

Klassisches, *trans*- und *cluster-signaling* durch
HIL-6 und membrangebundene HIL-6 (mbHIL-
6) Varianten und Identifizierung von neuen kon-
stitutiven gp130 Varianten



Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

Larissa Lamertz
aus Mönchengladbach

Düsseldorf, August 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

Berichterstatter:

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

Referent: Prof. Dr. rer. nat. William F. Martin

Tag der mündlichen Prüfung: 14.01.2019

Für Fabian und meine Eltern

„Ich habe keine besondere Begabung, sondern
bin nur leidenschaftlich neugierig.“
Albert Einstein

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen und Fachbegriffe	1
Aminosäuren.....	5
Abbildungverzeichnis.....	6
1 Einleitung	10
1.1 Zytokine	10
1.2 Die Interleukin-6 Familie.....	10
1.3 Das Glykoprotein gp130	11
1.4 Klassisches <i>signaling</i> von Interleukin-6	12
1.5 <i>Trans-signaling</i> wird über den Komplex aus IL-6 und dem löslichen IL-6R ausgelöst.....	15
1.6 Inhibitoren des klassischen und <i>Trans-signalings</i>	16
1.7 Das Designer-Zytokin HIL-6.....	18
1.8 <i>Cluster-signaling</i> wird über Zell-Zell-Kontakt ausgelöst.....	19
1.9 Zielsetzung dieser Arbeit	22
2 Material und Methoden	23
2.1 Material.....	23
2.1.1 Antibiotika	23
2.1.2 Antikörper.....	23
2.1.2.1 Primäre Antikörper	23
2.1.2.2 Sekundäre Antikörper	26
2.1.3 Chemikalien.....	27
2.1.4 Enzyme	28
2.1.5 Geräte	28
2.1.6 Kits	30
2.1.7 Oligonukleotide	30
2.1.8 Plasmide	33
2.1.9 Puffer und Lösungen	33
2.1.10 Inhibitoren und rekombinante Zytokine	36
2.1.10.1 Inhibitoren	36
2.1.10.2 Rekombinante Proteine	37
2.1.11 Verbrauchsmaterialien.....	37
2.1.12 Zellkulturmedien	38
2.1.13 Zelllinien.....	38
2.1.13.1 Adherente Zelllinien.....	43
2.2 Methoden	45
2.2.1 Molekularbiologische Methoden.....	45

Inhaltsverzeichnis

2.2.1.1	Messung von DNA Konzentrationen.....	45
2.2.1.2	Agarose-Gelelektrophorese.....	45
2.2.1.3	DNA Extraktion aus Agarosegelen.....	45
2.2.1.4	Dephosphorylierung von Plasmid-DNA.....	46
2.2.1.5	Restriktion der DNA über Endonukleasen	46
2.2.1.6	Herstellung des pMows-Vektors.....	46
2.2.1.7	Ligation von DNA Fragmenten	47
2.2.1.8	Transformation in chemisch kompetente XL-Blue 1 Bakterien	47
2.2.1.9	Mini Präparation von Plasmid-DNA	48
2.2.1.10	Midi-Präparation von Plasmid-DNA	48
2.2.1.11	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	48
2.2.1.12	Sequenzierung von Plasmid-DNA	50
2.2.2	Proteinbiochemische Methoden	50
2.2.2.1	Durchflusszytometrie	50
2.2.2.2	Kopräzipitation	50
2.2.2.3	Herstellung von Lysaten	51
2.2.2.4	Bestimmung des Proteingehaltes in Lysaten	51
2.2.2.5	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	52
2.2.2.6	Western Blot	52
2.2.2.7	Ablösen der Antikörper von der Membran (Stripping)	53
2.2.2.8	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA).....	53
2.2.3	Zellkultur basierende Methoden.....	54
2.2.3.1	Adhärente Zellen.....	54
2.2.3.2	Suspensionszellen	54
2.2.3.3	Transfektion von adhärenen Zellen	54
2.2.3.4	Retrovirale Transduktion	55
2.2.3.5	Proliferationsassay	55
2.2.3.6	Stimulationsassay.....	56
2.2.3.7	Transaktivierung	56
2.2.3.8	Konstitutives shedding.....	57
2.2.4	Statistische Analysen.....	57
2.2.5	Proteinaufreinigung und Isolierung.....	57
2.2.5.1	Reinigung von rekombinantem nHIL-6-Fc aus Zellkulturüberständen.....	58
3	Ergebnisse	60
3.1	Der <i>Trans-signaling</i> Inhibitor sgp130(Fc) bindet auch an membranständige IL-6:IL-6R Komplexe.....	67
3.1.1	Der <i>Trans-signaling</i> Inhibitor sgp130(Fc) bindet den klassischen <i>signaling</i> Komplex auf der Zelloberfläche	68

Inhaltsverzeichnis

3.1.2	Der <i>Trans-signaling</i> Inhibitor sgp130(Fc) bindet an das mbHIL-6 Protein auf der Zelloberfläche von Ba/F3-Zellen	69
3.1.3	Der <i>Trans-signaling</i> Inhibitor sgp130(Fc) bindet auch an das nmbHIL-6 Protein auf der Zelloberfläche von Ba/F3-Zellen	73
3.1.4	Der <i>Trans-signaling</i> Inhibitor sgp130(Fc) bindet das mbHIL-11 Protein auf der Zelloberfläche von Ba/F3-Zellen	75
3.2	Der <i>Trans-signaling</i> Inhibitor sgp130Fc inhibiert das <i>Cluster-signaling</i>	76
3.2.1	IL-6:IL-6R induziertes <i>Cluster-signaling</i> wird durch sgp130Fc gehemmt...	78
3.2.2	Membrangebundenes HIL-6-induziertes <i>Cluster-signaling</i> wird durch sgp130Fc gehemmt	82
3.2.3	Natives-membrangebundenes HIL-6-induziertes <i>Cluster-signaling</i> wird durch sgp130Fc gehemmt	93
3.2.4	<i>Shedding</i> von mbHIL-6 und nmbHIL-6 erfolgt durch ADAM Proteasen.....	99
3.2.5	Die proteolytisch gespaltenen Hyperzytokine sind biologisch aktiv.....	104
3.2.6	Lösliche Hyperzytokine sind nicht an den beobachteten <i>Cluster-signaling</i> -Effekten beteiligt.....	107
3.2.7	Membrangebundenes HIL-11-induziertes <i>Cluster-signaling</i> wird durch sgp130Fc gehemmt	109
3.3	Rekombinantes nHIL-6-Fc stimuliert Zellen weniger stark, als rekombinantes HIL-6-Fc	114
3.4	Autokrines IL-6 und IL-11 <i>signaling</i>	116
3.4.1	Die membranständigen Hyperzytokine wurden auf Ba/F3-gp130-Zellen exprimiert	118
3.4.2	Die Zelllinien zeigen eine autokrine Proliferation	119
3.4.3	Autokrine STAT3-Phosphorylierung wird durch den Januskinase Inhibitor P6 gehemmt.....	121
3.4.4	Verhindern intrazelluläre präformierte Komplexe von gp130 und mbHIL-6 die extrazelluläre sgp130Fc Hemmung des autokrinen <i>Trans-signalings</i> ?	125
3.5	Herstellung von konstitutiv aktiven, Ligandenunabhängigen gp130 Rezeptoren durch Deletion der Stalkregion und der Domänen 4-6	130
3.5.1	Aufbau von gp130	130
3.5.2	Alle gp130 Varianten werden exprimiert	133
3.5.3	Die gp130 Varianten werden auf der Zelloberfläche von Ba/F3-Zellen exprimiert	135
3.5.4	Die gp130 Varianten mit kombinierter Deletion der D4 bis D6 und der Stalkregion induzieren eine Zytokin-unabhängige STAT3 Phosphorylierung.....	136
3.5.5	Die konstitutiv aktiven gp130 Varianten induzieren liganden unabhängige ERK1/2 Phosphorylierung	138
3.5.6	Die STAT3 Phosphorylierung wird durch den Janus Kinase Inhibitor P6 inhibiert	140
3.5.7	Inhibition der Proliferation durch den Januskinase Inhibitor P6.....	142

Inhaltsverzeichnis

3.5.8	HIL-6-Fc bindet an den gp130-Komplex	143
4	Diskussion	146
4.1	Warum ist sgp130(Fc) ein selektiver Inhibitor des IL-6 <i>Trans-signalings</i> ?.....	146
4.2	sgp130Fc hemmt das <i>Cluster-signaling</i>	147
4.3	Autokrines klassisches und <i>Trans-signaling</i> lässt sich nicht durch sgp130(Fc) hemmen.....	149
4.4	Deletion der Fibronectin-III Domänen und der Stalkregion resultiert in einen ligandenunabhängigen konstitutiv aktiven gp130 Rezeptor	151
5	Zusammenfassung.....	154
6	Summary	156
7	Literaturverzeichnis.....	158
8	Anhang	167
8.1	Klonierungsstrategien	167
8.2	Publikationsverzeichnis	191
8.3	Danksagung	193
8.4	Eidesstattliche Versicherung.....	195

Abkürzungen und Fachbegriffe

ADAM	<i>A Disintegrin and Metalloproteinase</i>
AS	Aminosäure(n)
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
°C	Grad Celsius
Da	Dalton
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbant Assay</i>
FCS	fötales Kälberserum
g	Gramm oder ein Vielfaches der Erdbeschleunigung
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
gp130	Glykoprotein 130
h	human bzw. Stunde
L	Liter
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IL-6R	Interleukin-6 Rezeptor

Abkürzungen und Fachbegriffe

IZD	Intrazelluläre Domäne
JAK	Janus-Kinase
Kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LIF-R	<i>Leukemia Inhibitory Factor Receptor</i>
LPS	Lipopolysaccharide
MAPK	<i>Mitogen Activated Protein Kinase</i>
mg	Milligramm
Mio	Millionen
min	Minuten
ml	Milliliter
mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
n.s.	nicht signifikant
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion (<i>Polymerase chain reaction</i>)
pg	Pikogramm
pH	Potentia Hydrogenii

Abkürzungen und Fachbegriffe

PI3K	Phosphoinositol-3-Kinase
PIAS	<i>Protein Inhibitor of Activated STAT</i>
POD	Peroxidase
PVDF	Polyvinylidenfluorid
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
SOCS	<i>Suppressor Of Cytokine Signaling</i>
STAT	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription</i>
TBS	<i>Tris Buffered Saline</i>
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TMD	Transmembrandomäne
U	<i>Units</i>
µg	Mikrogramm

Abkürzungen und Fachbegriffe

μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
V	Volt
VHH	Einzeldomänenantikörper bzw. Nanobody
V/V	Volumen pro Volumen
ZBM	Zytokinbindungsmodul

Aminosäuren

A (Ala)	Alanin
C (Cys)	Cystein
D	Asparaginsäure
E (Glu)	Glutaminsäure
F (Phe)	Phenylalanin
G (Gly)	Glycin
H	Histidin
I (Ile)	Isoleucin
K (Lys)	Lysin
L (Leu)	Leucin
M	Methionin
N (Asn)	Asparagin
P	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: Eine Übersicht über einige Mitglieder der Interleukin-6 Familie.	11
Abbildung 1.2: Übersicht über den Aufbau von gp130.	12
Abbildung 1.3: Schematische Darstellung des klassischen <i>signalings</i>	13
Abbildung 1.4: Schematische Darstellung der STAT3-Phosphorylierung im klassischen <i>signaling</i>	14
Abbildung 1.5: <i>Shedding</i> des IL-6R über ADAM-Proteasen.	16
Abbildung 1.6: Übersicht über die Inhibitoren des klassischen und <i>Trans-signalings</i>	18
Abbildung 1.7: Schematische Darstellung von HIL-6.	19
Abbildung 1.8: Schematische Darstellung des <i>Cluster-signalings</i> von Ba/F3-IL-6R-Zellen mit IL-6 und Ba/F3-gp130-Zellen.	20
Abbildung 1.9: Übersicht über die drei bekannten <i>signaling</i> Arten.	21
Abbildung 3.1: Schematische Darstellung der Aktivierung der Interleukin-6 Signalkaskaden.	60
Abbildung 3.2: Schematische Darstellung des IL-6 <i>Trans-signalings</i>	61
Abbildung 3.3: Zusammenfassung der membrangebundenen Hyper-IL-6 Bausteine.	61
Abbildung 3.4: Die IL-6R Stalkregion im mbHIL-6 wurde um jeweils 15 Aminosäuren verkürzt.	63
Abbildung 3.5: Durch eine Punktmutation im IL-6R wurde die proteolytischen Spaltung inhibiert.	65
Abbildung 3.6: Generierung des nativen mbHIL-6 (nmbHIL-6).	66
Abbildung 3.7: Zusammenfassung der membrangebundenen Hyper-IL-11 Varianten.	67
Abbildung 3.8: Schematische Darstellung der Bindung von sgp130(Fc) an den membranständigen IL-6:IL-6R Komplex.	67
Abbildung 3.9: Durchflusszytometrie von Ba/F3-IL-6R-Zellen mit IL-6 und sgp130Fc Nachweis.	69
Abbildung 3.10: Schematische Darstellung der Bindung von sgp130(Fc) an mbHIL-6. ...	69
Abbildung 3.11: Nachweis der Rezeptoren und Mutationsvarianten von mbHIL-6 auf der Zelloberfläche.	70
Abbildung 3.12: Expression der Proteine mbHIL-6 und Varianten in HEK293-Zellen.	71
Abbildung 3.13: Nachweis der Bindung von sgp130Fc an mbHIL-6, mbHIL-6 Δ 15, mbHIL-6 Δ 30 und mbHIL-6 Δ 45.	72
Abbildung 3.14: Expression der Proteine nmbHIL-6 und Varianten in HEK293-Zellen. ...	73
Abbildung 3.15: Schematische Darstellung der Bindung von sgp130 an nmbHIL-6.	74
Abbildung 3.16: Oberflächenexpression von nmbHIL-6 und Bindung von sgp130Fc an nmbHIL-6.	74
Abbildung 3.17: Schematische Darstellung der Bindung von sgp130 an den IL-11:IL-11R Komplex und mbHIL-11.	75
Abbildung 3.18: Oberflächenexpression von IL-11R assoziierten Komplexen und Bindung von sgp130Fc an diese.	76
Abbildung 3.19: Schematische Darstellung des <i>Cluster-signalings</i>	77
Abbildung 3.20: Proliferation durch <i>Cluster-signaling</i> von Ba/F3-gp130- und Ba/F3-IL-6R-Zellen.	79
Abbildung 3.21: STAT3 Phosphorylierung durch <i>Cluster-signaling</i>	80
Abbildung 3.22: Inhibition des <i>sheddings</i> des IL-6R im <i>Cluster-signaling</i>	81
Abbildung 3.23: Inhibition der <i>Cluster-signaling</i> induzierten Proliferation von Ba/F3-gp130-Zellen durch Ba/F3-mbHIL-6-Zellen.	83

Abbildungungsverzeichnis

Abbildung 3.24: Inhibition der <i>Cluster-signaling</i> induzierten Proliferation von Ba/F3-gp130-Zellen durch Ba/F3-mbHIL-6 Δ 15-, Ba/F3-mbHIL-6 Δ 30-, oder Ba/F3-mbHIL-6 Δ 45-, Zellen.	84
Abbildung 3.25: Inhibition der <i>Cluster-signaling</i> induzierten Proliferation von Ba/F3-gp130-Zellen durch Ba/F3-HIL-6-Zellen.	86
Abbildung 3.26: Inhibition der <i>Cluster-signaling</i> induzierten STAT3 Phosphorylierung von Ba/F3-gp130-Zellen durch Ba/F3-mbHIL-6 und Mutationsvarianten.	87
Abbildung 3.27: Inhibition der <i>Cluster-signaling</i> induzierten STAT3 Phosphorylierung von Ba/F3-gp130-Zellen durch Ba/F3-mbHIL-6 und Mutationsvarianten.	91
Abbildung 3.28: Inhibition der <i>Cluster-signaling</i> induzierten Proliferation von Ba/F3-gp130-Zellen durch Ba/F3-nmbHIL-6-Zellen.	94
Abbildung 3.29: Inhibition der <i>Trans-signaling</i> induzierten Proliferation von Ba/F3-gp130-Zellen durch Ba/F3-nHIL-6-Zellen.	95
Abbildung 3.30: Inhibition der <i>Cluster-signaling</i> induzierten und <i>Trans-signaling</i> induzierten STAT3 Phosphorylierung von Ba/F3-gp130-Zellen durch Ba/F3-nmbHIL-6-Zellen und Ba/F3-gp130-Zellen durch Ba/F3-nHIL-6-Zellen.	98
Abbildung 3.31: Quantifizierung des durch IL-6R erzeugten sIL-6R.	100
Abbildung 3.32: Quantifizierung des durch mbHIL-6 erzeugten sHIL-6.	101
Abbildung 3.33: Quantifizierung der Inhibition durch mbHIL-6 erzeugten sHIL-6.	102
Abbildung 3.34: Quantifizierung des durch mbHIL-6 _{V563E} und mbHIL-6 _{V563G} erzeugten sHIL-6.	103
Abbildung 3.35: Quantifizierung des durch mbHIL-6 und nmbHIL-6 erzeugten sHIL-6/snHIL-6.	104
Abbildung 3.36: Die Proliferation von Ba/F3-gp130-Zellen erfolgt durch biologisch aktives Protein im Zellkulturüberstand.	105
Abbildung 3.37: Proliferationsassay von Ba/F3-gp130-Zellen mit den konditionierten Zellkulturüberständen von Ba/F3-mbHIL-6- und Ba/F3-nmbHIL-6-Zellen.	106
Abbildung 3.38: Gesheddete Hyperzytokine aus Zellkulturüberständen des <i>Cluster-signaling</i> s auf Ba/F3-gp130-Zellen.	108
Abbildung 3.39: Inhibition der <i>Cluster-signaling</i> induzierten Proliferation von Ba/F3-gp130-Zellen durch Ba/F3-IL-11R-Zellen mit IL-11 oder Ba/F3-mbHIL-11-Zellen oder Ba/F3-mbHIL-11R355E-Zellen.	110
Abbildung 3.40: Inhibition der durch <i>Cluster-signaling</i> -induzierten STAT3 Phosphorylierung von Ba/F3-gp130- und Ba/F3-IL-11R-Zellen mit IL-11 oder Ba/F3-gp130- und Ba/F3-mbHIL-11/Ba/F3-mbHIL-11R355E-Zellen.	113
Abbildung 3.41: Coomassie-Färbung von gereinigtem nHIL-6-Fc.	114
Abbildung 3.42: Proliferation von Ba/F3-gp130-Zellen durch HIL-6-Fc und nHIL-6-Fc.	115
Abbildung 3.43: STAT3-Phosphorylierung durch die Stimualtion von Ba/F3-gp130-Zellen mit rekombinanten HIL-6-Fc und nHIL-6-Fc.	116
Abbildung 3.44: Schematische Übersicht über autokrines <i>Trans-signaling</i> und klassisches <i>signaling</i>	117
Abbildung 3.45: Nachweis der Rezeptoren mbHIL-6, nmbHIL-6, IL-11R, mbHIL-11 und mbHIL-11R355E auf der Zelloberfläche von Ba/F3-gp130-Zellen.	118
Abbildung 3.46: Autoproliferation durch autokrines <i>signaling</i>	120
Abbildung 3.47: STAT3 Phosphorylierung durch autokrines- oder <i>Trans-signaling</i>	121
Abbildung 3.48: Inhibition der STAT3-Phosphorylierung durch autokrines oder <i>Trans-signaling</i>	124
Abbildung 3.49: Schematische Darstellung wie präformierte Komplexe von mbHIL-6 und gp130 gebildet werden würden.	126

Abbildungungsverzeichnis

Abbildung 3.50: STAT3-Phosphorylierung durch internes oder externes HIL-6-Fc.....	127
Abbildung 3.51: STAT3-Phosphorylierung durch internes mbHIL-6 wird nicht durch internes sgp130Fc inhibiert.	128
Abbildung 3.52: Schematische Darstellung von gp130.	131
Abbildung 3.53: Schematische Darstellung der gp130 Deletionsvarianten.	133
Abbildung 3.54: Expression von gp130 und den Deletionsvarianten aus CHO-K1 Zellen.	134
Abbildung 3.55: Durchflusszytometrie von Ba/F3-gp130-Zellen und gp130 Deletionsvarianten.	135
Abbildung 3.56: STAT3-Phosphorylierung von gp130 und den gp130 Deletionsvarianten.	137
Abbildung 3.57: STAT3-Phosphorylierung ausgewählter gp130 Deletionsvarianten transfiziert in CHO-K1 Zellen.	138
Abbildung 3.58: Phosphorylierung der <i>extracellular regulated kinasen</i> (ERK1/2).	139
Abbildung 3.59: Inhibition der STAT3-Phosphorylierung von gp130 und gp130 Deletionsvarianten durch P6.	141
Abbildung 3.60: Inhibition der Proliferation von gp130 und gp130 Deletionsvarianten durch P6.	142
Abbildung 3.61: Kopräzipitation von gp130 und HIL-6-Fc durch Protein-A Agarose <i>beads</i>	144
Abbildung 4.1: Übersicht über die Rezeptoraktivierungsarten und Wirkung der Inhibitoren.	150
Abbildung 4.2: Vergleichende Darstellung der konstitutiv aktiven Varianten von gp130 und dem IL-23R.	153
Abbildung 8.1: Klonierungsstrategie für pcDNA3.1-HIL-6.	167
Abbildung 8.2: Klonierungsstrategie für pcDNA3.1-mbHIL-6.	168
Abbildung 8.3: Subklonierung von mbHIL-6 in ein pMows-puro Plasmid.	169
Abbildung 8.4: Klonierungsstrategie für pcDNA3.1-mbHIL-6 Δ 15.	170
Abbildung 8.5: Subklonierung von mbHIL-6 Δ 15 in ein pMows-puro Plasmid.	171
Abbildung 8.6: Generierung von mbHIL-6 Δ 30 über eine SOE-PCR.	172
Abbildung 8.7: Generierung von mbHIL-6 Δ 45 über eine SOE-PCR.	173
Abbildung 8.8: Generierung der Punktmutation mbHIL-6 _{V563E} über eine <i>site-directed</i> <i>mutagenesis</i> -PCR.	175
Abbildung 8.9: Generierung der Punktmutation mbHIL-6 _{V563G} über eine <i>site-directed</i> <i>mutagenesis</i> -PCR.	176
Abbildung 8.10: Subklonierung von der cDNA nmbHIL-6 aus pmat von GeneArt in die Plasmide pcDNA3.1 und pMows-puro.	177
Abbildung 8.11: Erstellung von pcDNA3.1-nHIL-6-Fc und pMows-puro-nHIL-6-Fc. ...	178
Abbildung 8.12: Klonierungsstrategie für pcDNA3.1-HIL-11.	179
Abbildung 8.13: Klonierungsstrategie für pcDNA3.1-mbHIL-11.	180
Abbildung 8.14: Subklonierung von mbHIL-11 in ein pMows-puro Plasmid.	181
Abbildung 8.15: Generierung der Punktmutation mbHIL-11 _{R355E} über eine <i>site-directed</i> <i>mutagenesis</i> -PCR.	182
Abbildung 8.16: Generierung von gp130 Δ D4-D6(Δ 322-613),S Δ 614-616 über eine <i>SOE</i> -PCR.	183
Abbildung 8.17: Generierung von gp130 Δ D4-D6(Δ 322-613),S Δ 614-617 über eine <i>SOE</i> -PCR.	184
Abbildung 8.18: Generierung von gp130 Δ D4-D6(Δ 322-613),S Δ 614-618 über eine <i>SOE</i> -PCR.	185
Abbildung 8.19: Generierung von gp130 Δ D4-D6(Δ 322-613),S Δ 614-619 über eine <i>SOE</i> -PCR.	186
Abbildung 8.20: Generierung von gp130 Δ D4-D6 über eine <i>SOE</i> -PCR.	187
Abbildung 8.21: Generierung von gp130 Δ 614-616 über eine <i>site-directed mutagenesis</i> -PCR.	188

Abbildungverzeichnis

Abbildung 8.22: Generierung von $gp130_{\Delta D4-D6(329-613)}$ über eine <i>SOE</i> -PCR.	189
Abbildung 8.23: Generierung von $gp130_{\Delta D4-D6(329-613),\Delta S614-616}$ über eine <i>SOE</i> -PCR.	190

1 Einleitung

1.1 Zytokine

Zytokine sind kleine Proteine, die Wachstumsprozesse, Differenzierung und Zellfunktionen regulieren. Sie wirken sowohl parakrin, autokrin als auch endokrin. Zytokine werden in drei Gruppen eingeteilt, wovon eine die Wachstumsfaktoren bilden. Die zweite Gruppe bilden die Hämatoetine und die dritte Gruppe die Zytokine des Immunsystems. Zu Letzteren gehören die Interleukine. Interleukine regulieren die zellulären Prozesse nach Bindung an einen Rezeptor. Sie regulieren dadurch die Immunantwort und lösen Entzündungsantworten aus (Rassow, *et al.*).

1.2 Die Interleukin-6 Familie

Interleukin-6 (IL-6) ist das namensgebende Protein der Interleukin-6 Familie, zu der neben IL-6 auch Interleukin-11 (IL-11), der *leukemia inhibitory factor* (LIF), *ciliary neurotrophic factor* (CNTF), *Oncostatin M*, *cardiotropin-like cytokine* (CLC), Cardiotropin-1, Interleukin-27 (IL-27) und Interleukin-31 (IL-31) gehören (Murakami, *et al.* 1993, Pflanz, *et al.* 2004, Taga, *et al.* 1989) IL-6 spricht ein breites Spektrum an Zellen wie B-Zellen, T-Zellen und Hepatozyten an (Gauldie, *et al.* 1987, Hibi, *et al.* 1990). Allgemein sind die Zytokine der IL-6 Familie in inflammatorische Prozesse des Körpers involviert, mit Beteiligung an der Proliferation, Migration und Apoptose (Scheller, *et al.* 2014). IL-6 ist ein *four helix-bundle* Zytokin, mit einer *up-up-down-down* Topologie (Bazan 1990). Interleukin-6 hat ein Molekulargewicht von ca. 25 kDa. IL-6 bindet im ersten Schritt an den Interleukin-6 Rezeptor (IL-6R), der keine Signale weiterleiten kann (Yamasaki, *et al.* 1988) (Abbildung 1.1). Für die Signalweiterleitung wird im zweiten Bindungsschritt ein weiterer Rezeptor benötigt, der gp130-Rezeptor (Taga, *et al.* 1989). Die Gemeinsamkeit der IL-6 Familie basiert auf der gp130 Homo- oder Heterodimerformation (Stuhlmann-Laeisz, *et al.* 2006).

Einleitung

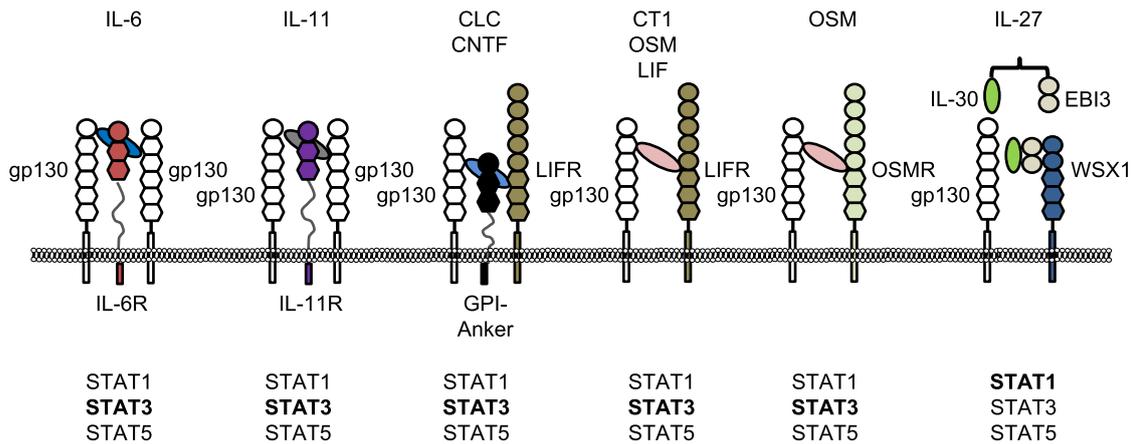


Abbildung 1.1: Eine Übersicht über einige Mitglieder der Interleukin-6 Familie. Abgebildet wurden einige Mitglieder der Interleukin-6 (IL-6) Familie mit ihren α - und β -Rezeptoren. Gp130 ist der β -Rezeptor vieler Mitglieder (weiß). Der Interleukin-6 Rezeptor (IL-6R, rot), Interleukin-11 Rezeptor (IL-11R, violett), *ciliary neurotrophic factor* Rezeptor (CNTFR, schwarz), *leukemia inhibitory factor* Rezeptor (LIFR, dunkelgrün), *Oncostatin M* Rezeptor (OSMR, hellgrün) und *T cell cytokine receptor (TCR)*² (WSX-1) sind die α -Rezeptoren, an welche die abgebildeten Zytokine zuerst binden.

Analog zu IL-6 bindet IL-11 initial den nicht-signaltransduzierenden Interleukin-11 Rezeptor. Durch die nachfolgende Bindung an gp130 wird ein Komplex für die Signalweiterleitung gebildet (Hilton, *et al.* 1994). Die anderen Zytokine der IL-6 Familie aktivieren die Signalkaskade über eine Heterodimerformation von gp130 mit anderen Rezeptoren (Davis, *et al.* 1991, Gearing, *et al.* 1992, Ip, *et al.* 1992, Pennica, *et al.* 1995, Pflanz, *et al.* 2004).

1.3 Das Glykoprotein gp130

Gp130 ist ein ubiquitär exprimiertes Protein. Nach der Bindung von IL-6 an den IL-6R und gp130 wurden tetramere und hexamere Komplexe gebildet, welche die Signalweiterleitung initiieren (Boulangier, *et al.* 2003) (Abbildung 1.2). IL-6 bindet an die Domäne 1 des gp130 über seine *site III* und an die Domäne 2 und 3 über seine *site II* (Bazan 1990, Ehlers, *et al.* 1994).

Gp130 besteht aus sechs extrazellulären Domänen, wovon Domäne 2 bis 6 Fibronectin III-ähnliche Domänen sind und Domäne 1 eine Ig-ähnliche Domäne ist (Hibi, *et al.* 1990) (Abbildung 1.2).

Einleitung

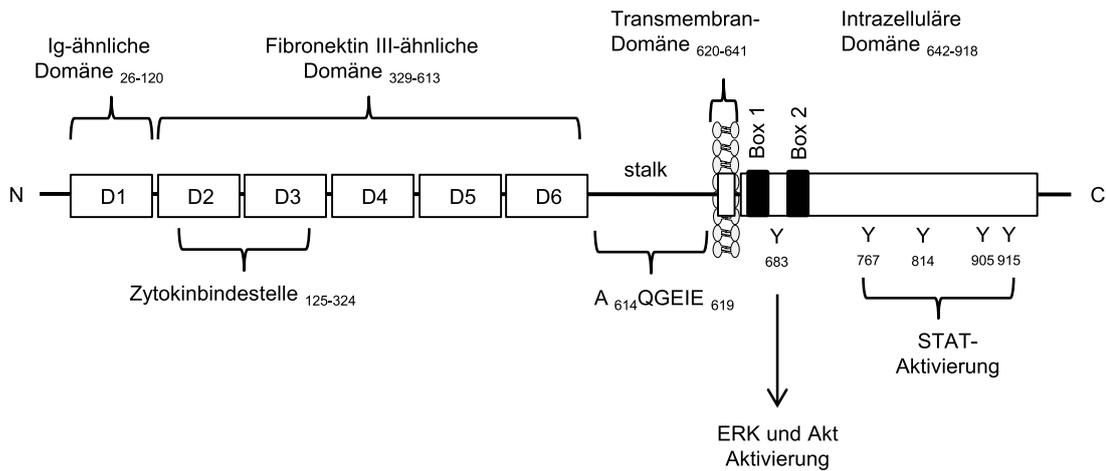


Abbildung 1.2: Übersicht über den Aufbau von gp130. Gp130 wurde als ein Protein mit sechs extrazellulären Domänen beschrieben, bei dem Domäne 1 als Ig-ähnliche Domäne beschrieben wurde. Domäne 2 und 3 wurden als Zytokinbindedomänen beschrieben. Die Domänen 2 bis 6 wurden zudem als Fibronectin III-ähnliche Domänen beschrieben. Eine, aus sechs Aminosäuren bestehende Stalkregion, folgte auf die Domänen 1 bis 6. Danach folgten die Transmembrandomäne und die intrazelluläre Domäne. Die intrazelluläre Domäne beinhaltet das Box 1- und Box 2-Motiv, welches für die Bindung der Januskinasen (JAK) essentiell war. In der intrazellulären Domäne befanden sich außerdem sechs Tyrosine (Y), welche für die Phosphorylierung wichtig waren.

Die intrazelluläre Domäne von gp130 vermittelt die Signaltransduktion. Durch verschiedene Mutationen von gp130 werden konstitutiv aktive Varianten generiert. Es wurde dadurch ein IL-6:IL-6R bzw. IL-11:IL-11R unabhängiges *signaling* generiert. Diese Mutationen waren kleine *in-frame* Deletionen in der Domäne D2 von gp130 (Kurth, *et al.* 2000, Rebouissou, *et al.* 2009, Sommer, *et al.* 2012).

1.4 Klassisches *signaling* von Interleukin-6

Für das klassische *signaling* wird ein homodimerer Komplex aus zwei gp130-Molekülen benötigt, der ein bis zwei IL-6R:IL-6-Komplexe bzw. für IL-11 an ein bis zwei IL-11R:IL-11 Komplexe bindet (Boulanger, *et al.* 2003). Dabei wird nur bei hohen Konzentrationen von IL-6 ein hexamerer Komplex aus zwei gp130, zwei IL-6R und zwei IL-6 Molekülen gebildet (Boulanger, *et al.* 2003). Bei geringen IL-6 Konzentrationen wird ein tetramerer Komplex gebildet, bestehend aus zwei gp130, einem IL-6R und einem IL-6 Molekül (Grötzinger, *et al.* 1999, Grötzinger, *et al.* 1997). IL-6/IL-11 besitzt drei Bindestellen, wobei *site I* für die Bindung des IL-6R/IL-11R benötigt wird. *Site II* wird für die Bindung der Zytokinbindedomäne von gp130 benötigt, wohingegen *site III* für die Bindung der Ig-Domäne von gp130 benötigt wird (Barton, *et al.* 2000, Grötzinger, *et al.* 1999) (Abbildung 1.3).

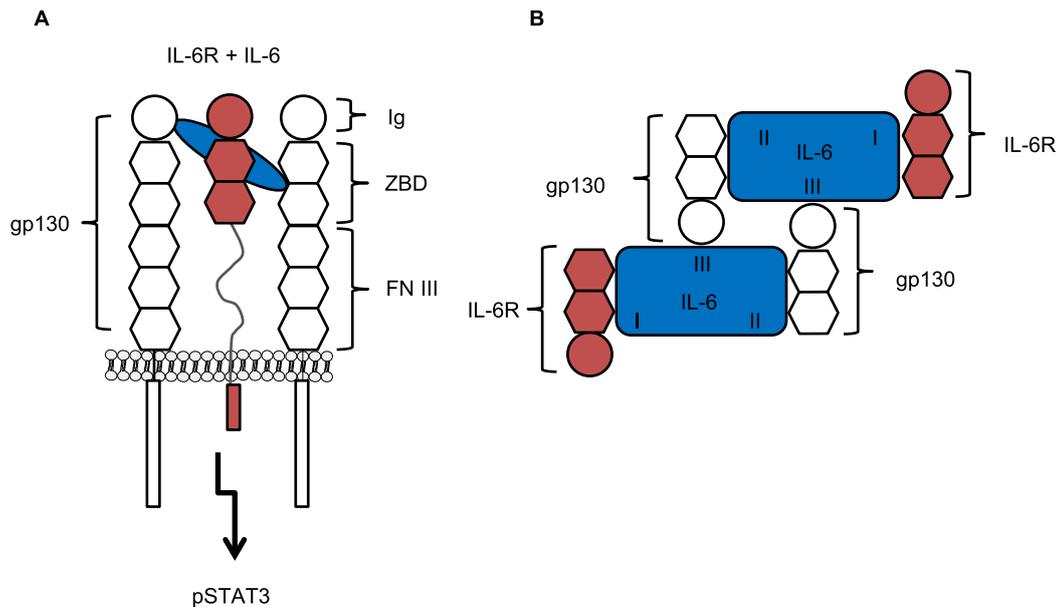


Abbildung 1.3: Schematische Darstellung des klassischen *signalings*. (A) Das klassische *signaling* wurde vereinfacht dargestellt. Nach Bindung des IL-6 an den IL-6R, werden zwei gp130-Moleküle rekrutiert, die im Anschluss eine STAT3-Phosphorylierung aktivieren. Es wurde dadurch ein tetramerer Komplex gebildet (Grötzinger, *et al.* 1997). (B) Ebenfalls ist schematisch ein hexamerer Komplex aus zwei IL-6, zwei IL-6R und zwei gp130-Molekülen dargestellt. Die Bindungsstellen wurden miteinbezogen.

Für die Signaltransduktion im klassischen *signaling* werden die an gp130 assoziierten Januskinasen (JAK) durch die Box 1/2-Motive der intrazellulären Domäne von gp130 gebunden (Stahl, *et al.* 1995, Tanner, *et al.* 1995) (Abbildung 1.4). Diese wiederum phosphorylieren sich nach gp130 Dimerisierung gegenseitig und anschließend gp130 an den Tyrosinen der intrazellulären Domäne (Heinrich, *et al.* 1998). Das *signal transducer and activator of transcription 3* (STAT3)-Protein wird über die Tyrosine Y767, Y814, Y905 und Y915 von gp130 gebunden und nachfolgend auch von JAK phosphoryliert (Lutticken, *et al.* 1994, Stahl, *et al.* 1995). Wichtig ist die *Src-homology 2* (SH2)-Domäne des STAT3-Proteins, welche die phosphorylierten Tyrosine des gp130 erkennt und daran bindet (Hemmann, *et al.* 1996). Nach Phosphorylierung werden die STAT3-Proteine in den Zellkern transportiert und aktivieren die Genexpression (Stahl, *et al.* 1995) (Abbildung 1.4).

Einleitung

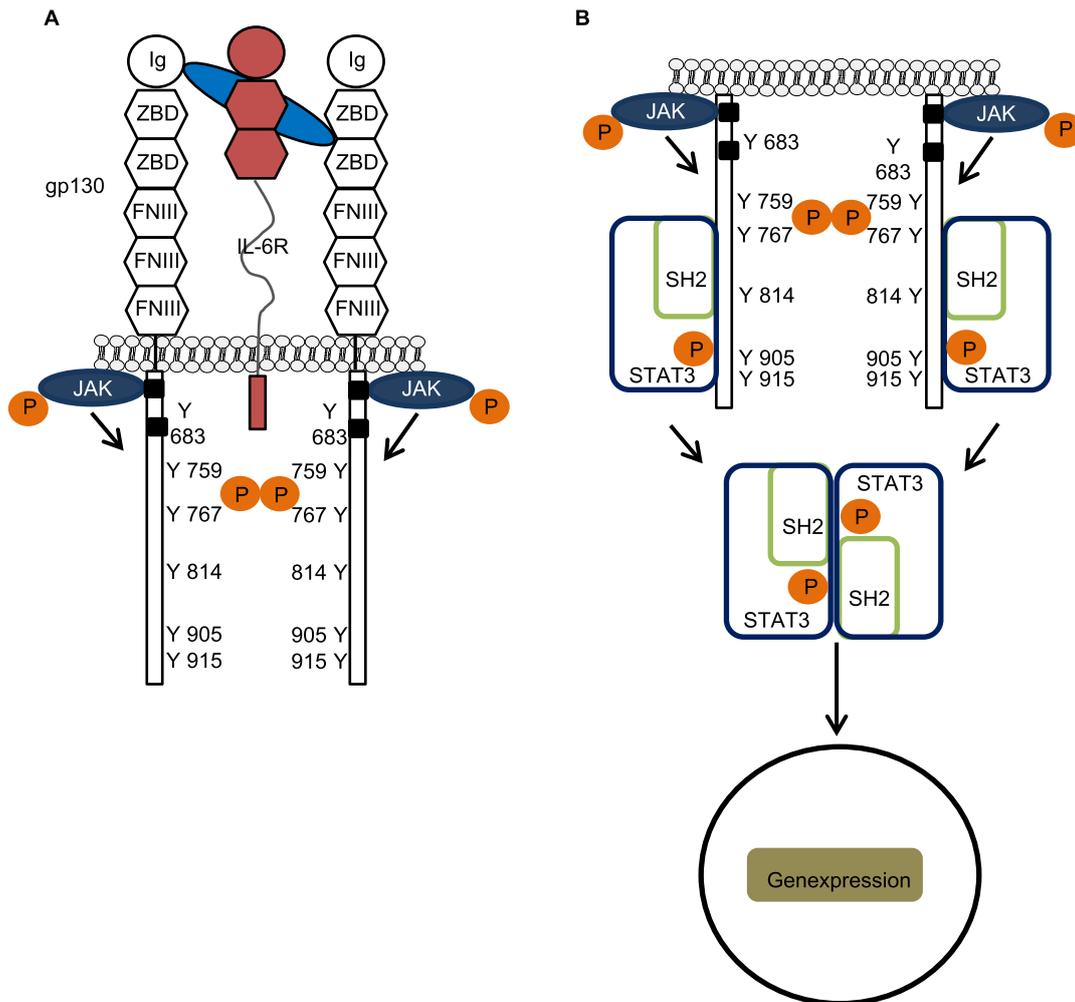


Abbildung 1.4: Schematische Darstellung der STAT3-Phosphorylierung im klassischen *signaling*. (A) Nach der Bindung des IL-6 an den humanen IL-6R und Komplexbildung mit gp130 werden die an gp130 assoziierten Januskinasen (JAK) über das Box 1/2-Motiv aktiviert. (B) Diese werden phosphoryliert und können im Anschluss die intrazellulären Tyrosine von gp130 phosphorylieren. Dadurch wird das *signal transducer and activator of transcription* Protein STAT1/STAT3/STAT5 rekrutiert. Die SH2-Domäne des STAT3-Proteins wird phosphoryliert und STAT3 wurde zu phosphoryliertem STAT3 (pSTAT3). pSTAT3 wurde in den Nukleus für die Transkription weiterer Gene geleitet.

Ferner werden der *mitogen-activated protein kinase* (MAPK)-Signalweg und Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K)-Signalweg aktiviert. Durch die Aktivierung der MAPK werden die *extracellular-signal regulated kinase* (ERK1/2)-Proteine aktiviert (Schaeffer and Weber 1999).

Für die Inhibition der STAT3-Phosphorylierung wird unter anderem das Protein *suppressor of cytokine signaling* (SOCS3) benötigt. Die Expression dieses Gens wurde ebenfalls durch das STAT3-Protein induziert. SOCS3 bindet an die JAK und gp130 und inhibiert die STAT3-Phosphorylierung (Kershaw, *et al.* 2013).

1.5 *Trans-signaling* wird über den Komplex aus IL-6 und dem löslichen IL-6R ausgelöst

Die Signaltransduktion durch das *Trans-signaling* ist nahezu identisch mit dem klassischen *signaling* (Abbildung 1.5). Dabei wird im Gegensatz zu dem klassischen *signaling* jedoch kein membranständiger IL-6R durch IL-6 gebunden, sondern der lösliche IL-6R (sIL-6R, Abbildung 1.5) (Mackiewicz, *et al.* 1992, Taga, *et al.* 1989). Der Komplex aus IL-6 und dem sIL-6R kann nachfolgend an gp130 auf Zielzellen binden und diese aktivieren. Der IL-6R wird nicht auf allen Zellen exprimiert, sondern hauptsächlich auf z.B. Hepatozyten, Neutrophilen Granulozyten, Makrophagen und Monozyten (Mackiewicz, *et al.* 1992). Der membranständige IL-6R kann über die Protease *A Disintegrin and Metalloproteinase domain-containing protein* (ADAM) 10/17 von der Zelloberfläche abgespalten werden (Müllberg, *et al.* 1993). Die Sequenz SLP↓VQDS in der IL-6R Stalkregion wurde als Schnittsequenz identifiziert, an der der membrangebundene IL-6R von der Zelloberfläche über eine ADAM10/17-Protease abgespalten wird (Riethmueller, *et al.* 2017) (Abbildung 1.5). Eine andere Möglichkeit um sIL-6R zu generieren, wird über alternatives Spleißen vermittelt (Lust, *et al.* 1992). Während durch klassisches *signaling* nur wenige Zellen, wie Hepatozyten, Neutrophile Granulozyten und T-Zellen aktiviert werden, können durch *Trans-signaling* im Prinzip alle Zellen stimuliert werden.

