 classic signaling." J Biol Chem **288**(21): 14756-14768.

- Bazan, J. F. (1989). "A novel family of growth factor receptors: a common binding domain in the growth hormone, prolactin, erythropoietin and IL-6 receptors, and the p75 IL-2 receptor beta-chain." Biochem Biophys Res Commun **164**(2): 788-795.
- Bazan, J. F. (1990). "Haemopoietic receptors and helical cytokines." Immunol Today **11**(10): 350-354.
- Becker, C., M. C. Fantini, C. Schramm, H. A. Lehr, S. Wirtz, A. Nikolaev, J. Burg, S. Strand, R. Kiesslich, S. Huber, H. Ito, N. Nishimoto, K. Yoshizaki, T. Kishimoto, P. R. Galle, M. Blessing, S. Rose-John and M. F. Neurath (2004). "TGF-beta suppresses tumor progression in colon cancer by inhibition of IL-6 trans-signaling." Immunity **21**(4): 491-501.
- Becker, C., M. C. Fantini, S. Wirtz, A. Nikolaev, H. A. Lehr, P. R. Galle, S. Rose-John and M. F. Neurath (2005). "IL-6 signaling promotes tumor growth in colorectal cancer." Cell Cycle **4**(2): 217-220.
- Beckman, R. A., L. M. Weiner and H. M. Davis (2007). "Antibody constructs in cancer therapy: protein engineering strategies to improve exposure in solid tumors." Cancer **109**(2): 170-179.
- Bertani, G. (1951). "Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic *Escherichia coli*." J Bacteriol **62**(3): 293-300.
- Bettelli, E., Y. Carrier, W. Gao, T. Korn, T. B. Strom, M. Oukka, H. L. Weiner and V. K. Kuchroo (2006). "Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells." Nature **441**(7090): 235-238.
- Boulanger, M. J., A. J. Bankovich, T. Kortemme, D. Baker and K. C. Garcia (2003a). "Convergent mechanisms for recognition of divergent cytokines by the shared signaling receptor gp130." Mol Cell **12**(3): 577-589.
- Boulanger, M. J., D. C. Chow, E. E. Brevnova and K. C. Garcia (2003b). "Hexameric structure and assembly of the interleukin-6/IL-6 alpha-receptor/gp130 complex." Science **300**(5628): 2101-2104.
- Bouso, P. and H. D. Moreau (2012). "Functional immunoimaging: the revolution continues." Nat Rev Immunol **12**(12): 858-864.
- Brooks, G. D., L. McLeod, S. Alhayyani, A. Miller, P. A. Russell, W. Ferlin, S. Rose-John, S. Ruwanpura and B. J. Jenkins (2016). "IL6 trans-signaling promotes KRAS-driven lung carcinogenesis." Cancer Res **76**(4): 866-876.
- Bulte, J. W. and D. L. Kraitchman (2004). "Iron oxide MR contrast agents for molecular and cellular imaging." NMR Biomed **17**(7): 484-499.
- Bulte, J. W., L. D. Ma, R. L. Magin, R. L. Kamman, C. E. Hulstaert, K. G. Go, T. H. The and L. de Leij (1993). "Selective MR imaging of labeled human peripheral blood mononuclear cells by liposome mediated incorporation of dextran-magnetite particles." Magn Reson Med **29**(1): 32-37.
- Buss, N. A., S. J. Henderson, M. McFarlane, J. M. Shenton and L. de Haan (2012). "Monoclonal antibody therapeutics: history and future." Curr Opin Pharmacol **12**(5): 615-622.
- Calabrese, L. H. and S. Rose-John (2014). "IL-6 biology: implications for clinical targeting in rheumatic disease." Nat Rev Rheumatol **10**(12): 720-727.
- Campbell, I. L., M. Ertz, S. L. Lim, R. Frausto, U. May, S. Rose-John, J. Scheller and J. Hidalgo (2014). "Trans-Signaling is a dominant mechanism for the pathogenic actions of Interleukin-6 in the brain." J Neurosci **34**(7): 2503-2513.
- Casanova, J. L. and L. Abel (2009). "Revisiting Crohn's disease as a primary immunodeficiency of macrophages." J Exp Med **206**(9): 1839-1843.
- Casola, S. (2010). "Mouse models for miRNA expression: the ROSA26 locus." Methods Mol Biol **667**: 145-163.
- Caussinus, E., O. Kanca and M. Affolter (2011). "Fluorescent fusion protein knockout mediated by anti-GFP nanobody." Nat Struct Mol Biol **19**(1): 117-121.
- Cermak, T., E. L. Doyle, M. Christian, L. Wang, Y. Zhang, C. Schmidt, J. A. Baller, N. V. Somia, A. J. Bogdanove and D. F. Voytas (2011). "Efficient design and assembly of custom TALEN and other TAL effector-based constructs for DNA targeting." Nucleic Acids Res **39**(12): e82.

- Chalaris, A., C. Garbers, B. Rabe, S. Rose-John and J. Scheller (2011). "The soluble Interleukin 6 receptor: generation and role in inflammation and cancer." Eur J Cell Biol **90**(6-7): 484-494.
- Chalaris, A., B. Rabe, K. Paliga, H. Lange, T. Laskay, C. A. Fielding, S. A. Jones, S. Rose-John and J. Scheller (2007). "Apoptosis is a natural stimulus of IL6R shedding and contributes to the proinflammatory trans-signaling function of neutrophils." Blood **110**(6): 1748-1755.
- Chames, P., M. Van Regenmortel, E. Weiss and D. Baty (2009). "Therapeutic antibodies: successes, limitations and hopes for the future." Br J Pharmacol **157**(2): 220-233.
- Christian, M., T. Cermak, E. L. Doyle, C. Schmidt, F. Zhang, A. Hummel, A. J. Bogdanove and D. F. Voytas (2010). "Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases." Genetics **186**(2): 757-761.
- Chung, C. D., J. Liao, B. Liu, X. Rao, P. Jay, P. Berta and K. Shuai (1997). "Specific inhibition of STAT3 signal transduction by PIAS3." Science **278**(5344): 1803-1805.
- Chung, S. J., Y. J. Kwon, M. C. Park, Y. B. Park and S. K. Lee (2011). "The correlation between increased serum concentrations of interleukin-6 family cytokines and disease activity in rheumatoid arthritis patients." Yonsei Med J **52**(1): 113-120.
- Collaboration, N. Sarwar, A. S. Butterworth, D. F. Freitag, J. Gregson, P. Willeit, D. N. Gorman, P. Gao, D. Saleheen, A. Rendon, C. P. Nelson, P. S. Braund, A. S. Hall, D. I. Chasman, A. Tybjaerg-Hansen, J. C. Chambers, E. J. Benjamin, P. W. Franks, R. Clarke, A. A. Wilde, M. D. Trip, M. Steri, J. C. Wittman, L. Qi, C. E. van der Schoot, U. de Faire, J. Erdmann, H. M. Stringham, W. Koenig, D. J. Rader, D. Melzer, D. Reich, B. M. Psaty, M. E. Kleber, D. B. Panagiotakos, J. Willeit, P. Wennberg, M. Woodward, S. Adamovic, E. B. Rimm, T. W. Meade, R. F. Gillum, J. A. Shaffer, A. Hofman, A. Onat, J. Sundstrom, S. Wassertheil-Smoller, D. Mellstrom, J. Gallacher, M. Cushman, R. P. Tracy, J. Kauhanen, M. Karlsson, J. T. Salonen, L. Wilhelmsen, P. Amouyel, B. Cantin, L. G. Best, Y. Ben-Shlomo, J. E. Manson, G. Davey-Smith, P. I. de Bakker, C. J. O'Donnell, J. F. Wilson, A. G. Wilson, T. L. Assimes, J. O. Jansson, C. Ohlsson, A. Tivesten, O. Ljunggren, M. P. Reilly, A. Hamsten, E. Ingelsson, F. Cambien, J. Hung, G. N. Thomas, M. Boehnke, H. Schunkert, F. W. Asselbergs, J. J. Kastelein, V. Gudnason, V. Salomaa, T. B. Harris, J. S. Kooner, K. H. Allin, B. G. Nordestgaard, J. C. Hopewell, A. H. Goodall, P. M. Ridker, H. Holm, H. Watkins, W. H. Ouwehand, N. J. Samani, S. Kaptoge, E. Di Angelantonio, O. Harari and J. Danesh (2012). "Interleukin-6 receptor pathways in coronary heart disease: a collaborative meta-analysis of 82 studies." Lancet **379**(9822): 1205-1213.
- Coppieters, K., T. Dreier, K. Silence, H. de Haard, M. Lauwereys, P. Casteels, E. Beirnaert, H. Jonckheere, C. Van de Wiele, L. Staelens, J. Hostens, H. Revets, E. Remaut, D. Elewaut and P. Rottiers (2006). "Formatted anti-tumor necrosis factor alpha VHH proteins derived from camelids show superior potency and targeting to inflamed joints in a murine model of collagen-induced arthritis." Arthritis Rheum **54**(6): 1856-1866.
- Cortez-Retamozo, V., N. Backmann, P. D. Senter, U. Wernery, P. De Baetselier, S. Muyldermans and H. Revets (2004). "Efficient cancer therapy with a nanobody-based conjugate." Cancer Res **64**(8): 2853-2857.
- Cressman, D. E., L. E. Greenbaum, R. A. DeAngelis, G. Ciliberto, E. E. Furth, V. Poli and R. Taub (1996). "Liver failure and defective hepatocyte regeneration in interleukin-6-deficient mice." Science **274**(5291): 1379-1383.
- De Benedetti, F., M. Massa, P. Pignatti, S. Albani, D. Novick and A. Martini (1994). "Serum soluble interleukin 6 (IL-6) receptor and IL-6/soluble IL-6 receptor complex in systemic juvenile rheumatoid arthritis." J Clin Invest **93**(5): 2114-2119.
- De Genst, E., K. Silence, K. Decanniere, K. Conrath, R. Loris, J. Kinne, S. Muyldermans and L. Wyns (2006). "Molecular basis for the preferential cleft recognition by dromedary heavy-chain antibodies." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(12): 4586-4591.
- De Meyts, P. (1994). "The structural basis of insulin and insulin-like growth factor-I receptor binding and negative co-operativity, and its relevance to mitogenic versus metabolic signalling." Diabetologia **37 Suppl 2**: S135-148.