Einleitung

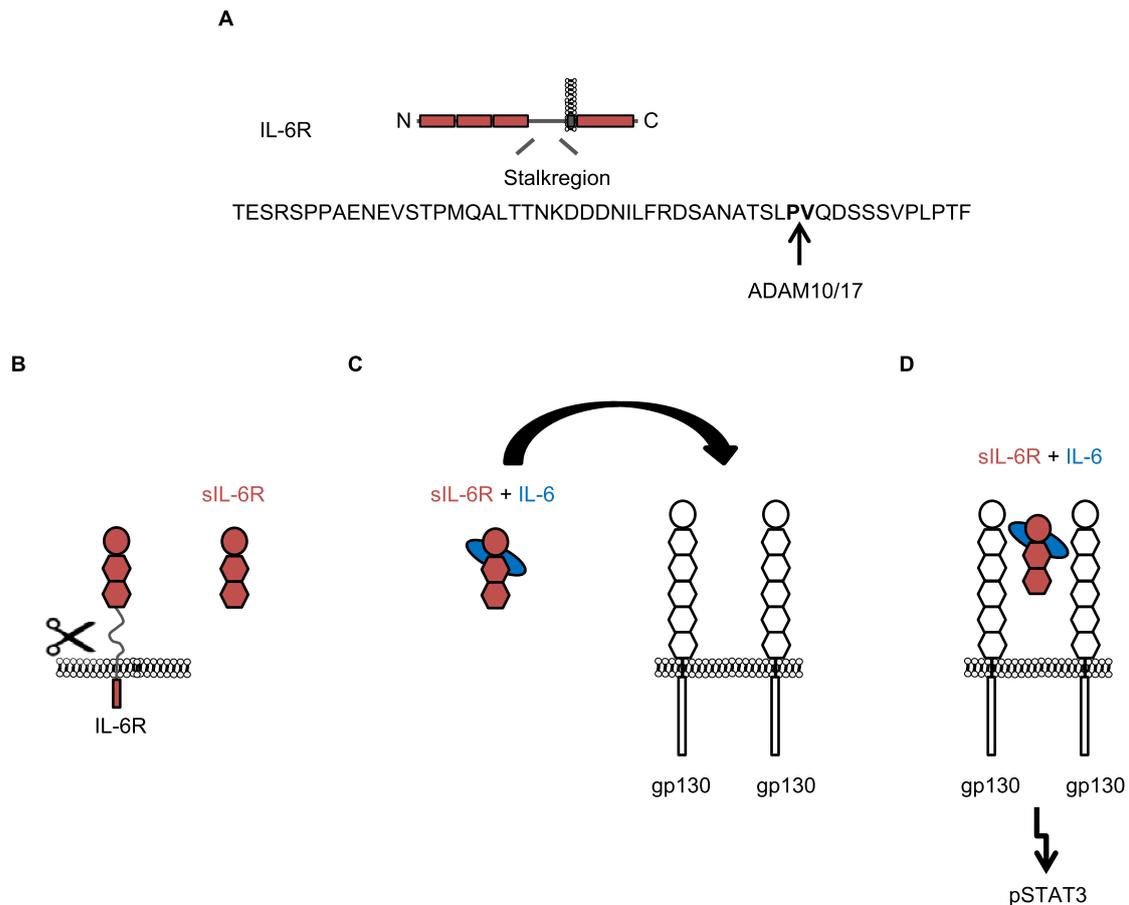


Abbildung 1.5: Shedding des IL-6 über ADAM-Proteasen. (A) Die Proteinsequenz der IL-6R Stalkregion wurde abgebildet mit der ADAM10- und 17-Schnittstelle (Riethmueller, *et al.* 2017). (B) Durch die proteolytische Spaltung wird der sIL-6R aus dem membranständigen Rezeptor generiert, der für die Aktivierung von Zellen genutzt wird (in Verbindung mit IL-6), die nur gp130 auf der Zelloberfläche exprimieren (C, D).

1.6 Inhibitoren des klassischen und *Trans-signalings*

IL-6 wurde als pro- und anti-inflammatorisches Zytokin identifiziert (Scheller, *et al.* 2011). Bei vielen Krankheiten, wie juveniler chronischer Arthritis und systemischer Sklerose wurde IL-6 in Verbindung mit dem sIL-6R als Auslöser gefunden (Keul, *et al.* 1998, Romero and Pincus 1992). Es wurde ebenfalls gezeigt, dass bei einer rheumatoiden Arthritis, Sepsis oder auch vielen anderen Krankheiten die sIL-6R-Spiegel im Blut erhöht sind (Marie, *et al.* 1997, Nowell, *et al.* 2003).

Weiterhin wurde für IL-6-defiziente Mäuse gezeigt, dass diese vor Autoimmunerkrankungen wie der Collagen-induzierten Arthritis oder Enzephalitis geschützt sind (Alonzi, *et al.* 1998, Ohshima, *et al.* 1998, Okuda, *et al.* 1998).

Dabei wurde die Signaltransduktion über den membranständigen IL-6R als anti-inflammatorischer Signalweg beschrieben, wohingegen die Signaltransduktion über den

Einleitung

sIL-6R als pro-inflammatorisch beschrieben wurde (Rabe, *et al.* 2007, Scheller, *et al.* 2011). Zu den anti-inflammatorischen Vorgängen gehört z.B. die Bekämpfung von bakteriellen Infektionen (Xing, *et al.* 2009). Zu den pro-inflammatorischen Vorgängen gehört z.B. die Inhibition der Differenzierung von regulatorischen T-Zellen, welche für die Unterdrückung des Immunsystems verantwortlich sind (Dominitzki, *et al.* 2007). Auf diesem Weg werden Autoimmunerkrankungen, bei denen das Immunsystem zu stark reagiert, induziert.

Es wurde auch eine lösliche Form von gp130 gefunden, durch die der Komplex bestehend aus IL-6:sIL-6R gebunden wird (Diamant, *et al.* 1997, Narazaki, *et al.* 1993). Dieser Anhaltspunkt wurde für die Entwicklung eines Inhibitors gegen IL-6:sIL-6R vermitteltes *Trans-signaling* verwendet. Hierzu wurde sgp130Fc entwickelt, welches den Komplex aus IL-6:sIL-6R im Körper abfängt und interessanterweise spezifisch nur *Trans-signaling* inhibiert (Jostock, *et al.* 2001) (Abbildung 1.6 A). Der IL-6R spezifische Antikörper Tocilizumab inhibiert hingegen klassisches und *Trans-signaling* (Sato, *et al.* 1993). Tocilizumab ist für die Therapie der rheumatoiden Arthritis zugelassen (Calabrese and Rose-John 2014). Für die Inhibition bindet Tocilizumab den IL-6R an der *site I*, die normalerweise von IL-6 gebunden wird. Dadurch kann keine Bindung von IL-6 an den membranständigen IL-6R oder den sIL-6R mehr erfolgen (Sato, *et al.* 1993) (Abbildung 1.6 B).

Der Antikörper B-R3 bindet an gp130 an der Stelle, die auch von IL-6 verwendet wird. Dieser Antikörper bewirkt eine Inhibition der Signaltransduktion aller Zytokine der IL-6 Familie (Wijdenes, *et al.* 1995) (Abbildung 1.6C).

Nanobodies bestehen aus der antigenbindenden variablen Domäne von Einkettenantikörpern. Die Firma Ablynx hat einen neutralisierenden IL-6R-Nanobody entwickelt, der das klassische *signaling* und das *Trans-signaling* hemmt (Patentnummer: WO 2008/020079 A1). Das Wirkprinzip ist identisch zum Hemmprinzip von Tocilizumab (Abbildung 1.6 D).

Einleitung

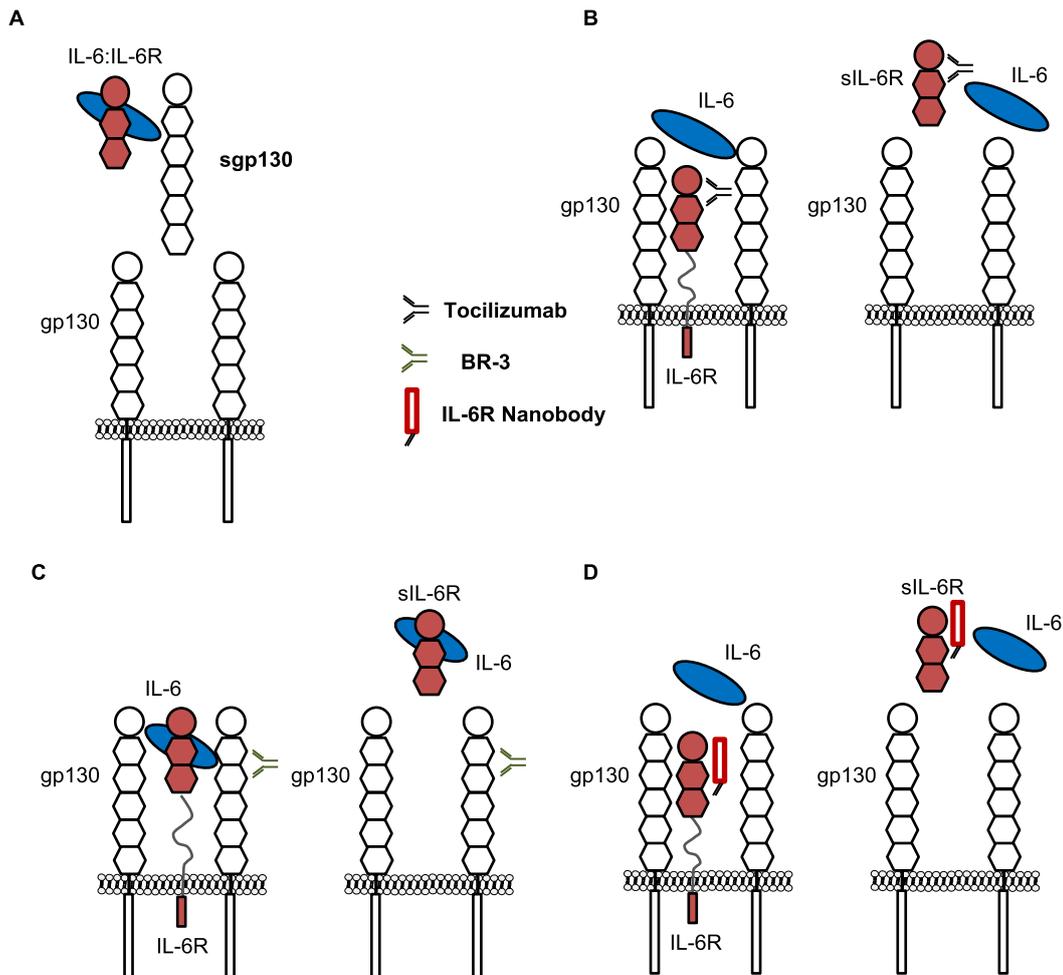


Abbildung 1.6: Übersicht über die Inhibitoren des klassischen und *Trans-signalings*. (A) Sgp130 ist ein Inhibitor des *Trans-signalings*. Sgp130 bindet nur IL-6:sIL-6R Komplexe. (B) Die Bindung von Tocilizumab an den membranständigen oder solublen IL-6R wurde ebenfalls dargestellt. Durch die Bindung wird die Bindestelle von IL-6 am IL-6R besetzt und weder klassisches noch *Trans-signalings* wird aktiviert. (C) Die Bindung des gp130-spezifischen Antikörpers B-R3 erfolgt an gp130. Die Zytokinbindestelle von gp130 wird dadurch blockiert. (D) Durch Bindung des IL-6R Nanobodies an den IL-6R wird die Bindestelle von IL-6 blockiert.

1.7 Das Designer-Zytokin HIL-6

HIL-6 wurde generiert um ein Zytokin zu entwickeln, welches Zellen besser über *Trans-signalings* aktiviert als die einzelnen Komponenten IL-6 und sIL-6R. Dafür wurde ein Fusionsprotein geschaffen, dass N-Terminal den sIL-6R und C-Terminal IL-6 trägt. Dazu wurden die beiden Proteine mit Peptidlinkern verbunden (Abbildung 1.7). HIL-6 ist 100 – 1000fach stärker aktiv als die Einzelkomponenten IL-6 und der sIL-6R (Fischer, *et al.* 1997, Rakemann, *et al.* 1999)

Einleitung

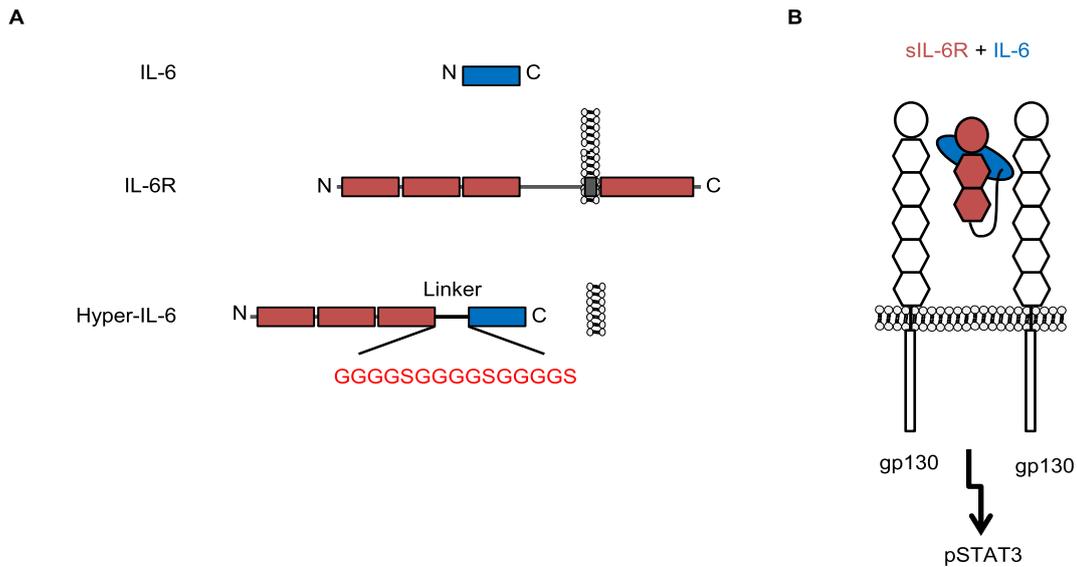


Abbildung 1.7: Schematische Darstellung von HIL-6. (A) Für die Generierung von HIL-6 wurde der sIL-6R (rot) verwendet. Über einen Peptidlinker wurde IL-6 (blau) mit dem sIL-6R verbunden. (B) HIL-6 kann Zellen aktivieren, die keinen membranständigen IL-6R, aber gp130 tragen.

HIL-6 wurde zu einem wichtigen Werkzeug, um *Trans-signaling in vitro* und *in vivo* zu untersuchen. Dabei wurde gezeigt, dass HIL-6 positive Effekte bei der Regeneration der Leber nach einer partiellen Hepatektomie zeigt, genauso wie nach der Schädigung durch D-Galactosamine (Galun, *et al.* 2000, Hecht, *et al.* 2001, Peters, *et al.* 2000). Im Vergleich zum *signaling* über die zwei einzelnen Komponenten IL-6 und (s)IL-6R, wurde durch das HIL-6 der Bindungsschritt zwischen den beiden Komponenten hinfällig. Dadurch wurde eine effektivere gp130 Rezeptoraktivierung induziert, dies war für experimentelle Analysen hilfreich (Rakemann, *et al.* 1999). Außerdem wurde durch HIL-6 eine stärkere Zellantwort induziert, als durch den IL-6:sIL-6R Komplex (Fischer, *et al.* 1997).

1.8 Cluster-signaling wird über Zell-Zell-Kontakt ausgelöst

Beim des *Cluster-signaling* werden gp130 (weiß) exprimierende Zellen als Empfänger-Zellen bezeichnet. IL-6R (rot) exprimierende Zellen fungieren als Transmitter-Zellen. Durch IL-6 (blau) kann nur ein Komplex mit IL-6R auf den Transmitter-Zellen gebildet werden, der dann gp130 auf den Empfänger-Zellen aktiviert (Heink, *et al.* 2017) (Abbildung 1.8).

Einleitung

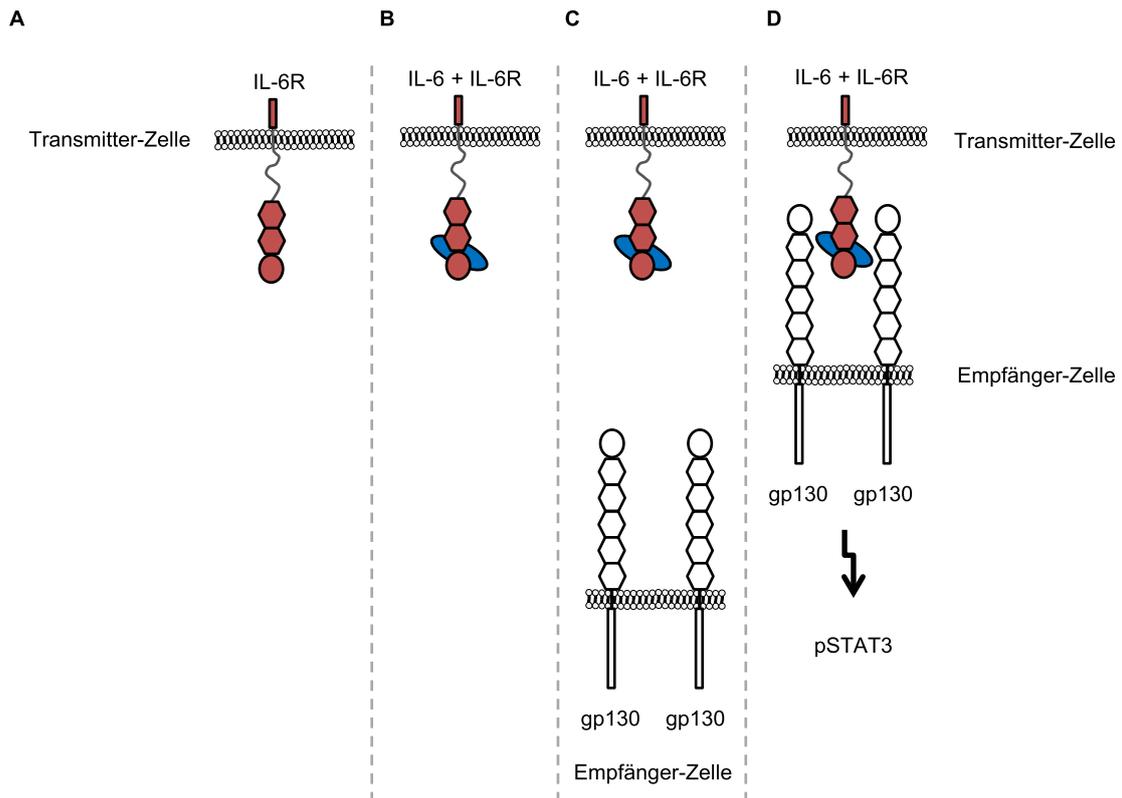


Abbildung 1.8: Schematische Darstellung des Cluster-signalings von Ba/F3-IL-6R-Zellen mit IL-6 und Ba/F3-gp130-Zellen. (A) Für das Cluster-signalings wurde eine Ba/F3-IL-6R-Zelle ohne gp130 auf der Zelloberfläche als Transmitter-Zelle deklariert. (B) Zuerst wurde IL-6 vom IL-6R auf der Zelle gebunden. (C) Ba/F3-gp130-Zellen wurden als Empfänger-Zellen deklariert. (D) Durch Zell-Zell-Kontakt können die Rezeptoren auf den beiden Zellen miteinander interagieren und pSTAT3 wird durch die Bindung von gp130 an den membrangebundenen Komplex aus IL-6:IL-6R aktiviert.

Gp130 wird beim Cluster-signalings im Gegensatz zum klassischen signalings nicht, durch eine Bindung von IL-6 an den membranständigen IL-6R und gp130 auf der selben Zelloberfläche aktiviert, sondern durch Zell-Zell-Kontakte zwischen zwei Zellen (Abbildung 1.9). Beim Cluster-signalings sind also zwei Zellen mit unterschiedlichen Rezeptorkonfigurationen involviert (Heink, *et al.* 2017) (Abbildung 1.9 C).

Einleitung

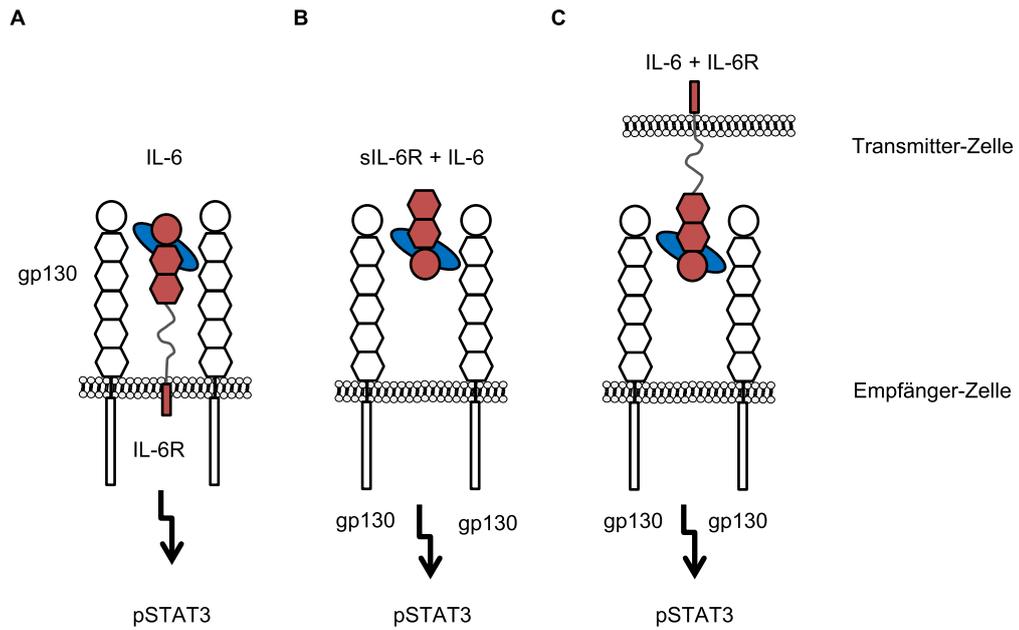


Abbildung 1.9: Übersicht über die drei bekannten *signaling* Arten. (A) Beim klassischen *signaling*, bei dem neben dem IL-6R auch gp130 auf der Zelloberfläche ist, wird durch Bindung von IL-6 pSTAT3 aktiviert. (B) Beim *Trans-signalung* wird der lösliche IL-6R und IL-6 von gp130 auf einer Zelloberfläche gebunden und pSTAT3 dadurch aktiviert. (C) Beim *Cluster-signalung* interagieren zwei unterschiedliche Zellen durch zwei unterschiedliche Rezeptoren. Dadurch wird pSTAT3 bei den gp130-tragenden Zellen aktiviert.

1.9 Zielsetzung dieser Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist es zu untersuchen, weshalb sgp130(Fc) ein spezifischer Inhibitor des IL-6 *Trans-signalings* ist. Als Hypothese wird angenommen, dass sgp130(Fc) aus sterischen Gründen nicht an membranständige IL-6:IL-6R-Komplexe binden kann. Zu diesem Zweck sollen membranständige Hyper-IL-6-Varianten erstellt und untersucht werden. Die Bindung von sgp130(Fc) an IL-6:IL-6R-Komplexe und membranständige HIL-6-Varianten soll dabei betrachtet werden. Des Weiteren soll geprüft werden, ob membranständige HIL-6 Zellen bei der Transaktivierung über *Cluster-signaling* gp130 aktivieren und ob sgp130(Fc) hierauf einen Einfluss hat. Das Prinzip soll auch für IL-11 untersucht werden. Im zweiten Teil der Arbeit soll gezeigt werden, ob durch Deletion der Fibronectin III-ähnliche Domänen und/oder der Stalkregion von gp130, Varianten erstellt werden können, die konstitutiv aktiv sind.

2 Material und Methoden

In diesem Abschnitt der Arbeit wurde auf das verwendete Material und die angewandten Methoden eingegangen.

2.1 Material

Das für diese Arbeit verwendete Material wurde in den nachfolgenden Kapiteln aufgeführt.

2.1.1 Antibiotika

Ampicillin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe	100 µg/ml
Puromycin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe	1,5 µg/ml
Neomycin	G-418 Genomycin, Genaxxon, Ulm	1600 µg/ml
Hygromycin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe	1000 µg/ml

2.1.2 Antikörper

2.1.2.1 Primäre Antikörper

α Phospho-STAT1 (Tyr701) (58D6)	Monoklonaler Antikörper aus dem Kaninchen Western Blot: 1:1000 Cell Signaling Technology Europe B.V.
α STAT1	Monoklonaler Antikörper aus dem Kaninchen Western Blot: 1:1000 Cell Signaling Technology Europe B.V.

Material und Methoden

α Phospho-STAT3 (Tyr705) (D3A7) XP [®]	Monoklonaler Antikörper aus dem Kaninchen Western Blot: 1:2000 Cell Signaling Technology Europe B.V.
α STAT3 (124H6)	Monoklonaler Antikörper aus der Maus Western Blot: 1:1000 Cell Signaling Technology Europe B.V.
α Phospho-p44/42 MAPK (ERK1/2) (Thr202/Tyr204) (D13.14.4E)XP [®]	Monoklonaler Antikörper aus dem Kaninchen Western Blot: 1:1000 Cell Signaling Technology Europe B.V.
α p44/42 MAPK (ERK1/2) (137F5)	Monoklonaler Antikörper aus dem Kaninchen Western Blot: 1:1000 Cell Signaling Technology Europe B.V.
α Myc-Tag (71D10)	Monoklonaler Antikörper aus dem Kaninchen Western Blot: 1:1000 Cell Signaling Technology Europe B.V.
α humaner IL-6R (4-11)	Monoklonaler Antikörper aus der Maus, Stocklösung: 1 μ g/ml Western Blot, ELISA 1:1000 Durchflusszytometrie 1:100 Herstellung beschrieben in (Chalaris, <i>et al.</i> 2007)

Material und Methoden

α humaner IL-6R (Baf227)	Biotinylierter IgG Antikörper aus der Ziege Stocklösung: 0,5 μ g/ μ l ELISA: 1:1000 R&D Systems GmbH, Minneapolis, USA
α humaner IL-6 biotin	Biotinylierter IgG Antikörper Western Blot: 1:500 Durchflusszytometrie: 1:100 Immunotools Friesoythe, Ger- many
α human CIS3/SOCS3 (C005)	Monoklonaler Antikörper aus dem Kaninchen, Stocklösung: 1-5 μ g/ml Western Blot: 1:1000 IBL International GmbH
α CD130 (gp130) (B-R3)	Monoklonaler Antikörper aus der Maus, Stocklösung 1 μ g/ μ l Western Blot: 1:1000 Abcam Cambridge, UK

2.1.2.2 *Sekundäre Antikörper*

α Maus IgG POD

*ImmunoPure Peroxidase
Conjugated Goat Anti-Mouse
IgG (H+L)*

Stocklösung: 0,8 μ g/ μ l

Western Blot 1:5000

Thermo Fischer Scientific,
Perbio Science USA, Waltham

α Kaninchen IgG POD

*ImmunoPure Peroxidase
Conjugated Goat Anti-Mouse
IgG (H+L)*

Stocklösung: 0,8 μ g/ μ l

Western Blot 1:5000

Thermo Fischer Scientific,
Perbio Science USA, Waltham

α Maus IgG (H+L)

*Allophycocyanin conjugated
AffiniPure F(ab')₂ Fragment
aus der Ziege*

Stocklösung: 1,5 μ g/ μ l

Durchflusszytometrie: 1:100

Jackson Immuno Research,
West Grove, Pa USA

Alexa Fluor 488

F(ab')₂-Ziege anti Kaninchen
IgG (H+L)

Stocklösung: 2 mg/ml

Durchflusszytometrie: 1:100

Life technologies, Darmstadt

α APC Streptavidin

*Allophycocyanin conjugated
Streptavidin*

Stocklösung: 0,2 mg/ml

Durchflusszytometrie: 1:100

BD biosciences, San Jose, CA

human IgG Fc APC

Allophycocyanin conjugated

Maus IgG2a Stocklösung: 0,2 mg/ml

Durchflusszytometrie 1:100

BioLegend London, UK

2.1.3 Chemikalien

5x Phusion HF Puffer

Thermo Scientific, St. Leon-Rot

10x Standard Restriktionspuffer

Thermo Scientific, St. Leon-Rot

10x T4 DNA Ligasepuffer

Thermo Scientific, St. Leon-Rot

Acrylamid, 30% (Rotiphorese®)

Carl Roth GmbH, Karlsruhe

Agarose

Bio-Budget Technologies, Krefeld

Ammoniumpersulfat (APS)

Sigma-Aldrich, München

β-Mercaptoethanol

Sigma-Aldrich, München

Bovines Serumalbumin (BSA)

Biomol, Hamburg

Bromphenolblau

Roth, Karlsruhe

Cell-titer blue

Promega, Mannheim

Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets

(EDTA-free)

Roche Diagnostics, Mannheim

Dimethylsulfoxid (DMSO)

Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri USA

DNA-Größenstandard

Thermo Scientific, Waltham, USA

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)

Life Technologies, Darmstadt

dNTP Mix (25 mM)

Thermo Scientific, St. Leon-Rot

Essigsäure

Roth, Karlsruhe

Ethanol

Merck, Darmstadt

Ethylendiamintetraacetat (EDTA)

Sigma-Aldrich, Steinheim

Fötale Kälberserum (FBS)

Gibco®, Thermo Scientific, St. Leon-Rot

Glycerin

Roth, Karlsruhe

Glycin

Merck, Darmstadt

Material und Methoden

Isopropanol	AppliChem GmbH, Darmstadt
Kaliumacetat	Merck KGaA, Darmstadt
LB-Agar Pulver	AppliChem GmbH, Darmstadt
Magermilchpulver	Roth, Karlsruhe
Methanol	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Natriumfluorid (NaF)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumorthovanadate (Na ₃ VO ₄)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumhydroxid (NaOH)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Nonident P-40	Sigma-Aldrich, Steinheim
Protein Marker (Page Ruler Prestained)	Thermo Scientific, Waltham USA
<i>Safer green</i>	Intas, Göttingen
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Triton-X 100	Merck KGaA, Darmstadt
Tris	Bethesda research Laboratories, Bethesda, USA
Trypanblau 0,4%	Bio-Rad, München
TurboFect™ Transfektionsreagenz	Thermo Scientific, St. Leon-Rot
Tween 20	Sigma-Aldrich, Steinheim

2.1.4 Enzyme

Alle verwendeten Enzyme stammen von Thermo Fischer Scientific (Waltham, USA). Eine Auflistung der verwendeten Enzyme wurde im Anhang 8.1 im Klonierungsschema vermerkt.

2.1.5 Geräte

Analytische Gleichchromatographie	Amersham plc/ GE healthcare, Chalfont, UK
Autoklav	SHp Steriltechnik AG, Detzel Schloss/Satuelle
<i>Cell counter</i> TC10	BioRad, München

Material und Methoden

<i>ChemoCam Imager</i>	Intas, Göttingen
CO ₂ -Inkubator 150 (E2) Brutschrank	Binder GmbH, Tuttlingen
CO ₂ -Inkubator HERAcell® 150	Thermo Scientific, Waltham, USA
Fluoreszenzmikroskop	KEYENCE, Neu-Isenburg
Heizbad Julabo sw21	Julabo GmbH, Seelbach
Inkubator	UNO BV, Zevenaar, Niederlande
Kühlzentrifuge 5417 R	Eppendorf, Hamburg
Kühlzentrifuge 5810	Eppendorf, Hamburg
pH-Meter	WTW, Weilheim
Peristaltic pump P1	Pharmacia fine chemicals, Uppsala, Schweden
Pipetten	Eppendorf GmbH, Hamburg
Pipetus®-Akku	Hirschmann, Laborgeräte, Eberstadt
PeqStar 2x <i>Twin Block Thermal Cycler</i>	Peqlab, VWR, Erlangen
Schüttler DRS-12	NeoLab, Heidelberg
Schüttler <i>Thermo-shaker</i>	Universal Labortechnik, Leipzig
Sterilbank SAFE 2020	Thermo Scientific, Waltham, USA
Superdex 75	GE Healthcare Life Sciences, Chalfont, UK
Tecan <i>infinite M200 PRO Reader</i>	Tecan, Maennedorf, Schweiz
Thermoblock	BIBBY Stuart Scientific, Stafford, UK
Trans-Blot Turbo TM Transfersystem	BioRad, München
Vortexer	VortexGenie2, Scientific Ind., Bohemia, USA
Wasserbad	Lauda, Lauda-Königshofen

Material und Methoden

2.1.6 Kits

Die nachfolgenden Kits wurden während dieser Arbeit verwendet:

Ermittlung der Proteinkonzentration	BCA Protein Assay Kit, Thermo Scientific, Waltham, USA
Chemilumineszenz	Immobilon Western HRP Substrat, MERCK KGaA, Darmstadt
DNA Extraktion	NucleoSpin Gel and PCR Clean up, Machery-Nagel GmbH & Co. KG, Düren
ELISA	Human IL-6/IL-6 R alpha Complex DuoSet ELISA, R&D Systems Wiesbaden-Nordenstadt
Midi-Präparation von Plasmid DNA	NucelBond Xtra Midi, Machery-Nagel GmbH & Co. KG, Düren
Mini-Präparation von Plasmid DNA	Gene JET Plasmid Miniprep KIT, Thermo Scientific, Waltham, USA
Proliferationsassay	CellTiter-Blue Cell Viability Assay, Promega GmbH, Mannheim

2.1.7 Oligonukleotide

Die nachfolgenden Oligonukleotide wurden von der Firma Eurofins MWG Operon GmbH in Ebersberg synthetisiert und für die Klonierungsarbeiten in dieser Arbeit verwendet:

pcDNA3.1 Fw	5'AAATTAATACGACTCACTATAGG 3'
pcDNA3.1 Rev	5'AGGCACAGTCGAGGCTG3'
IL6R stalk Fw	5'GATCGCGGCCGCAACAGAATCCAGGA GTCCTCCA3'
IL6R stalk Rev	5'GATCGGATCCTTATCTGGGGAAGAA G3'
Hyper IL-6 Fw	5'GATCAAGCTTGCCACCATGCTGGCA GTGGGCTGC3'
Hyper IL-6 Rev	5'GATCCTGTCTCAGGGCCCTCAGG3'

Material und Methoden

D353-367 Fw	5'GATCGCGGCCGCAACAGAATCCAG GAGTCCTC3'
D353-367Rev	5'ACAGACTACTTCTTCCCCAGATAA3'
SOE F1 mbHIL-6	5'CCTGGAGTACCTGCAGAACCGCTTC GAGAG3'
SOE R2 mbHIL-6	5'GGATCCTTATCTGGGGAAGAAGTAG TCTGT3'
SOE F2 mbHIL-6	5'ACTACTAATCTGGTTGCTGGAGGGA GCCTGG3'
SOE R1 mbHIL-6	5'CACCCAGATTAGTAGTAAGTGCCTGC ATGGG3'
SOEF1 mbHIL6d45	5'CCTGGAGTACCTGCAGAACCGCTTCG AGAG3'
SOEF2 mbHIL-6d45	5'AGTCCTCCACTGGTTGCTGGAGGGAG CCTGGC3'
SOER1 mbHIL-6d45	5'CTCCAGCAACCAGTGGAGGACTCCTG GATTCTGTTGC3'
PE Fw	5'GCGACAAGCCTCCCAGAGCAAGATTC TTCTTCA3'
PE Rev	5'TGAAGAAGAATCTTGCTCTGGGAGGC TTGTTCG3'
PG Fw	5'GCGACAAGCCTCCCAGGGCAAGATTC TTCTTCA3'
PG Rev	5'TGAAGAAGAATCTTGCCCTGGGAGGC TTGTCTGA3'
Primer AF	5'AGCGTGATCAACAGCGAGGAACTGG C3'
Primer AR	5'GATGCCGGAGCTGTGGCCCTCGGTAT TGAT3'
Primer I F1	5'CGAGGAAGCCAGCGGCATCACCGAG ATCGAGGCCATCG3'
Primer I R1	5'GGGCCACAGGCACCACGATGGCCTCG ATCTCGGTGATG3'

Material und Methoden

Primer I F2	5'GAGCGAGGAAGCCAGCGGCATCACC ATCGAGGCCATCGTGG3'
Primer I R2	5'CCAGGGCCACAGGCACCACGATGGCC TCGATGGTGATGCCG3'
Primer I F3	5'TTGGAGCGAGGAAGCCAGCGGCATC ACCGAGGCATCGTGGTGC3'
Primer I R3	5'AGGCCAGGGCCACAGGCACCACGAT GGCCTCGGTGATGCCGCTG3'
Primer I F4	5'CGATTGGAGCGAGGAAGCCAGCGGC ATCACCGCCATCGTGGTG3'
Primer I R4	5'GAAAGGCCAGGGCCACAGGCACCAC GATGGCGGTGATGCCGCTG3'
Variante 5 Fw	5'CACCACCCCTAAATTCGAGATCGAGG CCATCG3'
Variante 5 Rev	5'CGATGGCCTCGATCTCGAATTTAGGG GTGGTG3'
Variante 6 Fw	5'GCGATTGGAGCGAGGAAGCCAGCGG CATCACCGCCCAGGGGGAGATCGAG3'
Variante 6 Rev	5'GCACCACGATGGCCTCGATCTCCCC TGGGCGGTGATGCCGCTGGCTTCC3'
Variante 7 Fw	5'GCGGCATCACCTACGAGGACAGACCC TCTAAGGCCAGGGG3'
Variante 7 Rev	5'CACGATGGCCTCGATCTCCCCCTGGG CCTTAGAGGG3'
Variante 8 Fw	5'GCGGCATCACCTACGAGGACAGACCC TCTAAGGAGATC3'
Variante 8 Rev	5'CACAGGCACGATGGCCTCGATCTCCT TAGAGGG3'
nHIL6-Fc Fw	5'GATCAAGCTTGCCACCATGAACAGCT TCAG3'
nHIL6-Fc Rev	5'GATCGCGGCCGCGGCTGGAGGGCTTC TAGACTC3'

2.1.8 Plasmide

Die nachfolgenden Ausgangsplasmide wurden in dieser Arbeit verwendet. Die Klonierungsstrategien für die durchgeführten Mutationen sind im Anhang aufgeführt.

pcDNA3.1 (+)	Expressionsvektor für transiente und stabile Transfektion von Säugerzellen (Invitrogen, Carlsbad, Californien, USA).
pcDNA3.1-IL-6R	Vektor, dessen Insert für den humanen IL-6R kodiert (Garbers, <i>et al.</i> 2011).
pcDNA3.1-GFP	Vektor, dessen Insert für das Reportergen GFP kodiert.
pmat-gp130-AA-myc	Vektor, dessen Insert für das codon optimierte gp130 kodiert.
pcDNA3.1-HIL-6-Fc	Vektor, dessen Insert für Hyper IL-6 kodiert, mit einem Fc-Tag.
pmat-nmbHIL-6	Vektor, dessen Insert für natives membrangebundenes Hyper IL-6 kodiert.
pcDNA3.1-IL-11R	Vektor, dessen Insert für den humanen IL-11 rezeptor kodiert.
pcDNA3.1-HIL-11	Vektor, dessen Insert für Hyper IL-11 kodiert.
pMows-Plasmid	Expressionsplasmid für die stabile retrovirale Transduktion von murinen Ba/F3 Zellen zur Generierung neuer stabiler Zelllinien. Selektion erfolgt über Puromycin oder Hygromycin.

2.1.9 Puffer und Lösungen

Bakterien-Lysepuffer	50 mM Tris-HCl, pH 7,5 1% Tween 20
Blocking Puffer (Western Blot)	5% Milchpulver in TBS-T
Blocking Puffer (ELISA)	5% Sucrose 1% BSA in PBS

Material und Methoden

Coomassie-Lösung	4% <i>coomassie brilliant blue R250</i> 80% Methanol 20% Essigsäure
Coomassie-Entfärber	80% Methanol 20% Essigsäure
Dialysepuffer	50 mM Tris-HCl, pH 8,0 1 M Guanidin-HCl 2 mM red. Gluthathion 0,16 mM oxidiertes Glutathion
Dialysepuffer II	50 mM Tris-HCl, pH 8,0
FACS Puffer	0,5% BSA in PBS
IP-Puffer	20 mM Tris-HCl, pH 7,5 150 mM NaCl 1 mM EDTA 1 mM EGTA 2,5 mM Natriumpyrophosphat 1 mM β -Glycerophosphat 1 mM Na_3VO_4
IP-Lysepuffer	IP Puffer 1% Triton-X 100
Lysepuffer	10 mM Tris-HCl, pH 7,5 150 mM NaCl 0,5 mM EDTA 0,5% NP-40 1 mM Na_3VO_4 10 mM MgCl_2
Orange-G Ladepuffer (6x)	30% Glycerin 50 mM EDTA 0,25% Orange-G
PBS	150 mM NaCl 8 mM Na_2HPO_4 , pH 7,4 1,7 mM NaH_2PO_4 , pH 7,4
PBS-T	0,05% (V/V) Tween 20 in PBS

Material und Methoden

Phospho-STAT3 Lysepuffer	50 mM Tris-HCl, pH 7,5 150 mM NaCl 2 mM EDTA 2 mM NaF 1 mM Na ₃ VO ₄ 1% NP-40 1% Triton-X 100
Sammelgelpuffer	0,5 M Tris-HCl, pH 6,8 0,4% SDS
SDS-Laufpuffer	25 mM Tris-HCl, pH 8,3 192 mM Glycerin 0,1% SDS
SDS Probenpuffer (5x)	10% (m/V) SDS 5% (m/V) β-Mercaptoethanol 50% (m/V) Glycerol 125 mM Tris-HCl, pH 6,8 1 Spatelspitze Bromphenolblau
SDS Probenpuffer w/o β-Mercaptoethanol (5x)	10% (m/V) SDS 50% (m/V) Glycerol 125 mM Tris-HCl (pH 6,8) 1 Spatelspitze Bromphenolblau
Solubilisierungspuffer	6 M Guanidin-HCl 50 mM Tris-HCl, pH 8,0
Solution 1 (S1)	25 mM Tris-HCl, pH 8,0 10 mM EDTA 50 mM Glukose 100 µg/ml RNaseA
Solution 2 (S2)	200 mM NaOH 1% SDS
Solution 3 (S3)	2,8 mM Kaliumacetat, pH 5,1

Material und Methoden

Stripping Puffer	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 0,1% Essigsäure 10 mM EDTA
TBS	10 mM Tris-HCl, pH 8,0 150 mM NaCl
TBS-T	0,05% (V/V) Tween 20 in TBS
Transferpuffer	20 mM Tris-HCl, pH 8,5 192 mM Glycin 20% Methanol 0,001% SDS
Trenngelbuffer	1,5 M Tris-HCl, pH 8,8 0,4% SDS

2.1.10 Inhibitoren und rekombinante Zytokine

In dem nachfolgenden Abschnitt werden die, in dieser Arbeit verwendeten, Inhibitoren und Zytokine aufgelistet.

2.1.10.1 Inhibitoren

GW280264X	Inhibitor gegen ADAM10 und ADAM17. Iris Biotech. Marktredwitz
IL-6R-Nanobody	Patentnummer: WO 2008/020079 A1
Marimastat	Breitband Metalloproteinase Inhibitor, Sigma-Aldrich, Steinheim
P6	pan-Jak inhibitor Pyridone 6 (P6), Cayman Chemicals, Ann Arbor, Michigan, USA
Sgp130Fc	Conaris Research Institut AG, Kiel

VHH6 Der VHH6 Antikörper wurde zur Stabilisierung von Interleukin-6 und humanen Interleukin-6 Rezeptorkomplexen verwendet (Adams, *et al.* 2017).

2.1.10.2 Rekombinante Proteine

IL-6 Zytokin, isoliert aus *inclusion bodies*.

IL-11 Zytokin, isoliert aus *inclusion bodies*.

Hyper-IL-6 Ein Fusionsprotein aus humanem IL-6 (C-terminal) und löslichem humanem IL-6R (N-terminal), verbunden über einem Peptidlinker. Herstellung siehe (Fischer, *et al.* 1997)

Natives Hyper-IL-6 Ein Fusionsprotein, bei dem C-terminal der lösliche IL-6R (ohne Domäne D1) liegt. Es wurde über einen Peptidlinker mit humanem IL-6 (N-terminal), verbunden.