- Dienz, O., J. G. Rud, S. M. Eaton, P. A. Lanthier, E. Burg, A. Drew, J. Bunn, B. T. Suratt, L. Haynes and M. Rincon (2012). "Essential role of IL-6 in protection against H1N1 influenza virus by promoting neutrophil survival in the lung." Mucosal Immunol **5**(3): 258-266.
- Dillon, S. R., C. Sprecher, A. Hammond, J. Bilsborough, M. Rosenfeld-Franklin, S. R. Presnell, H. S. Haugen, M. Maurer, B. Harder, J. Johnston, S. Bort, S. Mudri, J. L. Kuijper, T. Bukowski, P. Shea, D. L. Dong, M. Dasovich, F. J. Grant, L. Lockwood, S. D. Levin, C. LeCiel, K. Waggle, H. Day, S. Topouzis, J. Kramer, R. Kuestner, Z. Chen, D. Foster, J. Parrish-Novak and J. A. Gross (2004). "Interleukin 31, a cytokine produced by activated T cells, induces dermatitis in mice." Nat Immunol **5**(7): 752-760.
- Dittrich, E., C. R. Haft, L. Muys, P. C. Heinrich and L. Graeve (1996). "A di-leucine motif and an upstream serine in the interleukin-6 (IL-6) signal transducer gp130 mediate ligand-induced endocytosis and down-regulation of the IL-6 receptor." J Biol Chem **271**(10): 5487-5494.
- Dittrich, E., S. Rosejohn, C. Gerhartz, J. Mullberg, T. Stoyan, K. Yasukawa, P. C. Heinrich and L. Graeve (1994). "Identification of a region within the cytoplasmic domain of the Interleukin-6 (IL-6) signal transducer gp130 important for ligand-induced endocytosis of the IL-6 receptor." J Biol Chem **269**(29): 19014-19020.
- Dominitzki, S., M. C. Fantini, C. Neufert, A. Nikolaev, P. R. Galle, J. Scheller, G. Monteleone, S. Rose-John, M. F. Neurath and C. Becker (2007). "Cutting edge: trans-signaling via the soluble IL-6R abrogates the induction of FoxP3 in naive CD4+CD25 T cells." J Immunol **179**(4): 2041-2045.
- East, L. and C. M. Isacke (2002). "The mannose receptor family." Biochim Biophys Acta **1572**(2-3): 364-386.
- Ebner, B., P. Behm, C. Jacoby, S. Burghoff, B. A. French, J. Schrader and U. Flogel (2010). "Early assessment of pulmonary inflammation by 19F MRI in vivo." Circ Cardiovasc Imaging **3**(2): 202-210.
- Eersels, K., P. Lieberzeit and P. Wagner (2016). "A review on synthetic receptors for bioparticle detection created by surface-imprinting techniques-from principles to applications." ACS Sensors **1**(10): 1171-1187.
- Engelholm, L. H., K. List, S. Netzel-Arnett, E. Cukierman, D. J. Mitola, H. Aaronson, L. Kjoller, J. K. Larsen, K. M. Yamada, D. K. Strickland, K. Holmbeck, K. Dano, H. Birkedal-Hansen, N. Behrendt and T. H. Bugge (2003). "uPARAP/Endo180 is essential for cellular uptake of collagen and promotes fibroblast collagen adhesion." J Cell Biol **160**(7): 1009-1015.
- Engelowski, E., A. Schneider, M. Franke, H. Xu, R. Clemen, A. Lang, P. Baran, C. Binsch, B. Knebel, H. Al-Hasani, J. M. Moll, D. M. Floss, P. Lang and J. Scheller (2018). "Synthetic Cytokine Receptors transmit biological signals using artificial ligands." Nat Commun (Manuscript in Press).
- Esteve, E., G. Villuendas, J. Mallolas, J. Vendrell, A. Lopez-Bermejo, M. Rodriguez, M. Recasens, W. Ricart, J. L. San Millan, H. Escobar-Morreale, C. Richart and J. M. Fernandez-Real (2006). "Polymorphisms in the interleukin-6 receptor gene are associated with body mass index and with characteristics of the metabolic syndrome." Clin Endocrinol (Oxf) **65**(1): 88-91.
- Eulenfeld, R., A. Dittrich, C. Khouri, P. J. Muller, B. Mutze, A. Wolf and F. Schaper (2012). "Interleukin-6 signalling: more than Jaks and STATs." Eur J Cell Biol **91**(6-7): 486-495.
- Ferreira, R. C., D. F. Freitag, A. J. Cutler, J. M. Howson, D. B. Rainbow, D. J. Smyth, S. Kaptoge, P. Clarke, C. Boreham, R. M. Coulson, M. L. Pekalski, W. M. Chen, S. Onengut-Gumuscu, S. S. Rich, A. S. Butterworth, A. Malarstig, J. Danesh and J. A. Todd (2013). "Functional IL6R 358Ala allele impairs classical IL-6 receptor signaling and influences risk of diverse inflammatory diseases." PLoS Genet **9**(4): e1003444.
- Fink, D., S. Wohrer, M. Pfeffer, T. Tombe, C. J. Ong and P. H. Sorensen (2010). "Ubiquitous expression of the monomeric red fluorescent protein mCherry in transgenic mice." Genesis **48**(12): 723-729.

- Fischer, M., J. Goldschmitt, C. Peschel, J. P. Brakenhoff, K. J. Kallen, A. Wollmer, J. Grotzinger and S. Rose-John (1997). "I. A bioactive designer cytokine for human hematopoietic progenitor cell expansion." Nat Biotechnol **15**(2): 142-145.
- Fleischmann, R. (2018). "Tofacitinib in the treatment of active rheumatoid arthritis in adults." Immunotherapy **10**(1): 39-56.
- Fleischmann, R., J. van Adelsberg, Y. Lin, G. D. Castelar-Pinheiro, J. Brzezicki, P. Hrycaj, N. M. Graham, H. van Hoogstraten, D. Bauer and G. R. Burmester (2017). "Sarilumab and nonbiologic disease-modifying antirheumatic drugs in patients with active rheumatoid arthritis and inadequate response or intolerance to tumor necrosis factor inhibitors." Arthritis Rheumatol **69**(2): 277-290.
- Flögel, U., S. Burghoff, P. L. van Lent, S. Temme, L. Galbarz, Z. Ding, A. El-Tayeb, S. Huels, F. Bonner, N. Borg, C. Jacoby, C. E. Muller, W. B. van den Berg and J. Schrader (2012). "Selective activation of adenosine A2A receptors on immune cells by a CD73-dependent prodrug suppresses joint inflammation in experimental rheumatoid arthritis." Sci Transl Med **4**(146): 146ra108.
- Flögel, U., Z. Ding, H. Hardung, S. Jander, G. Reichmann, C. Jacoby, R. Schubert and J. Schrader (2008). "In vivo monitoring of inflammation after cardiac and cerebral ischemia by fluorine magnetic resonance imaging." Circulation **118**(2): 140-148.
- Frank, J. A., B. R. Miller, A. S. Arbab, H. A. Zywicke, E. K. Jordan, B. K. Lewis, L. H. Bryant and J. W. M. Bulte (2003). "Clinically applicable labeling of mammalian and stem cells by combining; Superparamagnetic iron oxides and transfection agents." Radiology **228**(2): 480-487.
- Frenken, L. G., J. G. Hessing, C. A. Van den Hondel and C. T. Verrips (1998). "Recent advances in the large-scale production of antibody fragments using lower eukaryotic microorganisms." Res Immunol **149**(6): 589-599.
- Frenken, L. G. J., R. H. J. van der Linden, P. W. J. J. Hermans, J. W. Bos, R. C. Ruuls, B. de Geus and C. T. Verrips (2000). "Isolation of antigen specific Llama V-HH antibody fragments and their high level secretion by *Saccharomyces cerevisiae*." J Biotechnol **78**(1): 11-21.
- Friedrich, G. and P. Soriano (1991). "Promoter traps in embryonic stem cells: a genetic screen to identify and mutate developmental genes in mice." Genes Dev **5**(9): 1513-1523.
- Fukada, T., M. Hibi, Y. Yamanaka, M. Takahashi-Tezuka, Y. Fujitani, T. Yamaguchi, K. Nakajima and T. Hirano (1996). "Two signals are necessary for cell proliferation induced by a cytokine receptor gp130: involvement of STAT3 in anti-apoptosis." Immunity **5**(5): 449-460.
- Gabay, C. and I. Kushner (1999). "Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation." N Engl J Med **340**(6): 448-454.
- Gaillard, J., M. Pugnère, J. Tresca, J. Mani, B. Klein and J. Brochier (1999). "Interleukin-6 receptor signaling. II. Bio-availability of interleukin-6 in serum." Eur Cytokine Netw **10**(3): 337-344.
- Galun, E., E. Zeira, O. Pappo, M. Peters and S. Rose-John (2000). "Liver regeneration induced by a designer human IL-6/sIL-6R fusion protein reverses severe hepatocellular injury." FASEB J **14**(13): 1979-1987.
- Garbers, C., S. Aparicio-Siegmund and S. Rose-John (2015). "The IL-6/gp130/STAT3 signaling axis: recent advances towards specific inhibition." Curr Opin Immunol **34**: 75-82.
- Garbers, C., H. M. Hermanns, F. Schaper, G. Muller-Newen, J. Grotzinger, S. Rose-John and J. Scheller (2012). "Plasticity and cross-talk of interleukin 6-type cytokines." Cytokine Growth Factor Rev **23**(3): 85-97.
- Garbers, C., N. Monhasery, S. Aparicio-Siegmund, J. Lokau, P. Baran, M. A. Nowell, S. A. Jones, S. Rose-John and J. Scheller (2014). "The interleukin-6 receptor Asp358Ala single nucleotide polymorphism rs2228145 confers increased proteolytic conversion rates by ADAM proteases." Biochim Biophys Acta **1842**(9): 1485-1494.
- Garbers, C. and J. Scheller (2013). "Interleukin-6 and interleukin-11: same same but different." Biol Chem **394**(9): 1145-1161.

- Garbers, C., W. Thaiss, G. W. Jones, G. H. Waetzig, I. Lorenzen, F. Guilhot, R. Lissilaa, W. G. Ferlin, J. Grötzingler, S. A. Jones, S. Rose-John and J. Scheller (2011a). "Inhibition of classic signaling is a novel function of soluble GP130 which is controlled by the ratio of interleukin 6 and soluble interleukin 6 receptor." J Biol Chem **286**(50): 42959-42970.
- Garbers, C., W. Thaiss, G. H. Waetzig, G. W. Jones, D. M. Floss, I. Lorenzen, J. Grotzinger, S. A. Jones, S. Rose-John and J. Scheller (2011b). "Inhibition of Interleukin 6 classic signaling is a novel function of soluble gp130 which is controlled by the ratio of Interleukin 6 and soluble Interleukin 6 receptor." Cytokine **56**(1): 60-61.
- Gate, D., K. Rezai-Zadeh, D. Jodry, A. Rentsendorj and T. Town (2010). "Macrophages in Alzheimer's disease: the blood-borne identity." J Neural Transm (Vienna) **117**(8): 961-970.
- Gauldie, J., C. Richards, D. Harnish, P. Lansdorp and H. Baumann (1987). "Interferon beta 2/B-cell stimulatory factor type 2 shares identity with monocyte-derived hepatocyte-stimulating factor and regulates the major acute phase protein response in liver cells." Proc Natl Acad Sci U S A **84**(20): 7251-7255.
- Gerhartz, C., B. Heesel, J. Sasse, U. Hemmann, C. Landgraf, J. Schneider-Mergener, F. Horn, P. C. Heinrich and L. Graeve (1996). "Differential activation of acute phase response factor/STAT3 and STAT1 via the cytoplasmic domain of the interleukin 6 signal transducer gp130. I. Definition of a novel phosphotyrosine motif mediating STAT1 activation." J Biol Chem **271**(22): 12991-12998.
- Ghahroudi, M., A. Desmyter, L. Wyns, R. Hamers and S. Muyldermans (1997). "Selection and identification of single domain antibody fragments from camel heavy-chain antibodies." FEBS Lett **414**(3): 521-526.
- Ghazizadeh, S. and H. B. Fleit (1994). "Tyrosine phosphorylation provides an obligatory early signal for Fc gamma RII-mediated endocytosis in the monocytic cell line THP-1." J Immunol **152**(1): 30-41.
- Grapentin, C., F. Mayenfels, S. Barnert, R. Süß, R. Schubert, S. Temme, C. Jacoby, J. Schrader and U. Flögel (2014). "Optimization of Perfluorcarbon Nanoemulsions for Molecular Imaging by 19F MRI." Nanomedicine; One Central Press: 268-286.
- Greenberg, S., P. Chang and S. C. Silverstein (1993). "Tyrosine phosphorylation is required for Fc receptor-mediated phagocytosis in mouse macrophages." J Exp Med **177**(2): 529-534.
- Grivennikov, S., E. Karin, J. Terzic, D. Mucida, G. Y. Yu, S. Vallabhapurapu, J. Scheller, S. Rose-John, H. Cheroutre, L. Eckmann and M. Karin (2009). "IL-6 and Stat3 are required for survival of intestinal epithelial cells and development of colitis-associated cancer." Cancer Cell **15**(2): 103-113.
- Grötzingler, J., T. Kernebeck, K. J. Kallen and S. Rose-John (1999). "IL-6 type cytokine receptor complexes: hexamer, tetramer or both?" Biol Chem **380**(7-8): 803-813.
- Grotzinger, J., G. Kurapkat, A. Wollmer, M. Kalai and S. Rose-John (1997). "The family of the IL-6-type cytokines: specificity and promiscuity of the receptor complexes." Proteins **27**(1): 96-109.
- Hackam, D. J., O. D. Rotstein, A. Schreiber, W. Zhang and S. Grinstein (1997). "Rho is required for the initiation of calcium signaling and phagocytosis by Fc gamma receptors in macrophages." J Exp Med **186**(6): 955-966.
- Hamers-Casterman, C., T. Atarhouch, S. Muyldermans, G. Robinson, C. Hamers, E. B. Songa, N. Bendahman and R. Hamers (1993). "Naturally-Occurring Antibodies Devoid of Light-Chains." Nature **363**(6428): 446-448.
- Hamid, Y. H., S. A. Urhammer, D. P. Jensen, C. Glumer, K. Borch-Johnsen, T. Jorgensen, T. Hansen and O. Pedersen (2004). "Variation in the interleukin-6 receptor gene associates with type 2 diabetes in Danish whites." Diabetes **53**(12): 3342-3345.
- Hecht, N., O. Pappo, D. Shouval, S. Rose-John, E. Galun and J. H. Axelrod (2001). "Hyper-IL-6 gene therapy reverses fulminant hepatic failure." Mol Ther **3**(5 Pt 1): 683-687.
- Heikkila, K., S. Ebrahim and D. A. Lawlor (2008). "Systematic review of the association between circulating interleukin-6 (IL-6) and cancer." Eur J Cancer **44**(7): 937-945.

- Heilker, R., M. Spiess and P. Crottet (1999). "Recognition of sorting signals by clathrin adaptors." *Bioessays* **21**(7): 558-567.
- Helma, J., M. C. Cardoso, S. Muyldermans and H. Leonhardt (2015). "Nanobodies and recombinant binders in cell biology." *J Cell Biol* **209**(5): 633-644.
- Hermeij, G., S. S. Sjogaard, C. M. Petersen, A. Nykjaer and J. Gliemann (2006). "Tumour necrosis factor alpha-converting enzyme mediates ectodomain shedding of Vps10p-domain receptor family members." *Biochem J* **395**(2): 285-293.
- Hertlein, T., V. Sturm, S. Kircher, T. Basse-Lusebrink, D. Haddad, K. Ohlsen and P. Jakob (2011). "Visualization of abscess formation in a murine thigh infection model of *Staphylococcus aureus* by 19F-magnetic resonance imaging (MRI)." *PLoS One* **6**(3): e18246.
- Hibi, M., M. Murakami, M. Saito, T. Hirano, T. Taga and T. Kishimoto (1990). "Molecular cloning and expression of an IL-6 signal transducer, gp130." *Cell* **63**(6): 1149-1157.
- Hirano, T., T. Taga, K. Yasukawa, K. Nakajima, N. Nakano, F. Takatsuki, M. Shimizu, A. Murashima, S. Tsunasawa, F. Sakiyama and et al. (1987). "Human B-cell differentiation factor defined by an anti-peptide antibody and its possible role in autoantibody production." *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**(1): 228-231.
- Hirano, T., K. Yasukawa, H. Harada, T. Taga, Y. Watanabe, T. Matsuda, S. Kashiwamura, K. Nakajima, K. Koyama, A. Iwamatsu and et al. (1986). "Complementary DNA for a novel human interleukin (BSF-2) that induces B lymphocytes to produce immunoglobulin." *Nature* **324**(6092): 73-76.
- Hirota, K., B. Martin and M. Veldhoen (2010). "Development, regulation and functional capacities of Th17 cells." *Semin Immunopathol* **32**(1): 3-16.
- Hoge, J., I. Yan, N. Janner, V. Schumacher, A. Chalaris, O. M. Steinmetz, D. R. Engel, J. Scheller, S. Rose-John and H. W. Mittrucker (2013). "IL-6 controls the innate immune response against *Listeria monocytogenes* via classical IL-6 signaling." *J Immunol* **190**(2): 703-711.
- Holland, G. N., P. A. Bottomley and W. S. Hirnshaw (1977). "F-19 Magnetic-Resonance Imaging." *J Magn Reson* **28**(1): 133-136.
- Honda, M., S. Yamamoto, M. Cheng, K. Yasukawa, H. Suzuki, T. Saito, Y. Osugi, T. Tokunaga and T. Kishimoto (1992). "Human soluble IL-6 receptor: its detection and enhanced release by HIV infection." *J Immunol* **148**(7): 2175-2180.
- Horiuchi, S., Y. Koyanagi, Y. Zhou, H. Miyamoto, Y. Tanaka, M. Waki, A. Matsumoto, M. Yamamoto and N. Yamamoto (1994). "Soluble interleukin-6 receptors released from T cell or granulocyte/macrophage cell lines and human peripheral blood mononuclear cells are generated through an alternative splicing mechanism." *Eur J Immunol* **24**(8): 1945-1948.
- Hosokawa, T., K. Kusugami, K. Ina, T. Ando, M. Shinoda, A. Imada, M. Ohsuga, T. Sakai, T. Matsuura, K. Ito and K. Kaneshiro (1999). "Interleukin-6 and soluble interleukin-6 receptor in the colonic mucosa of inflammatory bowel disease." *J Gastroenterol Hepatol* **14**(10): 987-996.
- Howard, M. J. and C. M. Isacke (2002). "The C-type lectin receptor Endo180 displays internalization and recycling properties distinct from other members of the mannose receptor family." *J Biol Chem* **277**(35): 32320-32331.
- Howard, O. M., K. A. Clouse, C. Smith, R. G. Goodwin and W. L. Farrar (1993). "Soluble tumor necrosis factor receptor: inhibition of human immunodeficiency virus activation." *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(6): 2335-2339.
- Hu, Y., C. Liu and S. Muyldermans (2017). "Nanobody-based delivery systems for diagnosis and targeted tumor therapy." *Front Immunol* **8**: 1442.
- Huang, L., L. O. Gainkam, V. Caveliers, C. Vanhove, M. Keyaerts, P. De Baetselier, A. Bossuyt, H. Revets and T. Lahoutte (2008). "SPECT imaging with 99mTc-labeled EGFR-specific nanobody for in vivo monitoring of EGFR expression." *Mol Imaging Biol* **10**(3): 167-175.
- Hunter, C. A. and S. A. Jones (2015). "IL-6 as a keystone cytokine in health and disease." *Nat Immunol* **16**(5): 448-457.

- Hymel, D. and B. R. Peterson (2012). "Synthetic cell surface receptors for delivery of therapeutics and probes." Adv Drug Deliv Rev **64**(9): 797-810.
- Ismaili, A., M. Jalali-Javaran, M. J. Rasaei, F. Rahbarizadeh, M. Forouzandeh-Moghadam and H. R. Memari (2007). "Production and characterization of anti-(mucin MUC1) single-domain antibody in tobacco (*Nicotiana tabacum* cultivar Xanthi)." Biotechnol Appl Biochem **47**(Pt 1): 11-19.
- Janjic, J. M. and E. T. Ahrens (2009). "Fluorine-containing nanoemulsions for MRI cell tracking." Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol **1**(5): 492-501.
- Jilka, R. L., G. Hangoc, G. Girasole, G. Passeri, D. C. Williams, J. S. Abrams, B. Boyce, H. Broxmeyer and S. C. Manolagas (1992). "Increased osteoclast development after estrogen loss: mediation by interleukin-6." Science **257**(5066): 88-91.
- Jones, S. A. (2005). "Directing transition from innate to acquired immunity: defining a role for IL-6." J Immunol **175**: 3464-3468.
- Jostock, T., J. Mullberg, S. Ozbek, R. Atreya, G. Blinn, N. Voltz, M. Fischer, M. F. Neurath and S. Rose-John (2001). "Soluble gp130 is the natural inhibitor of soluble interleukin-6 receptor transsignaling responses." Eur J Biochem **268**(1): 160-167.
- Kasperek, P., M. Krausova, R. Haneckova, V. Kriz, O. Zbodakova, V. Korinek and R. Sedlacek (2014). "Efficient gene targeting of the Rosa26 locus in mouse zygotes using TALE nucleases." FEBS Letters **588**(21): 3982-3988.
- Kershaw, N. J., J. M. Murphy, N. P. Liao, L. N. Varghese, A. Laktyushin, E. L. Whitlock, I. S. Lucet, N. A. Nicola and J. J. Babon (2013). "SOCS3 binds specific receptor-JAK complexes to control cytokine signaling by direct kinase inhibition." Nat Struct Mol Biol **20**(4): 469-476.
- Ketteler, R., S. Glaser, O. Sandra, U. M. Martens and U. Klingmuller (2002). "Enhanced transgene expression in primitive hematopoietic progenitor cells and embryonic stem cells efficiently transduced by optimized retroviral hybrid vectors." Gene Ther **9**(8): 477-487.
- Kishimoto, T., S. Akira, M. Narazaki and T. Taga (1995). "Interleukin-6 family of cytokines and gp130." Blood **86**(4): 1243-1254.
- Kjoller, L., L. H. Engelholm, M. Hoyer-Hansen, K. Dano, T. H. Bugge and N. Behrendt (2004). "uPARAP/endo180 directs lysosomal delivery and degradation of collagen IV." Exp Cell Res **293**(1): 106-116.
- Kleinschnitz, C., M. Bendszus, M. Frank, L. Solymosi, K. V. Toyka and G. Stoll (2003). "In vivo monitoring of macrophage infiltration in experimental ischemic brain lesions by magnetic resonance imaging." J Cereb Blood Flow Metab **23**(11): 1356-1361.
- Klouche, M., S. Bhakdi, M. Hemmes and S. Rose-John (1999). "Novel path to activation of vascular smooth muscle cells: up-regulation of gp130 creates an autocrine activation loop by IL-6 and its soluble receptor." J Immunol **163**(8): 4583-4589.
- Krafft, M. P. (2001). "Fluorocarbons and fluorinated amphiphiles in drug delivery and biomedical research." Adv Drug Deliver Rev **47**(2-3): 209-228.
- Krafft, M. P. and J. G. Riess (2009). "Chemistry, physical chemistry, and uses of molecular fluorocarbon--hydrocarbon diblocks, triblocks, and related compounds--unique "apolar" components for self-assembled colloid and interface engineering." Chem Rev **109**(5): 1714-1792.
- Kubala, M. H., O. Kovtun, K. Alexandrov and B. M. Collins (2010). "Structural and thermodynamic analysis of the GFP:GFP-nanobody complex." Protein Sci **19**(12): 2389-2401.
- Kuhn, K. A., N. A. Manieri, T. C. Liu and T. S. Stappenbeck (2014). "IL-6 stimulates intestinal epithelial proliferation and repair after injury." PLoS One **9**(12): e114195.
- Lai, C. F., J. Ripberger, Y. Wang, H. Kim, R. B. Hawley and H. Baumann (1999). "The STAT3-independent signaling pathway by glycoprotein 130 in hepatic cells." J Biol Chem **274**(12): 7793-7802.
- Larsen, J. V. and C. M. Petersen (2017). "SorLA in Interleukin-6 signaling and turnover." Mol Cell Biol **37**(11): e00641-00616
- Layton, M. J., B. A. Cross, D. Metcalf, L. D. Ward, R. J. Simpson and N. A. Nicola (1992). "A Major Binding-Protein for Leukemia Inhibitory Factor in Normal Mouse Serum -