2.1.11 Verbrauchsmaterialien

6-Well Platte Cyto-One, USA-Scientific, Waltham, USA

12-Well Platte Cyto-one, USA-Scientific, Waltham, USA

96-Well Platte Cyto-One, USA-Scientific, Waltham, USA

96-Well Platte BSA Greiner bio-one, Solingen

10-cm Schale, beschichtet TPP, Trasadingen, Schweiz

10-cm Schale Greiner bio-one, Solingen

Amicon Ultra, 15 ml Filter Merck, Darmstadt

Bottle-top-Filter, 0,45 µm Thermo Scientific, Waltham, USA

Falcon Reaktionsgefäße, 15 ml und 50 ml Greiner bio-one, Solingen

Filter 0,45 µm, Polyvinylidenfluorid Roth, Karlsruhe

Kryoröhrchen VWR, Randor, USA

Mirkotubes, 1,5 ml und 2 ml Sarstedt, Nümbrecht

NAP-Säule GE Healthcare, München

Nitrilhandschuhe Ansell, München

Material und Methoden

Spritzen, Omnifix	Braun, Meisungen
Sterilpipetten Costra Stripette	Coming Incorporated, Coming, USA
PCR Kappen, Gr. 125	StarLab, Ahrensburg
PCR Tubes, 0,2 ml	StarLab, Ahrensburg
Pipettenspitzen	StarLab, Ahrensburg
PVDF-Transmembran	Roth, Karlsruhe
TC10 <i>System counting Slides</i>	BioRad Laboratories GmbH, München
Whatman-Papier	VWR, Langenfeld

2.1.12 Zellkulturmedien

DMEM ^{-/-}	Dulbecco's Modified Eagle's Medium, high Glucose (4,5 g/l), Life Technologies, Darmstadt
DMEM ^{+/+}	DMEM ^{-/-} , + 10% fötales Kälberserum (FCS) und 1% Penicillin (60mg/l)/Streptomycin (100 mg/l) (Pen/Strep).
Fötales Kälberserum	Life Technologies, Darmstadt
Penicilin (6mg/ml)/Streptomycin (10 mg/ml)	Genaxxon Biosciences GmbH, Ulm
Trypsin/EDTA	Life Technologies Darmstadt
TurboFect Transfection Reagent	Thermo Scientific, Waltham, USA

2.1.13 Zelllinien

Die nachfolgenden Zelllinien sind für experimentelle Zwecke verwendet worden oder zur retroviralen Transduktion.

Ba/F3	Murine prä-B-Zelllinie, wächst in Abhängigkeit von IL-3 (Zellkulturüberstand aus Wehi-3B Zellen, (Gearing, <i>et al.</i> 1994).
Ba/F3-gp130	Stabile Ba/F3 Zelllinie, die mit der cDNA für humanes gp130 transduziert wurde (Fischer, <i>et al.</i> 1997).

Material und Methoden

Ba/F3-GFP	Stabile Ba/F3 Zelllinie, die in dieser Arbeit mit der cDNA für GFP transduziert wurde. Wachstum in Abhängigkeit von IL-3.
Ba/F3-IL-6R	Stabile Ba/F3 Zelllinie, die mit cDNA für den humanen IL-6R transduziert wurde (Garbers, <i>et al.</i> 2011).
Ba/F3-mbHIL-6	Stabile Ba/F3 Zelllinie, die in dieser Arbeit mit der cDNA für mbHIL-6 transduziert wurde. Wachstum in Abhängigkeit von IL-3.
Ba/F3-mbHIL-6 Δ 15	Stabile Ba/F3 Zelllinie, die in dieser Arbeit mit der cDNA für mbHIL-6 Δ 15 transduziert wurde. Wachstum in Abhängigkeit von IL-3.
Ba/F3-mbHIL-6 Δ 30	Stabile Ba/F3 Zelllinie, die in dieser Arbeit mit der cDNA für mbHIL-6 Δ 30 transduziert wurde. Wachstum in Abhängigkeit von IL-3.
Ba/F3-mbHIL-6 Δ 45	Stabile Ba/F3 Zelllinie, die in dieser Arbeit mit der cDNA für mbHIL-6 Δ 45 transduziert wurde. Wachstum in Abhängigkeit von IL-3.
Ba/F3-gp130-mIL23R-mIL12R β 1	Stabile Ba/F3-gp130 Zelllinie, die von Dr. Dooreen Floss (Floss, <i>et al.</i> 2013) zuerst mit der cDNA für mIL-12R β 1 und dann mit der cDNA für mIL-23R stabil transduziert wurde.
Ba/F3-IL-11R	Stabile Ba/F3 Zelllinie, die mit der cDNA für den humanen IL-11R transduziert wurde. Wachstum in Abhängigkeit von IL-3.
Ba/F3-mbHIL-11	Stabile Ba/F3 Zelllinie, die mit der cDNA für mbHIL-11 transduziert wurde. Wachstum in Abhängigkeit von IL-3.

Material und Methoden

Ba/F3-mbHIL-11 _{R355E}	Stabile Ba/F3 Zelllinie, die mit der cDNA für mbHIL-11 _{R355E} transduziert wurde. Wachstum in Abhängigkeit von IL-3.
Ba/F3-HIL-6	Stabile Ba/F3 Zelllinie, die in dieser Arbeit mit der cDNA für HIL-6 transduziert wurde. Wachstum in Abhängigkeit von IL-3.
Ba/F3-nmbHIL-6	Stabile Ba/F3 Zelllinie, die in dieser Arbeit mit der cDNA für nmbHIL-6 transduziert wurde. Wachstum in Abhängigkeit von IL-3.
Ba/F3-nHIL-6	Stabile Ba/F3 Zelllinie, die in dieser Arbeit mit der cDNA für nHIL-6 transduziert wurde. Wachstum in Abhängigkeit von IL-3.
Ba/F3-mbHIL-6 _{V563E}	Stabile Ba/F3 Zelllinie, die in dieser Arbeit mit der cDNA für mbHIL-6 _{V563E} transduziert wurde. Wachstum in Abhängigkeit von IL-3.
Ba/F3-mbHIL-6 _{V563G}	Stabile Ba/F3 Zelllinie, die in dieser Arbeit mit der cDNA für mbHIL-6 _{V563G} transduziert wurde. Wachstum in Abhängigkeit von IL-3.
Ba/F3-mbHIL-6-GFP	Stabile Ba/F3-mbHIL-6 Zelllinie, die in dieser Arbeit mit der cDNA für GFP transduziert wurde. Wachstum in Abhängigkeit von IL-3.
Ba/F3-gp130-mbHIL-6	Stabile Ba/F3-gp130 Zelllinie, die in dieser Arbeit mit der cDNA für mbHIL-6 transduziert wurde. Zytokinunabhängiges Wachstum.
Ba/F3-gp130-mbHIL-6 Δ 15	Stabile Ba/F3-gp130 Zelllinie, die in dieser Arbeit mit der cDNA für mbHIL-6 Δ 15 transduziert wurde. Zytokinunabhängiges Wachstum.

Material und Methoden

Ba/F3-gp130-mbHIL-6 Δ 30	Stabile Ba/F3-gp130 Zelllinie, die in dieser Arbeit mit der cDNA für mbHIL-6 Δ 30 transduziert wurde. Zytokinunabhängiges Wachstum
Ba/F3-gp130-mbHIL-6 Δ 45	Stabile Ba/F3-gp130 Zelllinie, die in dieser Arbeit mit der cDNA für mbHIL-6 Δ 45 transduziert wurde. Zytokinunabhängiges Wachstum
Ba/F3-gp130-IL-11R	Stabile Ba/F3-gp130 Zelllinie, die mit cDNA für den humanen IL-11R transduziert wurde. Wachstum in Abhängigkeit von IL-11.
Ba/F3-gp130-mbHIL-11	Stabile Ba/F3-gp130 Zelllinie, die mit der cDNA für mbHIL-11 transduziert wurde. Zytokinunabhängiges Wachstum
Ba/F3-gp130-mbHIL-11R _{355E}	Stabile Ba/F3-gp130 Zelllinie, die mit der cDNA für mbHIL-11 _{R355E} transduziert wurde. Zytokinunabhängiges Wachstum
Ba/F3-gp130-HIL-6	Stabile Ba/F3-gp130 Zelllinie, die in dieser Arbeit mit der cDNA für HIL-6 transduziert wurde. Zytokinunabhängiges Wachstum
Ba/F3-gp130-nmbHIL-6	Stabile Ba/F3-gp130 Zelllinie, die in dieser Arbeit mit der cDNA für nmbHIL-6 transduziert wurde. Zytokinunabhängiges Wachstum.
Ba/F3-gp130-nHIL-6	Stabile Ba/F3-gp130 Zelllinie, die in dieser Arbeit mit der cDNA für nHIL-6 transduziert wurde. Zytokinunabhängiges Wachstum.
Ba/F3-gp130 _{ΔD4-D6} (Δ 322-613), S Δ 614-616-myc	Stabile Ba/F3 Zelllinie, die in dieser Arbeit mit der cDNA für gp130 _{ΔD4-D6} (Δ 322-613), S Δ 614-616-myc transduziert wurde. Wachstum in Abhängigkeit von IL-3.

Material und Methoden

Ba/F3-gp130 _{ΔD4-D6 (Δ322-613), SΔ614-617} -myc	Stabile Ba/F3 Zelllinie, die in dieser Arbeit mit der cDNA für gp130 _{ΔD4-D6 (Δ322-613), SΔ614-617} -myc transduziert wurde. Wachstum in Abhängigkeit von IL-3.
Ba/F3-gp130 _{ΔD4-D6 (Δ322-613), SΔ614-618} -myc	Stabile Ba/F3 Zelllinie, die in dieser Arbeit mit der cDNA für gp130 _{ΔD4-D6 (Δ322-613), SΔ614-618} -myc transduziert wurde. Wachstum in Abhängigkeit von IL-3.
Ba/F3-gp130 _{ΔD4-D6 (Δ322-613), SΔ614-619} -myc	Stabile Ba/F3 Zelllinie, die in dieser Arbeit mit der cDNA für gp130 _{ΔD4-D6 (Δ322-613), SΔ614-619} -myc transduziert wurde. Wachstum in Abhängigkeit von IL-3.
Ba/F3-gp130 _{Δ614-616} -myc	Stabile Ba/F3 Zelllinie, die in dieser Arbeit mit der cDNA für gp130 _{Δ614-616} -myc transduziert wurde. Wachstum in Abhängigkeit von IL-3.
Ba/F3-gp130 _{ΔD4-D6 (Δ322-613)} -myc	Stabile Ba/F3 Zelllinie, die in dieser Arbeit mit der cDNA für gp130 _{ΔD4-D6 (Δ322-613)} -myc transduziert wurde. Wachstum in Abhängigkeit von IL-3.
Ba/F3-gp130 _{ΔD4-D6 (Δ329-613)} -myc	Stabile Ba/F3 Zelllinie, die in dieser Arbeit mit der cDNA für gp130 _{ΔD4-D6 (Δ329-613)} -myc transduziert wurde. Wachstum in Abhängigkeit von IL-3.
Ba/F3-gp130 _{ΔD4-D6 (Δ329-613), SΔ614-616} -myc	Stabile Ba/F3 Zelllinie, die in dieser Arbeit mit der cDNA für gp130 _{ΔD4-D6 (Δ329-613), SΔ614-616} -myc transduziert wurde. Wachstum in Abhängigkeit von IL-3.
Ba/F3-gp130- gp130 _{ΔD4-D6 (Δ322-613), SΔ614-616} -myc	Stabile Ba/F3-gp130 Zelllinie, die in dieser Arbeit mit der cDNA für gp130 _{ΔD4-D6 (Δ322-613), SΔ614-616} -myc transduziert wurde. Zytokinunabhängiges Wachstum.

Material und Methoden

Ba/F3-gp130-gp130 _{ΔD4-D6} (Δ322-613), S _{Δ614-617} -myc	Stabile Ba/F3-gp130 Zelllinie, die in dieser Arbeit mit der cDNA für gp130 _{ΔD4-D6} (Δ322-613), S _{Δ614-617} -myc transduziert wurde. Zytokinunabhängiges Wachstum.
Ba/F3-gp130-gp130 _{ΔD4-D6} (Δ322-613), S _{Δ614-618} -myc	Stabile Ba/F3-gp130 Zelllinie, die in dieser Arbeit mit der cDNA für gp130 _{ΔD4-D6} (Δ322-613), S _{Δ614-618} -myc transduziert wurde. Zytokinunabhängiges Wachstum.
Ba/F3-gp130-gp130 _{ΔD4-D6} (Δ322-613), S _{Δ614-619} -myc	Stabile Ba/F3-gp130 Zelllinie, die in dieser Arbeit mit der cDNA für gp130 _{ΔD4-D6} (Δ322-613), S _{Δ614-619} -myc transduziert wurde. Zytokinunabhängiges Wachstum.

2.1.13.1 Adherente Zelllinien

CHO-K1	Chinesische Hamster Ovarialzellen, DMSZ Braunschweig, Deutschland.
CHO-K1-nHIL-6Fc	Chinesische Hamster Ovarialzellen, die in dieser Arbeit mit der cDNA für nHIL-6Fc transfiziert wurden.
COS7	SV40-transformierte Nierenfibroblasten aus der grünen Meerkatze (ATCC-Nummer: CRL-1651).
HEK293	Immortalisierte humane embryonale Nierenzellen (ATCC-Nummer: CRL-1573).

Material und Methoden

Phoenix-Eco

HEK293T wurden stabil mit cDNAs transfiziert, die für Antigen, Polymerase und Hüllproteine für ecotrophe murine Retroviren kodiert (Ketteler, *et al.* 2002). Zur Verfügung gestellt von Garry P. Nolan (Stanford University, CA, USA).

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 *Messung von DNA Konzentrationen*

Die Messung der DNA Konzentration wurde durch eine spektrometrische Messung am NanoDrop2000 (Peqlab Biotechnologie GmbH Erlangen) durchgeführt. Dabei wurde die Reinheit der DNA durch das Absorptionsverhältnis A260/A280 bestimmt.

2.2.1.2 *Agarose-Gelelektrophorese*

Die Trennung von DNA-Fragmenten und Bestimmung der Größe erfolgte durch Agarose-Gelelektrophorese (BioRad Laboratories GmbH, München). Diese Methode wurde verwendet, wenn DNA mittels Endonukleasen geschnitten wurde. Zur Herstellung eines 1% oder 2%igen Agarosegels wurde Agarose abgewogen und in TAE-Puffer aufgeköcht. Die flüssige Agarose wurde in Schlitten gegossen, ein Kamm eingesteckt und mit 0,001% *safer green* versetzt. Nach dem Auspolymerisieren der Agarose im Schlitten, wurde der Kamm herausgezogen. Das Agarosegel wurde im Schlitten in die mit TAE-Puffer gefüllte Gelelektrophorese Kammer überführt. Die durch den Kamm entstandenen Taschen wurden mit den DNA Proben beladen. Um die Proben in den Taschen zu behalten, bis diese im Gel aufgetrennt wurden, wurde vor dem beladen ein 5x Ladepuffer benutzt. Die Trennung der Fragmente Ihrer Größe nach erfolgte bei 100V. Als Kontrolle wurde entweder Gene Ruler Express oder Gene Ruler 1 kb verwendet, um die Größe der Fragmente mit Hilfe des INTAS iX Imager (INTAS Science Imaging Instruments) ermitteln zu können.

2.2.1.3 *DNA Extraktion aus Agarosegelen*

Nachdem die DNA Fragmente voneinander getrennt wurden, erfolgte die Gelextraktion. Hierbei wurde das Agarosegel (siehe Abschnitt 2.2.1.2) auf einen UV-Tisch (Bio-Budget Technologies GmbH) gelegt und mit Licht der Wellenlänge von 365 nm beleuchtet. Das in die DNA interkalierte *safer green* wurde dadurch angeregt, und die Banden leuchteten grün. Die gewünschten DNA Fragmente wurden mit einem Skalpell aus dem DNA-Gel herausgeschnitten und in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Isolierung aus der Agarose-

se erfolgte nach Herstellerangaben mit Hilfe des Nucleospin Extract II (Machery-Nagel GmbH & Co. KG Düren) Kit.

2.2.1.4 Dephosphorylierung von Plasmid-DNA

Um eine Religierung des 5' und 3' Endes der geschnittenen (siehe Abschnitt 2.2.1.5) Plasmid-DNA zu vermeiden, wurde nach der Inkubationszeit der Endonukleasen 1 U Fast-AP (Thermo Fischer Scientific, St. Leon, Deutschland) hinzugegeben und für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Durch Größentrennung der Fragmente auf einem Agarosegel wurde die Reaktion gestoppt.

2.2.1.5 Restriktion der DNA über Endonukleasen

Für die Spaltung von DNA, um nachfolgende DNA-Fragmente zu isolieren oder einen Vektor für weitere Klonierungen zu generieren, wurde Plasmid-DNA mittels Restriktionsendonukleasen geschnitten.

Für einen präparativen Verdau wurden dafür 10 µg Plasmid DNA und 10 U der entsprechenden Endonuklease eingesetzt. Um eine enzymatische Reaktion zu gewährleisten, wurde ebenfalls der zu der Endonuklease gehörige Puffer verwendet. Der Restriktionsansatz wurde in einem Volumen von 50 µl angesetzt und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Probe wurde zur Größentrennung auf ein Agarosegel aufgetragen. Die spezifischen Fragmente wurden mittels Extraktion (siehe Abschnitt 2.2.1.3) aus dem Agarosegel isoliert.

Für die Analyse von Plasmid-DNA aus einer Mini-Präparation wurde ebenfalls eine Restriktion mittels Endonukleasen durchgeführt. Dafür wurde jedoch 1 µg DNA verwendet und ein Ansatz mit einem gesamten Volumen von 20 µl angesetzt. Die Restriktion wurde für 2 Stunden oder über Nacht bei 37°C inkubiert.

2.2.1.6 Herstellung des pMows-Vektors

Für eine retrovirale Transduktion in murine prä-B Zelllinien (Ba/F3) wurde ein pMows Vektor verwendet, um die gewünschte cDNA klonieren zu können. Ein präparativer Verdau wurde mit 10 µg Plasmid-DNA des Plasmides pMows-puro-GFP, mit 5 U der Endonukleasen BamHI und EcoNI und mit 10 µl BamHI Puffer in einem Endvolumen von 50 µl mit destilliertem Wasser angesetzt und für 3 Stunden bei 37°C inkubiert. Die Endonukleasen

wurden bei 95°C für 20 Minuten hitzeinaktiviert, die Probe auf ein Agarosegel aufgetragen und der Größe nach getrennt. Die Isolierung des 5721 Basenpaar großen DNA-Fragments erfolgte über das *NuceloSpin extract II* Kit. Um den Überhang, der durch die Endonuklease BamHI entstanden ist, aufzufüllen, wurde die Probe nach der Isolierung mit 3 µl 10 x Klenow Puffer, 0,5 µl 2 mM dNTP-Mix und 5 U Klenow Fragment für 10 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Probe wurde für 10 Minuten bei 95°C hitzeinaktiviert, um die Klenow-Reaktion zu unterbrechen. Die Religation des Vektors wurde verhindert, indem dieser dephosphoryliert wurde (siehe Abschnitt 2.2.1.4).

Die Ligation mit der spezifischen cDNA erfolgte nachdem die cDNA mit der Endonuklease PmeI geschnitten wurde. Die cDNA wurde auch über ein Agarosegel der Größe nach getrennt, um nicht spezifische DNA Fragmente zu entfernen. Im Anschluss daran wurde die spezifische cDNA über das Kit *NucleoSpin extract II* aus dem Agarosegel isoliert und mit dem vorbereiteten pMows-puro Vektor ligiert.

2.2.1.7 Ligation von DNA Fragmenten

Für die Ligation des geschnittenen Inserts mit dem dephosphorylierten Vektor wurde bei einer *sticky-end* Klonierung ein molares Verhältnis von 3:1 eingehalten. Dazu wurde 1 U T4 DNA Ligase und 2 µl Ligase Puffer in einem Endvolumen von 20 µl über Nacht bei 4°C inkubiert. Bei einer *blunt-end* Klonierung wurden 2 U T4 DNA Ligase, mit 2 µl Ligasepuffer und 2 µl einer 50%igen PEG4000 Lösung zu dem molaren 3:1 Verhältnis eingesetzt. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4°C.

2.2.1.8 Transformation in chemisch kompetente XL-Blue 1 Bakterien

Für die Vermehrung von Plasmid-DNA durch Bakterien wurden Bakterien des Stammes XL-Blue 1 transformiert. Diese wurden 10 Minuten auf Eis aufgetaut und jeweils 10 µl Ligationsansatz (Transformation) oder 1 µl Plasmid (Re-Transformation) hinzugegeben. Das Gemisch wurde 5 Minuten auf Eis inkubiert, dann ein Hitzeschock bei 42°C für eine weitere Minute induziert und im Anschluss nochmals fünf Minuten auf Eis inkubiert. Zur anfänglichen Vermehrung wurde das Gemisch mit 500 µl LB Medium für eine Stunde bei 37°C und 1400 rpm im Thermoschüttler geschüttelt. Nach Ablauf der Stunde wurde das LB-Bakteriengemisch auf einer LB-Agarplatte mit entsprechendem Antibiotikum ausplattiert und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank gelagert.

2.2.1.9 Mini-Präparation von Plasmid-DNA

Um Plasmid-DNA aus 2 ml Bakterienkultur zu isolieren, wurde vor dem Animpfen mit der Kultur, das LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzt. Danach wurde eine Kolonie von der Agar-Platte (siehe Abschnitt 2.2.1.8) mit einer Pipettenspitze gepickt und diese Spitze in das LB-Medium mit Antibiotikum überführt. Die Vermehrung der Bakterien erfolgte bei 37°C, 1400 rpm im Thermoschüttler über Nacht. Am darauffolgenden Tag wurden pro Ansatz 100 µl von der Kultur abgenommen und der Rest mit 20.000 g für 5 Minuten bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in S1 Puffer resuspendiert und mit 200 µl S2 Puffer inkubiert. Nach fünf minütiger Inkubationszeit wurde 150 µl S3 Puffer hinzugegeben, invertiert, sowie 10 Minuten auf Eis inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das Gemisch mit 18.000 g bei 4°C für 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 900 µl 100%igem Ethanol (-20°C) auf Eis für fünf Minuten inkubiert. Um die DNA zu pelletieren, wurde erneut für 15 Minuten bei 4°C und 18.000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das entstandene DNA Pellet mit 500 ml 70 %igem Ethanol gewaschen und für 5 Minuten bei 4°C und 18.000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen, das Pellet luftgetrocknet und in 30 ml dH₂O gelöst.

2.2.1.10 Midi-Präparation von Plasmid-DNA

Zum Animpfen der Übernachtskultur wurden wahlweise die 100 µl der Mini-Präparation (siehe Abschnitt 2.2.1.9) oder eine Kolonie von einer Agarplatte (siehe Abschnitt 2.2.1.8) verwendet. Die Übernachtskultur wurde zusätzlich mit einem Volumen von 100 ml LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum bei 37°C über Nacht im Schüttler (INFORS AG Schweiz) inkubiert. Die Übernachtskultur wurde am darauffolgenden Tag mit 4.000 g bei 4°C für 15 Minuten zentrifugiert und die im Pellet enthaltenen Plasmide mithilfe des *NucleoBond Xtra* Midi (Machery-Nagel GmbH & Co. KG Düren) nach Protokoll des Herstellers isoliert. Die Konzentration der Plasmid-DNA wurde im Nanodrop (siehe Abschnitt 2.2.1.1) gemessen.

2.2.1.11 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Für die Amplifikation von spezifischen DNA-Sequenzen wurde die Methode der Polymerase Kettenreaktion angewendet. Dabei wurde bei der Amplifikation spezifischer DNA

Material und Methoden

Sequenzen mittels PCR, *Splicing by overlapping Extension* PCR (*soe*-PCR), oder *site-directed mutagenesis*-PCR, die *Phusion high fidelity* Polymerase verwendet, da diese über eine *proof reading* Funktion verfügt. Für die Polymerase-Kettenreaktion wurde der Thermocycler verwendet. Für die Methode der *soe*-PCR wurden die inneren Oligonukleotide so gewählt, dass deren Nukleotidsequenz überlappt und somit ein Fragment aus der spezifischen DNA Sequenz herausgelassen oder eingefügt wurde. Bei einem kleinen Abschnitt von einem bis drei Nukleotiden wurde die *site-directed mutagenesis*-PCR als Methode gewählt. Bei der *soe*-PCR und *site-directed mutagenesis*-PCR wurde im Anschluss an die erste PCR, eine weitere PCR durchgeführt mit dem Produkt aus der vorangegangenen PCR. Für die Polymerase-Kettenreaktion wurde folgender Ansatz verwendet, bei dem unterschiedliche Oligonukleotide verwendet wurden, je nachdem welche cDNA amplifiziert wurde:

Template	100 ng Plasmid
5' Oligonukleotid	10 μ M
3' Oligonukleotid	10 mM
dNTP-Mix	10 mM
10 x HF Puffer	5 μ l
Phusion Polymerase	1 U
dH ₂ O	Σ 50 μ l

Für die Polymerasekettenreaktion wurde folgendes Programm verwendet:

Denaturierung	98°C	5 Minuten	
Denaturierung	98°C	30 Sekunden	} 30x
Annealing	60°C	30 Sekunden	
Elongation	72°C	15 Sekunden/kb	
Elongation	72°C	10 Minuten	
Lagerung	4°C	∞	

Aufgrund der unterschiedlichen Längen der spezifischen DNA Sequenzen wurde die Elongationszeit variiert.

2.2.1.12 Sequenzierung von Plasmid-DNA

Zur Überprüfung der neu erstellten Plasmide, wurden diese von der Firma SeqLab Sequence Laboratories Göttingen GmbH sequenziert. Die Sequenzierungsmethode ist die Sanger Sequenzierung. Für die Sequenzierung wurden entweder Oligonukleotide mitversendet oder die von der Firma eigenen Oligonukleotide T7 und BGH rev verwendet.

2.2.2 Proteinbiochemische Methoden

2.2.2.1 Durchflusszytometrie

Für die Überprüfung der Oberflächenexpression von auf der Plasma-Membran lokalisierten Proteine wurden Ba/F3-Zellen mit der Methode der Durchflusszytometrie analysiert. Dafür wurden 1×10^6 Zellen pro Zelllinie mit 500 xg bei 4°C für fünf Minuten zentrifugiert. Das entstandene Pellet wurde zweimal mit 1 ml FACS-Puffer (0,5% BSA in PBS) gewaschen und erneut zentrifugiert. Das gewaschene Pellet wurde in 100 µl FACS Puffer resuspendiert und mit dem primären Antikörper (siehe Abschnitt 2.1.2.1) für 2 Stunden auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden danach dreimal mit FACS Puffer gewaschen und das gewaschene Pellet erneut in 100 µl FACS Puffer resuspendiert. Der Sekundärantikörper wurde hinzugegeben (siehe Abschnitt 2.1.2.1) und für 1 Stunde auf Eis im Dunkeln inkubiert. Die Zellen wurden nach der Inkubationszeit zweimal gewaschen und nach dem letzten Waschschritt in 200 µl FACS Puffer resuspendiert. Die resuspendierten Zellen wurden in ein FACS Röhrchen überführt. Die Analyse der Oberflächenexpression auf den Zellen erfolgte im FACS Canto II. Die Auswertung der Daten erfolgte mit der Software FCS Express 4 Flow

2.2.2.2 Kopräzipitation

Zur Untersuchung der Bindung zwischen Rezeptor und Zytokin wurde die Methode der Kopräzipitation angewandt. Hierzu wurden 1×10^7 Ba/F3-Zellen pro Kondition ausgesät und mit HIL-6-Fc für 30 Minuten stimuliert. Nach der Stimulation wurden die Zellen bei 300 g für 5 Minuten bei 4°C zentrifugiert und das Pellet in 200 µl IP Lysepuffer (siehe Abschnitt 2.1.9) resuspendiert. Für die Lyse rollten die Zellen für zwei Stunden bei 4°C in einem Falcon. Die lysierten Zellen wurden zur Abtrennung von Zellresten nach der Lyse für 15 Minuten bei 4°C mit 20.000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde auf 500 µl mit IP-

Puffer aufgefüllt. Davon wurden 50 µl als Input Fraktion abgenommen und mit 50 µl 5x Lämmli aufgeköcht (10 Minuten bei 95°C). Für die Präzipitation wurden Protein A-Agarose *beads* verwendet. Diese wurden zunächst dreimal gewaschen, um den Ethanol, in dem die *beads* gelöst sind, zu entfernen. Dafür wurden 50 µl *beads* pro Probe mit 500 µl IP Puffer versetzt und mit 300 g bei 4°C für 5 Minuten zentrifugiert. Die *beads* wurden zu den restlichen 450 µl des Lyseüberstandes hinzupipettiert und für vier Stunden bei 4°C invertiert. Im Anschluss wurde das Gemisch aus *beads* und Lysat zentrifugiert. Von dem Überstand wurden 50 µl abgenommen und als *Nonbound*-Fraktion gekennzeichnet. Diese wurde ebenfalls mit 50 µl 5x Lämmli versetzt und aufgeköcht. Der restliche Überstand wurde verworfen und die *beads* fünfmal mit 500 µl IP-Puffer gewaschen und zentrifugiert. Nach dem fünften Waschschrift wurde mit einer Hamilton-Spritze der gesamte Puffer entfernt und die verbliebenen *beads* mit 100 µl 2x Lämmli versetzt. Diese wurden aufgeköcht, zentrifugiert und die von den *beads* gelösten Proteine mit einer Hamilton-Spritze abgenommen. Die Analyse der Präzipitate erfolgte über die Methode des Western Blots.

2.2.2.3 Herstellung von Lysaten

Für die Analyse von Proteinen wurden nach der Durchführung des jeweiligen Experiments, wie der Stimulation (siehe Abschnitt 2.2.3.6) oder Transfektion, (siehe Abschnitt 2.2.3.3) Lysate hergestellt. Dafür wurden die Zellpellets entweder im phospho-STAT3 Lysepuffer oder im normalen Lysepuffer (siehe Abschnitt 2.1.9) resuspendiert. Danach folgte eine Inkubationszeit von 3 Stunden bei 4°C im Falcon, welches gerollt wurde. Zur Abtrennung von Proteinen und Zellresten wurden die Lysate im Anschluss für 15 Minuten bei 4°C mit 20.000 g zentrifugiert. Die entstandenen Überstände wurden in ein neues Reaktionsgefäß überführt und für die genaue Konzentration aller Proteine im BCA Assay (siehe Abschnitt 2.2.2.5) analysiert.

2.2.2.4 Bestimmung des Proteingehaltes in Lysaten

Für die Bestimmung der Konzentration der gesamten Proteinmenge nach der Lyse wurde der *Bicinchoninic acid assay* (BCA *assay*) angewandt. Von den Lysaten wurde für den Assay eine 1:20 Verdünnung in dH₂O angesetzt. Pro Kavität wurden 25 µl der Verdünnung in eine 96 Well Platte pipettiert. Es wurde eine Doppelbestimmung durchgeführt. Zur Bestimmung einer Standardgerade wurden verschiedene Konzentrationen von BSA in

dH₂O ebenfalls als Doppelbestimmung in Kavitäten überführt. Nach Zugabe des BCA Reaktionsgemisches (196 µl Solution klar und 4 µl Solution blau) wurde der Assay für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Messung erfolgte am TECAN Reader M200 Infinite pro bei einer Absorption von 562 nm. Die Konzentration wurde am Computer berechnet.

2.2.2.5 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Für die Trennung von Proteinen nach Ihrem Molekulargewicht wurde die Methode der SDS-PAGE angewandt. Dafür wurden 50 µg Zellysate (siehe Abschnitt 2.2.2.5 Bestimmung des Proteingehalts in Lysaten) oder 25 µl der Transaktivierungsproben oder IP-Proben (siehe Abschnitt 2.2.2.2 Immunopräzipitation) aufgetragen. Die Gele für die SDS Page wurden selbst hergestellt. Dafür wurden 1,5 mm dicke Gele mit einem Trenngel von ca. 6 cm und einem Sammelgel von ca. 1 cm gegossen. In das Sammelgel wurden 10-fach bzw. 15-fach Kämme gesteckt, um Probenaschen zu generieren. Die Größentrennung der Proteine erfolgte über das Mini-PROTEAN tetra System bei einer konstanten Spannung von 80-100 V. Nachdem die Lauffront das Ende des Trenngels erreicht hatte, wurde die SDS-PAGE gestoppt.

2.2.2.6 Western Blot

Für die Detektion von Proteinen wurden zunächst die Proteine auf eine PVDF Membran übertragen. Dafür wurde die Membran für eine Minute in Methanol aktiviert und im Anschluss für jeweils eine Minute erst in dH₂O und dann im Transferpuffer gewaschen. Da diese Methode auf einem *semi-dry blotting* System beruht, wurde das Whatman Papier in Transferpuffer getränkt. Der Transfer erfolgte wie vom Hersteller vorgegeben, indem 4x Whatman Papier in die Blotting Kassette eingelegt wurde. Darauf wurden nacheinander die gewaschene Membran, das SDS-Gel und 4x Whatman Papier geschichtet. Die Proteine wurden durch ihre negative Ladung bei konstanter Spannung und konstantem Strom (25 V, 1 A 40 Minuten) auf die Membran, die am Plus-Pol liegt, transferiert. Die Membran wurde aus der Kassette entnommen, in ein 50 ml Falcon überführt und die Proteine auf der Membran mit einer Blockierlösung (5% Milchpulver in TBS-T) für zwei Stunden geblockt. Der Primärantikörper wurde über Nacht bei 4°C inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurde der Primärantikörper entfernt und die Membran dreimal für 10 Minuten in TBS-T gewaschen. Somit wurde ungebundener Antikörper entfernt. Die Inkubation des Sekundäranti-

körpers erfolgte für 1 Stunde bei Raumtemperatur. Nach der Inkubationszeit wurde die Membran erneut dreimal mit TBS-T im Abstand von 10 Minuten und einmal mit TBS gewaschen. Die Detektion der Proteine auf der Membran erfolgte über das Immobilon Western Blot Detektions Kit am INTAS Chemo Cam Imager.

2.2.2.7 Ablösen der Antikörper von der Membran (Stripping)

Um andere Proteine auf der Membran nachzuweisen, wurden die Antikörper von der Membran entfernt (gestrippt). Hierfür wurde die Membran in 50 ml 1x Stripping Puffer mit 50 µl β-Mercaptoethanol für 30 Minuten bei 60°C im Wasserbad inkubiert. Das β-Mercaptoethanol löst die Bindung zwischen den Antikörpern und den auf der Membran haftenden Proteine. Die Membran wurde im Anschluss an die Inkubationszeit dreimal für 10 Minuten mit TBS-T gewaschen und für 2 Stunden in der Blockierlösung die unspezifischen Proteinbindestellen erneut geblockt. Der Primärantikörper wurde über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Detektion erfolgte wie im Abschnitt 2.2.2.7 beschrieben.

2.2.2.8 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Für die quantitative Bestimmung von Proteinkonzentrationen in Zellkulturüberständen wurde die Methode des ELISA verwendet. Für die Bestimmung von nHIL-6- oder nmbHIL-6-haltigem Zellkulturüberständen wurde das Kit Human IL-6/IL-6 R *alpha Complex DuoSet* ELISA nach Herstellerangaben verwendet. Für die quantitative Bestimmung des sIL-6R wurde ein Sandwich ELISA verwendet. Dafür wurde in einer 96 Well Platte 1 µg/ml 4-11 Antikörper (50 µl pro Well) über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Die Platte wurde am darauffolgenden Tag dreimal mit 200 µl PBS-T gewaschen, um ungebundenen Antikörper zu entfernen. Zur Vermeidung von unspezifische Bindungen wurde in jede Kavität 200 µl *Blocking* Puffer über zwei Stunden bei Raumtemperatur gegeben. Nach dreimaligen Waschen der Kavitäten wurden die Proben (verdünnt in 1% BSA PBS-T) und ein Standard (verdünnt in 1% BSA PBS-T) in einem Volumen von 50 µl als Doppelbestimmung aufgetragen. Der Standard wurde zur Bestimmung einer Standardgeraden in der Auswertung benötigt und bestand aus rekombinantem sIL-6R in verschiedenen Konzentrationen. Nach der Inkubationszeit wurden die Kavitäten dreimal gewaschen und der Detektionsantikörper Baf227 (0,5 µg/ml) in 1% BSA PBS in einem Volumen von 50 µl pro Kavität aufgetragen. Nach Ablauf der Inkubationszeit von 2 Stunden bei Raumtemperatur

erfolgte dreimaliges Waschen. In jede Kavität wurde Streptavidin-HRP Substrat (R&D Systems GmbH, Wiesbaden-Nordenstadt) verdünnt in 1 % BSA PBS (Volumen 100 µl pro Kavität) gegeben und für 30 Minuten im Dunkeln inkubiert. Es folgten ein erneuter Waschschrift mit PBS-T und die Zugabe von 75 µl POD Substrat pro Kavität für 20 Minuten bei Raumtemperatur. Zum Anhalten der Reaktion wurden 75 µl 1,8 M H₂SO₄ hinzugegeben und die Absorption im Tecan Infinite M200 Pro Reader bei 450 nm gemessen.

2.2.3 Zellkultur basierende Methoden

2.2.3.1 Adhärente Zellen

In dieser Arbeit wurden die adhärenen Zelllinien Phönix-Eco, CHO-K1 und HEK293 kultiviert. Diese wuchsen auf 10 cm Schalen mit 10 ml DMEM^{+/+} bei 37°C und 5% CO₂ in einer Wasserdampf gesättigten Atmosphäre. Die Zellen wurden subkultiviert, indem diese zweimal pro Woche mit PBS gewaschen und mit 2 ml Trypsin/EDTA abgelöst wurden. Die abgelösten Zellen wurde bei 1.200 g für 5 Minuten bei Raumtemperatur pelletiert und in DMEM^{+/+} resuspendiert. In einer 1:10 Verdünnung wurden diese auf eine neue 10 cm Zellkulturplatte für adhärenente Zellen übertragen.

2.2.3.2 Suspensionszellen

In dieser Arbeit wurden Ba/F3-Zellen und deren transduzierte Subtypen in 10 cm Petrischalen mit zehn ml DMEM^{+/+} samt entsprechendem Zytokin kultiviert. Ba/F3-Zellen und transduzierte Subtypen wurden in demselben Inkubator wie die adhärenente Zellen kultiviert. Das Passagieren dieser Zellen erfolgte einmal in der Woche in einem Verhältnis von 1:10.000.

2.2.3.3 Transfektion von adhärenente Zellen

Für die Transfektion von adhärenente Zellen wurde diese einen Tag vor der Transfektion in einer Zellzahl von 2×10^6 (HEK293 und CHO-K1) oder 5×10^5 (Phönix-ECO) pro 10 cm Schale ausgesät. Die Transfektion erfolgte am nächsten Tag. Als Transfektionsreagenz wurde Turbofect verwendet. Dafür wurde ein Ansatz aus 5 µg Plasmid-DNA für HEK293 und CHO-K1 mit 1 ml DMEM^{-/-} und 10 µl Turbofect angesetzt, invertiert und für 15 bis 20

Minuten im Inkubator inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde das Gemisch vorsichtig auf die Zellen geträufelt, die Schale geschwenkt und für 6 Stunden im Inkubator gelassen. Nach dieser Zeit wurde das Medium gewechselt, da Turbofect toxische Eigenschaften für die Zellen besitzt.

Für die Transfektion von Phönix-Eco Zellen wurde ein anderes Protokoll verwendet. Hierfür wurde 1 µg Plasmid-DNA verwendet, welche in 200 µl DMEM^{-/-} mit 2 µl Turbofect für 15 bis 20 Minuten im Inkubator inkubiert wurde. Das Gemisch wurde vorsichtig auf die Zellen geträufelt und nach 6 Stunden das Medium erneuert. Für diese Transfektion wurde das Medium mit 30% FCS angesetzt. Als Kontrolle für alle adhärenenten Zellen wurde ein GFP-Expressionsplasmid mit transfiziert, um die Effizienz der Transfektion visuell erfassen zu können. Eine gute Effizienz liegt bei 50 bis 70% leuchtender Zellen.

2.2.3.4 Retrovirale Transduktion

Die retrovirale Transduktion wurde angewendet, um Ba/F3-Zellen stabil zu transduzieren. Hierfür wurden transfizierte Phönix-Eco Zellen benötigt. Diese Zellen sezernieren Viruspartikel mit den spezifischen Plasmiden in den Zellkulturüberstand, welche dann die Ba/F3-Zellen transduzieren. Dafür wurden Ba/F3- oder stabile Ba/F3-gp130-Zellen bei 1.200 g für 5 Minuten bei Raumtemperatur pelletiert. Die Zellzahl wurde über den *Cell counter* TC10 bestimmt. Die Zellzahl wurde zunächst auf 2×10^6 Zellen pro ml eingestellt. Für die Transduktion wurden 50 µl verwendet. Der Überstand der Phönix-Eco Zellen wurde abgenommen und bei Raumtemperatur für 5 Minuten bei 300 g zentrifugiert. Der zentrifugierte Überstand wurde zu 50 µl der Zellsuspension gegeben. Zum Schluss wurde Polybren hinzupipettiert und das Gemisch für 2 Stunden bei Raumtemperatur mit 300 g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 5 ml DMEM^{+/+} mit entsprechendem Zytokin resuspendiert und auf einer 6-Well Platte ausgesät. Nach 48 Stunden wurde Puromycin oder Hygromycin für die Selektion der transduzierten Zellen hinzugegeben.

2.2.3.5 Proliferationsassay

Der Proliferationsassay wurde genutzt, um die Proliferation Ba/F3-Zellen zu überprüfen. Hierfür wurden die Zellen dreimal mit 10 ml PBS gewaschen und die Zellzahl mit Hilfe des *Cell counter* TC10 bestimmt. Für das Experiment wurden Triplikate angesetzt und eine Zellzahl von 5×10^3 Zellen pro 96 Well Kavität eingesetzt. Hinzugegeben wurde, entspre-

chend dem experimentellen Ansatz, Zytokin und / oder ein Inhibitor in entsprechender Konzentration. Danach erfolgte eine Inkubationszeit von 48 Stunden. Die Proliferation wurde durch einen *CellTiter-Blue Viability Assay* an dem Tecan Infinite M200 pro Reader (ex-Filter 530/25, em-Filter 590/35) gemessen. Für die Analyse wurden die höchsten noch messbaren Werte vom Ausgangszustand zum Zeitpunkt 0 subtrahiert und die errechneten Messwerte als „*relative light units*“ (RLU) deklariert.

2.2.3.6 Stimulationassay

Für die Untersuchung der Induzierbarkeit unterschiedlich stabiler Ba/F3 Zelllinien, wurde die Methode der Stimulation angewandt. Um Zytokinreste aus der Zellsuspension zu entfernen, wurden die Zellen dreimal in zehn ml PBS gewaschen. Nach dem letzten Waschschritt wurden die Zellen in DMEM^{-/-} resuspendiert und durch das Weglassen von FCS die Signalwege nicht mehr aktiviert. Damit wurden die Zellen in einen inaktiven Zustand gebracht, um alle induzierbaren Signale auszuschalten und diese im späteren Verlauf des Experiments zu analysieren. Die Zellen wurden auf Kavitäten aufgeteilt, um verschiedene Zeitpunkte für den Assay zu erhalten. Nach einer Inkubationszeit von vier Stunden in DMEM^{-/-} wurde der Stimulationassay gestartet. Dafür wurden 10 ng/ml Zytokin zu den Zellen hinzugegeben. Die Nullkontrolle wurde ohne die Zugabe von Zytokin behandelt. Die Zellen wurden nach fest gewählten Zeitpunkten geerntet, indem diese in ein Reaktionsgefäß überführt wurden und mit 300 g für 5 Minuten bei 4°C zentrifugiert wurden. Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet lysiert (siehe Abschnitt 2.2.2.4).

2.2.3.7 Transaktivierung

Um die Rezeptorinteraktion zwischen zwei Rezeptoren auf zwei verschiedenen Zellen untersuchen zu können, wurden Ba/F3-gp130-Zellen als Empfänger-Zellen ausgewählt und andere Ba/F3-Zellen, je nach experimentellem Ansatz, als Transmitter-Zellen gewählt. Dafür wurden die entsprechenden Zellen fünfmal mit 10 ml PBS gewaschen und mit Hilfe des *Cell Counter* TC10 gezählt. Es wurde eine Konzentration von 5×10^5 Zellen pro ml eingestellt. Um keine unspezifischen Signale der Empfänger-Zellen zu erhalten, wurde wie in Abschnitt 2.2.3.6 beschrieben, das FCS und Zytokin weggelassen, um die Signalwege herunterzuregulieren. Die Transmitter-Zellen wurden in DMEM^{+/+} Medium mit entsprechendem Zytokin resuspendiert. Die entsprechenden Inhibitoren für die Experimente wur-

den hinzugegeben und für 3 Stunden inkubiert. Um keinen solublen Rezeptor in dem Überstand der Transmitter-Zellen zu haben, wurden diese dreimal in 10 ml PBS gewaschen und erneut mit Inhibitoren versetzt. Anschließend wurden die Zellen zusammenpipettiert und für 30 Minuten inkubiert. Diese wurden nach 30 Minuten, wie in Abschnitt 2.2.3.6 beschrieben, geerntet.

2.2.3.8 Konstitutives shedding

Das konstitutive *shedding* wurde zur Analyse der Aktivität der ADAM10 und ADAM17 Protease gemessen. Dafür wurden stabil transduzierte Ba/F3-Zellen mit den entsprechenden zu untersuchenden Rezeptoren dreimal mit 10 ml PBS gewaschen, um abgeschnittene Rezeptoren zu entfernen. Danach wurden die Zellen mit Hilfe des *Cell Counter* TC10 auf eine Zelldichte von 1×10^6 Zellen pro ml in einer 12-Well Platte mit je 1 ml ausgesät. Dazu kam, je nach Ansatz, ein *shedding* Inhibitor bzw. keine Zugabe, um konstitutives *shedding* darstellen zu können. Die Inkubation wurde für 24 Stunden angesetzt. Die Zellen wurden dafür im Inkubator bei 37°C mit 5% CO₂ inkubiert. Die Zellen wurden, wie in Abschnitt 2.2.3.6 beschrieben, geerntet und der Überstand bei -20°C eingefroren.

2.2.4 Statistische Analysen

Die angegebenen Daten wurden durch Bilden des Mittelwertes und der Standardabweichung (SD) ermittelt. Die statistischen Daten wurden durch den *Student's t-test* erhoben. Die Signifikanzangaben wurden wie folgt berücksichtigt:

* = $p \leq 0,05$

** = $p \leq 0,01$

*** = $p \leq 0,001$

Die Werte zeigen wie signifikant das errechnete Ergebnis ist. Dabei ist $p \leq 0,05$ signifikant, $p \leq 0,01$ sehr signifikant und $p \leq 0,001$ hoch signifikant.

2.2.5 Proteinaufreinigung und Isolierung

Für diese Arbeit wurde nHIL-6-Fc als rekombinante Proteine verwendet. NHIL-6-Fc wurde aus Zellkulturüberständen von CHO-K1 Zellen gereinigt.

2.2.5.1 *Reinigung von rekombinantem nHIL-6-Fc aus Zellkulturüberständen*

Für die Reinigung aus Zellkulturüberständen wurden CHO-K1 Zellen transfiziert (siehe Material und Methoden 2.2.3.3) und über Neomycin einzelne Klone, die nHIL-6-Fc exprimieren, selektiert. Dafür wurden auf einer 96-Well Platte 0,5 Zellen pro Kavität in 200 μ l DMEM^{+/+} mit 1600 μ g/ml Neomycin ausgesät. Die Kavitäten wurden alle 24 Stunden betrachtet und Zellen, aus den Kavitäten entnommen, in denen Zellen angewachsen sind. Diese wurden weiterhin in 6-Well Platten mit 5 ml DMEM^{+/+} Medium über Neomycin selektiert. Die exprimierten Proteine wurden durch einen Western Blot der Zellkulturüberstände nachgewiesen, und stark exprimierende Klone ausgewählt. Diese Klone wurden für die Zellkultur auf 10 cm Zellkulturschalen übertragen und gleichzeitig über mehrere Wochen in einer *Rollerbottle* Flasche mit Induktionsmedium für eine höhere Proteinexpression kultiviert. Dafür wurde nicht das herkömmliche FCS verwendet, sondern *low* IgG FCS. Dadurch wurde die Proteinexpression verstärkt, da die Apoptose der Zellen vermindert wurde. Durch die *Rollerbottle* wurden mehr Zellen als in einer Zellkulturschale kultiviert, wodurch eine höhere Menge an Protein exprimiert wurde. Die Überstände wurden alle vier Tage abgenommen und mit 2.000 g für 15 Minuten bei 4°C und im Anschluss mit 10.000 g für 30 Minuten bei 4°C zentrifugiert, um Zellreste zu entfernen. Der zentrifugierte Zellkulturüberstand wurde weggefroren (-80 °C) und für die Proteinaufreinigung über Nacht aufgetaut. Der Zellkulturüberstand wurde über einen *Bottle top* Filter mit einer Porengröße von 45 μ m von weiteren Zellresten befreit, und die Proteine über eine Affinitätschromatographie isoliert. Dafür wurden HiTrap Protein A HP Säulen (GE Lifesciences) verwendet. Dabei bindet der Fc-tag von nHIL-6-Fc an die Säule und bleibt an der Säule haften. Andere Proteine bleiben nach den Waschschritten nicht an der Säule haften, da diese keinen Fc-tag besitzen (Affinitätschromatographie). Das Protein wurde durch 50 mM Zitratpuffer (pH 3,25) von der Säule gelöst (eluiert) und eine Neutralisierung des sauren pH erfolgte über 1 M Tris (pH 11). Das Protein wurde über einen Amicon Ultra 15 ml Filter (Merck, Darmstadt, Deutschland) konzentriert. Dabei wurde das Eluat auf den mit PBS kalibrierten Filter der Säule gegeben. Das 1 M Tris wurde während der Zentrifugation durch die Poren des Filters in das Auffanggefäß gedrückt. nHIL-6-Fc ist größer als die Poren und bleibt am Filter haften. Für den weiteren Verlauf wurde das Protein vorsichtig mit dem verbliebenen Tris in der Filterkammer abgespült. Eine Umstellung von Tris auf PBS erfolgte über eine NAP Säule (GE Healthcare, München, Deutschland). Dafür wurde das aufkonzentrierte Eluat auf die NAP Säule gegeben und Tris heraustropfen gelassen. Das Protein bleibt im

Material und Methoden

Filter der NAP Säule haften. Es wurde mit PBS das Protein von der Säule gewaschen. Die Konzentration wurde im NanoDrop2000 (Peqlab Biotechnologie GmbH Erlangen) bestimmt. Das Protein wurde aliquotiert und in Stickstoff bei -80 °C weggefroren. Für die Bestimmung der Aktivität des Proteins wurde ein Proliferationsassay durchgeführt (Material und Methoden 2.2.3.5).

3 Ergebnisse

Im klassischen *signaling* bindet Interleukin-6 (IL-6, blau) an einen membranständigen, nicht signalweiterleitenden Interleukin-6 Rezeptor (IL-6R, rot) (Heinrich, *et al.* 2003) (Abbildung 3.1). Diese zwei Moleküle gehen einen Komplex, mit dem ebenfalls membranständigen signalweiterleitenden und ubiquitär exprimierten Glykoprotein gp130 (weiß) ein (Abbildung 3.1) (Heinrich, *et al.* 2003)

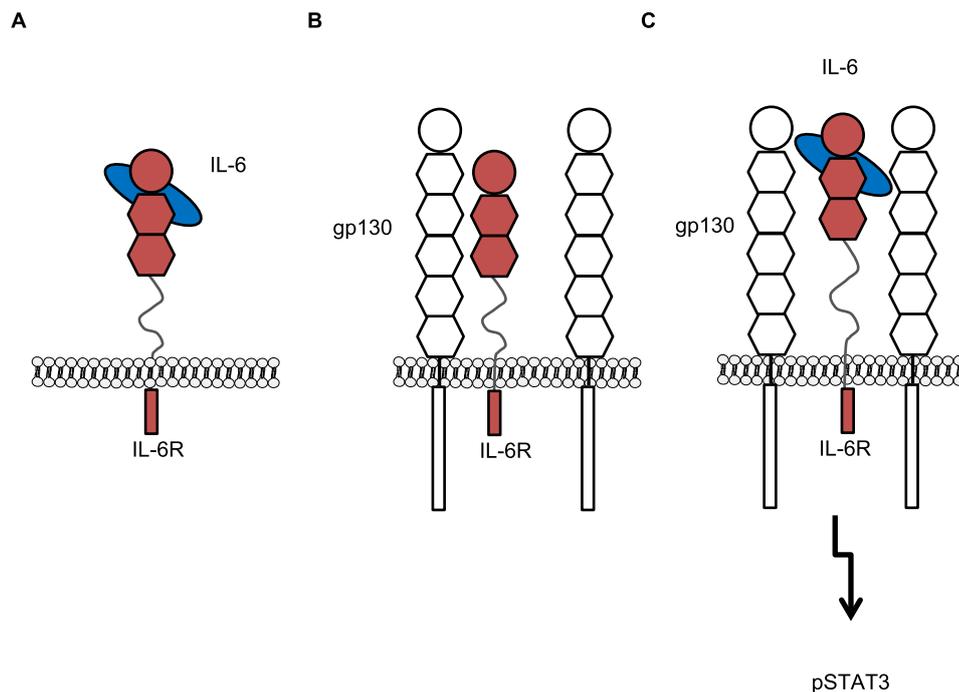


Abbildung 3.1: Schematische Darstellung der Aktivierung der Interleukin-6 Signalkaskaden. (A) Durch Bindung von IL-6 (blau) an den membranständigen IL-6R (rot) mit anschließender Rekrutierung von gp130 (weiß) wurde die Signalkaskade aktiviert. Dabei bindet zuerst IL-6 (blau) an den membranständigen IL-6R (rot), durch fehlendes gp130 (weiß) wird die Signalkaskade allerdings nicht aktiviert. (B) Auch ohne IL-6 wird die Signalkaskade nicht aktiviert. (C) Sobald IL-6 (blau) an den membranständigen IL-6R (rot) bindet, wird ein Komplex mit gp130 (weiß) gebildet, welcher die Signalkaskade aktiviert (pSTAT3).

Im *Trans-signaling* wurde der membranständige IL-6R (rot) über eine ADAM Protease gespalten (Müllberg, *et al.* 1993) oder wurde über alternatives Spleißen generiert und liegt als löslicher IL-6R (solubler IL-6R, sIL-6R) vor (Abbildung 3.2) (Heinrich, *et al.* 1998). Dieser bindet an IL-6 und geht einen Komplex mit membranständigem gp130 ein.

Ergebnisse

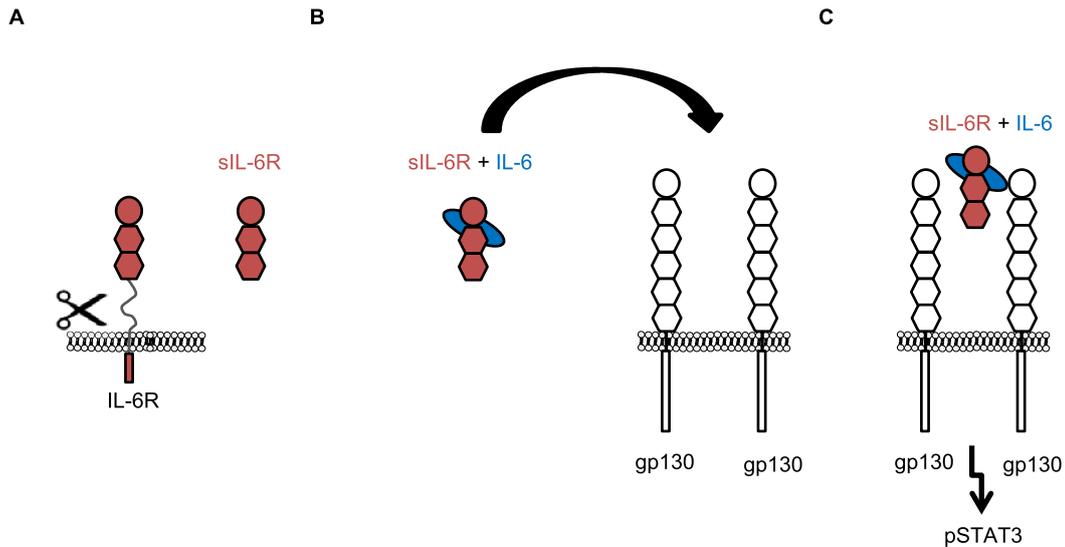


Abbildung 3.2: Schematische Darstellung des IL-6 Trans-signalings. (A) Beim Trans-signalings wird der membranständige IL-6R (rot) über eine ADAM Protease proteolytisch gespalten und es entsteht ein löslicher IL-6R (sIL-6R, rot). (B) Durch Bindung von IL-6 (blau) an den sIL-6R wird ein Komplex gebildet, der gp130 auf jeder Zelle binden kann. (C) Durch die Bindung von IL-6:sIL-6R an gp130 wurde die Phosphorylierung des STAT3 Proteins induziert.

In dieser Arbeit wurden neue Designer Zytokine erstellt. Dabei wurde das bereits untersuchte Hyper-IL-6 (HIL-6) mit der Stalkregion des IL-6Rs, der Transmembrandomäne, und der intrazellulären Domäne (rot) verbunden. HIL-6 besteht aus dem N-terminalen sIL-6R (rot), welcher über einen Linker mit IL-6 (C-terminal, blau) verbunden ist (Abbildung 3.3 A) (Fischer, *et al.* 1997). Das neue Zytokin wurde membrangebundenes HIL-6 genannt (mbHIL-6, Abbildung 3.3 B).

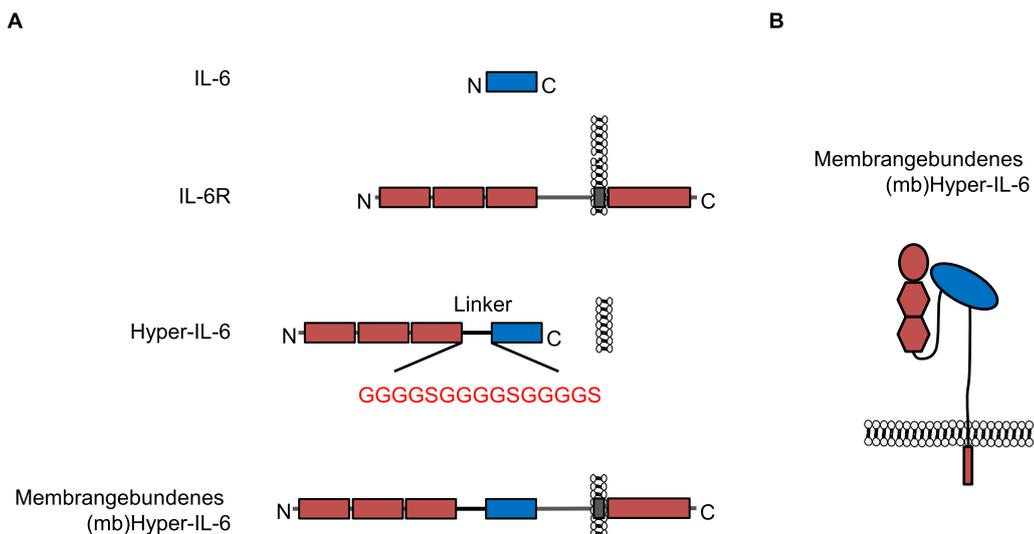


Abbildung 3.3: Zusammenfassung der membrangebundenen Hyper-IL-6 Bausteine. (A) IL-6 (blau) und der IL-6R (rot) wurden zu einem HIL-6-Konstrukt (blau/rot) zusammengefasst (Fischer, *et al.* 1997). Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein membrangebundenes HIL-6 (mbHIL-6) erstellt, das aus HIL-6 (rot/blau), der IL-6R Stalkregion, der Transmembrandomäne und der intrazellulären Domäne (rot) des IL-6R zusammengesetzt wurde. (B) Das mbHIL-6 auf der Zelloberfläche wurde wie abgebildet konstruiert.

Ergebnisse

Durch eine Verkürzung der Stalkregion des IL-6R wurde gezeigt, dass der IL-6R nicht mehr proteolytisch gespalten wurde (Baran, *et al.* 2013). Dabei wurde durch unterschiedliche Kürzungen der IL-6R Stalkregion die ADAM10/17-Erkennungssequenz deletiert. Die 51 Aminosäuren lange Stalkregion wurde dabei schrittweise um eine 15 Aminosäuren lange Region gekürzt, in der ADAM-Proteasen den IL-6R spalten (Abbildung 3.4) (Baran, *et al.* 2013). Eine weitere Möglichkeit, die proteolytische Spaltung über ADAM-Proteasen zu unterdrücken, wurde durch gezielte Punktmutation in der IL-6R Stalkregion untersucht. Dafür wurde, an der Erkennungsstelle der ADAM10/17-Protease, eine Aminosäure ausgetauscht (Abbildung 3.5) (Garbers, *et al.* 2011, Riethmueller, *et al.* 2017).

Ergebnisse

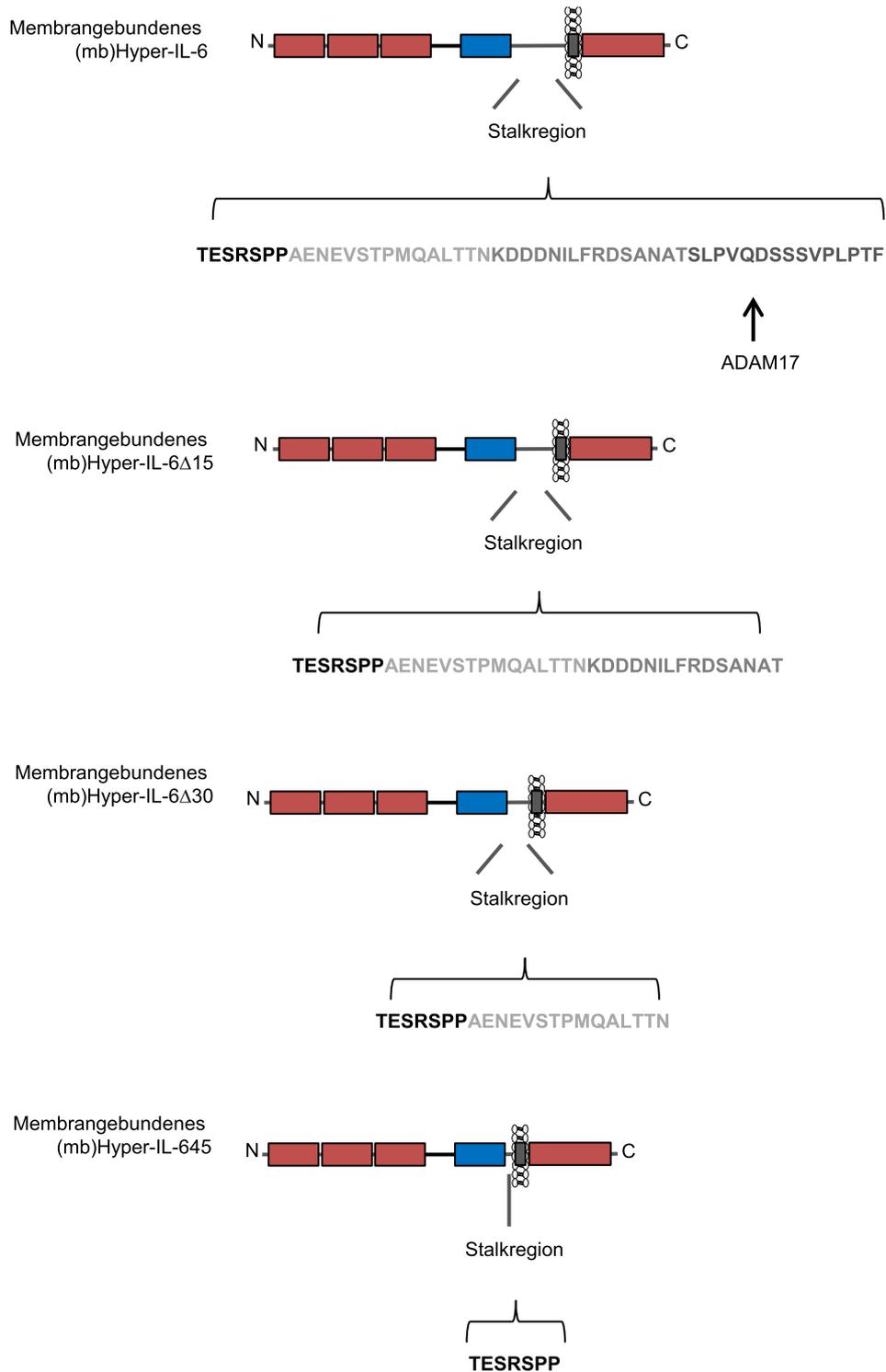


Abbildung 3.4: Die IL-6R Stalkregion im mbHIL-6 wurde um jeweils 15 Aminosäuren verkürzt. Die 51 Aminosäure lange Stalkregion des IL-6R im mbHIL-6 wurde schrittweise um 15 Aminosäuren gekürzt, um eine proteolytische Spaltung über die ADAM-Proteasen zu verhindern.

Eine weitere Möglichkeit, die proteolytische Spaltung über ADAM-Proteasen zu unterdrücken, wurde durch gezielte Punktmutation in der IL-6R Stalkregion untersucht. Dafür wurde, an der Erkennungsstelle der ADAM10/17-Protease, eine Aminosäure ausgetauscht

Ergebnisse

(Abbildung 3.5) (Garbers, *et al.* 2011, Riethmueller, *et al.* 2017). In der Veröffentlichung wurde postuliert, dass die Schnittstelle der Proteasen nicht, wie bisher angenommen, zwischen Gln-357 und Asp-358 lag, sondern zwischen Pro-355 and Val-356 (Abbildung 3.5) (Riethmueller, *et al.* 2017). Zwei Punktmutationen der Stalkregion des mbHIL-6 wurden generiert. Die erste war mbHIL-6_{V563G} und die zweite war mbHIL-6_{V563E} (Abbildung 3.5). Alle diese Varianten wurden in die Vektoren pcDNA3.1 und pMows-puromycin kloniert und nachfolgend in Ba/F3- und Ba/F3-gp130-Zellen retroviral transduziert. Die Klonierungsschemata befinden sich im Anhang unter 8.1.

Ergebnisse

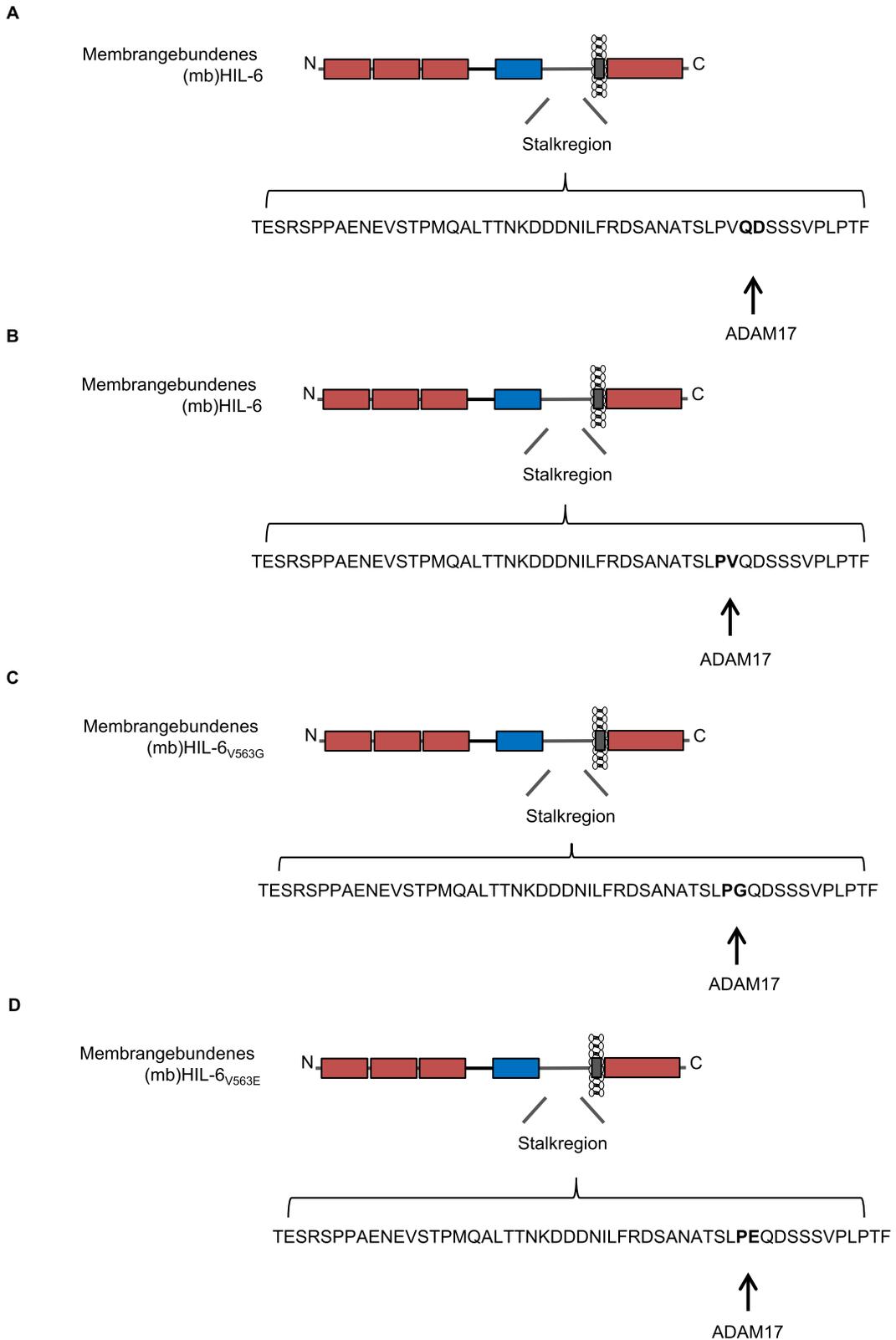


Abbildung 3.5: Durch eine Punktmutation im IL-6R wurde die proteolytischen Spaltung inhibiert. (A) Als erstes wurde Wildtyp mbHIL-6 mit der ADAM17-Schnittstelle basierend auf Baran *et al.*, 2013 konstruiert. (B) Allerdings wurde im Verlauf der Arbeit eine weitere ADAM17-Schnittstelle basierend auf Riethmueller *et al.*, 2017 gefunden, auf die basierend weitere Punktmutationen generiert wurde. (C) Das erste war die Punktmutation V563G in der Stalkregion des mbHIL-6 zur Inhibition der proteolytischen Spaltung. (D) Die zweite Punktmutation war V563E in der Stalkregion des mbHIL-6 zur Inhibition der proteolytischen Spaltung.

Ergebnisse

In dieser Arbeit wurde außerdem untersucht, ob eine Änderung der Reihenfolge von sIL-6R und IL-6 im HIL-6 eine experimentelle Veränderung in der Zellantwort hervorruft. Dafür wurde ein weiteres Designerzytokin erstellt, das N-terminal mit IL-6 beginnt und über einen Linker mit sIL-6R verbunden wurde und natives HIL-6 (nmbHIL-6) genannt wurde. Zunächst wurde *in silico* überprüft, welche Länge der Linker zwischen IL-6 und sIL-6R aufweisen sollte.

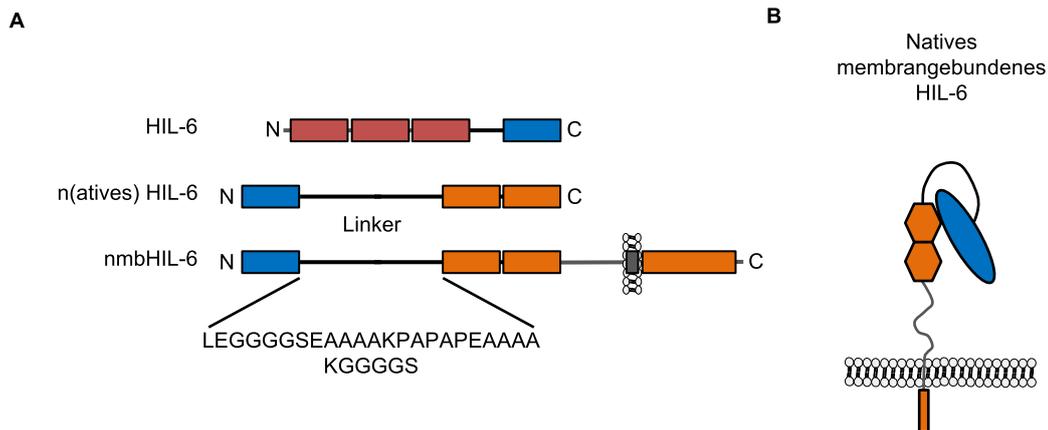


Abbildung 3.6: Generierung des nativen mbHIL-6 (nmbHIL-6). (A) HIL-6 wurde aus den Proteinen sIL-6R (rot) und IL-6 (blau) generiert. Für natives HIL-6 (nHIL-6) wurde N-terminal IL-6 (blau) über einen Linker mit sIL-6R (orange) verbunden. Domäne 1 des sIL-6R wurde weggelassen. Für vergleichende Experimente wurde eine membrangebundene Variante erstellt (nmbHIL-6). (B) Diese wurde wie mbHIL-6 mit der IL-6R Stalkregion, der Transmembrandomäne und der intrazellulären Domäne (orange) vom IL-6R verbunden nmbHIL-6 auf der Zelloberfläche.

Dabei wurde klar, dass für eine Verknüpfung von IL-6 mit dem sIL-6R die D1 Domäne deletiert werden muss. Dies ist problemlos möglich, da die Domäne 1 des IL-6R für die Aktivität nicht benötigt wird (Abbildung 3.6 A). Um das Protein in seiner Funktionalität mit mbHIL-6 zu vergleichen, wurde eine membranständige Variante generiert. Das Protein wurde natives(n)-mbHIL-6 genannt (Abbildung 3.6 B). Zudem wurde untersucht, ob es einen Unterschied zwischen HIL-6 und nHIL-6 gab.

Analog zum IL-6 wurde das IL-11 untersucht. Dabei wurden ebenfalls zwei Hyperzytokine erstellt, die basierend auf dem mbHIL-6 erstellt wurden und als mbHIL-11 und als mbHIL-11_{R355E} bezeichnet wurde (Abbildung 3.7).

Ergebnisse

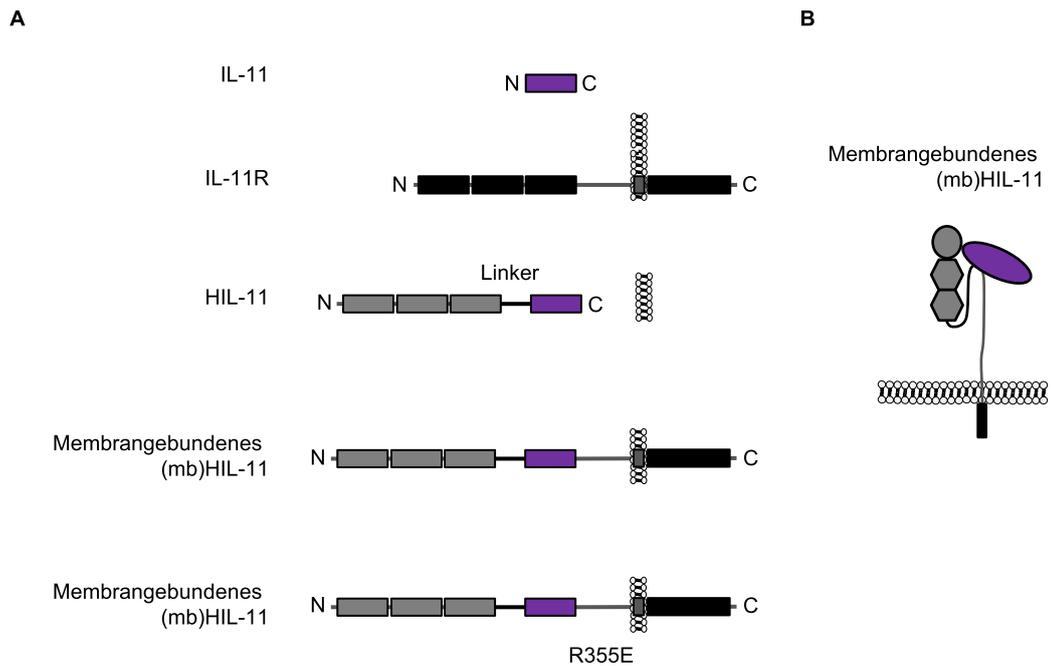


Abbildung 3.7: Zusammenfassung der membrangebundenen Hyper-IL-11 Varianten. (A) IL-11 (lila) und der IL-11R (schwarz) wurden zu einem HIL-11-Konstrukt (lila/schwarz) zusammengefasst. Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein membrangebundenes HIL-11 (mbHIL-11) erstellt, das aus HIL-11 (grau/schwarz), der IL-11R Stalkregion, der Transmembrandomäne und der intrazellulären Domäne (schwarz) des IL-11R zusammengesetzt wurde. (B) mbHIL-11 wurde schematisch auf der Zelloberfläche dargestellt.

Zudem wurde eine Mutationsvariante (mbHIL-11_{R355E}) generiert, für die gezeigt wurde, dass sie weniger proteolytisch gespalten wird (Abbildung 3.7) (Lokau, *et al.* 2016).

3.1 Der *Trans-signaling* Inhibitor sgp130(Fc) bindet auch an membranständige IL-6:IL-6R Komplexe

Der bisherige Forschungsstand besagt, dass der Inhibitor sgp130(Fc) *Trans-signaling* aber kein klassisches *signaling* inhibieren kann. Es wird vermutet, dass sgp130(Fc) aus sterischen Gründen nicht an den IL-6:IL-6R Komplex binden kann. Daher wurde initial die Interaktion von sgp130 (weiß) mit dem membranständigen IL-6R:IL-6 (blau:rot) Komplex untersucht (Abbildung 3.8).

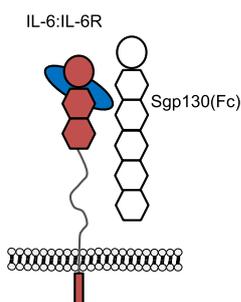


Abbildung 3.8: Schematische Darstellung der Bindung von sgp130(Fc) an den membranständigen IL-6:IL-6R Komplex. Ba/F3-IL-6R-Zellen (rot) binden zuerst IL-6 (blau), wodurch sgp130(Fc) (weiß) den Komplex auf der Zelloberfläche binden kann.

3.1.1 Der *Trans-signaling* Inhibitor sgp130(Fc) bindet den klassischen *signaling* Komplex auf der Zelloberfläche

Initial sollte mittels Durchflusszytometrie untersucht werden, ob sgp130(Fc) an membranständige IL-6:IL-6R Komplexe binden kann. Die Vermutung wurde aufgestellt, dass aufgrund einer sterischen Hinderung sgp130Fc den Komplex nicht binden kann. Durch spezifische Antikörperbindung wurde zunächst die Expression des IL-6R und im Weiteren die Interaktion von Rezeptoren in Verbindung mit Zytokinen und die Bindung dieser Komplexe durch sgp130Fc nachgewiesen.

Die Oberflächenexpression des IL-6R auf Ba/F3-Zellen wurde zunächst durch Bindung eines IL-6R (4-11 Antikörper) spezifischen Antikörpers überprüft (Abbildung 3.9 A). Für diesen Schritt wurden Zellen ohne gp130 auf der Zelloberfläche verwendet. Um zu untersuchen, ob IL-6 an den IL-6R bindet, wurden Ba/F3-IL-6R-Zellen mit 1 µg/ml IL-6 für 30 Minuten inkubiert und die Bindung von IL-6 über einen IL-6 Antikörper (IL-6 biotin) nachgewiesen (Abbildung 3.9 B).

Darauf aufbauend, wurde die Bindung von sgp130Fc an den Komplex nachgewiesen. Es wurden Ba/F3-IL-6R zunächst mit 1 µg/ml IL-6 für 30 Minuten und im Anschluss mit 10 µg/ml sgp130Fc für 30 Minuten inkubiert. Die Bindung von sgp130Fc wurde über den Antikörper APC *anti-human* IgG Fc festgestellt (Abbildung 3.9 C). Als Kontrolle wurden Ba/F3-IL-6R-Zellen, ohne IL-6, aber mit sgp130Fc inkubiert (Abbildung 3.9 D). Bei fehlendem IL-6 wurde keine Bindung von sgp130Fc nachgewiesen.

In diesem Experiment wurde gezeigt, dass nach Bindung von IL-6 an den IL-6R, ohne gp130 auf der Zelloberfläche, sgp130Fc an den Komplex binden kann.

Somit ist die Hypothese widerlegt, dass aufgrund einer sterischen Hinderung die Inhibition des klassischen *signalings* durch sgp130Fc nicht funktioniert.

Ergebnisse

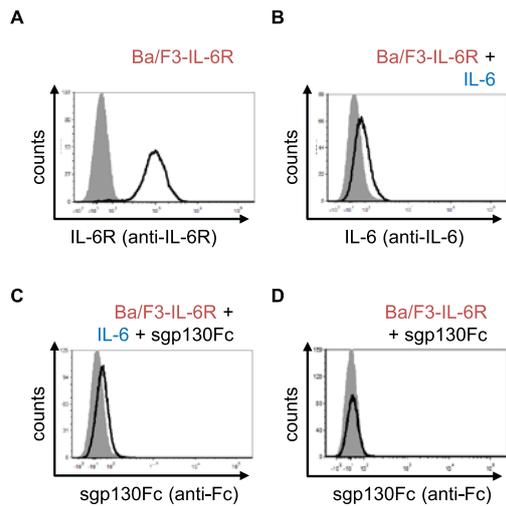


Abbildung 3.9: Durchflusszytometrie von Ba/F3-IL-6R-Zellen mit IL-6 und sgp130Fc Nachweis. (A) Der IL-6R wurde auf Ba/F3-IL-6R-Zellen mittels 4-11 Antikörper nachgewiesen. (B) IL-6 konnte den IL-6R auf Ba/F3-IL-6R-Zellen binden. Der Nachweis von IL-6 erfolgte über einen biotinylierten Antikörper gegen IL-6. IL-6 wurde für 30 Minuten mit den Zellen inkubiert. (C) Sgp130Fc konnte den IL-6R auf Ba/F3-IL-6R-Zellen mit IL-6 binden. Der Nachweis erfolgte über den Antikörper APC *anti-human* IgG Fc. IL-6 wurde für 30 Minuten mit den Zellen inkubiert, danach erfolgte eine Inkubation mit sgp130Fc für 30 Minuten. (D) Die Bindung von sgp130Fc erfolgt ohne Zugabe von 1 µg/ml IL-6 nicht. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Experimenten (n=3).

3.1.2 Der *Trans-signaling* Inhibitor sgp130(Fc) bindet an das mbHIL-6 Protein auf der Zelloberfläche von Ba/F3-Zellen

Der gleiche experimentelle Ansatz wie für den IL-6:IL-6R Komplex wurde für die neu erstellen Hyperzytokine verfolgt. Die Bindung von sgp130Fc wurde hierbei untersucht, da HIL-6 zwar mit sgp130Fc einen Komplex bildet, mbHIL-6 aber auf der Membran vorliegt. Somit könnte eine sterische Hinderung in der Bindung von sgp130Fc an das mbHIL-6 vorliegen. Der einzige Unterschied bestand darin, dass IL-6 nicht vorher mit inkubiert wurde, da dieses bereits Bestandteil der Hyperzytokine ist (Abbildung 3.10)

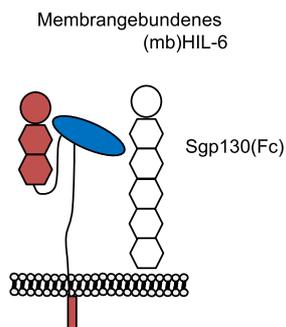


Abbildung 3.10: Schematische Darstellung der Bindung von sgp130(Fc) an mbHIL-6. Ba/F3-mbHIL-6-Zellen (rot, blau) binden sgp130(Fc) (weiß) auf der Zelloberfläche.

Ergebnisse

Die Oberflächenexpression von mbHIL-6, mbHIL-6 Δ 15, mbHIL-6 Δ 30, mbHIL-6 Δ 45, mbHIL-6_{V563G} und mbHIL-6_{V563E} auf Ba/F3-Zellen wurde zunächst durch Bindung eines IL-6R (4-11 Antikörper) spezifischen Antikörpers überprüft (Abbildung 3.11 A-F). Für diesen Schritt wurden Zellen ohne gp130 auf der Zelloberfläche verwendet.

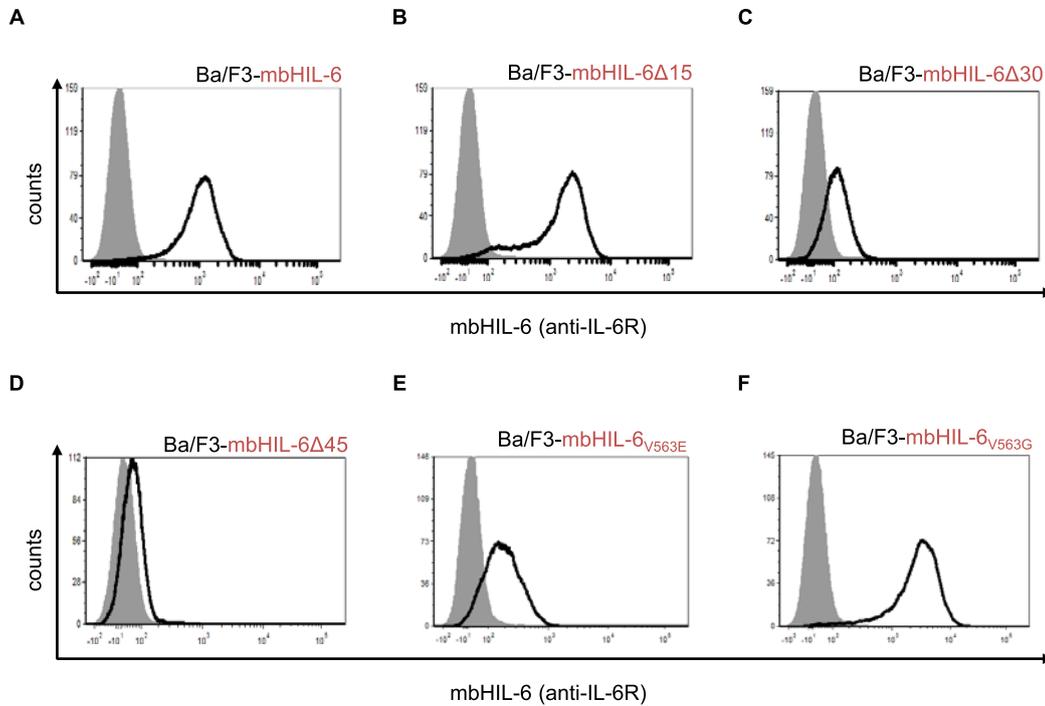


Abbildung 3.11: Nachweis der Rezeptoren und Mutationsvarianten von mbHIL-6 auf der Zelloberfläche. (A) Für die Oberflächenexpression von mbHIL-6 auf Ba/F3-Zellen erfolgte der Nachweis über den Antikörper 411 mit APC konjugiertem *goat anti-mouse* IgG polyklonalen Antikörper. Als Kontrollzelle wurde Ba/F3 verwendet, welche wie Ba/F3-mbHIL-6-Zellen behandelt wurden. (B) Für die Oberflächenexpression von mbHIL-6 Δ 15 auf Ba/F3-Zellen erfolgte der Nachweis über den Antikörper 411 mit APC konjugiertem *goat anti-mouse* IgG polyklonalen Antikörper. Als Kontrollzelle wurde Ba/F3 verwendet, welche wie Ba/F3-mbHIL-6 Δ 15-Zellen behandelt wurden. (C) Für die Oberflächenexpression von mbHIL-6 Δ 30 auf Ba/F3-Zellen erfolgte der Nachweis über den Antikörper 411 mit APC konjugiertem *goat anti-mouse* IgG polyklonalen Antikörper. Als Kontrollzelle wurde Ba/F3 verwendet, welche wie Ba/F3-mbHIL-6 Δ 30-Zellen behandelt wurden. (D) Für die Oberflächenexpression von mbHIL-6 Δ 45 auf Ba/F3-Zellen erfolgte der Nachweis über den Antikörper 411 mit APC konjugiertem *goat anti-mouse* IgG polyklonalen Antikörper. Als Kontrollzelle wurde Ba/F3 verwendet, welche wie Ba/F3-mbHIL-6 Δ 45-Zellen behandelt wurden. (E) Für die Oberflächenexpression von mbHIL-6_{V563E} auf Ba/F3-Zellen erfolgte der Nachweis erfolgte über den Antikörper 411 mit APC konjugiertem *goat anti-mouse* IgG polyklonalen Antikörper. Als Kontrollzelle wurde Ba/F3 verwendet, welche wie Ba/F3-mbHIL-6_{V563E}-Zellen behandelt wurden. (F) Für die Oberflächenexpression von mbHIL-6_{V563G} auf Ba/F3-Zellen erfolgte der Nachweis erfolgte über den Antikörper 411 mit APC konjugiertem *goat anti-mouse* IgG polyklonalen Antikörper. Als Kontrollzelle wurde Ba/F3 verwendet, welche wie Ba/F3-mbHIL-6_{V563G}-Zellen behandelt wurden. Dargestellt ist jeweils ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Experimenten (n=3).