- Identification as a Soluble Form of the Cellular Receptor." P Natl Acad Sci USA **89**(18): 8616-8620.
- Li, M., Z. S. Liu, X. L. Liu, Q. Hui, S. Y. Lu, L. L. Qu, Y. S. Li, Y. Zhou, H. L. Ren and P. Hu (2017). "Clinical targeting recombinant immunotoxins for cancer therapy." Onco Targets Ther **10**: 3645-3665.
- Liang, Q., N. Satyamurthy, J. R. Barrio, T. Toyokuni, M. P. Phelps, S. S. Gambhir and H. R. Herschman (2001). "Noninvasive, quantitative imaging in living animals of a mutant dopamine D2 receptor reporter gene in which ligand binding is uncoupled from signal transduction." Gene Ther **8**(19): 1490-1498.
- Lienert, F., J. J. Lohmueller, A. Garg and P. A. Silver (2014). "Synthetic biology in mammalian cells: next generation research tools and therapeutics." Nat Rev Mol Cell Biol **15**(2): 95-107.
- Lim, D., K. S. Kim, H. Kim, K. C. Ko, J. J. Song, J. H. Choi, M. Shin, J. J. Min, J. H. Jeong and H. E. Choy (2017). "Anti-tumor activity of an immunotoxin (TGFalpha-PE38) delivered by attenuated *Salmonella typhimurium*." Oncotarget **8**(23): 37550-37560.
- Lim, W. A. and C. H. June (2017). "The principles of engineering immune cells to treat cancer." Cell **168**(4): 724-740.
- Lo, C. W., M. W. Chen, M. Hsiao, S. Wang, C. A. Chen, S. M. Hsiao, J. S. Chang, T. C. Lai, S. Rose-John, M. L. Kuo and L. H. Wei (2011). "IL-6 trans-signaling in formation and progression of malignant ascites in ovarian cancer." Cancer Res **71**(2): 424-434.
- Lokau, J., M. Agthe and C. Garbers (2016). "Generation of soluble Interleukin-11 and Interleukin-6 receptors: a crucial function for proteases during Inflammation." Mediators Inflamm **2016**: 1785021.
- Luckheeram, R. V., R. Zhou, A. D. Verma and B. Xia (2012). "CD4(+)T cells: differentiation and functions." Clin Dev Immunol **2012**: 925135.
- Lust, J. A., K. A. Donovan, M. P. Kline, P. R. Greipp, R. A. Kyle and N. J. Maimle (1992). "Isolation of an mRNA encoding a soluble form of the human interleukin-6 receptor." Cytokine **4**(2): 96-100.
- Ma, Y., Y. Ren, Z. J. Dai, C. J. Wu, Y. H. Ji and J. Xu (2017). "IL-6, IL-8 and TNF-alpha levels correlate with disease stage in breast cancer patients." Adv Clin Exp Med **26**(3): 421-426.
- Maliszewski, C. R., T. A. Sato, T. Vanden Bos, S. Waugh, S. K. Dower, J. Slack, M. P. Beckmann and K. H. Grabstein (1990). "Cytokine receptors and B cell functions. I. Recombinant soluble receptors specifically inhibit IL-1- and IL-4-induced B cell activities in vitro." J Immunol **144**(8): 3028-3033.
- Mamot, C., R. Ritschard, W. Kung, J. W. Park, R. Herrmann and C. F. Rochlitz (2006). "EGFR-targeted immunoliposomes derived from the monoclonal antibody EMD72000 mediate specific and efficient drug delivery to a variety of colorectal cancer cells." J Drug Target **14**(4): 215-223.
- Marz, P., J. G. Cheng, R. A. Gadiant, P. H. Patterson, T. Stoyan, U. Otten and S. Rose-John (1998). "Sympathetic neurons can produce and respond to interleukin 6." P Natl Acad Sci USA **95**(6): 3251-3256.
- Matsuda, M., J. G. Park, D. C. Wang, S. Hunter, P. Chien and A. D. Schreiber (1996). "Abrogation of the Fc gamma receptor IIA-mediated phagocytic signal by stem-loop Syk antisense oligonucleotides." Mol Biol Cell **7**(7): 1095-1106.
- Matthews, V. B., T. L. Allen, S. Risis, M. H. Chan, D. C. Henstridge, N. Watson, L. A. Zaffino, J. R. Babb, J. Boon, P. J. Meikle, J. B. Jowett, M. J. Watt, J. O. Jansson, C. R. Bruce and M. A. Febbraio (2010). "Interleukin-6-deficient mice develop hepatic inflammation and systemic insulin resistance." Diabetologia **53**(11): 2431-2441.
- McFarland-Mancini, M. M., H. M. Funk, A. M. Paluch, M. Zhou, P. V. Giridhar, C. A. Mercer, S. C. Kozma and A. F. Drew (2010). "Differences in wound healing in mice with deficiency of IL-6 versus IL-6 receptor." J Immunol **184**(12): 7219-7228.
- Memoli, B., G. Grandaliano, M. Soccio, L. Postiglione, B. Guida, V. Bisesti, P. Esposito, A. Procino, D. Marrone, A. Michael, M. Andreucci, F. P. Schena and G. Pertosa (2005). "In vivo modulation of soluble "antagonistic" IL-6 receptor synthesis and release in ESRD." J Am Soc Nephrol **16**(4): 1099-1107.

- Mitsuyama, K., E. Sasaki, A. Toyonaga, H. Ikeda, O. Tsuruta, A. Irie, N. Arima, T. Oriishi, K. Harada, K. Fujisaki and et al. (1991). "Colonic mucosal interleukin-6 in inflammatory bowel disease." *Digestion* **50**(2): 104-111.
- Mitsuyama, K., A. Toyonaga, E. Sasaki, O. Ishida, H. Ikeda, O. Tsuruta, K. Harada, H. Tateishi, T. Nishiyama and K. Tanikawa (1995). "Soluble interleukin-6 receptors in inflammatory bowel disease: relation to circulating interleukin-6." *Gut*. **36**(1): 45-49.
- Montero-Julian, F. A. (2001). "The soluble IL-6 receptors: serum levels and biological function." *Cell Mol Biol* **47**: 583-597.
- Morel, J., A. Constantin, G. Baron, E. Dernis, R. M. Flipo, S. Rist, B. Combe, J. E. Gottenberg, T. Schaeferbeke, M. Soubrier, O. Vittecoq, M. Dougados, A. Saraux, X. Mariette, P. Ravaud and J. Sibilia (2017). "Risk factors of serious infections in patients with rheumatoid arthritis treated with tocilizumab in the French Registry REGATE." *Rheumatology* **56**(10): 1746-1754.
- Moscou, M. J. and A. J. Bogdanove (2009). "A simple cipher governs DNA recognition by TAL effectors." *Science* **326**(5959): 1501.
- Müllberg, J., E. Dittrich, L. Graeve, C. Gerhartz, K. Yasukawa, T. Taga, T. Kishimoto, P. C. Heinrich and S. Rose-John (1993a). "Differential shedding of the two subunits of the interleukin-6 receptor." *FEBS Lett* **332**(1-2): 174-178.
- Müllberg, J., W. Oberthur, F. Lottspeich, E. Mehl, E. Dittrich, L. Graeve, P. C. Heinrich and S. Rose-John (1994). "The soluble human IL-6 receptor. Mutational characterization of the proteolytic cleavage site." *J Immunol* **152**(10): 4958-4968.
- Müllberg, J., H. Schooltink, T. Stoyan, M. Gunther, L. Graeve, G. Buse, A. Mackiewicz, P. C. Heinrich and S. Rose-John (1993b). "The soluble interleukin-6 receptor is generated by shedding." *Eur J Immunol* **23**(2): 473-480.
- Müller-Newen, G., C. Kohne, R. Keul, U. Hemmann, W. MüllerEsterl, J. Wijdenes, J. P. J. Brakenhoff, M. H. L. Hart and P. C. Heinrich (1996). "Purification and characterization of the soluble interleukin-6 receptor from human plasma and identification of an isoform generated through alternative splicing." *Eur J Biochem* **236**(3): 837-842.
- Müller, L. K. and K. Landfester (2015). "Natural liposomes and synthetic polymeric structures for biomedical applications." *Biochem Biophys Res Commun* **468**(3): 411-418.
- Murakami, M., M. Hibi, N. Nakagawa, T. Nakagawa, K. Yasukawa, K. Yamanishi, T. Taga and T. Kishimoto (1993). "IL-6-induced homodimerization of gp130 and associated activation of a tyrosine kinase." *Science* **260**(5115): 1808-1810.
- Muyldermans, S. (2013). "Nanobodies: natural single-domain antibodies." *Annu Rev Biochem* **82**: 775-797.
- Naka, T., N. Nishimoto and T. Kishimoto (2002). "The paradigm of IL-6: from basic science to medicine." *Arthritis Res* **4 Suppl 3**: S233-242.
- Nakajima, T., S. Kinoshita, T. Sasagawa, K. Sasaki, M. Naruto, T. Kishimoto and S. Akira (1993). "Phosphorylation at threonine-235 by a ras-dependent mitogen-activated protein kinase cascade is essential for transcription factor NF-IL6." *P Natl Acad Sci USA* **90**(6): 2207-2211.
- Narazaki, M., K. Yasukawa, T. Saito, Y. Ohsugi, H. Fukui, Y. Koishihara, G. D. Yancopoulos, T. Taga and T. Kishimoto (1993). "Soluble forms of the interleukin-6 signal-transducing receptor component gp130 in human serum possessing a potential to inhibit signals through membrane-anchored gp130." *Blood* **82**(4): 1120-1126.
- Navarro, G., S. Taroumian, N. Barroso, L. Duan and D. Furst (2014). "Tocilizumab in rheumatoid arthritis: a meta-analysis of efficacy and selected clinical conundrums." *Semin Arthritis Rheum* **43**(4): 458-469.
- Neveu, W. A., J. B. Allard, O. Dienz, M. J. Wargo, G. Ciliberto, L. A. Whittaker and M. Rincon (2009). "IL-6 is required for airway mucus production induced by inhaled fungal allergens." *J Immunol* **183**(3): 1732-1738.
- Nguyen, V. K., R. Hamers, L. Wyns and S. Muyldermans (2000). "Camel heavy-chain antibodies: diverse germline V(H)H and specific mechanisms enlarge the antigen-binding repertoire." *EMBO J* **19**(5): 921-930.