Es wurde zudem eine Expressionanalyse der Hyperzytokinproteine in Bezug zu Ihrem Molekulargewicht durchgeführt. Durch die Durchflusszytometrie konnte nur dargestellt werden, dass die Proteine auf der Zelloberfläche exprimiert wurden, allerdings konnte keine Aussage über das Molekulargewicht getroffen werden. Dafür wurden Zelllysate auf ein

Ergebnisse

SDS-Gel aufgetragen und die Proteine über einen spezifischen IL-6R Antikörper detektiert.

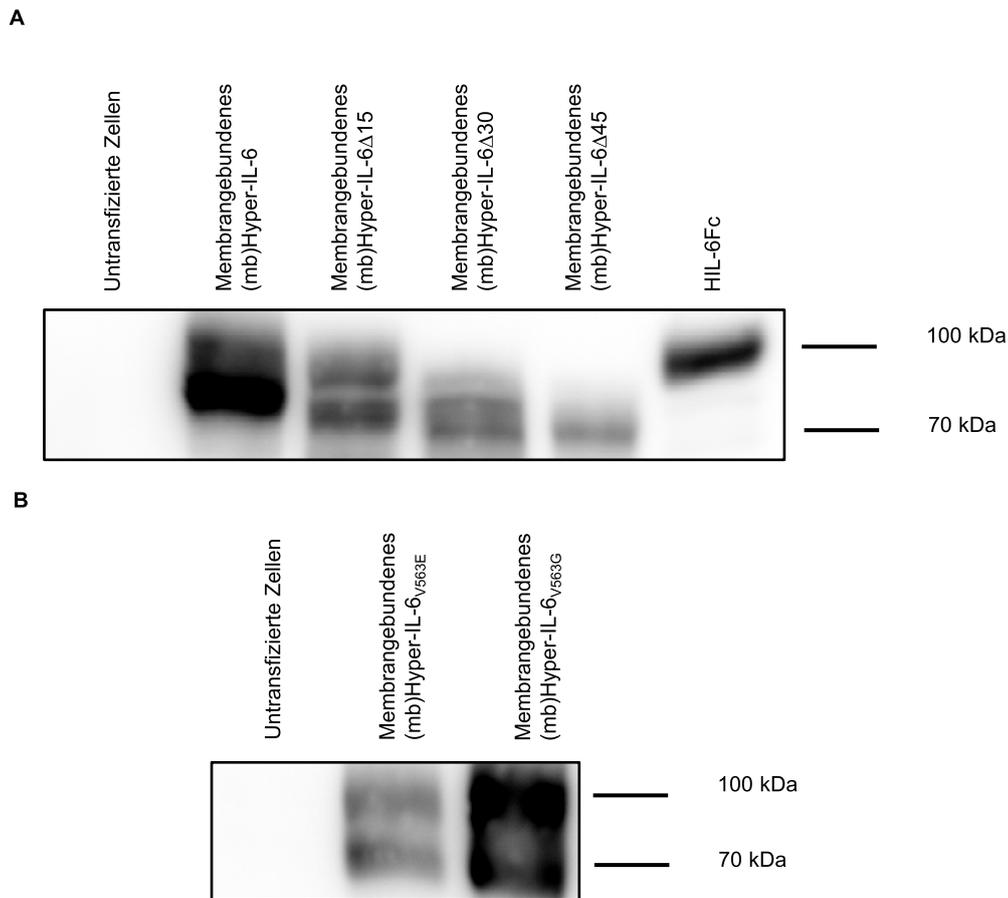


Abbildung 3.12: Expression der Proteine mbHIL-6 und Varianten in HEK293-Zellen. (A) Die Plasmide pcDNA3.1-mbHIL-6, pcDNA3.1-mbHIL-6 Δ 15, pcDNA3.1-mbHIL-6 Δ 30 pcDNA3.1-mbHIL-6 Δ 45 und pcDNA3.1-HIL-6Fc wurden in HEK293-Zellen transient transfiziert. Die Zellen wurden in pSTAT3 Lysepuffer lysiert und 50 μ g Gesamtprotein aufgetragen. Detektiert wurden die Proteine über den spezifischen IL-6R Antikörper (4-11). (B) Die Plasmide pcDNA3.1-mbHIL-6_{V563E} und pcDNA3.1-mbHIL-6_{V563G} wurden in HEK293-Zellen transient transfiziert. Die Zellen wurden in pSTAT3 Lysepuffer lysiert und 50 μ g Gesamtprotein aufgetragen. Detektiert wurden die Proteine über den spezifischen IL-6R Antikörper (4-11). Dargestellt ist jeweils ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Experimenten (n=3).

Für das Protein mbHIL-6 wurde ein Molekulargewicht von ca. 75 kDa errechnet. Dieses Molekulargewicht wurde durch eine Detektion in HEK293-Zellen ermittelt. Zudem wurde ein zweites Molekulargewicht detektiert, welches bei ca. 100 kDa lag (Abbildung 3.12 A). Für das Protein mbHIL-6 Δ 15 wurde ein Molekulargewicht von ca. 72 kDa errechnet. Dieses Molekulargewicht wurde detektiert. Zudem wurde ein Molekulargewicht von knapp unter 100 kDa detektiert (Abbildung 3.12 A). Für das Protein mbHIL-6 Δ 30 wurde ein Molekulargewicht von ca. 71 kDa errechnet. Dieses Molekulargewicht wurde ermittelt (Abbildung 3.12 A). Zudem wurde ein Molekulargewicht von ca. 80 kDa detektiert. Für das

Ergebnisse

Protein mbHIL-6 Δ 45 wurde ein Molekulargewicht von ca. 69 kDa errechnet. Dieses Molekulargewicht wurde detektiert (Abbildung 3.12 A).

Für das Protein HIL-6Fc wurde ein Molekulargewicht von ca. 83 kDa errechnet. Dieses Molekulargewicht wurde nicht detektiert, stattdessen wurde ein Molekulargewicht von ca. 100 kDa detektiert (Abbildung 3.12 A). Für das Protein mbHIL-6_{V563E} wurde ein Molekulargewicht von ca. 75 kDa errechnet. Dieses Molekulargewicht wurde detektiert, zudem ein Molekulargewicht von ca. 100 kDa. Das gleiche galt für das Protein mbHIL-6_{V563G} (Abbildung 3.12 B). Die Unterschiede zwischen berechneten und detektierten Molekulargewichten sind sehr wahrscheinlich auf Glykosilierungen zurück zu führen.

Als nächstes wurde die Bindung von sgp130Fc an die Proteine mbHIL-6, mbHIL-6 Δ 15, mbHIL-6 Δ 30, mbHIL-6 Δ 45, mbHIL-6_{V563E} und mbHIL-6_{V563G} durch die Durchflusszytometrie untersucht. Es wurden Ba/F3-mbHIL-6, Ba/F3-mbHIL-6 Δ 15, Ba/F3-mbHIL-6 Δ 30, Ba/F3-mbHIL-6 Δ 45 mit 10 μ g/ml sgp130Fc für 30 Minuten inkubiert. Die Bindung von sgp130Fc wurde über APC *anti-human* IgG Fc festgestellt (Abbildung 3.13 A-D).

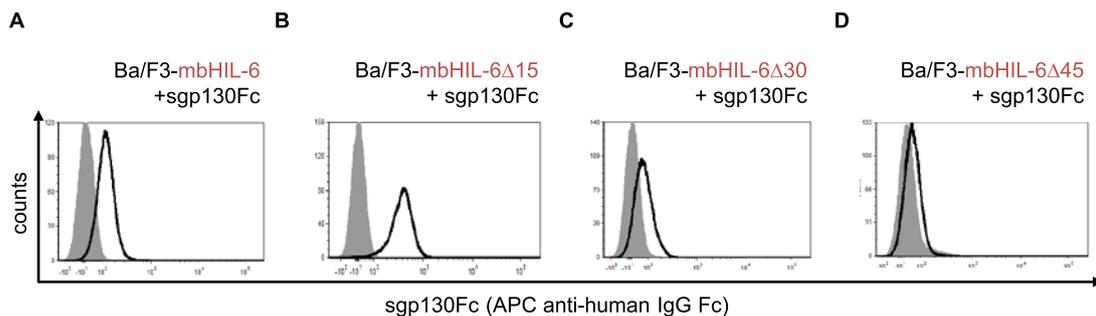


Abbildung 3.13: Nachweis der Bindung von sgp130Fc an mbHIL-6, mbHIL-6 Δ 15, mbHIL-6 Δ 30 und mbHIL-6 Δ 45. (A) Die Bindung von sgp130Fc an Ba/F3-mbHIL-6-Zellen wurde durch den Antikörper APC-gekoppelten *anti-human* IgG Fc in der Durchflusszytometrie bestimmt. Dafür wurden Ba/F3-mbHIL-6-Zellen für 30 Minuten mit 10 μ g/ml sgp130Fc stimuliert. (B) Das gleiche Experiment wurde für die Bindung von sgp130Fc an Ba/F3-mbHIL-6 Δ 15-Zellen durchgeführt. Ba/F3-mbHIL-6 Δ 15-Zellen wurden für 30 Minuten mit 10 μ g/ml sgp130Fc stimuliert. Die Bindung wurde durch den Antikörper APC-gekoppelten *anti-human* IgG Fc in der Durchflusszytometrie bestimmt. (C) Die Bindung von sgp130Fc an Ba/F3-mbHIL-6 Δ 30-Zellen wurde durch den Antikörper APC-gekoppelten *anti-human* IgG Fc in der Durchflusszytometrie bestimmt. Ba/F3-mbHIL-6 Δ 30-Zellen wurden für 30 Minuten mit 10 μ g/ml sgp130Fc stimuliert. (D) Auch die Bindung von sgp130Fc an Ba/F3-mbHIL-6 Δ 45-Zellen wurde durchgeführt. Ba/F3-mbHIL-6 Δ 45-Zellen wurden für 30 Minuten mit 10 μ g/ml sgp130Fc stimuliert. Die Bindung wurde durch den Antikörper APC-gekoppelten *anti-human* IgG Fc in der Durchflusszytometrie bestimmt. Bei allen dargestellten Zelllinien wurden Ba/F3-Zellen als Negativkontrolle verwendet (graue Kurve). Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Experimenten (n=3).

Auf die Untersuchung der Bindung von sgp130Fc an Ba/F3-mbHIL-6_{V563E} und Ba/F3-mbHIL-6_{V563G} wurde verzichtet, da die Punktmutation keine Änderung der Bindung von sgp130Fc an die Proteine mbHIL-6_{V563E} und mbHIL-6_{V563G} induzieren sollte. Die Untersuchung der Bindung von sgp130Fc an den Komplex mbHIL-6 wurde als ausreichend deklariert. Hingegen kann eine Änderung der Länge der Stalkregion auch eine Änderung der

Ergebnisse

Bindung von sgp130Fc an die Proteine mbHIL-6 Δ 15, mbHIL-6 Δ 30, mbHIL-6 Δ 45 induzieren.

Sgp130Fc wurde auf der Zelloberfläche von Ba/F3-mbHIL-6-, Ba/F3-mbHIL-6 Δ 15-, Ba/F3-mbHIL-6 Δ 30- und Ba/F3-mbHIL-6 Δ 45-Zellen nachgewiesen aber nicht auf Ba/F3-Zellen ohne mbHIL-6 (graue Kurve) (Abbildung 3.13 A-D). In diesem Experiment wurde gezeigt, dass die Proteine mbHIL-6, mbHIL-6 Δ 15, mbHIL-6 Δ 30, mbHIL-6 Δ 45, mbHIL-6_{V563E} und mbHIL-6_{V563G} exprimiert wurden und das sgp130Fc an diese Proteine binden kann. Somit wurde die Hypothese, dass es eine sterische Hinderung in der Bindung von sgp130Fc an mbHIL-6 gibt, widerlegt.

3.1.3 Der *Trans-signaling* Inhibitor sgp130(Fc) bindet auch an das nmbHIL-6 Protein auf der Zelloberfläche von Ba/F3-Zellen

NmbHIL-6 wurde retroviral in Ba/F3-Zellen transduziert. Es wurde zuerst eine Expressionsanalyse der Proteine in Bezug zu Ihrem Molekulargewicht durchgeführt. Da nmbHIL-6 ein neu konstruiertes Protein ist, wurde zunächst die Expression des Proteins in HEK293-Zellen überprüft. Aufgrund der Durchflusszytometrie konnte nur dargestellt werden, dass die Proteine auf der Zelloberfläche exprimiert wurden, allerdings konnte keine Aussage über das Molekulargewicht getroffen werden. Dafür wurden Zelllysate auf ein SDS-Gel aufgetragen und die Proteine über einen spezifischen biotinylierten IL-6 Antikörper detektiert (Abbildung 3.14). NmbHIL-6 wurde im Western Blot nachgewiesen.

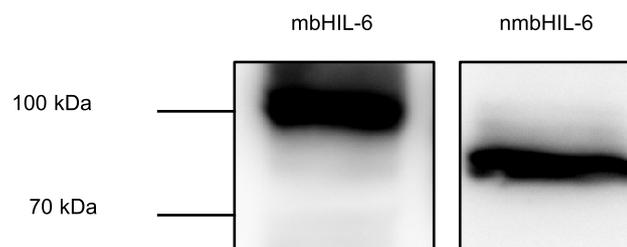


Abbildung 3.14: Expression der Proteine nmbHIL-6 und Varianten in HEK293-Zellen. Die Plasmide pcDNA3.1-mbHIL-6 und pcDNA3.1-nmbHIL-6 wurden in HEK293-Zellen transient transfiziert. Die Zellen wurden in pSTAT3 Lysepuffer lysiert und 50 μ g Gesamtprotein aufgetragen. Detektiert wurden die Proteine über den spezifischen biotinylierten IL-6 Antikörper. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis aus zwei unabhängigen Experimenten (n=2).

Für die Bindung von sgp130Fc an Ba/F3-nmbHIL-6-Zellen wurden diese mit 10 μ g/ml sgp130Fc für 30 Minuten inkubiert. Dieses Experiment gab Aufschluss darüber, ob sgp130Fc das nmbHIL-6 auf der Zelloberfläche binden konnte (Abbildung 3.15). Die Bin-

Ergebnisse

Die Bindung von sgp130Fc wurde hierbei untersucht, da HIL-6 zwar mit sgp130Fc einen Komplex bildet, nmb aber eine membrangebundene Variante ist. Somit könnte eine sterische Hinderung in der Bindung von sgp130Fc an das nmbHIL-6 vorliegen.

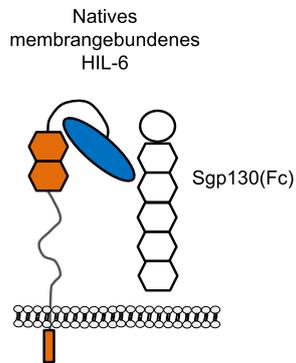


Abbildung 3.15: Schematische Darstellung der Bindung von sgp130 an nmbHIL-6. Sgp130(Fc) (weiß) bindet an das auf der Zelloberfläche vorhandene nmbHIL-6 (blau und orange).

Nach der Inkubationszeit von 30 Minuten wurden die Zellen gewaschen und mit dem Antikörper APC *anti-human-IgG-Fc* inkubiert. Die Analyse der Bindung von sgp130Fc wurde im Durchflusszytometer durchgeführt.

Für beide Experimente wurden Ba/F3-Zellen gleich behandelt, um eine unspezifische Antikörper/sgp130Fc-Bindung auszuschließen (Abbildung 3.16). Die Analyse ergab, dass sgp130Fc an nmbHIL-6 auf der Oberfläche von Ba/F3-Zellen binden kann, von Ba/F3-Zellen jedoch nicht (graue Fläche). Hier wurde gezeigt, dass sgp130Fc auch das neu erstellte nmbHIL-6 binden kann.

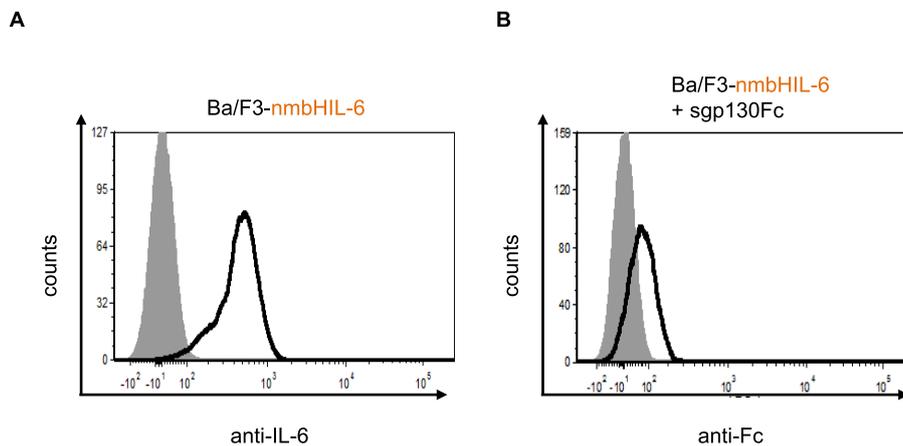


Abbildung 3.16: Oberflächenexpression von nmbHIL-6 und Bindung von sgp130Fc an nmbHIL-6. (A) Für die Oberflächenexpression wurden 1×10^6 Ba/F3-nmbHIL-6-Zellen gewaschen und zuerst mit einem biotinylierten IL-6 Antikörper und dann mit dem Streptavidin-APC-Antikörper inkubiert. (B) Sgp130Fc wurde für 30 Minuten mit 1×10^6 Ba/F3-nmbHIL-6-Zellen inkubiert. Die Zellen wurden danach mit dem Antikörper APC-gekoppelten *anti-human-IgG-Fc* inkubiert. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Experimenten ($n=3$).

3.1.4 Der *Trans-signaling* Inhibitor sgp130(Fc) bindet das mbHIL-11 Protein auf der Zelloberfläche von Ba/F3-Zellen

Der gleiche experimentelle Ansatz wie für den IL-6:IL-6R Komplex wurde für den IL-11:IL-11R Komplex verfolgt (Abbildung 3.17). Die Bindung von sgp130Fc wurde initial hierbei untersucht, da HIL-11 zwar mit sgp130Fc einen Komplex bildet, aber in diesem Fall eine membrangebundene Variante vorliegt. Somit könnte eine sterische Hinderung in der Bindung von sgp130Fc an das mbHIL-11 vorliegen, genauso wie an den IL-11:IL-11R Komplex.

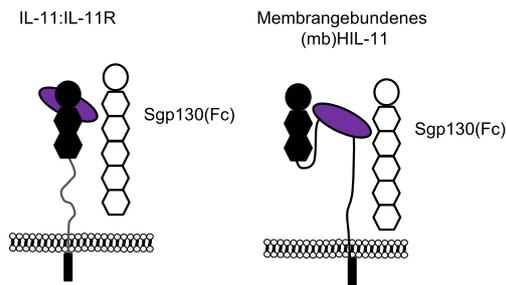


Abbildung 3.17: Schematische Darstellung der Bindung von sgp130 an den IL-11:IL-11R Komplex und mbHIL-11. Sgp130(Fc) (weiß) bindet an den auf der Zelloberfläche befindlichen Komplex aus IL-11:IL-11R (lila:schwarz) und mbHIL-11 (lila/schwarz).

Für dieses Experiment wurde die Methode der Durchflusszytometrie angewendet. Durch spezifische Antikörperbindung wurde zunächst die Expression des IL-11R, mbHIL11 und mbHIL11_{R355E} und im Weiteren die Interaktion von Rezeptoren in Verbindung mit Zytokinen und die Bindung dieser Komplexe durch sgp130Fc nachgewiesen.

Die Oberflächenexpression des IL-11R, mbHIL11 und mbHIL11_{R355E} auf Ba/F3-Zellen wurde zunächst durch Bindung eines myc (71D10) spezifischen Antikörpers überprüft (Abbildung 3.18 A und B).

Um zu untersuchen, ob sgp130Fc den Komplex aus IL-11:IL-11R bindet, wurden Ba/F3-IL-11R-Zellen mit 1 µg/ml IL-11 für 30 Minuten inkubiert und im Anschluss mit 10 µg/ml sgp130Fc für 30 Minuten inkubiert. Die Bindung von sgp130Fc wurde über APC *anti-human* IgG Fc festgestellt (Abbildung 3.18 A). Als Kontrolle wurden Ba/F3-IL-11R-Zellen, ohne IL-11, aber mit sgp130Fc inkubiert (Abbildung 3.18 A). Bei fehlendem IL-11 wurde keine Bindung von sgp130Fc nachgewiesen. Zu den Zelllinien Ba/F3-mbHIL-11 und Ba/F3-mbHIL-11_{R355E} wurde kein IL-11 hinzugegeben. Die Zellen wurden direkt für 30 Minuten mit 10 µg/ml sgp130Fc inkubiert und die Bindung von sgp130Fc mithilfe des APC *anti-human* IgG Fc analysiert (Abbildung 3.18 B).

In diesem Experiment wurde gezeigt, dass nach Bindung von IL-11 an den IL-11R, ohne gp130 auf der Zelloberfläche, sgp130Fc den Komplex binden kann. Zudem wurde die Bin-

Ergebnisse

derung von sgp130Fc an den Komplex aus mbHIL-11 und mbHIL-11_{R355E} nachgewiesen. Sgp130Fc bindet nicht anBa/F3-Zellen (graue Fläche).

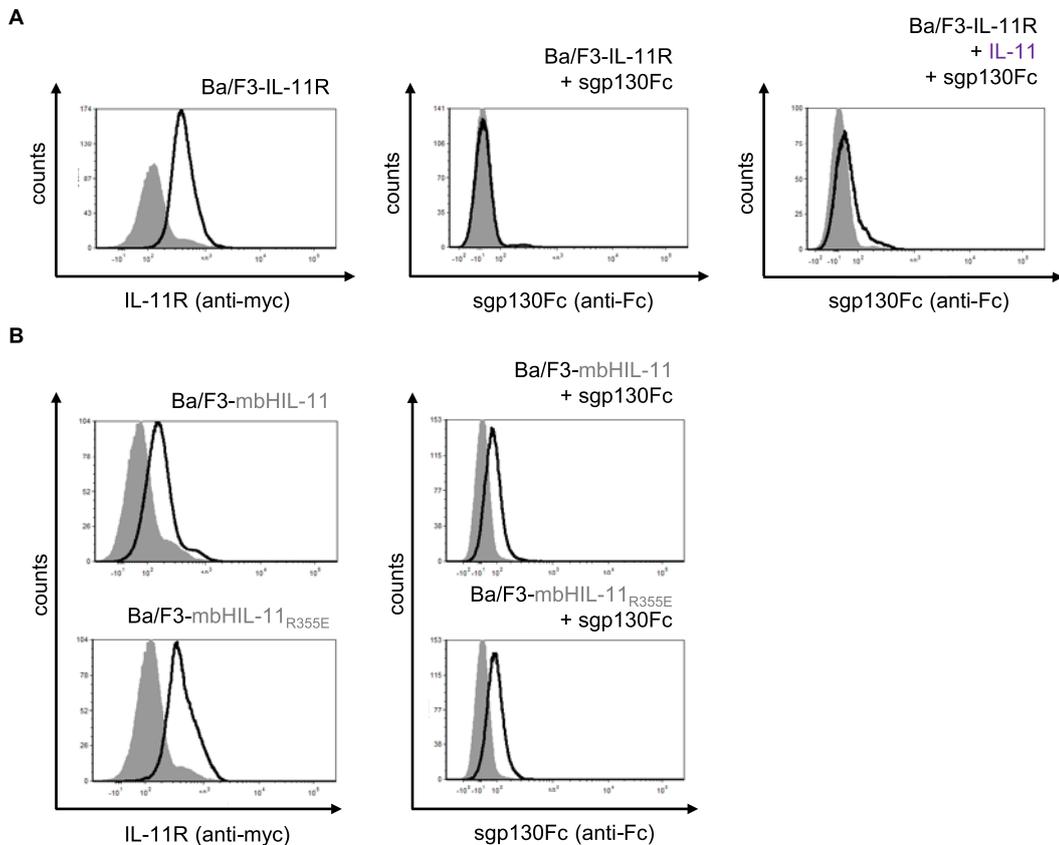


Abbildung 3.18: Oberflächenexpression von IL-11R assoziierten Komplexen und Bindung von sgp130Fc an diese. (A) Für die Oberflächenexpression wurden 1×10^6 Ba/F3-IL-11R-Zellen gewaschen und zuerst mit einem myc Antikörper (71D10) und dann mit dem Alexa Fluor 488 Antikörper inkubiert. Für die Bindung von sgp130Fc wurden die Zellen für 30 Minuten mit $1 \mu\text{g/ml}$ IL-11 und im Anschluss für 30 Minuten mit $10 \mu\text{g/ml}$ sgp130Fc inkubiert. Die Zellen wurden danach mit dem Antikörper APC-gekoppelten *anti-human-IgG-Fc* inkubiert. Das gleiche wurde ohne die Inkubation von $1 \mu\text{g/ml}$ IL-11 durchgeführt. **(B)** Für die Oberflächenexpression wurden 1×10^6 Ba/F3-mbHIL-11- und Ba/F3-mbHIL-11_{R355E}-Zellen gewaschen und zuerst mit einem myc Antikörper (71D10) und dann mit dem Alexa Fluor 488 Antikörper inkubiert. Sgp130Fc wurde für 30 Minuten mit 1×10^6 Ba/F3-mbHIL-11- und Ba/F3-mbHIL-11_{R355E}-Zellen inkubiert. Die Zellen wurden danach mit dem Antikörper APC-gekoppelten *anti-human-IgG-Fc* inkubiert. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Experimenten ($n=3$).

Sgp130Fc sollte das klassische IL-11 *signaling* und das *Cluster-signaling* inhibieren, da sgp130Fc die membranständigen IL-11 Komplexe binden kann.

3.2 Der *Trans-signaling* Inhibitor sgp130Fc inhibiert das *Cluster-signaling*

Es wurde neben dem klassischen *signaling* über einen membrangebundenen IL-6R und dem *Trans-signaling* über einen löslichen IL-6R ein weitere *signaling* Art von einer ande-

ren Arbeitsgruppe gezeigt (Heink et al., 2017). Dafür wurde eine Empfänger-Zelle, die gp130 exprimiert, über eine Transmitter-Zelle, die IL-6 gebunden an den IL-6R exprimiert, aktiviert (Abbildung 3.19). Dieses wurde als *Cluster-signaling* bezeichnet (Abbildung 3.19).

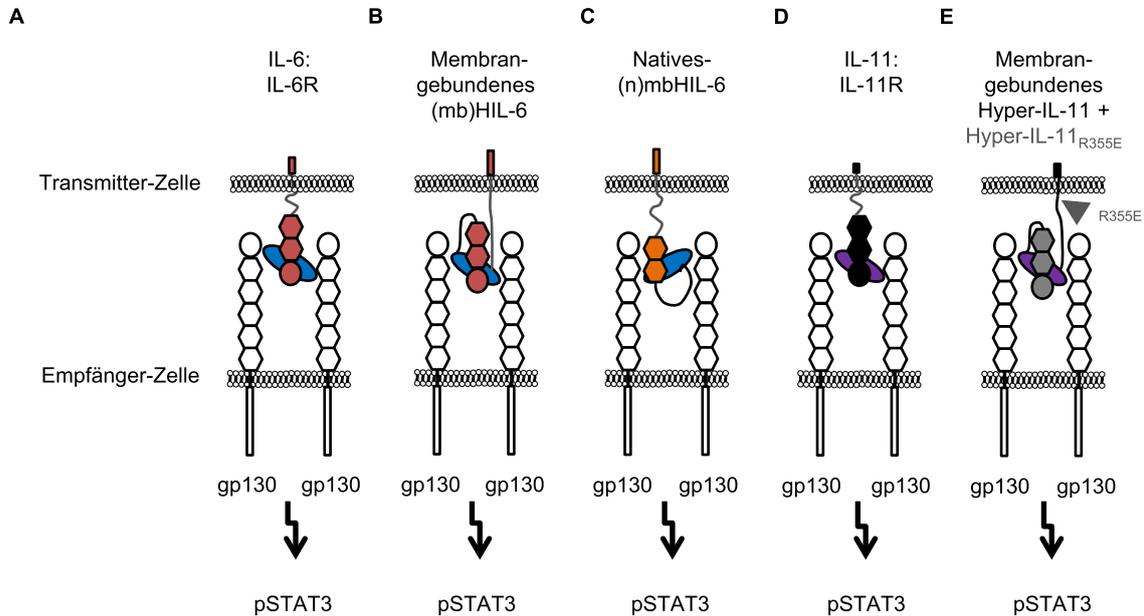


Abbildung 3.19: Schematische Darstellung des *Cluster-signalings*. (A) Ba/F3-gp130-Zellen (weiß) werden als Empfänger-Zellen bezeichnet. Die Aktivierung der Signalkaskade wird nur induziert, wenn Ba/F3-IL-6R (rot) in Verbindung mit IL-6 (blau) als Transmitter-Zellen die Ba/F3-gp130-Zellen aktivieren. (B) Die Aktivierung der Signalkaskade wird nur induziert, wenn Ba/F3-mbHIL-6-Zellen (rot) als Transmitter-Zellen die Ba/F3-gp130-Zellen aktivieren. (C) Die Aktivierung der Signalkaskade wird nur induziert, wenn Ba/F3-nmbHIL-6-Zellen (orange) als Transmitter-Zellen die Ba/F3-gp130-Zellen aktivieren. (D) Die Aktivierung der Signalkaskade wird nur induziert, wenn Ba/F3-IL-11R (schwarz) in Verbindung mit IL-11 (lila) als Transmitter-Zellen die Ba/F3-gp130-Zellen aktivieren. (E) Die Aktivierung der Signalkaskade wird nur induziert, wenn Ba/F3-mbHIL-11-Zellen als Transmitter-Zellen die Ba/F3-gp130-Zellen aktivieren.

Um das *Cluster-signaling* darzustellen werden Ba/F3-gp130-Zellen (weiß) als Empfänger-Zellen verwendet. Ba/F3-IL-6R-Zellen (rot) werden als Transmitter-Zellen verwendet. Nur in Verbindung mit IL-6 (blau) findet eine Proliferation und eine STAT3 Phosphorylierung in den nachfolgenden Experimenten statt (Abbildung 3.19).

Zuerst wurde überprüft, ob *Cluster-signaling* durch membranständigen IL-6R in Verbindung mit IL-6 induziert wird. Danach, ob die neu generierten Hyperzytokine ebenfalls *Cluster-signaling* induzieren können. Für das *Cluster-signaling*, bezogen auf den membranständigen IL-6R und die neuen Hyperzytokine, wurde im Rahmen dieser Arbeit überprüft, ob der *Trans-signaling* Inhibitor sgp130Fc das *Cluster-signaling* inhibiert. Zudem sollte die Inhibition des *Cluster-signalings* durch den IL-6R Antikörpern Tocilizumab und einem IL-6R-Nanobody überprüft werden.

3.2.1 IL-6:IL-6R induziertes *Cluster-signaling* wird durch sgp130Fc gehemmt

Das *Cluster-signaling* wurde bereits für IL-6:IL-6R Komplexe gezeigt. Die Inhibition durch sgp130Fc des *Cluster-signalings* wurde nicht erfolgreich gezeigt (Heink, *et al.* 2017). Durch den Nachweis, dass durch sgp130Fc der Komplex von IL-6:IL-6R auf der Zelloberfläche gebunden wird, wurde in dieser Arbeit die Inhibition des *Cluster-signalings* von IL-6:IL-6R Komplexen durch sgp130Fc unabhängig von vorangegangenen Studien untersucht. Für den experimentellen Nachweis des *Cluster-signalings* wurde zuerst die Methode des Proliferationsassays durchgeführt. Als Kontrolle wurden die verwendeten Zelllinien Ba/F3-gp130 und Ba/F3-IL-6R einzeln kultiviert. Dabei wurden diese Zellen einmal ohne Zugabe von Zytokin und einmal mit Zugabe von IL-3 (konditionierter Zellkulturüberstand, IL-3 haltig) gemessen (Abbildung 3.20). Außerdem wurden die Zellen mit den Zytokinen 10 ng/ml IL-6 oder 10 ng/ml HIL-6 stimuliert. Ba/F3-gp130-Zellen proliferieren nach der Zugabe von 10 ng/ml HIL-6. Die Zugabe von IL-3 oder 10 ng/ml IL-6 hat keine Auswirkung auf die Proliferation dieser Zellen (siehe Abbildung 3.20).

Ba/F3-IL-6R-Zellen hingegen proliferieren nicht nach der Zugabe von 10 ng/ml HIL-6 oder 10 ng/ml IL-6 (siehe Abbildung 3.20). Eine Proliferation dieser Zellen erfolgt nur in Gegenwart von IL-3 (siehe Abbildung 3.20).

Für das *Cluster-signaling* wurden Ba/F3-gp130- und Ba/F3-IL-6R-Zellen in Gegenwart von IL-6 kokultiviert. Es erfolgte zudem eine Zugabe von IL-3, um die Apoptose von Ba/F3-IL-6R-Zellen zu verhindern. Die Proliferation von Ba/F3-IL-6R-Zellen durch Zugabe von IL-3 war geringer, als die durch *Cluster-signaling* induzierte Proliferation der kokultivierten Zellen.

Sgp130Fc wurde als Inhibitor untersucht, weswegen es in einem weiteren Ansatz zu dem *Cluster-signaling* hinzugegeben wurde. Die Proliferation wurde durch die Zugabe von 10 µg/ml sgp130Fc inhibiert und zwar auf das Level der IL-3 induzierten Proliferation der Ba/F3-IL-6R-Zellen. Damit hemmt sgp130Fc das *Cluster-signaling*. (Abbildung 3.20). Für eine bessere Bindung zwischen IL-6 und dem IL-6R, wurde ebenfalls ein Ansatz mit 10 µg/ml des Nanobodies VHH6 inkubiert. VHH6 stabilisiert die Verbindung zwischen IL-6 und IL-6R. Die Proliferation der Ba/F3-gp130-Zellen wurde durch den Nanobody VHH6 begünstigt, aber dennoch durch sgp130Fc inhibiert (Abbildung 3.20).

Ergebnisse

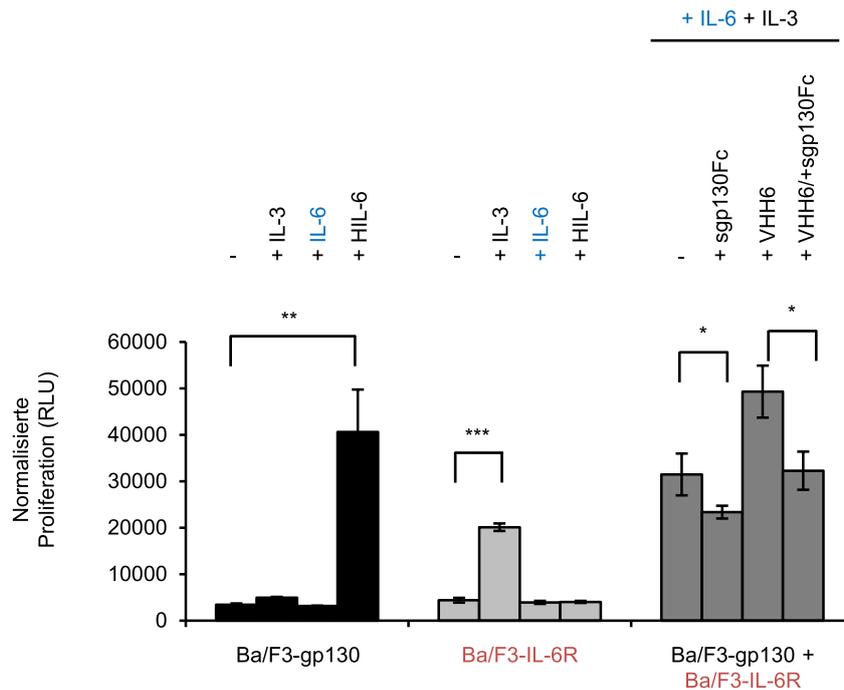


Abbildung 3.20: Proliferation durch *Cluster-signaling* von Ba/F3-gp130- und Ba/F3-IL-6R-Zellen. (A) Durch Zytokinzugabe wurde die Zellviabilität (Proliferation, RLU) getestet (schwarz für Ba/F3-gp130-, hellgrau für Ba/F3-IL-6R-Zellen). Es wurde einzeln kein Zytokin, IL-3, 10 ng/ml IL-6 oder 10 ng/ml HIL-6 zu Ba/F3-gp130- oder Ba/F3-IL-6R-Zellen hinzugegeben. Bei Kokultivierung von beiden Zelllinien (dunkelgrau) wurde in allen Ansätzen IL-3 und 10 ng/ml IL-6 hinzugegeben. Eine Zugabe von 10 µg/ml sgp130Fc bei der Kokultivierung von Ba/F3-gp130- und Ba/F3-IL-6R-Zellen wurde ebenfalls durchgeführt (dunkelgrau, zweiter und vierter Balken). Auch die Zugabe des Stabilisators VHH6 (10 µg/ml) (dunkelgrau dritter und vierter Balken) wurde durchgeführt. Die Signifikanz wurde durch einen *Students TTest* ermittelt und wurde zwischen signifikant (*) und sehr hoch signifikant (***) eingestuft. Die Messung erfolgte im Tecan Reader bei einer Absorption von 560 nm. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Experimenten (n=3).

Im weiteren Verlauf wurde das *Cluster-signaling* über die Methode der Stimulation nachgewiesen. Bei dem *Cluster-signaling* der Zellen wurde ebenfalls die Phosphorylierung des STAT3 Proteins (Ergebnisse 3.1) untersucht.

Als Kontrolle für diese Methode wurden Ba/F3-gp130- und Ba/F3-IL-6R-Zellen einzeln stimuliert. Es wurden 5×10^5 Ba/F3-gp130-Zellen als Empfänger-Zellen und 5×10^5 Ba/F3-IL-6R-Zellen als Transmitter-Zellen verwendet.

Eine Phosphorylierung von STAT3 (pSTAT3) bei Ba/F3-gp130-Zellen wurde nur nach Stimulation mit 10 ng/ml HIL-6 detektiert (Abbildung 3.21 A). Nach der Stimulation mit 10 ng/ml HIL-6 und IL-3, wurde bei Ba/F3-IL-6R-Zellen kein pSTAT3 Signal detektiert (Abbildung 3.21 A). Die im weiteren Experiment detektierten Banden wurden somit durch *Cluster-signaling* induziert. STAT3 diente in allen Experimenten als Ladekontrolle, um

Ergebnisse

nachzuweisen, dass die gleiche Menge an Protein aufgetragen wurde (Abbildung 3.21 A-D).

IL-6 wurde in verschiedenen Konzentrationen zu den Zellen hinzugegeben (Abbildung 3.21 B-D). Es wurde weiterhin IL-3 zu den Ba/F3-IL-6R-Zellen hinzugegeben. Bei beiden Zelllinien wurde durch IL-3 keine STAT3 Phosphorylierung induziert. Ba/F3-gp130- und Ba/F3-IL-6R-Zellen wurden, nach der Inkubationszeit des Inhibitors sgp130Fc, für 30 Minuten kokultiviert. Ba/F3-IL-6R-Zellen wurden jeweils mit IL-6, mit IL-6 und 10 µg/ml VHH6, mit IL-6 und 10 µg/ml sgp130Fc oder mit IL-6, 10 µg/ml VHH6 und 10 µg/ml sgp130Fc inkubiert (Abbildung 3.21 B-D).

Bei der Zugabe von 1 ng/ml IL-6 wurde kein phosphoryliertes STAT3 Protein detektiert (Abbildung 3.21 B).

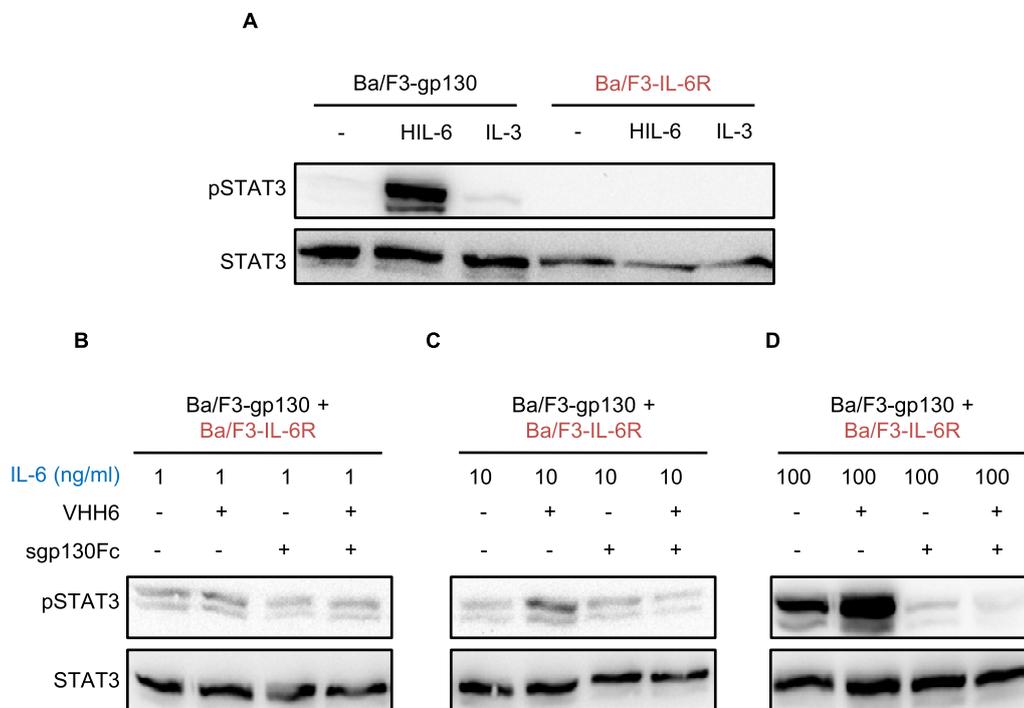


Abbildung 3.21: STAT3 Phosphorylierung durch Cluster-signaling. (A) Als Kontrolle wurden jeweils Ba/F3-gp130- und Ba/F3-IL-6R-Zellen mit 10 ng/ml HIL-6 oder IL-3 kultiviert. (B) Die Phosphorylierung des STAT3 (pSTAT3) Proteins wurde durch Kokultivierung von Ba/F3-gp130- und Ba/F3-IL-6R-Zellen (rot) mit unterschiedlichen IL-6 (blau) Konzentrationen induziert. Der Nanobody VHH6 (10 µg/ml) wurde als Stabilisator von IL-6 mit dem IL-6R verwendet. Die Inhibition erfolgte über die Zugabe von 10 µg/ml sgp130Fc. Die Stimulation, sowie die Kokultivierung von Ba/F3-gp130- und Ba/F3-IL-6R-Zellen erfolgte für 30 Minuten. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Experimenten (n=3).

Nach Zugabe von 10 ng/ml IL-6 und von 10 µg/ml VHH6 wurde eine schwache STAT3 Phosphorylierung detektiert (Abbildung 3.21 C). Der verstärkende Einfluss von VHH6 wurde in gleicher Form im Proliferationsassay nachgewiesen. Eine komplette Inhibition

Ergebnisse

der STAT3 Phosphorylierung durch sgp130Fc konnte während des *Cluster-signalings* mit 10 µg/ml VHH6 und 10 µg/ml sgp130Fc detektiert werden (Abbildung 3.21 C).

Bei der Zugabe von 100 ng/ml IL-6 wurde eine starke STAT3 Phosphorylierung detektiert. Die Zugabe von 10 µg/ml VHH6 verstärkte das Signal zusätzlich (Abbildung 3.21 D). Die Inhibition durch 10 µg/ml sgp130Fc wurde bei 100 ng/ml IL-6 deutlich sichtbar. Das Experiment zeigt, dass *Cluster-signaling* durch sgp130Fc inhibiert wurde.

Für den IL-6R wurde gezeigt, dass dieser durch die Protease ADAM 10/17 proteolytisch gespalten wird (Garbers, *et al.* 2011, Riethmueller, *et al.* 2017). Zur Inhibition der proteolytischen Spaltung (*shedding*) des IL-6R wurde der *shedding* Inhibitor GW verwendet, der die Protease ADAM 10/17 hemmt (Garbers, *et al.* 2011, Hundhausen, *et al.* 2003). Um auszuschließen, dass sIL-6R in Verbindung mit IL-6 Ba/F3-gp130-Zellen aktiviert, wurde GW (3 µM) in diesem Experiment, für die Analyse der STAT3 Phosphorylierung, hinzugegeben. Zudem wurde der IL-6R Antikörper Tocilizumab mit untersucht (Abbildung 3.22).

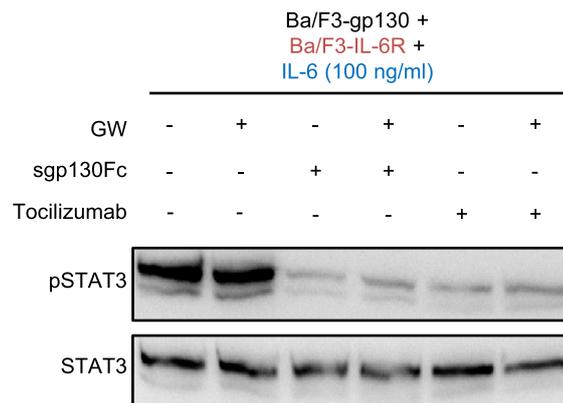


Abbildung 3.22: Inhibition des *sheddings* des IL-6R im *Cluster-signaling*. Ba/F3-IL-6R-Zellen wurden mit 3 µM GW inkubiert. 100 ng/ml IL-6 wurde für die Aktivierung des *Cluster-signalings* hinzugegeben. Die Inhibitoren sgp130Fc und Tocilizumab wurden in einer Konzentration von 10 µg/ml ebenfalls hinzugegeben. Die STAT3-Phosphorylierung wurde analysiert, wobei STAT3 als Ladekontrolle untersucht wurde. Die Kointivierung von Ba/F3-gp130- und Ba/F3-IL-6R-Zellen wurde für 30 Minuten durchgeführt. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Experimenten (n=3).

Bei der Zugabe von 100 ng/ml IL-6 wurde eine starke STAT3 Phosphorylierung detektiert. Die Zugabe von 3 µM GW zeigte keine Änderung der pSTAT3 Signalstärke. Die Inhibition durch 10 µg/ml sgp130Fc wurde bei 100 ng/ml IL-6 deutlich sichtbar. Ebenfalls wurde die Inhibition durch 10 µg/ml Tocilizumab deutlich (Abbildung 3.22).

Zusammenfassend wurden die Erkenntnisse gewonnen, dass *Cluster-signaling* erfolgreich induziert wurde, da Ba/F3-gp130-Zellen durch Ba/F3-IL-6R-Zellen mit IL-6 proliferieren und STAT3 phosphoryliert wurde. Zudem wurde das *Cluster-signaling* durch den VHH6

Nanobody verstärkt und durch die Zugabe von sgp130Fc und Tocilizumab inhibiert. Durch Zugabe des *shedding* Inhibitors GW wurde kein Unterschied in der STAT3 Phosphorylierung aufgedeckt. Initial wurde hierbei also gezeigt, dass sgp130Fc das *Cluster-signaling* inhibiert.

3.2.2 Membrangebundenes HIL-6-induziertes *Cluster-signaling* wird durch sgp130Fc gehemmt

Das *Cluster-signaling* wurde für IL-6:IL-6R Komplexe gezeigt und auf die neu erstellten Hyperzytokine übertragen. Auch hierbei wurde die Frage gestellt, ob sgp130Fc das *Cluster-signaling* inhibieren kann, da durch das mbHIL-6 eine andere Proteinstruktur vorliegt, als beim IL-6:IL-6R Komplex, bei dem das IL-6 zuerst an den IL-6R binden muss. Durch den Nachweis, dass durch sgp130Fc das mbHIL-6 auf der Zelloberfläche gebunden wird, wurde in dieser Arbeit die Inhibition des *Cluster-signaling*s von mbHIL-6 Komplexen durch sgp130Fc untersucht. Die Zellviabilität wurde durch einen Proliferationsassay bestimmt. Dafür wurden Ba/F3-mbHIL-6- und Ba/F3-gp130-Zellen kokultiviert. Dieses Experiment wurde Analog mit den Mutationsvarianten durchgeführt.

Als Kontrolle wurden die verwendeten Zelllinien Ba/F3-gp130 und Ba/F3-mbHIL-6 einzeln kultiviert. Dabei wurden Ba/F3-gp130- und Ba/F3-mbHIL-6-Zellen ohne Zugabe von Zytokin (Abbildung 3.23 A), durch Zugabe von IL-3 und durch Zugabe von 10 ng/ml HIL-6 stimuliert. Ba/F3-gp130-Zellen proliferieren nach der Zugabe von 10 ng/ml HIL-6. IL-3 hat keine Auswirkung auf die Proliferation dieser Zelllinien (siehe Abbildung 3.23 A).

Ba/F3-mbHIL-6-Zellen proliferieren nicht nach der Zugabe von 10 ng/ml HIL-6 (siehe Abbildung 3.23 A). Die Proliferation dieser Zellen erfolgte nur in Gegenwart von IL-3 (siehe Abbildung 3.23 A).

Für die Zelllinien Ba/F3-mbHIL-6 Δ 15, Ba/F3-mbHIL-6 Δ 30, Ba/F3-mbHIL-6 Δ 45 und Ba/F3-HIL-6 wurde das Experiment analog durchgeführt (siehe Abbildung 3.23 B). Ba/F3-HIL-6-Zellen wurden dabei nicht für das *Cluster-signaling* untersucht. Ba/F3-HIL-6-Zellen aktivieren Ba/F3-gp130-Zellen über *Trans-signaling* und sind Kontrollzellen.

Für das *Cluster-signaling* wurden Ba/F3-gp130- und Ba/F3-mbHIL-6-Zellen kokultiviert. Dabei ist zu beachten, dass IL-3 hinzugegeben wurde, um die Apoptose der Ba/F3-mbHIL-6-Zellen zu verhindern. Die Proliferation von Ba/F3-mbHIL-6-Zellen durch IL-3 war geringer, als die der kokultivierten Zellen.

Ergebnisse

Sgp130Fc wurde als Inhibitor untersucht, weswegen es in einem weiteren Ansatz hinzugegeben wurde. Die Proliferation wurde durch die Zugabe von 10 µg/ml sgp130Fc inhibiert und zwar auf das Level der IL-3 induzierten Proliferation, der Ba/F3-mbHIL-6-Zellen. Damit hemmt sgp130Fc das *Cluster-signaling* (Abbildung 3.23).

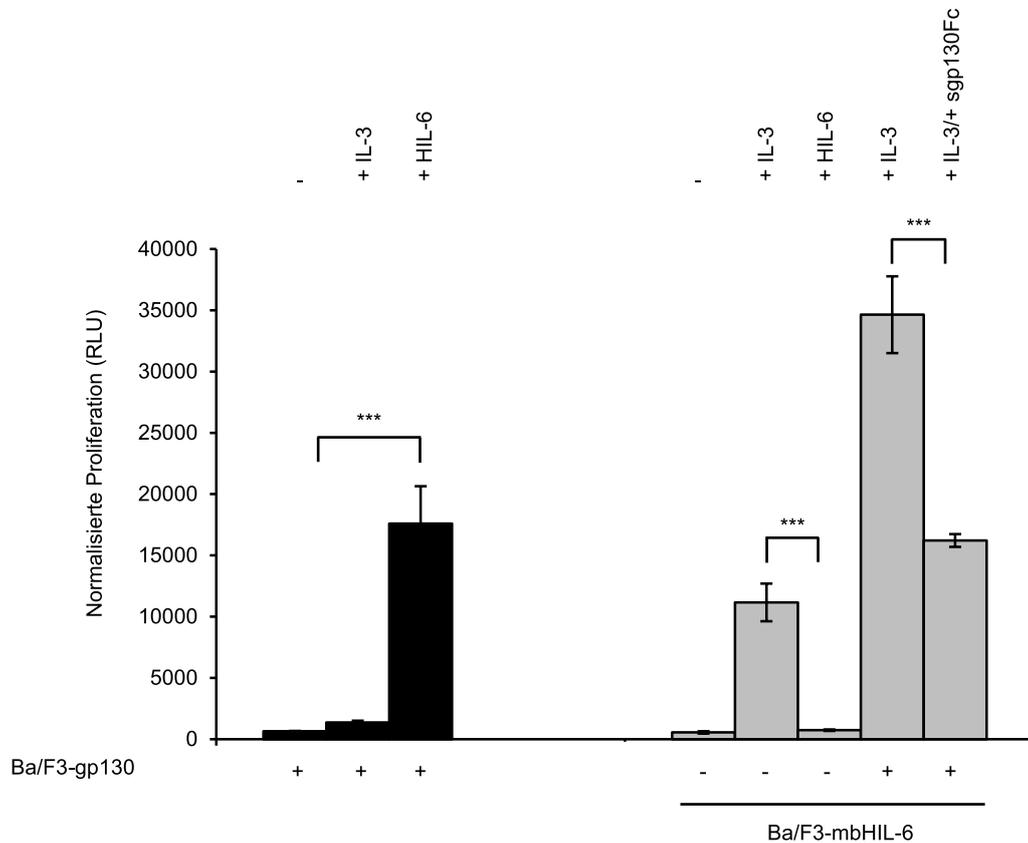


Abbildung 3.23: Inhibition der *Cluster-signaling* induzierten Proliferation von Ba/F3-gp130-Zellen durch Ba/F3-mbHIL-6-Zellen. Ba/F3-gp130-(schwarz) und Ba/F3-mbHIL-6-Zellen wurden einzeln, als Kontrolle, kultiviert. Ba/F3-gp130-Zellen wurden mit 10 ng/ml HIL-6 (schwarz, dritter Balken) und IL-3 (schwarz, zweiter Balken) stimuliert. Ba/F3-mbHIL-6-Zellen wurden mit 10 ng/ml HIL-6 (grau, dritter Balken) und IL-3 (grau, zweiter Balken) stimuliert. Ba/F3-gp130- und Ba/F3-mbHIL-6-Zellen wurden zur Analyse des *Cluster-signaling*s mit IL-3 kokultiviert (grau vierter Balken). Für die Inhibition wurden 10 µg/ml sgp130Fc hinzugegeben (grau, fünfter Balken). Die Zellen wurden für 72 Stunden kultiviert. Die Signifikanz wurde durch einen *Students TTest* als sehr hoch eingestuft (***). Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Experimenten (n=3).

Für die Zelllinien Ba/F3-mbHIL-6Δ15, Ba/F3-mbHIL-6Δ30 und Ba/F3-mbHIL-6Δ45 wurde das gleiche Experiment durchgeführt (Abbildung 3.24). Als Kontrolle wurden die verwendeten Zelllinien Ba/F3-gp130, Ba/F3-mbHIL-6Δ15, Ba/F3-mbHIL-6Δ30 und Ba/F3-mbHIL-6Δ45 einzeln kultiviert. Dabei wurden Ba/F3-gp130-, Ba/F3-mbHIL-6Δ15-, Ba/F3-mbHIL-6Δ30-, und Ba/F3-mbHIL-6Δ45-Zellen ohne Zugabe von Zytokin (Abbildung 3.24), durch Zugabe von IL-3 und durch Zugabe von 10 ng/ml HIL-6 stimuliert. Ba/F3-gp130-Zellen proliferieren nach der Zugabe von 10 ng/ml HIL-6. IL-3 hat keine

Ergebnisse

Auswirkung auf die Proliferation dieser Zelllinien (siehe Abbildung 3.24). Ba/F3-mbHIL-6 Δ 15-, Ba/F3-mbHIL-6 Δ 30-, und Ba/F3-mbHIL-6 Δ 45-Zellen proliferieren nicht nach der Zugabe von 10 ng/ml HIL-6 (siehe Abbildung 3.24). Die Proliferation dieser Zellen erfolgte nur in Gegenwart von IL-3 (siehe Abbildung 3.24). Für das *Cluster-signaling* wurden Ba/F3-gp130- und Ba/F3-mbHIL-6 Δ 15-Zellen kokultiviert. Dabei ist zu beachten, dass IL-3 hinzugegeben wurde, um die Apoptose der Ba/F3-mbHIL-6 Δ 15-Zellen zu verhindern. Die Proliferation von Ba/F3-mbHIL-6 Δ 15-Zellen durch IL-3 war geringer, als die der kokultivierten Zellen.

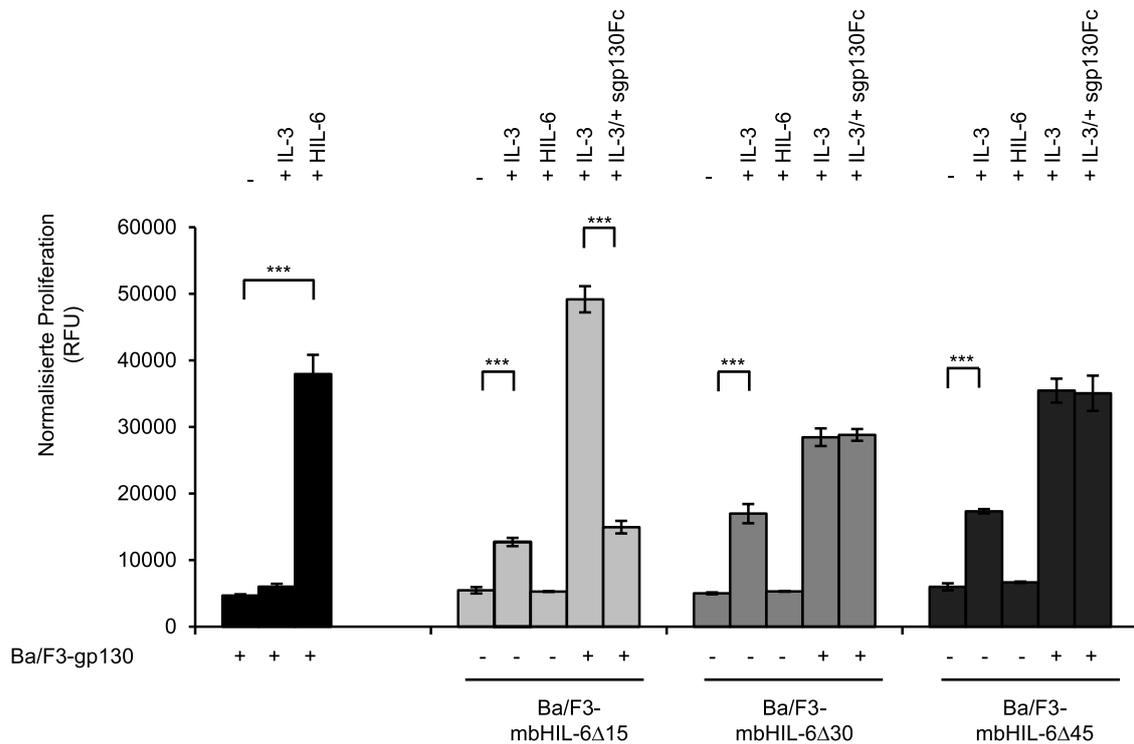


Abbildung 3.24: Inhibition der *Cluster-signaling* induzierten Proliferation von Ba/F3-gp130-Zellen durch Ba/F3-mbHIL-6 Δ 15-, Ba/F3-mbHIL-6 Δ 30-, oder Ba/F3-mbHIL-6 Δ 45-, Zellen. Ba/F3-gp130- (schwarz) und Ba/F3-mbHIL-6 Δ 15- (hellgrau), Ba/F3-mbHIL-6 Δ 30- (mittelgrau), Ba/F3-mbHIL-6 Δ 45- (dunkelgrau) Zellen wurden einzeln, als Kontrolle, kultiviert. Ba/F3-gp130-Zellen wurden mit 10 ng/ml HIL-6 (schwarz, dritter Balken) und IL-3 (schwarz, zweiter Balken) stimuliert. Ba/F3-mbHIL-6 Δ 15- (hellgrau), Ba/F3-mbHIL-6 Δ 30- (mittelgrau) und Ba/F3-mbHIL-6 Δ 45- (dunkelgrau) wurden mit 10 ng/ml HIL-6 (dritter Balken) und IL-3 (zweiter Balken) stimuliert. Ba/F3-gp130- und Ba/F3-mbHIL-6 Δ 15-Zellen oder Ba/F3-gp130- und Ba/F3-mbHIL-6 Δ 45-Zellen wurden für die Analyse des *Cluster-signaling*s mit IL-3 kokultiviert. Für die Analyse der Inhibition wurden 10 μ g/ml sgp130Fc hinzugegeben. Die Zellen wurden für 72 Stunden kultiviert. Die Signifikanz durch einen *Students TTest* wurde zwischen signifikant (*) und sehr hoch signifikant (***) ermittelt. Die Proliferation wurde bei einer Absorption von 560 nm im Tecan Reader gemessen. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Experimenten (n=3).

Sgp130Fc wurde als Inhibitor untersucht, weswegen es in einem weiteren Ansatz hinzugegeben wurde. Die Proliferation wurde durch die Zugabe von 10 μ g/ml sgp130Fc inhibiert

Ergebnisse

und zwar auf das Level der IL-3 induzierten Proliferation, der Ba/F3-mbHIL-6 Δ 15-Zellen. Damit hemmt sgp130Fc das *Cluster-signaling* (Abbildung 3.24).

Für das *Cluster-signaling* wurden Ba/F3-gp130- und Ba/F3-mbHIL-6 Δ 30-Zellen kokultiviert. Dabei ist zu beachten, dass IL-3 hinzugegeben wurde, um die Apoptose der Ba/F3-mbHIL-6 Δ 30-Zellen zu verhindern. Die Proliferation von Ba/F3-mbHIL-6 Δ 30-Zellen durch IL-3 war geringer, als die der kokultivierten Zellen.

Sgp130Fc wurde als Inhibitor untersucht, weswegen es in einem weiteren Ansatz hinzugegeben wurde. Die Proliferation wurde durch die Zugabe von 10 μ g/ml sgp130Fc nicht inhibiert (Abbildung 3.24)

Für das *Cluster-signaling* wurden Ba/F3-gp130- und Ba/F3-mbHIL-6 Δ 45-Zellen kokultiviert. Dabei ist zu beachten, dass IL-3 hinzugegeben wurde, um die Apoptose der Ba/F3-mbHIL-6 Δ 45-Zellen zu verhindern. Die Proliferation von Ba/F3-mbHIL-6 Δ 45-Zellen durch IL-3 war geringer, als die der kokultivierten Zellen.

Sgp130Fc wurde als Inhibitor untersucht, weswegen es in einem weiteren Ansatz hinzugegeben wurde. Die Proliferation wurde durch die Zugabe von 10 μ g/ml sgp130Fc nicht inhibiert (Abbildung 3.24).

Das Ergebnis für das *Cluster-signaling* der Zelllinien Ba/F3-mbHIL-6 Δ 30 und Ba/F3-mbHIL-6 Δ 45 ist insofern interessant, da sgp130Fc die Proteine binden kann. An dieser Stelle bleibt die Frage offen, warum die Proliferation nicht gehemmt wird.

Als Kontrolle wurde die Zelllinie Ba/F3-HIL-6 mit untersucht. Dabei wurde kein *Cluster-signaling*, sondern *Trans-signaling* gezeigt.

Für das *Trans-signaling* wurden Ba/F3-gp130- und Ba/F3-HIL-6-Zellen kokultiviert. Dabei ist zu beachten, dass IL-3 hinzugegeben wurde, um die Apoptose der Ba/F3-HIL-6-Zellen zu verhindern. Die Proliferation von Ba/F3-HIL-6-Zellen durch IL-3 war geringer, als die der kokultivierten Zellen.

Sgp130Fc wurde als Inhibitor untersucht, weswegen es in einem weiteren Ansatz hinzugegeben wurde. Die Proliferation wurde durch die Zugabe von 10 μ g/ml sgp130Fc inhibiert (Abbildung 3.25).

Ergebnisse

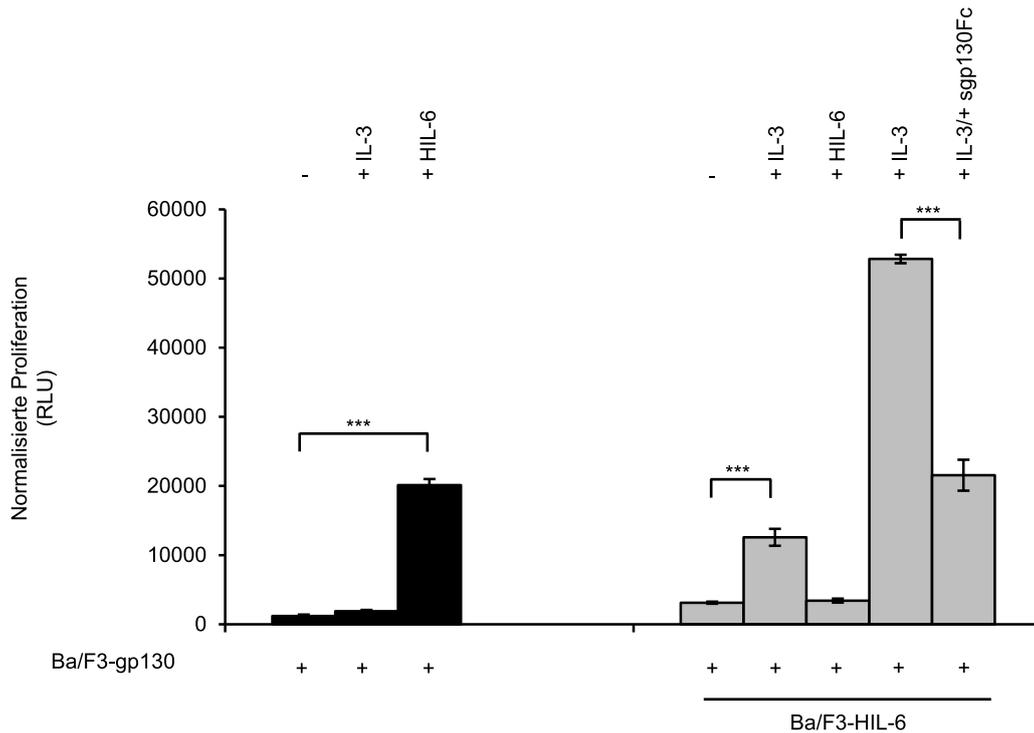


Abbildung 3.25: Inhibition der *Cluster-signaling* induzierten Proliferation von Ba/F3-gp130-Zellen durch Ba/F3-HIL-6-Zellen. Ba/F3-gp130-(schwarz) und Ba/F3-HIL-6-Zellen (hellgrau) wurden einzeln, als Kontrolle, kultiviert. Ba/F3-gp130-Zellen wurden mit 10 ng/ml HIL-6 (schwarz, dritter Balken) und IL-3 (schwarz, zweiter Balken) stimuliert. Ba/F3-HIL-6-Zellen wurden mit 10 ng/ml HIL-6 (dritter Balken) und IL-3 (zweiter Balken) stimuliert. Ba/F3-gp130- und Ba/F3-HIL-6-Zellen wurden für die Analyse des *Trans-signalings* mit % IL-3 kokultiviert. Für die Inhibition wurden 10 µg/ml sgp130Fc hinzugegeben. Die Zellen wurden für 72 Stunden kultiviert. Die Signifikanz durch einen *Students TTest* wurde zwischen signifikant (*) und sehr hoch signifikant (***) ermittelt. Die Proliferation wurde bei einer Absorption von 560 nm im Tecan Reader gemessen. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Experimenten (n=3).

Für das *Cluster-signaling* zwischen Ba/F3-gp130- und Ba/F3-mbHIL-6-Zellen (und Mutationsvarianten) wurde die Phosphorylierung des STAT3 Proteins (Ergebnisse 3.1) untersucht. Dafür wurde die Methode Western Blot und *Cluster-signaling* angewandt. Ba/F3-gp130-Zellen wurden als Empfänger-Zellen und Ba/F3-mbHIL-6-, Ba/F3-mbHIL-6Δ15-, Ba/F3-mbHIL-6Δ30- und Ba/F3-mbHIL-6Δ45-Zellen als Transmitter-Zellen verwendet (Abbildung 3.26).

Als Kontrolle wurden 5×10^5 Ba/F3-gp130-, Ba/F3-mbHIL-6-, Ba/F3-mbHIL-6Δ15-, Ba/F3-mbHIL-6Δ30- und Ba/F3-mbHIL-6Δ45-Zellen ohne Zytokinzugabe stimuliert. (Abbildung 3.26). Um *Cluster-signaling* nachweisen zu können, wurden Ba/F3-gp130- und Ba/F3-mbHIL-6-Zellen für 30 Minuten kokultiviert. Es wurde eine starke STAT3-Phosphorylierung detektiert (Abbildung 3.26). Für den Nachweis der Inhibition durch sgp130Fc, wurden Ba/F3-gp130- und Ba/F3-mbHIL-6-Zellen mit 10 µg/ml sgp130Fc für 30 Minuten kokultiviert. Es wurde keine STAT3-Phosphorylierung detektiert (Abbildung

Ergebnisse

3.26). Das gleiche wurde für das *Cluster-signaling* von Ba/F3-gp130- und Ba/F3-mbHIL-6Δ15-Zellen, Ba/F3-gp130- und Ba/F3-mbHIL-6Δ30-Zellen oder Ba/F3-gp130- und Ba/F3-mbHIL-6Δ45-Zellen durchgeführt.

Ba/F3-mbHIL-6Δ15-Zellen konnten ebenfalls Ba/F3-gp130-Zellen über *Cluster-signaling* aktivieren (Abbildung 3.26). Die STAT3-Phosphorylierung war allerdings schwächer, als die zwischen Ba/F3-gp130- und Ba/F3-mbHIL-6-Zellen. Das *Cluster-signaling* wurde durch sgp130Fc inhibiert. Zwischen Ba/F3-mbHIL-6Δ30- und Ba/F3-gp130-Zellen, ebenso wie Ba/F3-mbHIL-6Δ45- und Ba/F3-gp130-Zellen wurde kein *Cluster-signaling* nachgewiesen (Abbildung 3.26) und somit auch keine Inhibition durch 10 µg/ml sgp130Fc.

STAT3 wurde in allen Experimenten als Ladekontrolle verwendet, um nachzuweisen, dass die gleiche Menge Protein aufgetragen wurde (Abbildung 3.26).

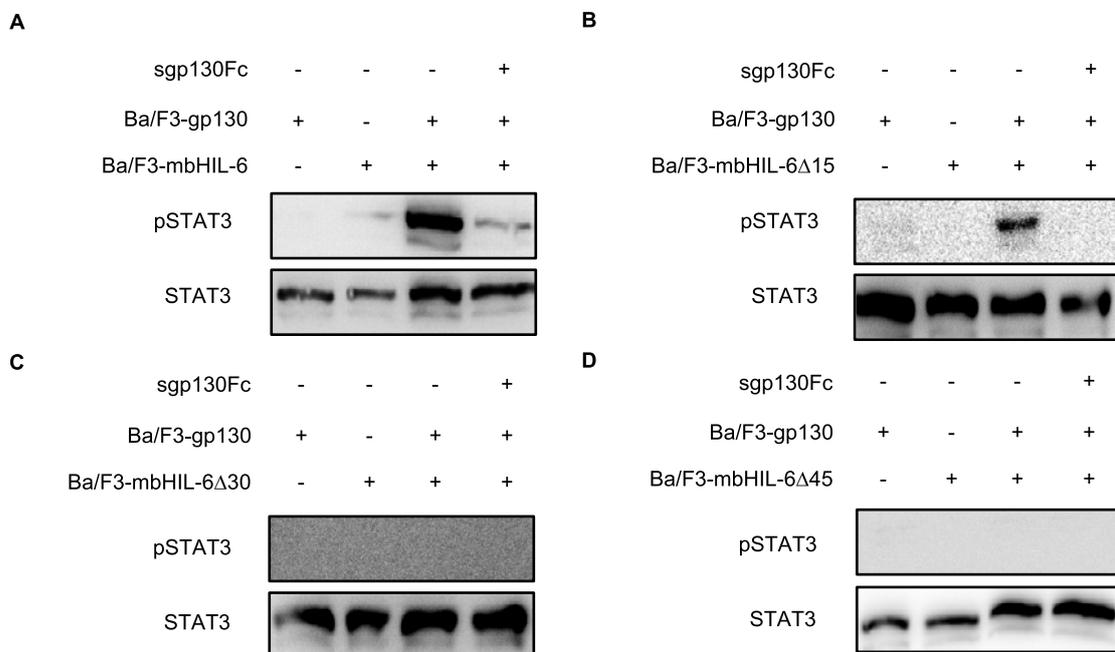


Abbildung 3.26: Inhibition der *Cluster-signaling* induzierten STAT3 Phosphorylierung von Ba/F3-gp130-Zellen durch Ba/F3-mbHIL-6 und Mutationsvarianten. (A) Zuerst wurden 5×10^5 Ba/F3-gp130-Zellen und 5×10^5 Ba/F3-mbHIL-6-Zellen einzeln ohne Zugabe von Zytokin kultiviert. Danach wurden diese für 30 Minuten kokultiviert. Der Inhibitor sgp130Fc wurde in einer Konzentration von 10 µg/ml bei der Kokultivierung hinzugegeben. Zur Analyse wurde die Phosphorylierung des STAT3 Proteins untersucht, wobei STAT3 als Ladekontrolle verwendet wurde. (B) Zuerst wurden 5×10^5 Ba/F3-gp130-Zellen und 5×10^5 Ba/F3-mbHIL-6Δ15-Zellen einzeln ohne Zugabe von Zytokin kultiviert. Danach wurden diese für 30 Minuten kokultiviert. Der Inhibitor sgp130Fc wurde in einer Konzentration von 10 µg/ml bei der Kokultivierung hinzugegeben. Zur Analyse wurde die Phosphorylierung des STAT3 Proteins untersucht, wobei STAT3 als Ladekontrolle verwendet wurde. (C) Zuerst wurden 5×10^5 Ba/F3-gp130-Zellen und 5×10^5 Ba/F3-mbHIL-6Δ30-Zellen einzeln ohne Zugabe von Zytokin kultiviert. Danach wurden diese für 30 Minuten kokultiviert. Der Inhibitor sgp130Fc wurde in einer Konzentration von 10 µg/ml bei der Kokultivierung hinzugegeben. Zur Analyse wurde die Phosphorylierung des STAT3 Proteins untersucht, wobei STAT3 als Ladekontrolle verwendet wurde. (D) Zuerst wurden 5×10^5 Ba/F3-gp130-Zellen und 5×10^5 Ba/F3-mbHIL-6Δ45-Zellen einzeln ohne Zugabe von Zytokin kultiviert. Danach wurden diese für 30 Minuten kokultiviert. Der Inhibitor sgp130Fc wurde in einer Konzentration von 10 µg/ml bei der Kokultivierung hinzugegeben. Zur Analyse wurde die Phosphorylierung des STAT3 Proteins untersucht, wobei STAT3 als Ladekontrolle verwendet wurde. Dargestellt ist je ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Experimenten (n=3).

Ergebnisse

Beim *Cluster-signaling* wurde zuerst die Proliferation und im Anschluss die STAT3 Phosphorylierung von Ba/F3-gp130- und Ba/F3-mbHIL-6 Δ 30-Zellen/ Ba/F3-mbHIL-6 Δ 45-Zellen untersucht. Dabei wurde keine Inhibition des *Cluster-signalings* durch sgp130Fc bei der Proliferation gezeigt. Das ist interessant, da bei der STAT3 Phosphorylierung gar keine Bande detektiert wurde. Es wird hierbei argumentiert, dass bei der Proliferation durch *Cluster-signaling* die durch IL-3 induzierte Proliferation von Ba/F3-gp130- und Ba/F3-mbHIL-6 Δ 30-Zellen/ Ba/F3-mbHIL-6 Δ 45-Zellen zusammengefasst diese Proliferationsrate zeigt. Deswegen wird auch keine Hemmung durch sgp130Fc induziert. Zusammengefasst wird gesagt, dass die Proliferation nicht durch *Cluster-signaling* sondern durch eine Addition beider IL-3 induzierter Proliferationen die Gesamtproliferation erklärt, da keine STAT3 Phosphorylierung detektiert wurde.

Da diese Mutationsvarianten nach einer Verkürzung von 30 Aminosäuren kein Signal mehr zeigten, wurden die Mutationsvarianten mbHIL-6_{V563E} und mbHIL-6_{V563G} für die weitere Analyse der STAT3 Phosphorylierung betrachtet. Zudem wurden die Kontrollzellen Ba/F3-HIL-6, die *Trans-signaling* induzieren, ebenfalls mit betrachtet. Dafür wurde der *shedding* Inhibitor GW für die Analyse des *Cluster-signalings* mit berücksichtigt.

Als Kontrolle für diese Methode wurden die Ba/F3-gp130- und Ba/F3-mbHIL-6-Zellen einzeln stimuliert. Es wurden 5×10^5 Ba/F3-gp130-Zellen als Empfänger-Zellen und 5×10^5 Ba/F3-mbHIL-6-Zellen als Transmitter-Zellen verwendet.

Eine Phosphorylierung von STAT3 (pSTAT3) bei Ba/F3-gp130-Zellen wurde nur nach Stimulation mit 10 ng/ml HIL-6 detektiert (Abbildung 3.27 A). Nach der Stimulation mit 10 ng/ml HIL-6 und IL-3, wurde bei Ba/F3-mbHIL-6-Zellen kein pSTAT3 Signal detektiert (Abbildung 3.27 A). Die im weiteren Experiment detektierten Banden wurden somit durch *Cluster-signaling* induziert. STAT3 diente in allen Experimenten als Ladekontrolle, um nachzuweisen, dass die gleiche Menge an Protein aufgetragen wurde (Abbildung 3.27 A und B).

Es wurde weiterhin IL-3 zu den Ba/F3-mbHIL-6-Zellen hinzugegeben. Bei beiden Zelllinien wurde durch IL-3 keine STAT3 Phosphorylierung induziert.

Ba/F3-gp130- und Ba/F3-mbHIL-6-Zellen wurden, nach der Inkubationszeit der Inhibitoren sgp130Fc, Tocilizumab oder IL-6R-Nanobody, für 30 Minuten kokultiviert. Ba/F3-mbHIL-6-Zellen wurden jeweils mit 10 μ g/ml sgp130Fc, mit 10 μ g/ml Tocilizumab oder mit 10 μ g/ml des IL-6R-Nanobodies inkubiert (Abbildung 3.27 B). Zudem wurde jeweils eine Probe mit 3 μ M GW oder ohne GW Zugabe stimuliert.

Ergebnisse

Die STAT3 Phosphorylierung wurde bei der Zugabe von 3 μM GW nicht stärker oder schwächer detektiert, als ohne Zugabe von GW. Es wurde eine komplette Inhibition der STAT3 Phosphorylierung durch sgp130Fc während des *Cluster-signalings* mit 10 $\mu\text{g/ml}$ sgp130Fc detektiert. Das gleiche wurde für die Zugabe von 10 $\mu\text{g/ml}$ des IL-6R-Nanobodies detektiert. Bei der Zugabe von 10 $\mu\text{g/ml}$ Tocilizumab wurde die STAT3 Phosphorylierung nicht inhibiert (Abbildung 3.27 B). Das Experiment wurde Analog für die Zelllinien Ba/F3-mbHIL-6_{V563E}, Ba/F3-mbHIL-6_{V563G} und Ba/F3-HIL-6 genauso durchgeführt und die gleichen Erkenntnisse gewonnen. Als Kontrolle für diese Methode wurden die Ba/F3-gp130- und Ba/F3-mbHIL-6_{V563E}-Zellen einzeln stimuliert. Es wurden 5×10^5 Ba/F3-gp130-Zellen als Empfänger-Zellen und 5×10^5 Ba/F3-mbHIL-6_{V563E}-Zellen als Transmitter-Zellen verwendet.

Eine Phosphorylierung von STAT3 (pSTAT3) bei Ba/F3-gp130-Zellen wurde nur nach Stimulation mit 10 ng/ml HIL-6 detektiert (Abbildung 3.27 A). Nach der Stimulation mit 10 ng/ml HIL-6 und IL-3, wurde bei Ba/F3-mbHIL-6_{V563E}-Zellen kein pSTAT3 Signal detektiert (Abbildung 3.27 A). Die im weiteren Experiment beobachteten Banden wurden somit durch *Cluster-signaling* induziert. STAT3 diente in allen Experimenten als Ladekontrolle, um nachzuweisen, dass die gleiche Menge an Protein aufgetragen wurde (Abbildung 3.27 A und B).

Es wurde weiterhin IL-3 zu den Ba/F3-mbHIL-6_{V563E}-Zellen hinzugegeben. Bei beiden Zelllinien wurde durch IL-3 keine STAT3 Phosphorylierung induziert.

Ba/F3-gp130- und Ba/F3-mbHIL-6_{V563E}-Zellen wurden, nach der Inkubationszeit der Inhibitoren sgp130Fc, Tocilizumab oder IL-6R-Nanobody, für 30 Minuten kokultiviert. Ba/F3-mbHIL-6_{V563E}-Zellen wurden jeweils mit 10 $\mu\text{g/ml}$ sgp130Fc, mit 10 $\mu\text{g/ml}$ Tocilizumab oder mit 10 $\mu\text{g/ml}$ des IL-6R-Nanobody inkubiert (Abbildung 3.27 B). Zudem wurde jeweils eine Probe mit 3 μM GW oder ohne GW Zugabe stimuliert.

Die STAT3 Phosphorylierung wurde bei der Zugabe von 3 μM GW nicht stärker oder schwächer detektiert, als ohne Zugabe von GW. Es wurde eine komplette Inhibition der STAT3 Phosphorylierung durch sgp130Fc während des *Cluster-signalings* mit 10 $\mu\text{g/ml}$ sgp130Fc detektiert. Das gleiche wurde für die Zugabe von 10 $\mu\text{g/ml}$ des IL-6R-Nanobodies detektiert. Bei der Zugabe von 10 $\mu\text{g/ml}$ Tocilizumab wurde die STAT3 Phosphorylierung nicht inhibiert (Abbildung 3.27 B).

Ba/F3-gp130- und Ba/F3-mbHIL-6_{V563G}-Zellen wurden einzeln stimuliert. Es wurden 5×10^5 Ba/F3-gp130-Zellen als Empfänger-Zellen und 5×10^5 Ba/F3-mbHIL-6_{V563G}-Zellen als Transmitter-Zellen verwendet.

Ergebnisse

Eine Phosphorylierung von STAT3 (pSTAT3) bei Ba/F3-gp130-Zellen wurde nur nach Stimulation mit 10 ng/ml HIL-6 detektiert (Abbildung 3.28 A). Nach der Stimulation mit 10 ng/ml HIL-6 und IL-3, wurde bei Ba/F3-mbHIL-6_{V563G}-Zellen kein pSTAT3 Signal detektiert (Abbildung 3.27 A). Die im weiteren Experiment beobachteten Banden wurden somit durch *Cluster-signaling* induziert. STAT3 diente in allen Experimenten als Ladekontrolle, um nachzuweisen, dass die gleiche Menge an Protein aufgetragen wurde (Abbildung 3.27 A und B).

Es wurde weiterhin IL-3 zu den Ba/F3-mbHIL-6_{V563G}-Zellen hinzugegeben. Bei beiden Zelllinien wurde durch IL-3 keine STAT3 Phosphorylierung induziert.

Ba/F3-gp130- und Ba/F3-mbHIL-6_{V563G}-Zellen wurden nach der Inkubationszeit der Inhibitoren sgp130Fc oder Tocilizumab oder IL-6R-Nanobody für 30 Minuten kokultiviert. Ba/F3-mbHIL-6_{V563G}-Zellen wurden jeweils mit 10 µg/ml sgp130Fc, mit 10 µg/ml Tocilizumab oder mit 10 µg/ml des IL-6R Nanobodies inkubiert (Abbildung 3.27 B). Zudem wurde jeweils eine Probe mit 3 µM GW oder ohne GW Zugabe stimuliert.

Die STAT3 Phosphorylierung wurde bei der Zugabe von 3 µM GW nicht stärker oder schwächer detektiert, als ohne Zugabe von GW. Es wurde eine komplette Inhibition der STAT3 Phosphorylierung durch sgp130Fc während des *Cluster-signalings* mit 10 µg/ml sgp130Fc detektiert. Das gleiche wurde für die Zugabe von 10 µg/ml des IL-6R-Nanobodies detektiert. Bei der Zugabe von 10 µg/ml Tocilizumab wurde die STAT3 Phosphorylierung nicht inhibiert (Abbildung 3.27 B).

Ba/F3-gp130- und Ba/F3-HIL-6-Zellen wurden einzeln stimuliert. Es wurden 5×10^5 Ba/F3-gp130-Zellen als Empfänger-Zellen und 5×10^5 Ba/F3-HIL-6-Zellen als Transmitter-Zellen verwendet.