- Nicola, N. A., D. Metcalf, M. Matsumoto and G. R. Johnson (1983). "Purification of a factor inducing differentiation in murine myelomonocytic leukemia-cells-identification as granulocyte colony-stimulating factor." J Biol Chem **258**(14): 9017-9023.
- Nowell, M. A., P. J. Richards, S. Horiuchi, N. Yamamoto, S. Rose-John, N. Topley, A. S. Williams and S. A. Jones (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.
- Oberg, H. H., D. Wesch, S. Grussel, S. Rose-John and D. Kabelitz (2006). "Differential expression of CD126 and CD130 mediates different STAT-3 phosphorylation in CD4+CD25- and CD25high regulatory T cells." Int Immunol **18**(4): 555-563.
- Okabe, M., M. Ikawa, K. Kominami, T. Nakanishi and Y. Nishimune (1997). "'Green mice' as a source of ubiquitous green cells." Febs Letters **407**(3): 313-319.
- Owens, D. E., 3rd and N. A. Peppas (2006). "Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles." Int J Pharm **307**(1): 93-102.
- Parekh, R. B., R. A. Dwek, T. W. Rademacher, G. Opdenakker and J. Van Damme (1992). "Glycosylation of interleukin-6 purified from normal human blood mononuclear cells." Eur J Biochem **203**(1-2): 135-141.
- Paul, D., S. Achouri, Y. Z. Yoon, J. Herre, C. E. Bryant and P. Cicuta (2013). "Phagocytosis dynamics depends on target shape." Biophys J **105**(5): 1143-1150.
- Peters, M., G. Blinn, T. Jostock, P. Schirmacher, K. H. Meyer zum Buschenfelde, P. R. Galle and S. Rose-John (2000). "Combined interleukin 6 and soluble interleukin 6 receptor accelerates murine liver regeneration." Gastroenterology **119**(6): 1663-1671.
- Peters, M., S. Jacobs, M. Ehlers, P. Vollmer, J. Mullberg, E. Wolf, G. Brem, K. H. Meyer zum Buschenfelde and S. Rose-John (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.
- Pignatti, P., L. Ciapponi, P. Galle, M. B. Hansen, M. Massa, C. Meazza, G. Paonessa, D. Novick, G. Ciliberto, A. Martini and F. De Benedetti (2003). "High circulating levels of biologically inactive IL-6/sIL-6 receptor complexes in systemic juvenile idiopathic arthritis: evidence for serum factors interfering with the binding to gp130." Clin Exp Immunol **131**(2): 355-363.
- Pond, L., L. A. Kuhn, L. Teyton, M. P. Schutze, J. A. Tainer, M. R. Jackson and P. A. Peterson (1995). "A role for acidic residues in di-leucine motif-based targeting to the endocytic pathway." J Biol Chem **270**(34): 19989-19997.
- Rabe, B., A. Chalaris, U. May, G. H. Waetzig, D. Seegert, A. S. Williams, S. A. Jones, S. Rose-John and J. Scheller (2008). "Transgenic blockade of interleukin 6 transsignaling abrogates inflammation." Blood **111**(3): 1021-1028.
- Rafique, A., J. Martin, M. Blome, T. Huang, A. Ouyang and N. Papadopoulos (2014). "AB0037 Evaluation of the binding kinetics and functional bioassay activity of sarilumab and tocilizumab to the human il-6 receptor (il-6r) alpha." Ann Rheum Dis **72**(Suppl 3): A797.791-A797.
- Raimondo, M. G., M. Biggioggero, C. Crotti, A. Becciolini and E. G. Favalli (2017). "Profile of sarilumab and its potential in the treatment of rheumatoid arthritis." Drug Des Devel Ther **11**: 1593-1603.
- Randolph, G. J., K. Inaba, D. F. Robbiani, R. M. Steinman and W. A. Muller (1999). "Differentiation of phagocytic monocytes into lymph node dendritic cells in vivo." Immunity **11**(6): 753-761.
- Rasmussen, S. G. F., H. J. Choi, J. J. Fung, E. Pardon, P. Casarosa, P. S. Chae, B. T. DeVree, D. M. Rosenbaum, F. S. Thian, T. S. Kobilka, A. Schnapp, I. Konetzki, R. K. Sunahara, S. H. Gellman, A. Pautsch, J. Steyaert, W. I. Weis and B. K. Kobilka (2011). "Structure of a nanobody-stabilized active state of the beta(2) adrenoceptor." Nature **469**(7329): 175-180.
- Rejman, J., V. Oberle, I. S. Zuhorn and D. Hoekstra (2004). "Size-dependent internalization of particles via the pathways of clathrin- and caveolae-mediated endocytosis." Biochem J **377**(Pt 1): 159-169.

- Ries, J., C. Kaplan, E. Platonova, H. Eghlidi and H. Ewers (2012). "A simple, versatile method for GFP-based super-resolution microscopy via nanobodies." Nat Methods **9**(6): 582-584.
- Riethmüller, S., P. Somasundaram, J. C. Ehlers, C. W. Hung, C. M. Flynn, J. Lokau, M. Agthe, S. Dusterhoft, Y. Zhu, J. Grotzinger, I. Lorenzen, T. Koudelka, K. Yamamoto, U. Pickhinke, R. Wichert, C. Becker-Pauly, M. Radisch, A. Albrecht, M. Hessefort, D. Stahnke, C. Unverzagt, S. Rose-John, A. Tholey and C. Garbers (2017). "Proteolytic origin of the soluble human IL-6R in vivo and a decisive role of N-glycosylation." PLoS Biol **15**(1): e2000080.
- Robak, T., A. Gladalska, H. Stepien and E. Robak (1998). "Serum levels of interleukin-6 type cytokines and soluble interleukin-6 receptor in patients with rheumatoid arthritis." Mediators Inflamm **7**(5): 347-353.
- Romano, M., M. Sironi, C. Toniatti, N. Polentarutti, P. Fruscella, P. Ghezzi, R. Faggioni, W. Luini, V. van Hinsbergh, S. Sozzani, F. Bussolino, V. Poli, G. Ciliberto and A. Mantovani (1997). "Role of IL-6 and its soluble receptor in induction of chemokines and leukocyte recruitment." Immunity **6**(3): 315-325.
- Rosales, C. and E. Uribe-Querol (2017). "Phagocytosis: A fundamental process in immunity." Biomed Res Int **2017**: 9042851.
- 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. (2015). "The soluble interleukin-6 receptor and related proteins." Best Pract Res Clin Endocrinol Metab **29**(5): 787-797.
- Rose-John, S. (2017). "The soluble Interleukin 6 receptor: advanced therapeutic options in inflammation." Clin Pharmacol Ther **102**(4): 591-598.
- Rose-John, S. (2018). "Interleukin-6 family cytokines." Cold Spring Harb Perspect Biol **10**(2): a028415.
- Rose-John, S., H. Schooltink, D. Lenz, E. Hipp, G. Dufhues, H. Schmitz, X. Schiel, T. Hirano, T. Kishimoto and P. C. Heinrich (1990). "Studies on the structure and regulation of the human hepatic interleukin-6 receptor." Eur J Biochem **190**(1): 79-83.
- Rose-John, S., K. Winthrop and L. Calabrese (2017). "The role of IL-6 in host defence against infections: immunobiology and clinical implications." Nat Rev Rheumatol **13**(7): 399-409.
- Rothbauer, U., K. Zolghadr, S. Tillib, D. Nowak, L. Schermelleh, A. Gahl, N. Backmann, K. Conrath, S. Muyldermans, M. C. Cardoso and H. Leonhardt (2006). "Targeting and tracing antigens in live cells with fluorescent nanobodies." Nat Methods **3**(11): 887-889.
- Roybal, K. T., J. Z. Williams, L. Morsut, L. J. Rupp, I. Kolinko, J. H. Choe, W. J. Walker, K. A. McNally and W. A. Lim (2016). "Engineering T-cells with customized therapeutic response programs using synthetic notch receptors." Cell **167**(2): 419-432.
- Saito, M., K. Yoshida, M. Hibi, T. Taga and T. Kishimoto (1992). "Molecular cloning of a murine IL-6 receptor-associated signal transducer, gp130, and its regulated expression in vivo." J Immunol **148**(12): 4066-4071.
- Sansone, P., G. Storci, S. Tavolari, T. Guarnieri, C. Giovannini, M. Taffurelli, C. Ceccarelli, D. Santini, P. Paterini, K. B. Marcu, P. Chieco and M. Bonafe (2007). "IL-6 triggers malignant features in mammospheres from human ductal breast carcinoma and normal mammary gland." J Clin Invest **117**(12): 3988-4002.
- Sarosiek, S., R. Shah and N. C. Munshi (2016). "Review of siltuximab in the treatment of multicentric Castleman's disease." Ther Adv Hematol **7**(6): 360-366.
- Scambia, G., U. Testa, P. B. Panici, R. Martucci, E. Foti, M. Petrini, M. Amoroso, V. Masciullo, C. Peschle and S. Mancuso (1994). "Interleukin-6 serum levels in patients with gynecological tumors." Int J Cancer **57**(3): 318-323.
- Scheller, J., A. Chalaris, C. Garbers and S. Rose-John (2011a). "ADAM17: a molecular switch to control inflammation and tissue regeneration." Trends Immunol **32**(8): 380-387.

- Scheller, J., A. Chalaris, D. Schmidt-Arras and S. Rose-John (2011b). "The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6." Biochim Biophys Acta **1813**(5): 878-888.
- Scheller, J., C. Garbers and S. Rose-John (2014). "Interleukin-6: from basic biology to selective blockade of pro-inflammatory activities." Semin Immunol **26**(1): 2-12.
- Scheller, J., N. Ohnesorge and S. Rose-John (2006). "Interleukin-6 trans-signalling in chronic inflammation and cancer." Scand J Immunol **63**(5): 321-329.
- Scheller, J. and S. Rose-John (2006). "Interleukin-6 and its receptor: from bench to bedside." Med Microbiol Immunol **195**(4): 173-183.
- Schett, G. (2018). "Physiological effects of modulating the interleukin-6 axis." Rheumatology **57**(suppl_2): 43-50.
- Schiel, X., S. Rose-John, G. Dufhues, H. Schooltink, V. Gross and P. C. Heinrich (1990). "Microheterogeneity of human interleukin 6 synthesized by transfected NIH/3T3 cells: comparison with human monocytes, fibroblasts and endothelial cells." Eur J Immunol **20**(4): 883-887.
- Schmieder, A. H., K. Wang, H. Zhang, A. Senpan, D. Pan, J. Keupp, S. D. Caruthers, S. A. Wickline, B. Shen, E. M. Wagner and G. M. Lanza (2014). "Characterization of early neovascular response to acute lung ischemia using simultaneous (19)F/ (1)H MR molecular imaging." Angiogenesis **17**(1): 51-60.
- Schmitz, J., H. Dahmen, C. Grimm, C. Gendo, G. Muller-Newen, P. C. Heinrich and F. Schaper (2000). "The cytoplasmic tyrosine motifs in full-length glycoprotein 130 have different roles in IL-6 signal transduction." J Immunol **164**(2): 848-854.
- Schroers, A., O. Hecht, K. J. Kallen, M. Pachta, S. Rose-John and J. Grotzinger (2005). "Dynamics of the gp130 cytokine complex: a model for assembly on the cellular membrane." Protein Sci **14**(3): 783-790.
- Schuett, H., R. Oestreich, G. H. Waetzig, W. Annema, M. Luchtefeld, A. Hillmer, U. Bavendiek, J. von Felden, D. Divchev, T. Kempf, K. C. Wollert, D. Seeger, S. Rose-John, U. J. Tietge, B. Schieffer and K. Grote (2012). "Transsignaling of interleukin-6 crucially contributes to atherosclerosis in mice." Arterioscler Thromb Vasc Biol **32**(2): 281-290.
- Schumacher, N., D. Meyer, A. Mauermann, J. von der Heyde, J. Wolf, J. Schwarz, K. Knittler, G. Murphy, M. Michalek, C. Garbers, J. W. Bartsch, S. Guo, B. Schacher, P. Eickholz, A. Chalaris, S. Rose-John and B. Rabe (2015). "Shedding of endogenous interleukin-6 receptor (IL-6R) is governed by a disintegrin and metalloproteinase (ADAM) proteases while a full-length IL-6R isoform localizes to circulating microvesicles." J Biol Chem **290**(43): 26059-26071.
- Shah, J. J., L. Feng, S. K. Thomas, Z. Berkova, D. M. Weber, M. Wang, M. H. Qazilbash, R. E. Champlin, T. R. Mendoza, C. Cleeland and R. Z. Orlowski (2016). "Siltuximab (CNTO 328) with lenalidomide, bortezomib and dexamethasone in newly-diagnosed, previously untreated multiple myeloma: an open-label phase I trial." Blood Cancer J **6**: e396.
- Shiozawa, S., K. Tsumiyama, K. Yoshida and A. Hashiramoto (2011). "Pathogenesis of joint destruction in rheumatoid arthritis." Arch Immunol Ther Exp **59**(2): 89-95.
- Siegall, C. B., V. K. Chaudhary, D. J. FitzGerald and I. Pastan (1989). "Functional analysis of domains II, Ib, and III of Pseudomonas exotoxin." J Biol Chem **264**(24): 14256-14261.
- Siglianti, I., M. Bendszus, C. Kleinschnitz and G. Stoll (2006). "Cytokine profile of iron-laden macrophages: implications for cellular magnetic resonance imaging." J Neuroimmunol **173**(1-2): 166-173.
- Simons, J. P., J. M. Loeffler, R. Al-Shawi, S. Ellmerich, W. L. Hutchinson, G. A. Tennent, A. Petrie, J. G. Raynes, J. B. de Souza, R. A. Lawrence, K. D. Read and M. B. Pepys (2014). "C-reactive protein is essential for innate resistance to pneumococcal infection." Immunology **142**(3): 414-420.
- Simpson, R. J., A. Hammacher, D. K. Smith, J. M. Matthews and L. D. Ward (1997). "Interleukin-6: structure-function relationships." Protein Sci **6**(5): 929-955.
- Spehlmann, M. E., C. F. Manthey, S. M. Dann, E. Hanson, S. S. Sandhu, L. Y. Liu, F. K. Abdelmalak, M. A. Diamanti, K. Retzlaff, J. Scheller, S. Rose-John, F. R. Greten, J. Y.

- Wang and L. Eckmann (2013). "Trp53 deficiency protects against acute intestinal inflammation." J Immunol **191**(2): 837-847.
- Sprecher, C. A., F. J. Grant, J. W. Baumgartner, S. R. Presnell, S. K. Schrader, T. Yamagiwa, T. E. Whitmore, P. J. O'Hara and D. F. Foster (1998). "Cloning and characterization of a novel class I cytokine receptor." Biochem Biophys Res Commun **246**(1): 82-90.
- Srinivas, M., P. A. Morel, L. A. Ernst, D. H. Laidlaw and E. T. Ahrens (2007). "Fluorine-19 MRI for visualization and quantification of cell migration in a diabetes model." Magn Reson Med **58**(4): 725-734.
- Stoddard, B. L. (2011). "Homing endonucleases: from microbial genetic invaders to reagents for targeted DNA modification." Structure **19**(1): 7-15.
- Strangfeld, A., A. Richter, B. Siegmund, P. Herzer, K. Rockwitz, W. Demary, M. Aringer, Y. Meissner, A. Zink and J. Listing (2017). "Risk for lower intestinal perforations in patients with rheumatoid arthritis treated with tocilizumab in comparison to treatment with other biologic or conventional synthetic DMARDs." Ann Rheum Dis **76**(3): 504-510.
- Swerdlow, D. I., M. V. Holmes, K. B. Kuchenbaecker, J. E. L. Engmann, T. Shah, R. Sofat, Y. R. Guo, C. Chung, A. Peasey, R. P. Ster, S. P. Mooijaart, H. A. Ireland, M. Leusink, C. Langenberg, K. Li, J. Palmén, P. Howard, J. A. Cooper, F. Drenos, J. Hardy, M. A. Nalls, Y. R. Li, G. Lowe, M. Stewart, S. J. Bielinski, J. Peto, N. J. Timpson, J. Gallacher, M. Dunlop, R. Houlston, I. Tomlinson, I. Tzoulaki, J. Luan, J. M. A. Boer, N. G. Forouhi, N. C. Onland-Moret, Y. T. van der Schouw, R. B. Schnabel, J. A. Hubacek, R. Kubinova, M. Baceviciene, A. Tamosiunas, A. Pajak, R. Topor-Madry, S. A. Maljutina, D. Baldassarre, B. Sennblad, E. Tremoli, U. de Faire, L. Ferrucci, S. Bandenelli, T. Tanaka, J. F. Meschia, A. Singleton, G. Navis, I. M. Leach, S. J. L. Bakker, R. T. Gansevoort, I. Ford, S. E. Epstein, M. S. Burnett, J. M. Devaney, J. W. Jukema, R. G. J. Westendorp, G. J. de Borst, Y. van der Graaf, P. A. de Jong, A. H. Maitland-van der Zee, O. H. Klungel, A. de Boer, P. A. Doevendans, J. W. Stephens, C. B. Eaton, J. G. Robinson, J. E. Manson, F. G. R. Fowkes, T. M. Frayling, J. F. Price, P. H. Whincup, R. W. Morris, D. A. Lawlor, G. D. Smith, Y. Ben-Shlomo, S. Redline, L. A. Lange, M. Kumari, N. J. Wareham, W. M. M. Verschuren, E. J. Benjamin, J. C. Whittaker, A. Hamsten, F. Dudbridge, J. A. C. Delaney, A. Wong, D. Kuh, R. Hardy, B. A. Castillo, J. J. Connolly, P. van der Harst, E. J. Brunner, M. G. Marmot, C. L. Wassel, S. E. Humphries, P. J. Talmud, M. Kivimaki, F. W. Asselbergs, M. Voevoda, M. Bobak, H. Pikhart, J. G. Wilson, H. Hakonarson, A. P. Reiner, B. J. Keating, N. Sattar, A. D. Hingorani, J. P. Casas and I.-R. M. R (2012). "The interleukin-6 receptor as a target for prevention of coronary heart disease: a mendelian randomisation analysis." Lancet **379**(9822): 1214-1224.
- Taga, T. and T. Kishimoto (1997). "Gp130 and the interleukin-6 family of cytokines." Annu Rev Immunol **15**: 797-819.
- Takahashi-Tezuka, M., Y. Yoshida, T. Fukada, T. Ohtani, Y. Yamanaka, K. Nishida, K. Nakajima, M. Hibi and T. Hirano (1998). "Gab1 acts as an adapter molecule linking the cytokine receptor gp130 to ERK mitogen-activated protein kinase." Mol Cell Biol **18**(7): 4109-4117.
- Takeuchi, T., Y. Tanaka, H. Yamanaka, K. Amano, R. Nagamine, W. Park, K. Shiozawa, M. Tsukano, J. C. Wei, J. Shao, O. Togo and H. Mashimo (2016). "Efficacy and safety of olokizumab in Asian patients with moderate-to-severe rheumatoid arthritis, previously exposed to anti-TNF therapy: results from a randomized phase II trial." Mod Rheumatol **26**(1): 15-23.
- Tanaka, Y. and E. M. Mola (2014). "IL-6 targeting compared to TNF targeting in rheumatoid arthritis: studies of olokizumab, sarilumab and sirukumab." Annals of the Rheumatic Diseases **73**(9): 1595-1597.
- Temme, S., F. Bonner, J. Schrader and U. Flogel (2012). "19F magnetic resonance imaging of endogenous macrophages in inflammation." Wiley Interdiscip Rev Nanomed Nanobiotechnol **4**(3): 329-343.

- Temme, S., C. Grapentin, T. Güden-Silber and U. Flögel (2016). "Fluorine magnetic resonance imaging chapter 4: active targeting of perfluorocarbon nanoemulsions." 103-140.
- Temme, S., C. Grapentin, C. Quast, C. Jacoby, M. Grandoch, Z. Ding, C. Owenier, F. Mayenfels, J. W. Fischer, R. Schubert, J. Schrader and U. Flögel (2015). "Noninvasive imaging of early venous thrombosis by ¹⁹F magnetic resonance imaging with targeted perfluorocarbon nanoemulsions." *Circulation* **131**(16): 1405-1414.
- Temme, S., C. Jacoby, Z. Ding, F. Bonner, N. Borg, J. Schrader and U. Flögel (2014). "Technical advance: monitoring the trafficking of neutrophil granulocytes and monocytes during the course of tissue inflammation by noninvasive ¹⁹F MRI." *J Leukoc Biol* **95**(4): 689-697.
- Tenhumberg, S., B. Schuster, L. Zhu, M. Kovaleva, J. Scheller, K. J. Kallen and S. Rose-John (2006). "gp130 dimerization in the absence of ligand: preformed cytokine receptor complexes." *Biochem Biophys Res Commun* **346**(3): 649-657.
- Thakur, M. L., J. P. Lavender, R. N. Arnot, D. J. Silvester and A. W. Segal (1977). "Indium-111-labeled autologous leukocytes in man." *J Nucl Med* **18**(10): 1014-1021.
- Tirotta, I., V. Dichiarante, C. Pigliacelli, G. Cavallo, G. Terraneo, F. B. Bombelli, P. Metrangolo and G. Resnati (2015). "(¹⁹F) magnetic resonance imaging (MRI): from design of materials to clinical applications." *Chem Rev* **115**(2): 1106-1129.
- Ullah, M. A., J. A. Revez, Z. Loh, J. Simpson, V. Zhang, L. Bain, A. Varelias, S. Rose-John, A. Blumenthal, M. J. Smyth, G. R. Hill, M. B. Sukkar, M. A. Ferreira and S. Phipps (2015). "Allergen-induced IL-6 trans-signaling activates gammadelta T cells to promote type 2 and type 17 airway inflammation." *J Allergy Clin Immunol* **136**(4): 1065-1073.
- Vaneycken, I., N. Devoogdt, N. Van Gassen, C. Vincke, C. Xavier, U. Wernery, S. Muyldermans, T. Lahoutte and V. Caveliers (2011). "Preclinical screening of anti-HER2 nanobodies for molecular imaging of breast cancer." *FASEB J* **25**(7): 2433-2446.
- Varghese, J. N., R. L. Moritz, M. Z. Lou, A. Van Donkelaar, H. Ji, N. Ivancic, K. M. Branson, N. E. Hall and R. J. Simpson (2002). "Structure of the extracellular domains of the human interleukin-6 receptor alpha-chain." *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(25): 15959-15964.
- Viswanathan, S., T. Benatar, S. Rose-John, D. A. Lauffenburger and P. W. Zandstra (2002). "Ligand/receptor signaling threshold (LIST) model accounts for gp130-mediated embryonic stem cell self-renewal responses to LIF and HIL-6." *Stem Cells* **20**(2): 119-138.
- Waage, A., P. Brandtzaeg, A. Halstensen, P. Kierulf and T. Espevik (1989a). "The complex pattern of cytokines in serum from patients with meningococcal septic shock - association between interleukin-6, interleukin-1, and fatal outcome." *J Exp Med* **169**(1): 333-338.
- Waage, A., P. Brandtzaeg, A. Halstensen, P. Kierulf and T. Espevik (1989b). "The complex pattern of cytokines in serum from patients with meningococcal septic shock. Association between interleukin 6, interleukin 1, and fatal outcome." *J Exp Med* **169**(1): 333-338.
- Wade, R., R. Hodgson, M. Biswas, M. Harden and N. Woolacott (2017). "A review of ruxolitinib for the treatment of myelofibrosis: a critique of the evidence." *Pharmacoeconomics* **35**(2): 203-213.
- Waiczies, H., S. Lepore, N. Janitzek, U. Hagen, F. Seifert, B. Ittermann, B. Purfurst, A. Pezzutto, F. Paul, T. Niendorf and S. Waiczies (2011). "Perfluorocarbon particle size influences magnetic resonance signal and immunological properties of dendritic cells." *PLoS One* **6**(7): e21981.
- Walker, F., H. H. Zhang, V. Matthews, J. Weinstock, E. C. Nice, M. Ernst, S. Rose-John and A. W. Burgess (2008). "IL6/sIL6R complex contributes to emergency granulopoietic responses in G-CSF- and GM-CSF-deficient mice." *Blood* **111**(8): 3978-3985.