Ergebnisse

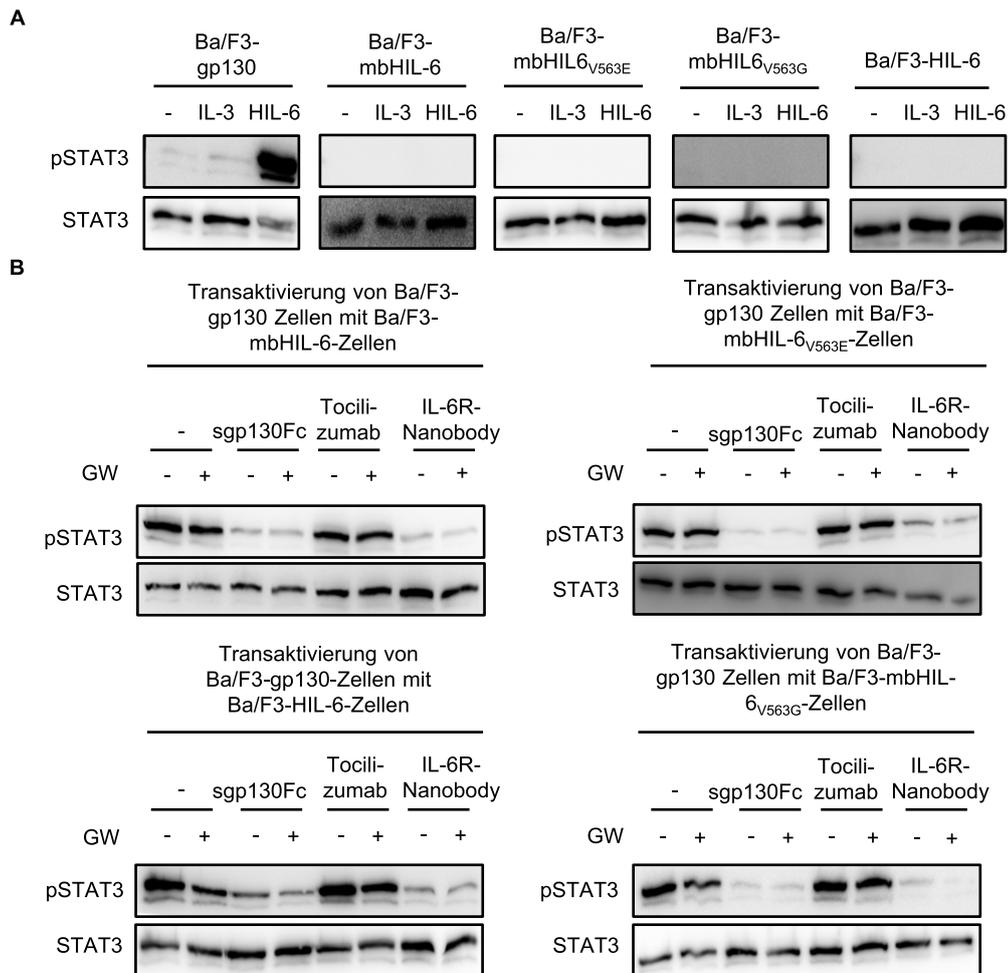


Abbildung 3.27: Inhibition der Cluster-signaling induzierten STAT3 Phosphorylierung von Ba/F3-gp130-Zellen durch Ba/F3-mbHIL-6 und Mutationsvarianten. (A) 5×10^5 Ba/F3-gp130-, Ba/F3-mbHIL-6-, Ba/F3-mbHIL-6_{V563E}-, Ba/F3-mbHIL-6_{V563G}- und Ba/F3-HIL-6-Zellen wurden einzeln kultiviert. Die Zelllinien wurden ohne Zytokinzugabe, mit IL-3 oder mit 10 ng/ml HIL-6 für 30 Minuten stimuliert. Als Nachweis wurde das Protein pSTAT3 gewählt, wobei STAT3 als Ladekontrolle untersucht wurde. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Experimenten (n=3). (B) 5×10^5 Ba/F3-gp130- und Ba/F3-mbHIL-6-Zellen wurden kokultiviert. Ba/F3-mbHIL-6-Zellen wurden mit und ohne Zugabe von 3 μ M GW, kultiviert. Außerdem wurden 10 μ g/ml sgp130Fc (sgp130Fc), sowie 10 μ g/ml Tocilizumab oder 10 μ g/ml IL-6R-Nanobody hinzugegeben. Vor der Kokultivierung wurden die mit GW behandelten Zellen gewaschen und die Inhibitoren erneut hinzugegeben. Die Zellen wurden für 30 Minuten kokultiviert. Zur Analyse wurde der Antikörper pSTAT3 verwendet, wobei STAT3 als Ladekontrolle verwendet wurde. (B) 5×10^5 Ba/F3-gp130- und Ba/F3-mbHIL-6_{V563E}-Zellen wurden kokultiviert. Ba/F3-mbHIL-6_{V563E}-Zellen wurden mit und ohne Zugabe von 3 μ M GW, kultiviert. Außerdem wurden 10 μ g/ml sgp130Fc (sgp130Fc), sowie 10 μ g/ml Tocilizumab oder 10 μ g/ml IL-6R-Nanobody hinzugegeben. Vor der Kokultivierung wurden die mit GW behandelten Zellen gewaschen und die Inhibitoren erneut hinzugegeben. Die Zellen wurden für 30 Minuten kokultiviert. Zur Analyse wurde der Antikörper pSTAT3 verwendet, wobei STAT3 als Ladekontrolle verwendet wurde. (B) 5×10^5 Ba/F3-gp130- und Ba/F3-mbHIL-6_{V563G}-Zellen wurden kokultiviert. Ba/F3-mbHIL-6_{V563G}-Zellen wurden mit und ohne Zugabe von 3 μ M GW, kultiviert. Außerdem wurden 10 μ g/ml sgp130Fc (sgp130Fc), sowie 10 μ g/ml Tocilizumab oder 10 μ g/ml IL-6R-Nanobody hinzugegeben. Vor der Kokultivierung wurden die mit GW behandelten Zellen gewaschen und die Inhibitoren erneut hinzugegeben. Die Zellen wurden für 30 Minuten kokultiviert. Zur Analyse wurde der Antikörper pSTAT3 verwendet, wobei STAT3 als Ladekontrolle verwendet wurde. (B) 5×10^5 Ba/F3-gp130- und Ba/F3-HIL-6-Zellen wurden kokultiviert. Ba/F3-HIL-6-Zellen wurden mit und ohne Zugabe von 3 μ M GW, kultiviert. Außerdem wurden 10 μ g/ml sgp130Fc (sgp130Fc), sowie 10 μ g/ml Tocilizumab oder 10 μ g/ml IL-6R-Nanobody hinzugegeben. Vor der Kokultivierung wurden die mit GW behandelten Zellen gewaschen und die Inhibitoren erneut hinzugegeben. Die Zellen wurden für 30 Minuten kokultiviert. Zur Analyse wurde der Antikörper pSTAT3 verwendet, wobei STAT3 als Ladekontrolle verwendet wurde. Dargestellt ist je ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Experimenten (n=3).

Ergebnisse

Eine Phosphorylierung von STAT3 (pSTAT3) bei Ba/F3-gp130-Zellen wurde nur nach Stimulation mit 10 ng/ml HIL-6 detektiert (Abbildung 3.27 A). Nach der Stimulation mit 10 ng/ml HIL-6 und IL-3, wurde bei Ba/F3-HIL-6-Zellen kein pSTAT3 Signal detektiert (Abbildung 3.27 A). Die im weiteren Experiment beobachteten Banden wurden somit durch *Cluster-signaling* induziert. STAT3 diente in allen Experimenten als Ladekontrolle, um nachzuweisen, dass die gleiche Menge an Protein aufgetragen wurde (Abbildung 3.27 A und B).

Es wurde weiterhin IL-3 zu den Ba/F3-HIL-6-Zellen hinzugegeben. Bei beiden Zelllinien wurde durch IL-3 keine STAT3 Phosphorylierung induziert.

Ba/F3-gp130- und Ba/F3-HIL-6-Zellen wurden, nach der Inkubationszeit der Inhibitoren sgp130Fc oder Tocilizumab oder IL-6R-Nanobody, für 30 Minuten kokultiviert. Ba/F3-HIL-6-Zellen wurden jeweils mit 10 µg/ml sgp130Fc, mit 10 µg/ml Tocilizumab oder mit 10 µg/ml des IL-6R-Nanobodies inkubiert (Abbildung 3.27 B). Zudem wurde jeweils eine Probe mit 3 µM GW oder ohne GW Zugabe stimuliert. Die STAT3 Phosphorylierung wurde bei der Zugabe von 3 µM GW nicht stärker oder schwächer detektiert, als ohne Zugabe von GW. Es wurde eine komplette Inhibition der STAT3 Phosphorylierung durch sgp130Fc während des *Cluster-signaling*s mit 10 µg/ml sgp130Fc detektiert. Das gleiche wurde für die Zugabe von 10 µg/ml des IL-6R-Nanobody detektiert. Bei der Zugabe von 10 µg/ml Tocilizumab wurde die STAT3 Phosphorylierung nicht inhibiert (Abbildung 3.27 B).

In diesem Abschnitt wurde herausgefunden, dass *Cluster-singaling* von Hyperzytokintragenden Zellen induziert wurde. Inhibiert wurde es durch die Zugabe von 10 µg/ml sgp130Fc und durch die Zugabe von 10 µg/ml des IL-6R-Nanobodies. Durch Tocilizumab dagegen wurde das *Cluster-signaling* nicht inhibiert. Das gleiche galt für die *Trans-signaling* induzierenden Zellen Ba/F3-HIL-6. Sgp130Fc kann zusammengefasst nicht nur mbHIL-6 und Mutationsvarianten von mbHIL-6 auf der Zelloberfläche binden, es inhibiert auch das *Cluster-signaling* von Ba/F3-gp130- und Ba/F3-mbHIL-6-Zellen (und Mutationsvarianten). Eine sterische Hinderung ist als Begründung, dass sgp130Fc klassisches *signaling* nicht inhibieren kann, unwahrscheinlich.

3.2.3 Natives-membrangebundenes HIL-6-induziertes *Cluster-signaling* wird durch sgp130Fc gehemmt

Die Erkenntnisse die aus dem Experiment mit mbHIL-6 gewonnen wurden, sollen auf nmbHIL-6 übertragen werden. NmbHIL-6 unterscheidet sich in der Domänenanzahl vom IL-6R und der Reihenfolge von IL-6 und dem IL-6R im Aufbau von mbHIL-6, wodurch die Inhibition des *Cluster-signaling*s von sgp130Fc hierfür untersucht wurde. Die Zellviabilität (RLU) wurde durch einen Proliferationsassay bestimmt. Dafür wurden Ba/F3-nmbHIL-6- und Ba/F3-gp130-Zellen kokultiviert. Dieses Experiment wurde analog mit der Zelllinie Ba/F3-nHIL-6 durchgeführt.

Als Kontrolle wurden die verwendeten Zelllinien Ba/F3-gp130 und Ba/F3-nmbHIL-6 einzeln kultiviert. Dabei wurden Ba/F3-gp130- und Ba/F3-nmbHIL-6-Zellen ohne Zugabe von Zytokin, durch Zugabe von IL-3 und durch Zugabe von 10 ng/ml HIL-6 stimuliert (Abbildung 3.28). Ba/F3-gp130-Zellen proliferieren nach der Zugabe von 10 ng/ml HIL-6. IL-3 hat keine Auswirkung auf die Proliferation dieser Zelllinien (siehe Abbildung 3.28). Ba/F3-nmbHIL-6-Zellen proliferieren nicht nach der Zugabe von 10 ng/ml HIL-6 (siehe Abbildung 3.28). Die Proliferation dieser Zellen erfolgte nur in Gegenwart von IL-3 (siehe Abbildung 3.28).

Für das *Cluster-signaling* wurden Ba/F3-gp130- und Ba/F3-nmbHIL-6-Zellen kokultiviert. Dabei ist zu beachten, dass IL-3 hinzugegeben wurde, um die Apoptose der Ba/F3-nmbHIL-6-Zellen zu verhindern. Die Proliferation von Ba/F3-nmbHIL-6-Zellen durch IL-3 war geringer, als die der kokultivierten Zellen (Abbildung 3.28).

Sgp130Fc wurde als Inhibitor untersucht, weswegen es in einem weiteren Ansatz hinzugegeben wurde. Die Proliferation von Ba/F3-gp130-Zellen mit Ba/F3-nmbHIL-6-Zellen wurde durch die Zugabe von 10 µg/ml sgp130Fc inhibiert und zwar auf dem Level der IL-3 induzierten Proliferation, der Ba/F3-nmbHIL-6-Zellen. Damit hemmt sgp130Fc das *Cluster-signaling* von nmbHIL-6 (Abbildung 3.28).

Ergebnisse

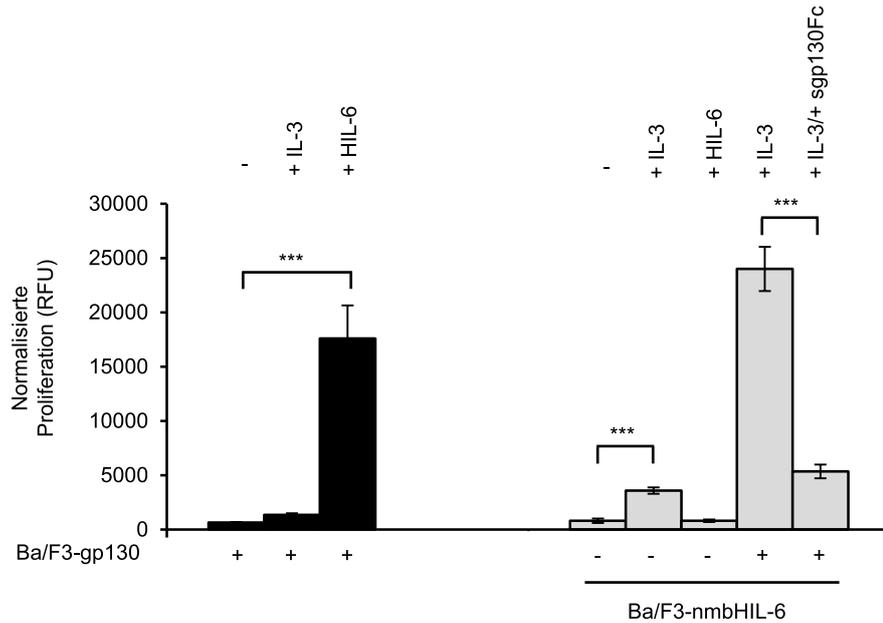


Abbildung 3.28: Inhibition der *Cluster-signaling* induzierten Proliferation von Ba/F3-gp130-Zellen durch Ba/F3-nmbHIL-6-Zellen. Ba/F3-gp130-(schwarz) und Ba/F3-nmbHIL-6-Zellen wurden einzeln, als Kontrolle, kultiviert. Ba/F3-gp130-Zellen wurden mit 10 ng/ml HIL-6 (schwarz, dritter Balken) und IL-3 (schwarz, zweiter Balken) für stimuliert. Ba/F3-nmbHIL-6-Zellen wurden mit 10 ng/ml HIL-6 (grau, dritter Balken) und IL-3 (grau, zweiter Balken) für stimuliert. Ba/F3-gp130- und Ba/F3-nmbHIL-6-Zellen wurden zur Analyse des *Cluster-signalings* mit IL-3 kokultiviert (grau vierter Balken). Für die Inhibition wurden 10 µg/ml sgp130Fc hinzugegeben (grau, fünfter Balken). Die Signifikanz wurde durch einen *Students TTest* als sehr hoch eingestuft (***). Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Experimenten (n=3).

Für die Zelllinie Ba/F3-nHIL-6 wurde das Experiment analog durchgeführt (siehe Abbildung 3.29). Ba/F3-nHIL-6-Zellen wurden dabei nicht für das *Cluster-signaling* untersucht. Ba/F3-nHIL-6 Zellen aktivieren Ba/F3-gp130-Zellen über *Trans-signaling* und sind Kontrollzellen. Als Kontrolle wurden die verwendeten Zelllinien Ba/F3-gp130 und Ba/F3-nHIL-6 einzeln kultiviert. Dabei wurden Ba/F3-gp130- und Ba/F3-nHIL-6-Zellen ohne Zugabe von Zytokin, durch Zugabe von IL-3 und durch Zugabe von 10 ng/ml HIL-6 stimuliert (Abbildung 3.29). Ba/F3-gp130-Zellen proliferieren nach der Zugabe von 10 ng/ml HIL-6. IL-3 hat keine Auswirkung auf die Proliferation dieser Zelllinien (siehe Abbildung 3.29). Ba/F3-nHIL-6-Zellen proliferieren nicht nach der Zugabe von 10 ng/ml HIL-6 (siehe Abbildung 3.29). Die Proliferation dieser Zellen erfolgte nur in Gegenwart von IL-3 (siehe Abbildung 3.29). Für das *Trans-signaling* wurden Ba/F3-gp130- und Ba/F3-nHIL-6-Zellen kokultiviert. Dabei ist zu beachten, dass IL-3 hinzugegeben wurde, um die Apoptose der Ba/F3-nHIL-6-Zellen zu verhindern. Die Proliferation von Ba/F3-nHIL-6-Zellen durch IL-3 war geringer, als die der kokultivierten Zellen (Abbildung 3.29).

Ergebnisse

Sgp130Fc wurde als Inhibitor untersucht, weswegen es in einem weiteren Ansatz hinzugegeben wurde. Die Proliferation von Ba/F3-gp130-Zellen mit Ba/F3-nHIL-6-Zellen wurde durch die Zugabe von 10 µg/ml sgp130Fc inhibiert und zwar auf dem Level der IL-3 induzierten Proliferation, der Ba/F3-nHIL-6-Zellen. Damit hemmt sgp130Fc das *Trans-signaling* von nmbHIL-6 (Abbildung 3.29).

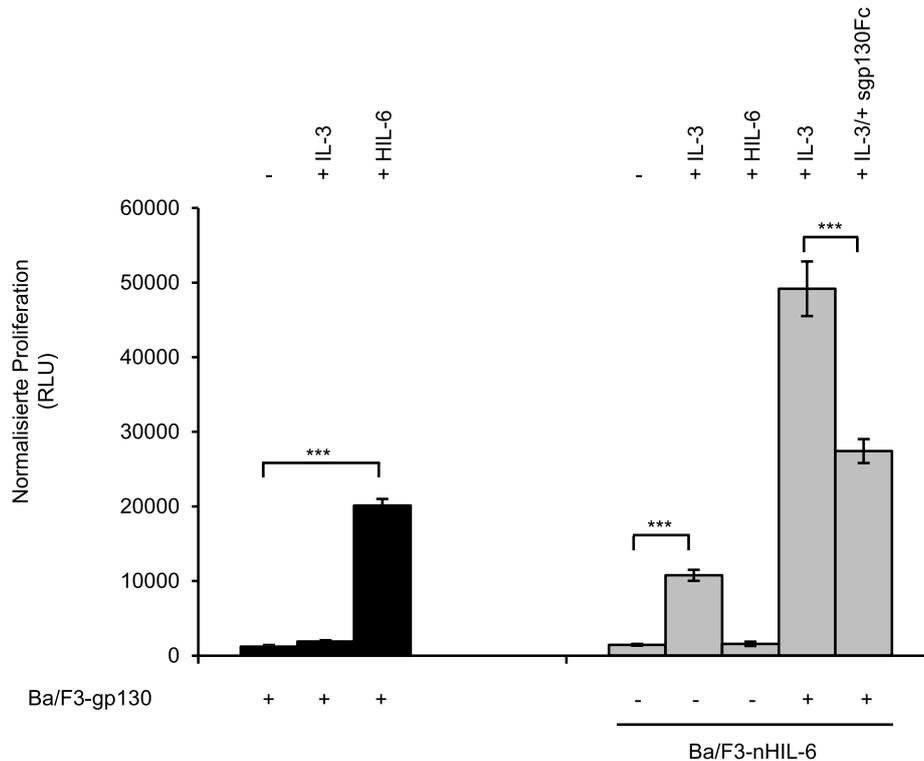


Abbildung 3.29: Inhibition der *Trans-signaling* induzierten Proliferation von Ba/F3-gp130-Zellen durch Ba/F3-nHIL-6-Zellen. Ba/F3-gp130-(schwarz) und Ba/F3-nHIL-6-Zellen (hellgrau) wurden einzeln, als Kontrolle, kultiviert. Ba/F3-gp130-Zellen wurden mit 10 ng/ml HIL-6 (schwarz, dritter Balken) und IL-3 (schwarz, zweiter Balken) stimuliert. Ba/F3-nHIL-6-Zellen wurden mit 10 ng/ml HIL-6 (dritter Balken) und IL-3 (zweiter Balken) stimuliert. Ba/F3-gp130- und Ba/F3-nHIL-6-Zellen wurden für die Analyse des *Trans-signaling*s mit IL-3 kokultiviert. Für die Inhibition wurden 10 µg/ml sgp130Fc hinzugegeben. Die Zellen wurden für 72 Stunden kultiviert. Die Signifikanz durch einen *Students TTest* wurde zwischen signifikant (*) und sehr hoch signifikant (***) ermittelt. Die Proliferation wurde bei einer Absorption von 560 nm im Tecan Reader gemessen. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Experimenten (n=3).

Für das *Cluster-signaling* zwischen Ba/F3-gp130- und Ba/F3-nmbHIL-6-Zellen wurde die Phosphorylierung des STAT3 Proteins (Ergebnisse 3.1) mittels Western Blot untersucht. Ba/F3-gp130-Zellen wurden als Empfänger-Zellen und Ba/F3-nmbHIL-6 als Transmitter-Zellen verwendet (Abbildung 3.19).

Als Kontrolle wurden 5×10^5 Ba/F3-gp130- und Ba/F3-nmbHIL-6-Zellen ohne Zytokinzugabe stimuliert. (Abbildung 3.30 A). Um *Cluster-signaling* nachweisen zu können, wurden Ba/F3-gp130- und Ba/F3-nmbHIL-6-Zellen für 30 Minuten kokultiviert. Es wurde eine STAT3-Phosphorylierung detektiert (Abbildung 3.30 A). Für den Nachweis der Inhibition

Ergebnisse

durch sgp130Fc, wurden Ba/F3-gp130- und Ba/F3-nmbHIL-6-Zellen mit 10 µg/ml sgp130Fc für 30 Minuten kokultiviert. Es wurde keine STAT3-Phosphorylierung detektiert (Abbildung 3.30 A).

Zudem wurde dieses Experiment mit dem *shedding* Inhibitor GW durchgeführt. Dafür wurden die Kontrollzellen Ba/F3-nHIL-6, die *Trans-signaling* induzieren, ebenfalls mit betrachtet. Als Kontrolle wurden Ba/F3-gp130- und Ba/F3-nmbHIL-6-Zellen einzeln stimuliert. Es wurden 5×10^5 Ba/F3-gp130-Zellen als Empfänger-Zellen und 5×10^5 Ba/F3-nmbHIL-6-Zellen als Transmitter-Zellen verwendet (Abbildung 3.19).

Eine Phosphorylierung von STAT3 (pSTAT3) bei Ba/F3-gp130-Zellen wurde nur nach Stimulation mit 10 ng/ml HIL-6 detektiert (Abbildung 3.30 B). Nach der Stimulation mit 10 ng/ml HIL-6 und IL-3, wurde bei Ba/F3-nmbHIL-6-Zellen kein pSTAT3 Signal detektiert (Abbildung 3.30 B). Die im weiteren Experiment detektierten Banden wurden somit durch *Cluster-signaling* induziert. STAT3 diente in allen Experimenten als Ladekontrolle, um nachzuweisen, dass die gleiche Menge an Protein aufgetragen wurde (Abbildung 3.30 A-C).

Es wurde weiterhin IL-3 zu den Ba/F3-nmbHIL-6-Zellen hinzugegeben. Bei beiden Zelllinien wurde durch IL-3 keine STAT3 Phosphorylierung induziert.

Ba/F3-gp130- und Ba/F3-nmbHIL-6-Zellen wurden, nach der Inkubationszeit des Inhibitors sgp130Fc, Tocilizumab oder IL-6R-Nanobody für 30 Minuten kokultiviert. Ba/F3-nmbHIL-6-Zellen wurden jeweils mit 10 µg/ml sgp130Fc, mit 10 µg/ml Tocilizumab oder mit 10 µg/ml des IL-6R-Nanobodies inkubiert (Abbildung 3.30 C). Zudem wurde jeweils eine Probe mit 3 µM GW oder ohne GW Zugabe stimuliert.

Die STAT3 Phosphorylierung wurde bei der Zugabe von 3 µM GW nicht stärker oder schwächer detektiert, als ohne Zugabe von GW. Es wurde eine komplette Inhibition der STAT3 Phosphorylierung durch sgp130Fc während des *Cluster-signalings* mit 10 µg/ml sgp130Fc detektiert. Bei der Zugabe von 10 µg/ml Tocilizumab und 10 µg/ml des IL-6R-Nanobodies wurde die STAT3 Phosphorylierung nicht inhibiert (Abbildung 3.30 C). Das Experiment wurde analog für die Zelllinien Ba/F3-nHIL-6 genauso durchgeführt und die gleichen Erkenntnisse gewonnen. Eine Phosphorylierung von STAT3 (pSTAT3) bei Ba/F3-gp130-Zellen wurde nur nach Stimulation mit 10 ng/ml HIL-6 detektiert (Abbildung 3.30 B). Nach der Stimulation mit 10 ng/ml HIL-6 und IL-3, wurde bei Ba/F3-nHIL-6-Zellen kein pSTAT3 Signal detektiert (Abbildung 3.30 B). Die im weiteren Experiment detektierten Banden wurden somit durch *Trans-signaling* induziert. STAT3 diente in allen

Ergebnisse

Experimenten als Ladekontrolle, um nachzuweisen, dass die gleiche Menge an Protein aufgetragen wurde (Abbildung 3.30 A-C).

Es wurde weiterhin IL-3 zu den Ba/F3-nHIL-6-Zellen hinzugegeben. Bei beiden Zelllinien wurde durch IL-3 keine STAT3 Phosphorylierung induziert.

Ba/F3-gp130- und Ba/F3-nHIL-6-Zellen wurden, nach der Inkubationszeit des Inhibitors sgp130Fc, für 30 Minuten kokultiviert. Ba/F3-nHIL-6-Zellen wurden jeweils mit 10 µg/ml sgp130Fc, Tocilizumab oder IL-6R-Nanobody mit 10 µg/ml Tocilizumab oder mit 10 µg/ml des IL-6R-Nanobodies inkubiert (Abbildung 3.30 C). Zudem wurde jeweils eine Probe mit 3 µM GW oder ohne GW Zugabe stimuliert.

Die STAT3 Phosphorylierung wurde bei der Zugabe von 3 µM GW nicht stärker oder schwächer detektiert, als ohne Zugabe von GW. Es wurde eine komplette Inhibition der STAT3 Phosphorylierung durch sgp130Fc während des *Cluster-signalings* mit 10 µg/ml sgp130Fc detektiert. Bei der Zugabe von 10 µg/ml Tocilizumab und 10 µg/ml des IL-6R-Nanobodies wurde die STAT3 Phosphorylierung nicht inhibiert (Abbildung 3.30 C).

Ergebnisse

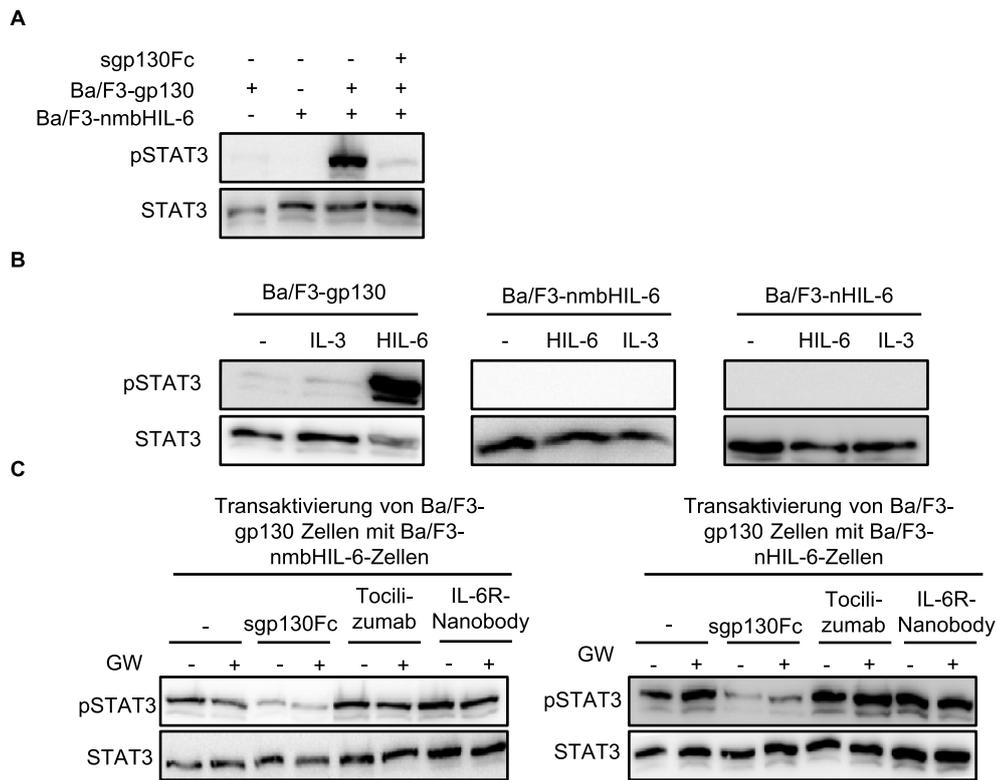


Abbildung 3.30: Inhibition der *Cluster-signaling* induzierten und *Trans-signaling* induzierten STAT3 Phosphorylierung von Ba/F3-gp130-Zellen durch Ba/F3-nmbHIL-6-Zellen und Ba/F3-gp130-Zellen durch Ba/F3-nHIL-6-Zellen. (A) Zuerst wurden 5×10^5 Ba/F3-gp130-Zellen und 5×10^5 Ba/F3-nmbHIL-6-Zellen einzeln ohne Zugabe von Zytokin kultiviert. Danach wurden diese für 30 Minuten kokultiviert. Der Inhibitor sgp130Fc wurde in einer Konzentration von 10 $\mu\text{g/ml}$ bei der Kokultivierung hinzugegeben. Zur Analyse wurde die Phosphorylierung des STAT3 Proteins untersucht, wobei STAT3 als Ladekontrolle verwendet wurde. (B) 5×10^5 Ba/F3-gp130-, Ba/F3-nmbHIL-6- und Ba/F3-nHIL-6-Zellen wurden einzeln kultiviert. Die Zelllinien wurden ohne Zytokinzugabe, mit IL-3 oder mit 10 ng/ml HIL-6 für 30 Minuten stimuliert. Als Nachweis wurde das Protein pSTAT3 gewählt, wobei STAT3 als Ladekontrolle untersucht wurde. (C) 5×10^5 Ba/F3-gp130- und Ba/F3-nmbHIL-6-Zellen wurden kokultiviert. Ba/F3-nmbHIL-6-Zellen wurden mit und ohne Zugabe von 3 μM GW, kultiviert. Außerdem wurden 10 $\mu\text{g/ml}$ sgp130Fc (sgp130Fc), sowie 10 $\mu\text{g/ml}$ Tocilizumab oder 10 $\mu\text{g/ml}$ IL-6R-Nanobody hinzugegeben. Vor der Kokultivierung wurden die mit GW behandelten Zellen gewaschen und die Inhibitoren erneut hinzugegeben. Ba/F3-gp130- und Ba/F3-nmbHIL-6-Zellen wurden für 30 Minuten kokultiviert. Zur Analyse wurde der Antikörper pSTAT3 verwendet, wobei STAT3 als Ladekontrolle verwendet wurde. 5×10^5 Ba/F3-gp130- und Ba/F3-nHIL-6-Zellen wurden kokultiviert. Ba/F3-nHIL-6-Zellen wurden mit und ohne Zugabe von 3 μM GW, kultiviert. Außerdem wurden 10 $\mu\text{g/ml}$ sgp130Fc (sgp130Fc), sowie 10 $\mu\text{g/ml}$ Tocilizumab oder 10 $\mu\text{g/ml}$ IL-6R-Nanobody hinzugegeben. Vor der Kokultivierung wurden die mit GW behandelten Zellen gewaschen und die Inhibitoren erneut hinzugegeben. Ba/F3-gp130- und Ba/F3-nmbHIL-6-Zellen wurden für 30 Minuten kokultiviert. Zur Analyse wurde der Antikörper pSTAT3 verwendet, wobei STAT3 als Ladekontrolle verwendet wurde. Dargestellt ist je ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Experimenten ($n=3$)

In diesem Abschnitt wurde gezeigt, dass die Reihenfolge des sIL-6R und IL-6 im Hyperzytokin keinen Einfluss auf die Aktivität hat. Weiterhin wurde herausgefunden, dass *Cluster-signaling* von Hyperzytokin-tragenden Zellen induziert wurde. Inhibiert wurde es durch die Zugabe von sgp130Fc. Durch Tocilizumab und dem IL-6R-Nanobody dagegen wurde das *Cluster-signaling* nicht inhibiert. Das gleiche galt für die *Trans-signaling* induzieren-

den Zellen Ba/F3-nHIL-6. Eine Erklärung dafür liegt darin, dass durch die fehlende Domäne 1 des IL-6R eine andere Konfirmation des Hyperzytokins vorliegt, wodurch der IL-6R-Nanobody nicht mehr an das Hyperzytokin binden kann und somit keine Inhibition möglich ist. Sgp130Fc kann zusammengefasst nicht nur nmbHIL-6 auf der Zelloberfläche binden, es inhibiert auch das *Cluster-signaling* von Ba/F3-gp130- und Ba/F3-nmbHIL-6-Zellen.

3.2.4 *Shedding* von mbHIL-6 und nmbHIL-6 erfolgt durch ADAM Proteasen

Der IL-6R wird durch ADAM-Proteasen gespalten (*shedding*) (Garbers, *et al.* 2011, Müllberg, *et al.* 1993). Der Rezeptor liegt danach nicht mehr membrangebunden, sondern als lösliche Form, ohne Transmembran und intrazellulärer Domäne, vor (Heinrich, *et al.* 2003). Um ausschließen zu können, dass das *Cluster-signaling* in unserem System teilweise durch den löslichen IL-6R induziert wurde, wurde das *shedding* des IL-6R untersucht. Die Quantifizierung des sIL-6R im Überstand wurde durch einen IL-6R ELISA ermittelt. Für die Analyse des *sheddings* des IL-6Rs wurde konstitutives *shedding* von Ba/F3-IL-6R-Zellen über 24 Stunden untersucht. Hierbei wurden zuerst Ba/F3- und Ba/F3-gp130-Zellen als Kontrollen genutzt. Um eine Inhibition des *sheddings* zu erreichen, wurde der ADAM10/ADAM17 *shedding* Inhibitor GW verwendet. Marimastat wurde als Breitspektrum-inhibitor für alle Matrixmetalloproteasen eingesetzt. Da alle Inhibitoren in DMSO gelöst wurden, wurde DMSO ebenfalls als Kontrolle betrachtet, um *shedding* durch DMSO zu berücksichtigen (Abbildung 3.31).

Bei den Zelllinien Ba/F3 und Ba/F3-gp130 wurde wie erwartet kein sIL-6R im Zellkulturüberstand nachgewiesen (Abbildung 3.31). Bei Ba/F3-IL-6R-Zellen wurde nach 24 Stunden im Überstand eine sIL-6R Konzentration von 13 ng/ml sIL-6R gemessen (Abbildung 3.31). Das *shedding* des IL-6R wurde durch die Inhibitoren GW und Marimastat vollständig inhibiert (Abbildung 3.31). Somit ist es unwahrscheinlich, dass *shedding* ein Grund für die Proliferation und STAT3 Phosphorylierung im *Cluster-singaling* ist, da das *shedding* durch GW effektiv inhibiert wurde.

Ergebnisse

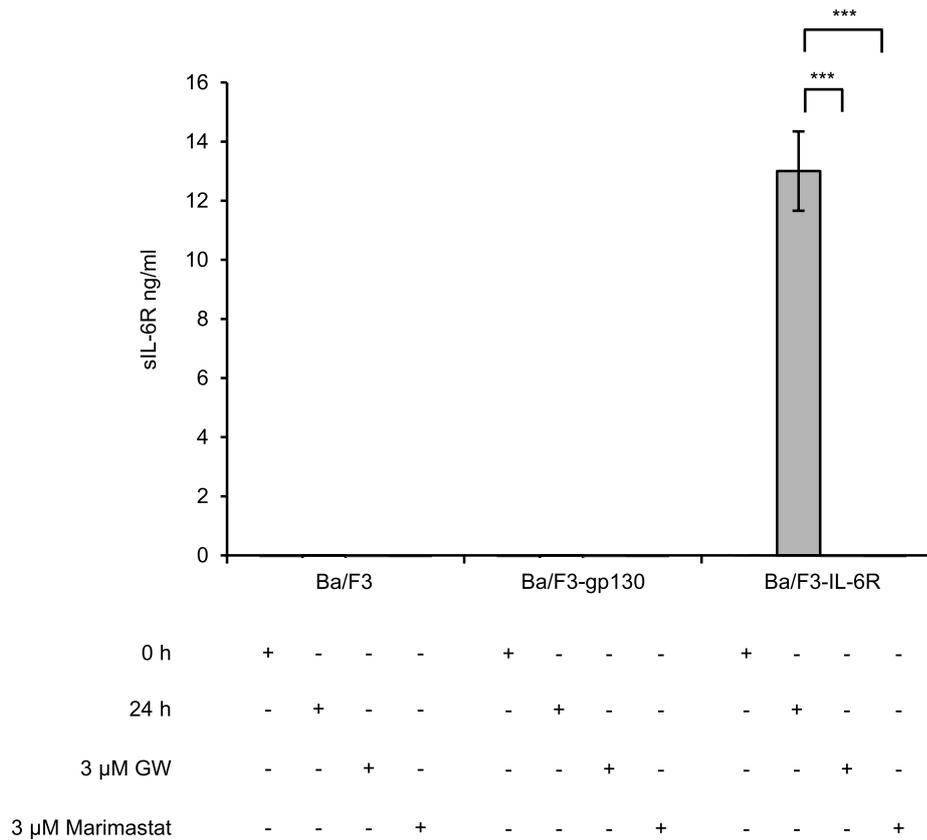


Abbildung 3.31: Quantifizierung des durch IL-6R erzeugten sIL-6R. Zellkulturüberstände von Ba/F3-, Ba/F3-gp130- und Ba/F3-IL-6R-Zellen wurden im ELISA quantifiziert. Dabei wurden die Werte 0 Stunden (0 h), für die Quantifizierung von nicht gewegewaschenen Rezeptoren, ermittelt. Konstitutives *shedding* wurde durch eine Inkubation über 24 Stunden gemessen und die Werte dafür ebenfalls quantifiziert (konst.). GW (3 μ M) und Marimastat (3 μ M) wurden für die Inhibition des *sheddings* eingesetzt (GW und Marimastat) und die Werte ebenfalls quantifiziert. DMSO wurde als Kontrolle für die Auswirkung des Lösungsmittels der Inhibitoren erhoben. In den Zellkulturüberständen von Ba/F3- und Ba/F3-gp130-Zellen wurde kein sIL-6R gemessen. Die Signifikanz wurde durch einen *Students TTest* ermittelt und wurde zwischen signifikant (*) und sehr hoch signifikant (***) eingestuft. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Experimenten (n=3).

Für die Analyse des *sheddings* wurde auch das mbHIL-6 untersucht. mbHIL-6 wurde mit der Stalkregion des IL-6R konstruiert, wodurch es zum *shedding* des mbHIL-6 kommen kann. Somit könnten die gezeigten effekte des *Cluster-signalings* auf lösliches HIL-6 zurückführbar sein. Dafür wurden Ba/F3-mbHIL-6-, Ba/F3-mbHIL-6 Δ 15-, Ba/F3-mbHIL-6 Δ 30- und Ba/F3-mbHIL-6 Δ 45-Zellen näher untersucht. Ba/F3-gp130-Zellen wurden als Kontrolle verwendet. Ba/F3-HIL-6 sezernierende Zellen wurden als Positivkontrolle verwendet. Zuerst wurde für die Zelllinien Ba/F3-gp130, Ba/F3-mbHIL-6, Ba/F3-mbHIL-6 Δ 15, Ba/F3-mbHIL-6 Δ 30, Ba/F3-mbHIL-6 Δ 45 und Ba/F3-HIL-6 das konstitutive *shedding* nach 24 Stunden untersucht (Abbildung 3.32).

Ergebnisse

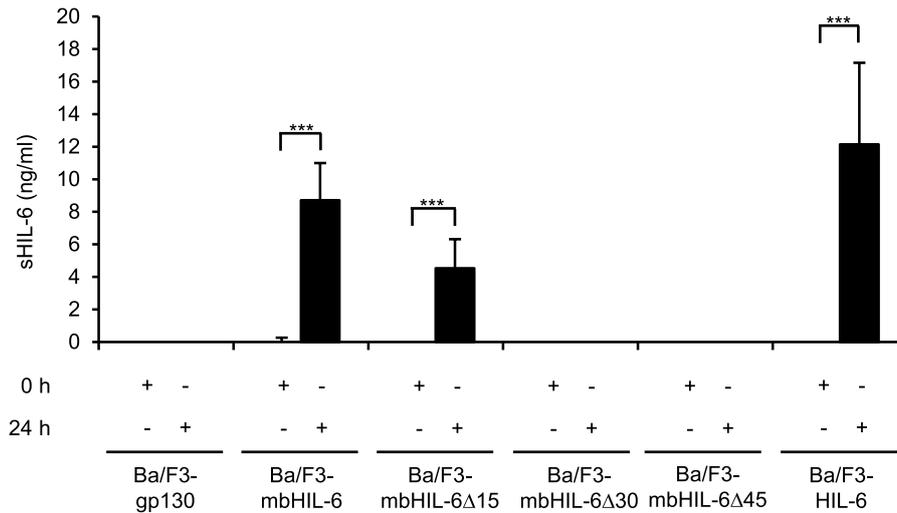


Abbildung 3.32: Quantifizierung des durch mbHIL-6 erzeugten sHIL-6. Das sHIL-6 in den Zellkulturüberständen von Ba/F3-gp130-, Ba/F3-mbHIL-6-, Ba/F3-mbHIL-6Δ15-, Ba/F3-mbHIL-6Δ30-, Ba/F3-mbHIL-6Δ45- und Ba/F3-HIL-6-Zellen wurden durch einen ELISA gemessen. Dabei wurden die Werte 0 Stunden (0 h) für die Quantifizierung von nicht gewegewaschenen Rezeptoren ermittelt. Konstitutives *shedding* wurde durch eine Inkubation über 24 Stunden gemessen und die Werte dafür ebenfalls quantifiziert (24 h) Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Experimenten (n=3).

Bei der Zelllinie Ba/F3-gp130 wurde kein sHIL-6 im Zellkulturüberstand quantifiziert (Abbildung 3.32). Bei Ba/F3-mbHIL-6-Zellen wurde nach 24 Stunden im Überstand eine Konzentration von 9 ng/ml sHIL-6 gemessen (Abbildung 3.32). Bei Ba/F3-mbHIL-6Δ15-Zellen wurde nach 24 Stunden im Überstand eine Konzentration von 5 ng/ml sHIL-6 gemessen (Abbildung 3.32). Bei Ba/F3-mbHIL-6Δ30- und Ba/F3-mbHIL-6Δ45-Zellen wurde nach 24 Stunden im Überstand kein sHIL-6 gemessen (Abbildung 3.32). Bei Ba/F3-HIL-6-Zellen wurde nach 24 Stunden im Überstand eine Konzentration von 12 ng/ml sHIL-6 gemessen (Abbildung 3.32). Bei den Hyperzytokinen und den Mutationsvarianten, bei denen die Stalkregion verkürzt wurde, wurde konstitutives *shedding* induziert. Die Inhibition mit GW und Marimastat wurde nur für Ba/F3-mbHIL-6-Zellen untersucht. Um eine Inhibition des *sheddings* zu erreichen, wurde der ADAM10/ADAM17 *shedding* Inhibitor GW (3 μM) verwendet. Marimastat (3 μM) wurde als Breitspektrum-inhibitor für alle Matrixmetalloproteasen eingesetzt. Da alle Inhibitoren in DMSO gelöst wurden, wurde DMSO ebenfalls als Kontrolle betrachtet, um *shedding* durch DMSO zu berücksichtigen (Abbildung 3.33).

Ergebnisse

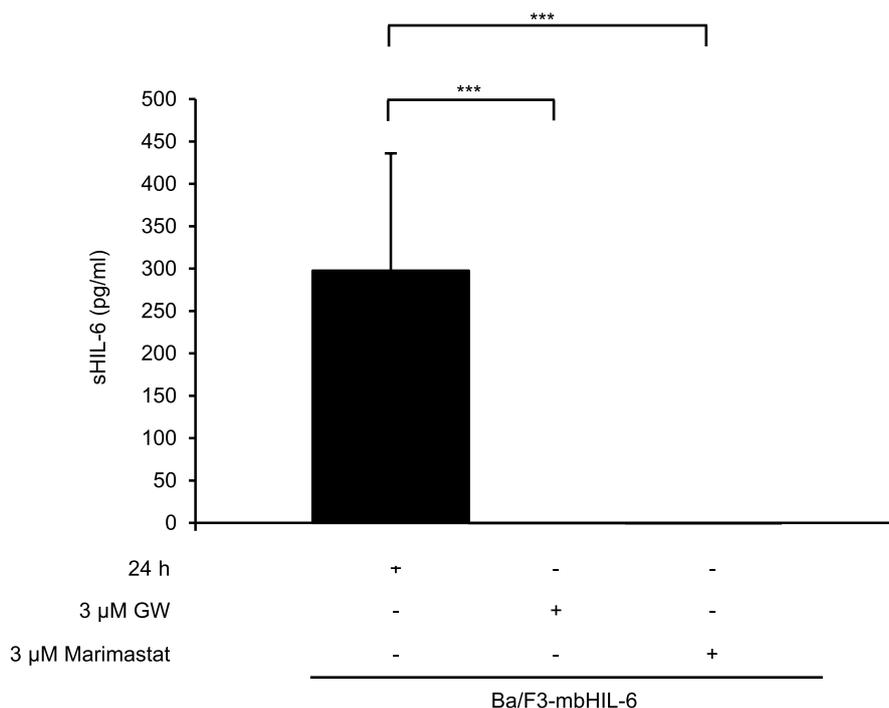


Abbildung 3.33: Quantifizierung der Inhibition durch mbHIL-6 erzeugten sHIL-6. Die Inhibition des *sheddings* von mbHIL-6 wurde durch GW (3 μM) und Marimastat (3 μM) ermittelt und die Werte ebenfalls gemessen. DMSO wurde als Kontrolle für die Auswirkung des Lösungsmittels der Inhibitoren erhoben. Die Signifikanz wurde durch einen *Students TTest* ermittelt und wurde zwischen signifikant (*) und sehr hoch signifikant (***) eingestuft. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Experimenten (n=3).

Exemplarisch wurde für mbHIL-6 gezeigt, dass *shedding* durch 3 μM GW und 3 μM Marimastat inhibiert wurde (Abbildung 3.33).

Für die Varianten mbHIL-6_{V563E} und mbHIL-6_{V563G} wurde ebenfalls das *shedding* untersucht. Es wurde der gleiche Versuchsansatz wie für mbHIL-6 verfolgt.