- Wang, Y., Z. Fan, L. Shao, X. Kong, X. Hou, D. Tian, Y. Sun, Y. Xiao and L. Yu (2016). "Nanobody-derived nanobiotechnology tool kits for diverse biomedical and biotechnology applications." Int J Nanomedicine **11**: 3287-3303.
- Weldon, J. E. and I. Pastan (2011). "A guide to taming a toxin-recombinant immunotoxins constructed from Pseudomonas exotoxin A for the treatment of cancer." FEBS J **278**(23): 4683-4700.
- Weldon, J. E., L. Xiang, O. Chertov, I. Margulies, R. J. Kreitman, D. J. FitzGerald and I. Pastan (2009). "A protease-resistant immunotoxin against CD22 with greatly increased activity against CLL and diminished animal toxicity." Blood **113**(16): 3792-3800.
- Wesolowski, J., V. Alzogaray, J. Reyelt, M. Unger, K. Juarez, M. Urrutia, A. Cauerhff, W. Danquah, B. Rissiek, F. Scheuplein, N. Schwarz, S. Adriouch, O. Boyer, M. Seman, A. Licea, D. V. Serreze, F. A. Goldbaum, F. Haag and F. Koch-Nolte (2009). "Single domain antibodies: promising experimental and therapeutic tools in infection and immunity." Med Microbiol Immunol **198**(3): 157-174.
- Wienke, D., J. R. MacFadyen and C. M. Isacke (2003). "Identification and characterization of the endocytic transmembrane glycoprotein Endo180 as a novel collagen receptor." Mol Biol Cell **14**(9): 3592-3604.
- Wiesinger, M. Y., S. Haan, S. Wuller, M. E. Kauffmann, T. Recker, A. Kuster, P. C. Heinrich and G. Muller-Newen (2009). "Development of an IL-6 inhibitor based on the functional analysis of murine IL-6Ralpha(1)." Chem Biol **16**(7): 783-794.
- Winnard, P. T., Jr., J. B. Kluth, Y. Kato, D. Artemov and V. Raman (2007). "Development of novel chimeric transmembrane proteins for multimodality imaging of cancer cells." Cancer Biol Ther **6**(12): 1889-1899.
- Winthrop, K. L. (2017). "The emerging safety profile of JAK inhibitors in rheumatic disease." Nat Rev Rheumatol **13**(4): 234-243.
- Wolf, J., G. H. Waetzig, A. Chalaris, T. M. Reinheimer, H. Wege, S. Rose-John and C. Garbers (2016). "Different soluble forms of the Interleukin-6 family signal transducer gp130 fine-tune the blockade of Interleukin-6 trans-signaling." J Biol Chem **291**(31): 16186-16196.
- Worth, R. G., L. Mayo-Bond, M. K. Kim, J. G. van de Winkel, R. F. Todd, 3rd, H. R. Petty and A. D. Schreiber (2001). "The cytoplasmic domain of FcgammaRIIA (CD32) participates in phagolysosome formation." Blood **98**(12): 3429-3434.
- Wunderlich, F. T., P. Strohle, A. C. Konner, S. Gruber, S. Tovar, H. S. Bronneke, L. Juntti-Berggren, L. S. Li, N. van Rooijen, C. Libert, P. O. Berggren and J. C. Bruning (2010). "Interleukin-6 signaling in liver-parenchymal cells suppresses hepatic inflammation and improves systemic insulin action." Cell Metab **12**(3): 237-249.
- Yamasaki, K., T. Taga, Y. Hirata, H. Yawata, Y. Kawanishi, B. Seed, T. Taniguchi, T. Hirano and T. Kishimoto (1988). "Cloning and expression of the human interleukin-6 (BSF-2/IFN beta 2) receptor." Science **241**(4867): 825-828.
- Yokoyama, A., N. Kohno, S. Fujino, H. Hamada, Y. Inoue, S. Fujioka, S. Ishida and K. Hiwada (1995). "Circulating interleukin-6 levels in patients with bronchial asthma." Am J Respir Crit Care Med **151**(5): 1354-1358.
- Yokoyama, A., N. Kohno, K. Sakai, K. Kondo, Y. Hirasawa and K. Hiwada (1997). "Circulating levels of soluble interleukin-6 receptor in patients with bronchial asthma." Am J Respir Crit Care Med **156**(5): 1688-1691.
- Yoshizaki, K., T. Matsuda, N. Nishimoto, T. Kuritani, L. Taeho, K. Aozasa, T. Nakahata, H. Kawai, H. Tagoh, T. Komori and et al. (1989). "Pathogenic significance of interleukin-6 (IL-6/BSF-2) in Castleman's disease." Blood **74**(4): 1360-1367.
- Youn, H. and K. J. Hong (2012). "In vivo non invasive molecular imaging for immune cell tracking in small animals." Immune Netw **12**(6): 223-229.
- Zohlh ofer, D., L. Graeve, S. Rose-John, H. Schooltink, E. Dittrich and P. Heinrich (1992). "The hepatic interleukin-6 receptor. Down-regulation of the interleukin-6 binding subunit (gp80) by its ligand." FEBS Lett **306**(2-3): 219-222.

8. Anhang

8.1 DNA-Sequenz von CIR2 für den *Knock-in* in den murinen Rosa26 Lokus

EcoRI **loxP**
 1 GAATTC AACG TCGAGATAAC TTCGTATAGC ATACATTATA CGAAGTTATA

Neomycin Resistenz

51 TGCCACCATG ATTGAACAAG ATGGATTGCA CGCAGGTTCT CCGGCCGCTT
 101 GGGTGGAGAG GCTATTCGGC TATGACTGGG CACAACAGAC AATCGGCTGC
 151 TCTGATGCCG CCGTGTTCGG GCTGTCAGCG CAGGGGCGCC CGGTTCTTTT
 201 TGTCAAGACC GACCTGTCCG GTGCCCTGAA TGAAC TGCAA GACGAGGCAG
 251 CGCGGCTATC GTGGCTGGCC ACGACGGGCG TTCCTTGCGC AGCTGTGCTC
 301 GACGTTGTCA CTGAAGCGGG AAGGGACTGG CTGCTATTGG GCGAAGTGCC
 351 GGGCAGGAT CTCCTGT CAT CTCACCTTGC TCCTGCCGAG AAAGTATCCA
 401 TCATGGCTGA TGCAATGCGG CGGCTGCATA CGCTTGATCC GGCTACCTGC
 451 CCATTCGACC ACCAAGCGAA ACATCGCATC GAGCGAGCAC GTACTCGGAT
 501 GGAAGCCGGT CTTGTGATC AGGATGATCT GGACGAAGAG CATCAGGGGC
 551 TCGCGCCAGC CGAACTGTTT GCCAGGCTCA AGGCGAGCAT GCCCGACGGC
 601 GAGGATCTCG TCGTGACCCA TGGCGATGCC TGCTTGCCGA ATATCATGGT
 651 GGAAAATGGC CGCTTTTCTG GATTCATCGA CTGTGGCCGG CTGGGTGTGG
 701 CGGACCCTTA TCAGGACATA GCGTTGGCTA CCCGTGATAT TGCTGAAGAG
 751 CTTGGCGGCG AATGGGCTGA CCGCTTCTC GTGCTTTACG GTATCGCCGC
 801 TCCGATTTCG CAGCGCATCG CTTTCTATCG CTTTCTTGAC GAGTTCTTCT
 851 AGGCGGGACT CTGGGGTTCG AAATGACCGA CCAAGCGACG CCAACCTGCT
 901 CATCACGAGA TTTTCGATTC ACCGCCGCTT TCTATGAAAG GTTGGGCTTC
 951 GGAATCGTTT TCCGGGACGC CGGCTGGATG ATCCTCCAGC GCGGGGATCT
 1001 CATGCTGGAG TTCTTCGCCC ACCCTAGGGG GAGGCTAACT GAAACACGGA

loxP

1051 AGGAGACAAT ACCGGAAGGA ACCCGCGCTA TGACGGCAAT AAATAACTTC
 1101 GTATAGCATA CATTATACGA AGTTATATAC CGG

AgeI HindIII
ACCGGTA AGCTTCGCCA

CIR2

1151 CCATGAGCAG CAGCTGCTCA GGGCTGAGCA GGGTCCTGGT GGCCGTGGCT
 1201 ACAGCCCTGG TGTCTGCCTC CTCCGAACAA AAATCATCT CAGAAGAGGA
 1251 TCTGGGATCC CAAGTGCAGC TGGTTGAAAG CGGCGGTGCG CTGGTTCAGC
 1301 CGGGTGGTAG CCTGCGTCTG AGCTGTGCGG CGAGCGGCTT TCCGGTGAAC
 1351 CGTTATAGCA TGCGTTGGTA TCCTCAGGCA CCGGGCAAAG AACGTGAATG
 1401 GGTGGCGGGC ATGAGCAGCG CGGGTGATCG TAGCAGCTAT GAAGATAGCG
 1451 TGAAAGGCCG TTTTACCATT AGCCGTGATG ATGCGCGTAA CACCGTGTAT
 1501 CTGCAGATGA ACAGCCTGAA ACCGGAAGAT ACCGCGGTGT ATTATTGCAA
 1551 CGTGAACGTG GGCTTTGAAT ATTGGGGCCA GGGCACCCAG GTTACCGTTA
 1601 GCTCTGAGTT CACAGAAATCC AGGAGTCCTC CACTGGTTGC TGGAGGGAGC
 1651 CTGGCCTTCG GAACGCTCCT CTGCATTGCC ATTGTTCTGA GATCTAGAAG
 1701 AAGGCAGAGC ATCGAGAGAG GCGCCTTCGA GGGCGCTAGA TACAGCAGAA
 1751 GCAGCAGCAG CCCTACCGAG GCCACCGAGA AGAACATCCT GGTGTCCGAC
 1801 ATGGAAATGA ACGAGCAGCA GGAATAA

NotI
GCG GCCGCGTCAT AATCAGCCAT

1851 ACCACATTTG TAGAGGTTTT ACTTGCTTTA AAAAACCTCC CAAACCTCCC
 1901 CCTGAACCTG AAACATAAAA TGAATGCAAT TGTGTTGTT AACTTGGTTA
 1951 TTGCAGCTTA TAATGGTTAC AAATAAAGCA ATAGCATCCC AAATTTACA
 2001 AATAAAGCAT TTTTTTCACT GCATTCTAGT TGTGGTTTGT CCAAACCTCAT

EcoRI
GAATTC

2051 CAATGTATCT TAAGGCTGGT CGAGACCGGT

8.2 Analyse der aktivierten Signalwege von Ba/F3-gp130 Zellen nach Hyper-IL-6 Stimulation

Tabelle 8.1: Übersicht bezüglich der Aktivierung von induzierten Signalwegen in Ba/F3-gp130 Zellen nach Stimulation mit 100 ng/ml Hyper-IL-6. Durchgeführt auf DAVID.org

KeGG Signalweg	Anzahl (Gene)	% (involvierte Gene/Gesamtanzahl Gene)	p-Wert	Benferroni-Analyse
TNF signaling pathway	13	10,1	7,9E-10	1,1E-7
Cytokine-cytokine receptor interaction	15	11,6	1,4E-7	2,0E-5
Jak-STAT signaling pathway	12	9,3	2,1E-7	2,9E-5
Osteoclast differentiation	10	7,8	4,8E-6	6,7E-4
Toll-like receptor signaling pathway	8	6,2	7,1E-5	9,8E-3
Chagas disease (American trypanosomiasis)	8	6,2	8,1E-5	1,1E-2
MAPK signaling pathway	11	8,5	2,4E-4	3,2E-2
Influenza A	9	7,0	3,4E-4	4,5E-2
Transcriptional misregulation in cancer	8	6,2	1,5E-3	1,8E-1
NF-kappa B signaling pathway	6	4,7	3,1E-3	3,4E-1
Hepatitis B	7	5,4	3,7E-3	4,0E-1
Cytosolic DNA-sensing pathway	5	3,9	4,1E-3	4,3E-1
Herpes simplex infection	8	6,2	5,2E-3	5,2E-1
African trypanosomiasis	4	3,1	5,3E-3	5,2E-1
Prolactin signaling pathway	5	3,9	6,5E-3	5,9E-1
HTLV-1 infection	9	7,0	7,3E-3	6,4E-1
Rheumatoid arthritis	5	3,9	9,7E-3	7,4E-1
FoxO signaling pathway	6	4,7	1,2E-2	8,1E-1
Malaria	4	3,1	1,3E-2	8,3E-1
T cell receptor signaling pathway	5	3,9	2,2E-2	9,5E-1
Inflammatory bowel disease (IBD)	4	3,1	2,2E-2	9,6E-1
Apoptosis	4	3,1	2,3E-2	9,6E-1
Insulin resistance	5	3,9	2,6E-2	9,7E-1
p53 signaling pathway	4	3,1	3,1E-2	9,9E-1
Pertussis	4	3,1	4,0E-2	1,0E0
Salmonella infection	4	3,1	4,5E-2	1,0E0
Hepatitis C	5	3,9	5,0E-2	1,0E0
Measles	5	3,9	5,0E-2	1,0E0
MicroRNAs in cancer	7	5,4	6,3E-2	1,0E0
PI3K-Akt signaling pathway	8	6,2	6,7E-2	1,0E0
Cell adhesion molecules (CAMs)	5	3,9	8,4E-2	1,0E0
Type II diabetes mellitus	3	2,3	9,2E-2	1,0E0
Staphylococcus aureus infection	3	2,3	9,2E-2	1,0E0

8.3 Publikationen

Publikationen im Rahmen dieser Arbeit:

Baran, P., S. Hansen, G. H. Waetzig, M. Akbarzadeh, L. Lamertz, H. J. Huber, M. R. Ahmadian, J. M. Moll and J. Scheller (2018). "The balance of Interleukin (IL)-6, IL-6:soluble IL-6 receptor (IL-6R) and IL-6:sIL-6R:sgp130 complexes allows simultaneous classic and trans-signaling." J Biol Chem **293**(18): 6762-6775.

Temme*, S., **P. Baran***, P. Bouvain*, C. Grapentin, W. Krämer, B. Knebel, H. Al-Hasani, J.M. Moll, D.M Floss, J. Schrader, R. Schubert and U. Flögel and J. Scheller. "A synthetic Cargo Internalization Receptor (CIR) system for nanoparticle tracking of individual cell populations by ¹⁹F MRI." (Manuskript in Vorbereitung) *Gleichberechtigte Autoren.

Weitere Publikationen:

Engelowski E., A. Schneider, M. Franke, H. Xu, R. Clemen, A. Lang, **P. Baran**, C. Binsch, B. Knebel, H. Al-Hasani, J. M. Moll, D. M. Floss, P. Lang and J. Scheller (2018). "Synthetic Cytokine Receptors transmit biological signals using artificial ligands" Nat Commun (Manuskript im Druck).

Lamertz L., F. Rummel, **P. Baran**, J.M. Moll, D.M Floss and J. Scheller. (2018) "Soluble gp130 binds to membrane-bound Interleukin (IL)-6:IL-6 receptor complexes and blocks trans-activation but not autocrine classic and trans-signaling." Sci Signal (Manuskript in Revision).

Moll, J. M., M. Wehmöller, N. C. Frank, L. Homey, **P. Baran**, C. Garbers, L. Lamertz, J. H. Axelrod, E. Galun, H. D. Mootz and J. Scheller (2017). "Split(2) protein-ligation generates active IL-6-type hyper-cytokines from inactive precursors." ACS Synth Biol **6**(12): 2260-2272.

Schröder, J., J. M. Moll, **P. Baran**, J. Grötzinger, J. Scheller and D. M. Floss (2015). "Non-canonical interleukin 23 receptor complex assembly: p40 protein recruits interleukin 12 receptor beta1 via site II and induces p19/interleukin 23 receptor interaction via site III." J Biol Chem **290**(1): 359-370.

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

Sommer, J., E. Engelowski, **P. Baran**, C. Garbers, D. M. Floss and J. Scheller (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

Baran, P., R. Nitz, J. Grotzinger, J. Scheller and C. Garbers (2013). "Minimal interleukin 6 (IL-6) receptor stalk composition for IL-6 receptor shedding and IL-6 classic signaling." J Biol Chem **288**(21): 14756-14768.

8.4 Danksagungen

Zuerst möchte ich mich an dieser Stelle herzlichst bei meinem Erstgutachter und Betreuer Herrn Prof. Dr. Jürgen Scheller für die Möglichkeit der Durchführung dieser Arbeit am Institut für Biochemie und Molekularbiologie II bedanken. Außerdem gilt mein Dank für die intensive hervorragende Betreuung, die konstruktiven Gespräche und Denkanstöße, sowie die außerordentlich schnelle Korrektur dieser Arbeit. Ein herzliches Dankeschön dafür, dass jederzeit ein offenes Ohr vorhanden war und für die gastfreundlichen Abende in der Familientrattoria „Da Jürgen“.

Des Weiteren möchte ich mich sehr bei Herrn Prof. Dr. Ulrich Flögel für die Übernahme des Zweitgutachtens bedanken und die hierfür investierte Zeit.

Einen herzlichen Dank möchte ich an dieser Stelle an Dr. Sebastian Temme ausrichten, für viele konstruktive Gespräche und Ideen bezüglich der CIRs, sowie für den fachlichen und technischen Austausch und die Unterstützung. Auch an Pascal Bouvain möchte ich meinen Dank aussprechen, für die gute Zusammenarbeit.

Darüber hinaus möchte ich dem gesamten Institut für Biochemie und Molekularbiologie II meinen herzlichsten Dank aussprechen. Vielen Dank für diese freundschaftliche und kollegiale Arbeitsatmosphäre! Ganz besonders gilt mein Dank an meine alten Labornachbarn Dr. Manuel Franke und an Dr. Jutta Schröder. Es war mir stets eine Freude mit euch zu arbeiten und den ein oder anderen Spaß zu machen. PhD Jens Moll gilt mein Dank für die Unterstützung bei Proteinreinigungen und für viele fruchtbare fachliche sowie private Gespräche. Ein großer Dank auch an Dr. Doreen Floß, Larissa Lamertz, Erika Engelowski, Dr. Alexander Lang, Ilse Meyer, Feresthteh Kamrani, Selina Hansen, Jana Lissy und Marcel Buchholzer. Ein großes Dankeschön geht auch an Sofie Beier und Oliver Krumbach, für die letzte konstruktive und schnelle Korrektur dieser Arbeit. Am allermeisten möchte ich mich an dieser Stelle bei einer ganz besonderen Arbeitskollegin bedanken: Petra Oprée-Jeremic. Du bist einfach nur ein Engel auf Erden! Aller herzlichsten Dank dafür, dass du einfach du bist.

Bei Herrn Prof. Reza Ahmadian und Herrn Dr. Roland Piekorz möchte ich mich sehr für viele fachliche Gespräche, Ihre Hilfsbereitschaft, konstruktive Kritik und Ihre stets freundliche Art bedanken.

Dr. Christoph Garbers möchte ich besonders für die weiterhin andauernde Unterstützung und Freundschaft danken, sowie die außerordentlich gute Zeit im Institut, während meiner Masterarbeit.

Anhang

Bei Dr. David Calvo-Sanchez möchte ich mich sehr für die lange Freundschaft bedanken und für die Möglichkeit, meine ersten selbständigen Erfahrungen im Labor sammeln zu können. Die „Hasenjagd“ wird immer in Erinnerung bleiben.

Auch an all meine Freunde möchte ich ein riesiges Dankeschön aussprechen. An dieser Stelle möchte ich vor allem die „Endstation“ erwähnen: Janko, Sarah, Bambi, Eva, Nico, Kathy, Gina, Jesus, Timo und Simon. Chris und Sigggi, vielen Dank für die Beste WG die es je gegeben hat, es wird nie eine bessere geben. Natürlich auch ein riesiges Dankschön an meine langjährigen Weggefährten und Festivalmitstreiter: André, Valerie, Linda, Marc aka. Mausebär, Jan und die Muddi. Bei Lexxi möchte ich mich auch sehr für die seit Ewigkeiten bestehende Freundschaft bedanken. Vielen Dank für viele unfassbar schöne und unvergessliche Momente, Erlebnisse und für eure tiefgreifende Freundschaft. Danke für die Unterstützung, den Rückhalt und euer Verständnis, vor allem in den letzten Monaten. Auch einen Dank an alle, die ich an dieser Stelle vergessen habe.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern Christina und Jan Baran, meiner Schwester Anna Rosinski und meinen Neffen Basti und Emilie. Dafür, dass ihr mich in jeder Art und Weise unterstützt habt, euer Vertrauen entgegengebracht habt und jederzeit ein offenes Ohr hattet. Gerade in schwierigen Zeit hat mir euer bedingungsloser Rückhalt sehr viel Kraft gegeben. Ich kann nicht in Wort fassen, wie dankbar ich euch dafür bin. Abschließend gilt mein aller größter Dank Melanie Wehmöller. Aus aller tiefstem Herzen einfach Danke für alles! Dein Verständnis, deine Motivation, deine Hilfsbereitschaft und für die wunderschönen Urlaube sowie Tauchgänge mit dir. Danke, dass du ein Teil meines Lebens bist und es dich gibt!

8.5 Eidesstaatliche Erklärung

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

Die Dissertation wurde in der vorgelegten oder in einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Ich habe bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, den Mai 2018

(Paul Baran)