Ergebnisse

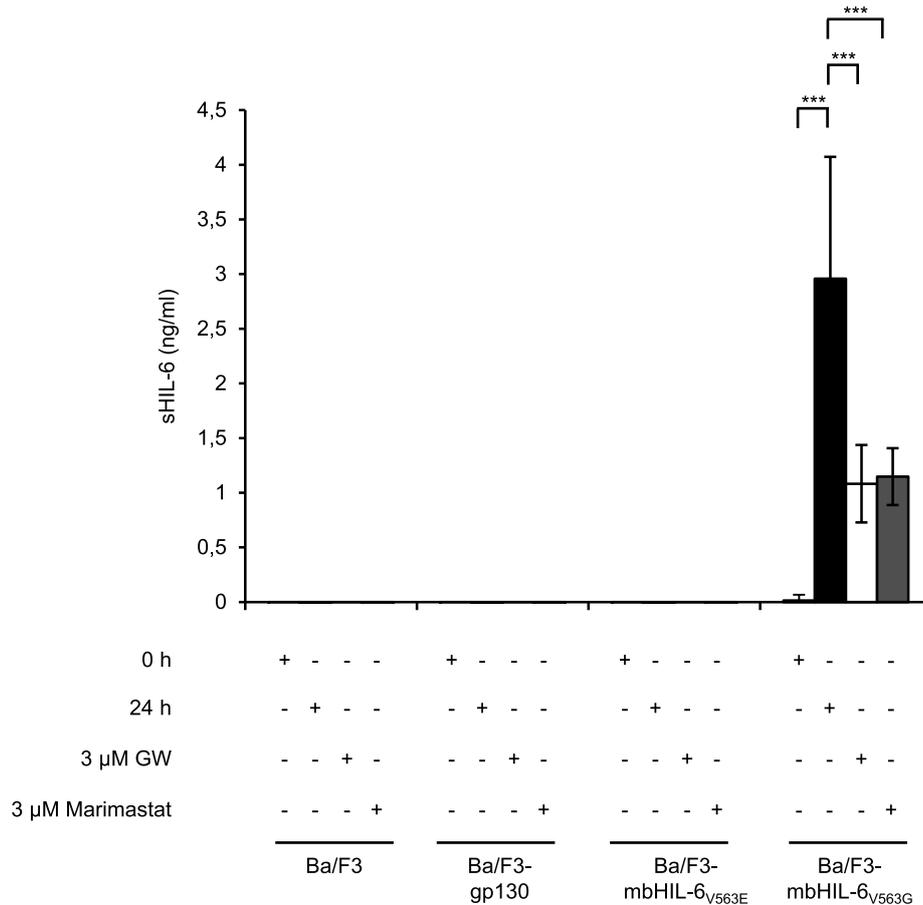


Abbildung 3.34: Quantifizierung des durch mbHIL-6_{V563E} und mbHIL-6_{V563G} erzeugten sHIL-6. SHIL-6 wurde in den Zellkulturüberständen von Ba/F3-, Ba/F3-gp130-, Ba/F3-mbHIL-6_{V563E}- und Ba/F3-mbHIL-6_{V563G}-Zellen durch einen ELISA quantifiziert. Dabei wurden die Werte 0 Stunden (0 h) für die Quantifizierung von nicht gewaschenen Rezeptoren ermittelt. Konstitutives *shedding* wurde durch eine Inkubation über 24 Stunden gemessen und die Werte dafür ebenfalls quantifiziert (24 h.). Die Inhibition des *sheddings* von mbHIL-6 wurde durch GW (3 μ M) und Marimastat (3 μ M) ermittelt und die Werte ebenfalls quantifiziert. DMSO wurde als Kontrolle für die Auswirkung des Lösungsmittels der Inhibitoren erhoben. Die Signifikanz wurde durch einen *Students TTest* ermittelt und wurde zwischen signifikant (*) und sehr hoch signifikant (***) eingestuft. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Experimenten (n=3).

Bei den Zelllinien Ba/F3, Ba/F3-gp130 und Ba/F3-mbHIL-6_{V563E} wurde kein sHIL-6 im Zellkulturüberstand quantifiziert (Abbildung 3.34). Bei Ba/F3-mbHIL-6_{V563G}-Zellen wurde nach 24 Stunden im Überstand eine sHIL-6 Konzentration von 3 ng/ml sHIL-6 gemessen. Das *shedding* von mbHIL-6_{V563E} und mbHIL-6_{V563G} wurde durch die Inhibitoren GW und Marimastat inhibiert (Abbildung 3.34).

Als letztes wurde das *shedding* von mbHIL-6 gemessen. Es wurde für die Zelllinien Ba/F3-mbHIL-6 und Ba/F3-nmbHIL-6 das konstitutive *shedding* nach 24 Stunden untersucht (Abbildung 3.35).

Es wurde ein IL-6 ELISA verwendet, da der Antikörper des IL-6R ELISAS nicht an mbHIL-6 bindet. Bei Ba/F3-mbHIL-6-Zellen wurde nach 24 Stunden im Überstand eine IL-6 Konzentration von 25 pg/ml gemessen. Bei Ba/F3-nmbHIL-6-Zellen wurde nach 24

Ergebnisse

Stunden im Überstand eine IL-6 Konzentration von ca. 22 pg/ml gemessen (Abbildung 3.35).

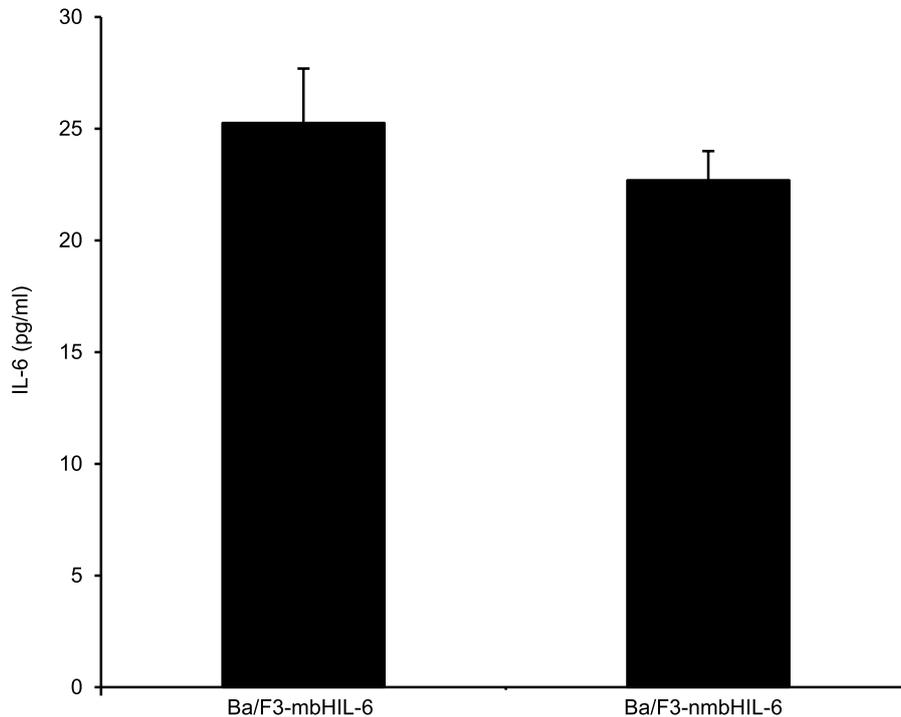


Abbildung 3.35: Quantifizierung des durch mbHIL-6 und nmbHIL-6 erzeugten sHIL-6/snHIL-6. SHIL-6 und snHIL-6 in Zellkulturüberständen von Ba/F3-mbHIL-6- und Ba/F3-nmbHIL-6-Zellen wurden durch einen ELISA quantifiziert. Konstitutives *shedding* wurde durch eine Inkubation über 24 Stunden gemessen und die Werte dafür quantifiziert (24 h). Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis aus zwei unabhängigen Experimenten (n=2).

In diesem Abschnitt wurde der sIL-6R/IL-6 Gehalt in den Zellkulturüberständen der Zelllinien Ba/F3, Ba/F3-gp130, Ba/F3-hIL-6R, Ba/F3-mbHIL-6, Ba/F3-mbHIL-6 Δ 15, Ba/F3-mbHIL-6 Δ 30, Ba/F3-mbHIL-6 Δ 45, Ba/F3-HIL-6, Ba/F3-mbHIL-6_{V563E}, Ba/F3-mbHIL-6_{V563G} und Ba/F3-nmbHIL-6 gemessen. Dabei wurde gezeigt, dass *shedding* über ADAM-Proteasen induziert wird. Für die Inhibitoren GW und Marimastat wurde exemplarisch gezeigt, dass diese das *shedding* inhibieren. *Shedding* wurde für mbHIL-6, mbHIL-6-Mutationsvarianten und nmbHIL-6 gezeigt, allerdings ist dieses durch GW inhibierbar. Somit ist das *Cluster-signaling* durch Zell-Zell-Kontakt und nicht durch Proteine im Zellkulturüberstand (*Trans-signaling*) aktiviert worden.

3.2.5 Die proteolytisch gespaltenen Hyperzytokine sind biologisch aktiv

Da für die Hyperzytokine und den IL-6R eine *shedding* Aktivität gezeigt wurde, wurde auch überprüft, ob die löslichen Hyperzytokine biologisch aktiv sind. Dies ist vor allem

Ergebnisse

wichtig, um die Frage zu klären, ob lösliche Proteine oder Zell-Zell-Kontakt für die Proliferation und STAT3 Phosphorylierung von Ba/F3-gp130-Zellen verantwortlich sind. Die durch proteolytische Spaltung generierten Proteine im Zellkulturüberstand wurden durch einen IL-6R-ELISA quantifiziert. Um zu testen, ob diese Proteine biologisch aktiv sind, wurden Ba/F3-gp130-Zellen mit den Zellkulturüberständen stimuliert. Dafür wurden 10% des Zellkulturüberstandes im Gesamtmedium eingesetzt. Als Kontrolle wurden Ba/F3-gp130-Zellen mit 10% HIL-6 Zellkulturüberständen, im Bezug zu dem Gesamtmedium, aus CHO-K1 Zellen kultiviert. Der Zellkulturüberstand von Ba/F3-HIL-6-Zellen wurde ebenfalls als Kontrolle verwendet (Abbildung 3.36).

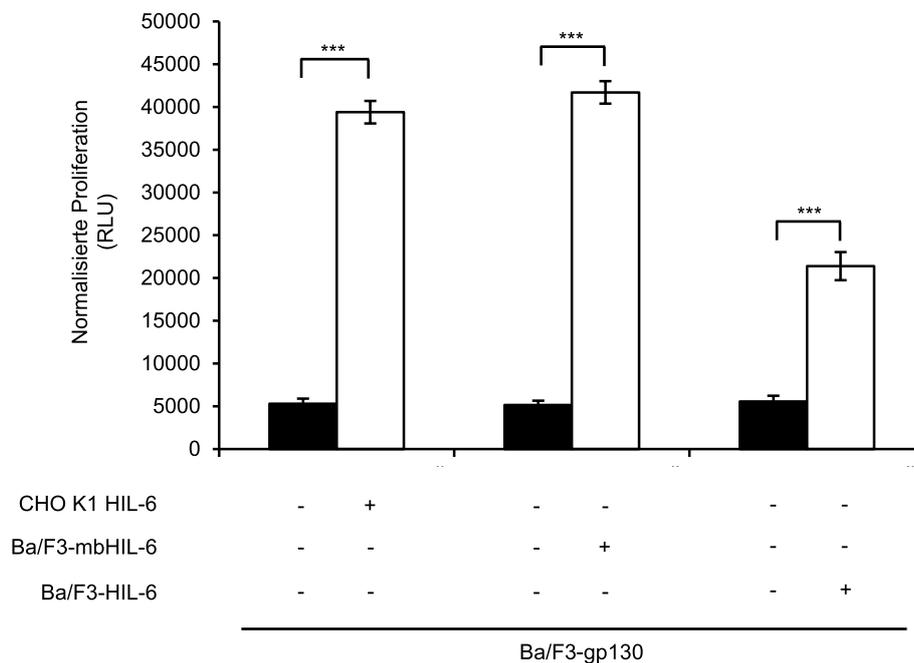


Abbildung 3.36: Die Proliferation von Ba/F3-gp130-Zellen erfolgt durch biologisch aktives Protein im Zellkulturüberstand. Ba/F3-gp130-Zellen wurden mit verschiedenen Zellkulturüberständen im Proliferationsassay gemessen. Dafür wurden 10% von bereits getestetem HIL-6 Überstand aus CHO-K1 Zellen verwendet (Balkenpaar 1, weiß). 10% von dem Zellekulturüberstand von Ba/F3-mbHIL-6-Zellen wurde verwendet (Balkenpaar 2, weiß). 10% von dem Zellekulturüberstand von Ba/F3-HIL-6-Zellen wurde verwendet (Balkenpaar 3, weiß). Als Kontrolle für zytokinunabhängige Proliferation von Ba/F3-gp130-Zellen wurden diese ohne Zytokinzugabe kultiviert (Balkenpaare 1-3, schwarz). Die Signifikanz wurde durch einen *Students TTest* ermittelt und wurde zwischen signifikant (*) und sehr hoch signifikant (***) ermittelt. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis aus zwei unabhängigen Experimenten (n=2).

Für alle Zellkulturüberstände wurde die Proliferation von Ba/F3-gp130-Zellen ohne Proteinzugabe gemessen, um eine Proliferation durch das Medium auszuschließen (Abbildung 3.36 schwarze Balken). Ebenso, dass Ba/F3-gp130-Zellen eine Zytokinunabhängige Proliferation zeigen (Abbildung 3.36, Balkenpaare 1-3, schwarz).

Es wurde eine Proliferation von Ba/F3-gp130-Zellen mit den HIL-6 Zellkulturüberständen von CHO-K1 Zellen gemessen. Die Proliferation lag bei ca. 40000 RLU (Abbildung 3.36,

Ergebnisse

Balkenpaar 1, weiß). Die Proteine im Zellkulturüberstand von Ba/F3-mbHIL-6-Zellen wurden als biologisch aktiv getestet, sie zeigen eine Proliferation von ca. 42000 RLU (Abbildung 3.36, Balkenpaar 2, weiß). Mit dem Zellkulturüberstand von Ba/F3-HIL-6 Zellen wurde die geringste Proliferation gemessen (ca. 20000 RLU), auch hier wurde das Protein im Überstand als biologisch aktiv getestet (Abbildung 3.36, Balkenpaar 3, weiß).

Für die Vergleichbarkeit zwischen mbHIL-6 und nmbHIL-6 wurde untersucht, ob die proteolytisch gespaltenen Proteine auch biologisch aktiv sind. Dafür wurden Ba/F3-gp130-Zellen mit den Zellkulturüberständen von Ba/F3-mbHIL-6- und Ba/F3-nmbHIL-6-Zellen kultiviert. Es wurden 10% der Überstände im Proliferationsassay eingesetzt (Abbildung 3.37).

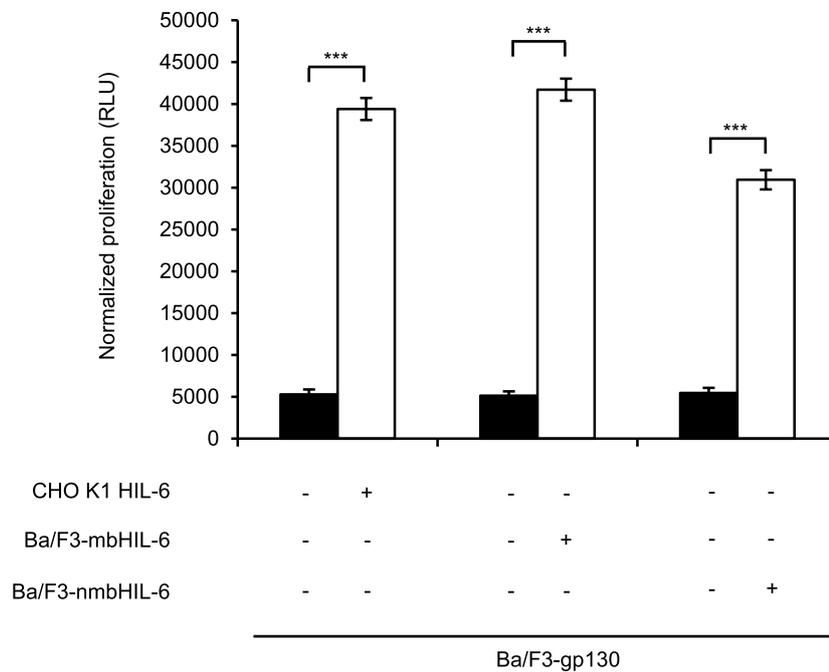


Abbildung 3.37: Proliferationsassay von Ba/F3-gp130-Zellen mit den konditionierten Zellkulturüberständen von Ba/F3-mbHIL-6- und Ba/F3-nmbHIL-6-Zellen. 5×10^3 Ba/F3-gp130-Zellen wurden mit den Zellkulturüberständen von CHO-K1 HIL-6-, Ba/F3-mbHIL-6- und Ba/F3-nmbHIL-6-Zellen für 72 Stunden kultiviert. Als Kontrolle wurde 10 % der Zellkulturüberstand von CHO-K1 Zellen eingesetzt. Um eine zytokinunabhängige Proliferation auszuschließen, wurden Ba/F3-gp130-Zellen ohne Zugabe von Zytokin kultiviert. Die Signifikanz wurde durch einen *Students-TTest* ermittelt und wurde zwischen signifikant (*) und sehr hoch signifikant (***) eingestuft. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis aus zwei unabhängigen Experimenten (n=2).

Ba/F3-gp130-Zellen wurden zur Kontrolle ohne Zytokin kultiviert. Dadurch wurde eine zytokinunabhängige Proliferation der Zellen ausgeschlossen. Ohne Zytokinzugabe zeigten die Zellen keine Proliferation. Mit den quantifizierten Zellkulturüberständen von CHO-K1 Zellen wurde eine Proliferation von ca. 40000 RLU gemessen (Abbildung 3.37). Durch die Zellkulturüberstände von Ba/F3-mbHIL-6-Zellen wurde eine Proliferation von ca. 40000

RLU gemessen. Durch die Zellkulturüberstände von Ba/F3-mbHIL-6-Zellen wurde eine Proliferation von ca. 35000 RLU gemessen (Abbildung 3.37).

Die gesheddeten Hyperzytokine in den Zellkulturüberständen sind somit biologisch aktiv.

3.2.6 Lösliche Hyperzytokine sind nicht an den beobachteten *Cluster-signaling*-Effekten beteiligt

Zur weiteren Untersuchung der Frage ob Zell-Zell-Kontakt oder lösliche Rezeptoren für die beobachteten Effekte im *Cluster-signaling* verantwortlich sind, wurden die Zellkulturüberstände aus dem *Cluster-signaling* für eine Stimulation von Ba/F3-gp130-Zellen verwendet. Wie bereits gezeigt, wurden biologisch aktive, lösliche Hyperzytokine durch *shedding* generiert und aktivieren die Proliferation von Ba/F3-gp130-Zellen. Die Zellkulturüberstände vom *Cluster-signaling* sind direkte Kontrollen, bei denen bei einer STAT3 Phosphorylierung der Ba/F3-gp130-Zellen eine klare Antwort auf die Frage, ob Zell-Zell-Kontakt oder lösliche Rezeptoren die Proliferation und STAT3 Phosphorylierung auslösen, gegeben werden kann.

Die Zellkulturüberstände enthalten zu wenig Hyperzytokin um Ba/F3-gp130-Zellen zu stimulieren (Abbildung 3.38). Entsprechend konnte kein pSTAT3 detektiert werden. Die offene Frage wurde insoweit geklärt, dass davon ausgegangen werden kann, dass *Cluster-signaling* durch Zell-Zell-Kontakt induziert wird, da in den Zellkulturüberständen nicht ausreichende Mengen von löslichen Hyperzytokinen für eine Aktivierung von Ba/F3-gp130-Zellen vorhanden sind.

Ergebnisse

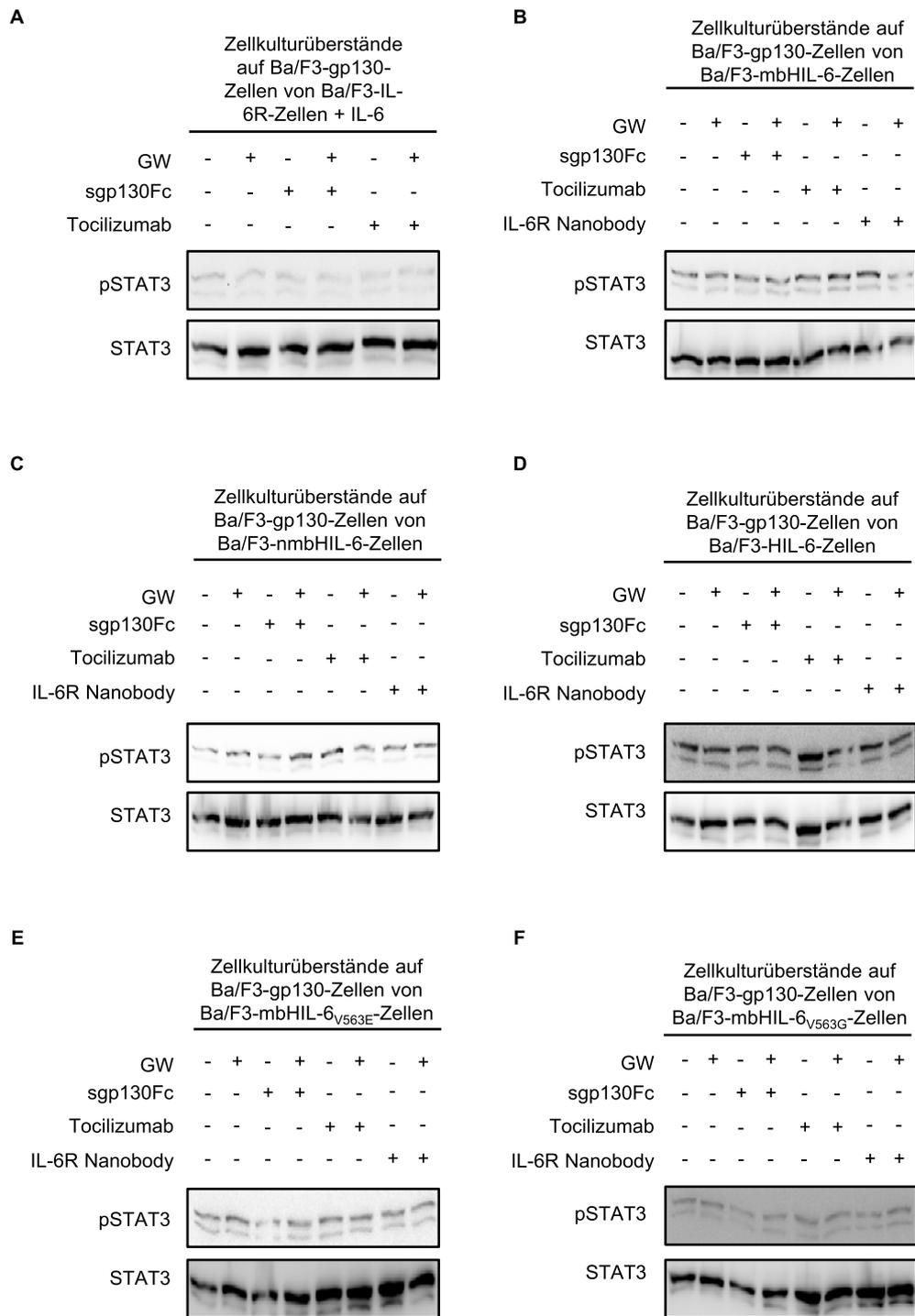


Abbildung 3.38: Gesheddete Hyperzytokine aus Zellkulturüberständen des *Cluster-signaling* auf Ba/F3-gp130-Zellen. (A-F) Ba/F3-gp130-Zellen wurden für 30 Minuten mit den Zellkulturüberständen aus dem *Cluster-signaling* stimuliert. Es wird für die Stimulation von Ba/F3-gp130-Zellen 10% des *Cluster-signaling* Zellkulturüberstandes im Bezug zum Gesamtmedium eingesetzt. Die Stimulation von Ba/F3-gp130-Zellen mit den Zellkulturüberständen des *Cluster-signaling*s von Ba/F3-gp130-Zellen mit Ba/F3-IL-6R-Zellen + IL-6 (A), von Ba/F3-gp130-Zellen mit Ba/F3-mbHIL-6-Zellen (B), von Ba/F3-gp130-Zellen mit Ba/F3-nmbHIL-6-Zellen (C), von Ba/F3-gp130-Zellen mit Ba/F3-HIL-6-Zellen (D), von Ba/F3-gp130-Zellen mit Ba/F3-mbHIL-6_{V563E}-Zellen (E) und von Ba/F3-gp130-Zellen mit Ba/F3-mbHIL-6_{V563G}-Zellen (F) wurde durchgeführt. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis aus mindestens zwei unabhängigen Experimenten (n=2).

3.2.7 Membrangebundenes HIL-11-induziertes *Cluster-signaling* wird durch sgp130Fc gehemmt

Nun wurde die Frage gestellt, ob sgp130Fc das IL-11 *Cluster-signaling* inhibieren kann. Interleukin-11 und Interleukin-6 stammen beide aus der Interleukin-6 Familie, wodurch die gleichen Ergebnisse erwartet werden können. Die gleichen experimentellen Ansätze wurden dafür in diesem Abschnitt wie für Interleukin-6 verfolgt. Für den experimentellen Nachweis des *Cluster-signaling*s durch IL-11:IL-11R Komplexe wurde zuerst die Methode des Proliferationsassays durchgeführt. Als Kontrolle wurden die verwendeten Zelllinien Ba/F3- Ba/F3-IL-11R, Ba/F3-mbHIL-11 und Ba/F3-mbHIL-11_{R355E} einzeln kultiviert. Dabei wurde die Proliferation dieser Zellen einmal ohne Zugabe von Zytokin, einmal mit Zugabe von 10 ng/ml HIL-6 und einmal mit Zugabe von IL-3 gemessen (Abbildung 3.39). Außerdem wurden Ba/F3-IL-11R-Zellen mit 10 ng/ml IL-11 stimuliert. Ba/F3-IL-11R-, Ba/F3-mbHIL-11-, und Ba/F3-mbHIL-11_{R355E}-Zellen proliferierten nicht nach der Zugabe von 10 ng/ml HIL-6 oder 10 ng/ml IL-11. Eine Proliferation dieser Zellen erfolgt nur in Gegenwart von IL-3 (siehe Abbildung 3.39).

Für das *Cluster-signaling* wurden Ba/F3-gp130- und Ba/F3-IL-11R-Zellen in Gegenwart von IL-11 kokultiviert. Es erfolgte zudem eine Zugabe von IL-3, um die Apoptose von Ba/F3-IL-11R-Zellen zu verhindern. Die Proliferation von Ba/F3-IL-11R durch Zugabe von IL-3 war geringer, als die durch *Cluster-signaling* induzierte Proliferation der kokultivierten Zellen.

Sgp130Fc wurde als Inhibitor untersucht, weswegen es in einem weiteren Ansatz zu dem *Cluster-signaling* hinzugegeben wurde. Die Proliferation wurde durch die Zugabe von 10 µg/ml sgp130Fc inhibiert und zwar auf das Level der IL-3 induzierten Proliferation der Ba/F3-IL-11R-Zellen. Damit hemmt sgp130Fc das IL-11 induzierte *Cluster-signaling* von Ba/F3-gp130- mit Ba/F3-IL-11R-Zellen (Abbildung 3.39). Für das *Cluster-signaling* wurden Ba/F3-gp130- und Ba/F3-mbHIL-11-Zellen kokultiviert. Es erfolgte zudem eine Zugabe von IL-3, um die Apoptose von Ba/F3-mbHIL-11-Zellen zu verhindern. Die Proliferation von Ba/F3-mbHIL-11-Zellen durch Zugabe von IL-3 war geringer, als die durch *Cluster-signaling* induzierte Proliferation der kokultivierten Zellen. Sgp130Fc wurde als Inhibitor untersucht, weswegen es in einem weiteren Ansatz zu dem *Cluster-signaling* hinzugegeben wurde. Die Proliferation wurde durch die Zugabe von 10 µg/ml sgp130Fc inhibiert und zwar auf das Level der IL-3 induzierten Proliferation der Ba/F3-mbHIL-11-Zellen. Damit hemmt sgp130Fc das *Cluster-signaling* von Ba/F3-gp130- durch Ba/F3-

Ergebnisse

mbHIL-11-Zellen (Abbildung 3.39). Der gleiche experimentelle Ansatz wurde für Ba/F3-mbHIL-11_{R355E}-Zellen verfolgt (Abbildung 3.39). Für das *Cluster-signaling* wurden Ba/F3-gp130- und Ba/F3-mbHIL-11_{R355E}-Zellen kokultiviert. Es erfolgte zudem eine Zugabe von IL-3, um die Apoptose von Ba/F3-mbHIL-11_{R355E}-Zellen zu verhindern. Die Proliferation von Ba/F3-mbHIL-11_{R355E}-Zellen durch Zugabe von IL-3 war geringer, als die durch *Cluster-signaling* induzierte Proliferation der kokultivierten Zellen.

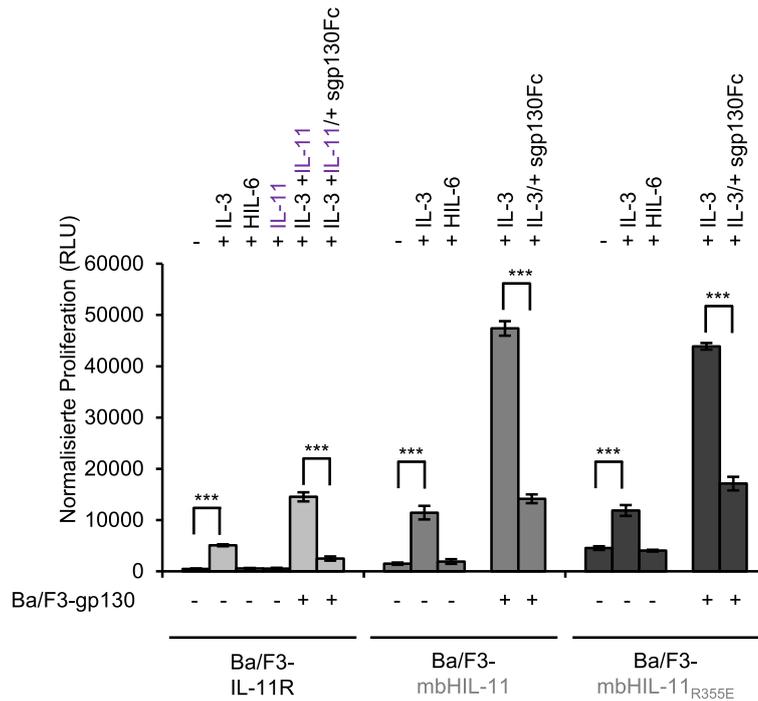


Abbildung 3.39: Inhibition der *Cluster-signaling* induzierten Proliferation von Ba/F3-gp130-Zellen durch Ba/F3-IL-11R-Zellen mit IL-11 oder Ba/F3-mbHIL-11-Zellen oder Ba/F3-mbHIL-11_{R355E}-Zellen. Durch Zytokinzugabe wurde die Zellviabilität (Proliferation) getestet (hellgrau für Ba/F3-IL-11R-Zellen, mittelgrau für Ba/F3-mbHIL-11-Zellen und dunkelgrau für Ba/F3-mbHIL-11_{R355E}-Zellen). Es wurde kein Zytokin, IL-3, 10 ng/ml IL-11 oder 10 ng/ml HIL-6 zu Ba/F3-IL-11R-, Ba/F3-mbHIL-11- oder Ba/F3-mbHIL-11_{R355E}-Zellen hinzugegeben. Bei Kokultivierung von Ba/F3-gp130- mit Ba/F3-IL-11R-Zellen (hellgrau) wurde in allen Ansätzen IL-3 und 10 ng/ml IL-11 hinzugegeben. Eine Zugabe von 10 µg/ml sgp130Fc bei der Kokultivierung von Ba/F3-gp130- und Ba/F3-IL-11R-Zellen wurde ebenfalls durchgeführt (hellgrau, sechster Balken). Bei Kokultivierung von Ba/F3-gp130- mit Ba/F3-mbHIL-11-Zellen (mittelgrau) wurde in allen Ansätzen IL-3 hinzugegeben. Eine Zugabe von 10 µg/ml sgp130Fc bei der Kokultivierung von Ba/F3-gp130- und Ba/F3-mbHIL-11-Zellen ebenfalls durchgeführt (mittelgrau, fünfter Balken). Bei Kokultivierung von Ba/F3-gp130- mit Ba/F3-mbHIL-11_{R355E}-Zellen (dunkelgrau) wurde in allen Ansätzen IL-3 hinzugegeben. Eine Zugabe von 10 µg/ml sgp130Fc bei der Kokultivierung von Ba/F3-gp130- und Ba/F3-mbHIL-11_{R355E}-Zellen ebenfalls durchgeführt (dunkelgrau, fünfter Balken). Die Signifikanz wurde durch einen *Students TTest* ermittelt und wurde zwischen signifikant (*) und sehr hoch signifikant (***) eingestuft. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Experimenten (n=3).

Sgp130Fc wurde als Inhibitor untersucht, weswegen es in einem weiteren Ansatz zu dem *Cluster-signaling* hinzugegeben wurde. Die Proliferation wurde durch die Zugabe von 10 µg/ml sgp130Fc inhibiert und zwar auf das Level der IL-3 induzierten Proliferation der

Ergebnisse

Ba/F3-mbHIL-11_{R355E}-Zellen. Damit hemmt sgp130Fc das *Cluster-signaling* von Ba/F3-gp130- durch Ba/F3-mbHIL-11_{R355E}-Zellen (Abbildung 3.39).

Im weiteren Verlauf wurde das *Cluster-signaling* über die Methode der Stimulation nachgewiesen. Bei dem *Cluster-signaling* der Zelllinien Ba/F3-gp130 mit Ba/F3-IL-11R, Ba/F3-gp130 mit Ba/F3-mbHIL-11 oder Ba/F3-gp130 mit Ba/F3-mbHIL-11_{R355E} wurde ebenfalls die Phosphorylierung des STAT3 Proteins (Ergebnisse 3.1) untersucht.

Als Kontrolle für diese Methode wurden Ba/F3-gp130- und Ba/F3-IL-11R-Zellen einzeln stimuliert. Es wurden 5×10^5 Ba/F3-gp130-Zellen als Empfänger-Zellen und 5×10^5 Ba/F3-IL-11R-Zellen als Transmitter-Zellen verwendet.

Eine Phosphorylierung von STAT3 (pSTAT3) bei Ba/F3-gp130-Zellen wurde nur nach Stimulation mit 10 ng/ml HIL-6 detektiert (Abbildung 3.40 A). Nach der Stimulation mit 10 ng/ml HIL-6, 10 ng/ml IL-11 und IL-3, wurde bei Ba/F3-IL-11R-Zellen kein pSTAT3 Signal detektiert (Abbildung 3.40 A). Die im weiteren Experiment detektierten Banden wurden somit durch *Cluster-signaling* induziert. STAT3 diente in allen Experimenten als Ladekontrolle, um nachzuweisen, dass die gleiche Menge an Protein aufgetragen wurde (Abbildung 3.40 A-C).

Es wurden 10 ng/ml IL-11 und IL-3 zu den Ba/F3-IL-11R-Zellen hinzugegeben. Bei Ba/F3-gp130- und Ba/F3-IL-11R-Zellen wurde durch IL-3 keine STAT3 Phosphorylierung induziert. Zudem wurde dieses Experiment mit dem *shedding* Inhibitor GW durchgeführt. Ba/F3-gp130- und Ba/F3-IL-11R-Zellen wurden, nach der Inkubationszeit des Inhibitors sgp130Fc, für 30 Minuten kokultiviert. (Abbildung 3.40 B). Zudem wurde jeweils eine Probe mit 3 μ M GW oder ohne GW Zugabe stimuliert.

Die STAT3 Phosphorylierung wurde bei der Zugabe von 3 μ M GW nicht stärker oder schwächer detektiert, als ohne Zugabe von GW. Es wurde eine komplette Inhibition der STAT3 Phosphorylierung durch sgp130Fc während des *Cluster-signalings* mit 10 μ g/ml sgp130Fc detektiert. Das Experiment wurde analog für die Zelllinien Ba/F3-mbHIL-11 und Ba/F3-mbHIL-11_{R355E} genauso durchgeführt. (Abbildung 3.40 B).

Als Kontrolle für diese Methode wurden Ba/F3-gp130- und Ba/F3-mbHIL-11-Zellen einzeln stimuliert. Es wurden 5×10^5 Ba/F3-gp130-Zellen als Empfänger-Zellen und 5×10^5 Ba/F3-mbHIL-11-Zellen als Transmitter-Zellen verwendet.

Eine Phosphorylierung von STAT3 (pSTAT3) bei Ba/F3-gp130-Zellen wurde nur nach Stimulation mit 10 ng/ml HIL-6 detektiert (Abbildung 3.40 A). Nach der Stimulation mit 10 ng/ml HIL-6, 10 ng/ml IL-11 und IL-3, wurde bei Ba/F3-mbHIL-11-Zellen kein pSTAT3 Signal detektiert (Abbildung 3.40 A). Das im weiteren Experiment beobachteten

Ergebnisse

pSTAT3 Signal wurden somit durch *Cluster-signaling* induziert. STAT3 diente in allen Experimenten als Ladekontrolle, um nachzuweisen, dass die gleiche Menge an Protein aufgetragen wurde (Abbildung 3.40 A-C).

Es wurden 10 ng/ml IL-11 und IL-3 zu den Ba/F3-mbHIL-11-Zellen hinzugegeben. Bei Ba/F3-gp130- und Ba/F3-mbHIL-11-Zellen wurde durch IL-3 keine STAT3 Phosphorylierung induziert. Zudem wurde dieses Experiment mit dem *shedding* Inhibitor GW durchgeführt. Ba/F3-gp130- und Ba/F3-mbHIL-11-Zellen wurden, nach der Inkubationszeit des Inhibitors sgp130Fc, für 30 Minuten kokultiviert. (Abbildung 3.40 B). Zudem wurde jeweils eine Probe mit 3 μ M GW oder ohne GW Zugabe stimuliert.

Die STAT3 Phosphorylierung wurde bei der Zugabe von 3 μ M GW nicht stärker oder schwächer detektiert, als ohne Zugabe von GW. Es wurde eine komplette Inhibition der STAT3 Phosphorylierung durch sgp130Fc während des *Cluster-signalings* mit 10 μ g/ml sgp130Fc detektiert.

Ba/F3-gp130- und Ba/F3-mbHIL-11_{R355E}-Zellen wurden einzeln stimuliert. Es wurden 5×10^5 Ba/F3-gp130-Zellen als Empfänger-Zellen und 5×10^5 Ba/F3-mbHIL-11-Zellen als Transmitter-Zellen verwendet.

Eine Phosphorylierung von STAT3 (pSTAT3) bei Ba/F3-gp130-Zellen wurde nur nach Stimulation mit 10 ng/ml HIL-6 detektiert (Abbildung 3.40 A). Nach der Stimulation mit 10 ng/ml HIL-6, 10 ng/ml IL-11 und IL-3, wurde bei Ba/F3-mbHIL-11_{R355E}-Zellen kein pSTAT3 Signal detektiert (Abbildung 3.41 A). Die im weiteren Experiment detektierte pSTAT3 Signale wurden somit durch *Cluster-signaling* induziert. STAT3 diente in allen Experimenten als Ladekontrolle, um nachzuweisen, dass die gleiche Menge an Protein aufgetragen wurde (Abbildung 3.40 A-C).

Es wurden 10 ng/ml IL-11 und IL-3 zu den Ba/F3-mbHIL-11_{R355E}-Zellen hinzugegeben. Bei Ba/F3-gp130- und Ba/F3-mbHIL-11_{R355E}-Zellen wurde durch IL-3 keine STAT3 Phosphorylierung induziert. Zudem wurde dieses Experiment mit dem *shedding* Inhibitor GW durchgeführt. Ba/F3-gp130- und Ba/F3-mbHIL-11_{R355E}-Zellen wurden, nach der Inkubationszeit des Inhibitors sgp130Fc, für 30 Minuten kokultiviert. (Abbildung 3.40 B). Zudem wurde jeweils eine Probe mit 3 μ M GW oder ohne GW Zugabe stimuliert.

Die STAT3 Phosphorylierung wurde bei der Zugabe von 3 μ M GW nicht stärker oder schwächer detektiert, als ohne Zugabe von GW. Es wurde eine komplette Inhibition der STAT3 Phosphorylierung durch sgp130Fc während des *Cluster-signalings* mit 10 μ g/ml sgp130Fc detektiert.

Ergebnisse

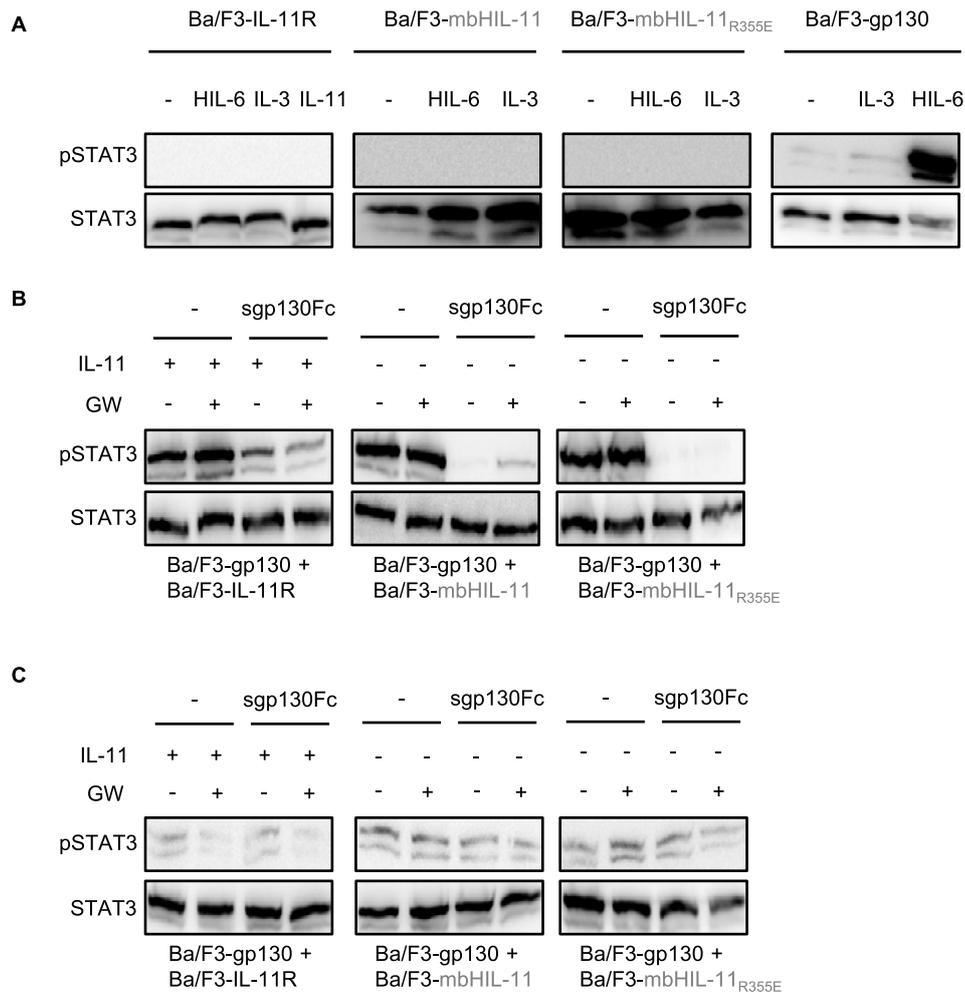


Abbildung 3.40: Inhibition der durch Cluster-signaling-induzierten STAT3 Phosphorylierung von Ba/F3-gp130- und Ba/F3-IL-11R-Zellen mit IL-11 oder Ba/F3-gp130- und Ba/F3-mbHIL-11/Ba/F3-mbHIL-11R355E-Zellen. (A) Zuerst wurden 5×10^5 Ba/F3-gp130-Zellen, 5×10^5 Ba/F3-IL-11R-Zellen, 5×10^5 Ba/F3-mbHIL-11-Zellen und 5×10^5 Ba/F3-mbHIL-11_{R355E}-Zellen einzeln, ohne Zugabe von Zytokin, kultiviert. Die Zelllinien wurden außerdem mit IL-3, 10 ng/ml IL-11 oder mit 10 ng/ml HIL-6 für 30 Minuten stimuliert. Als Nachweis wurde das Protein pSTAT3 gewählt, wobei STAT3 als Ladekontrolle untersucht wurde. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Experimenten (n=3). (B) 5×10^5 Ba/F3-gp130- und Ba/F3-IL-11R-Zellen wurden kokultiviert. Ba/F3-IL-11R-Zellen mit 10 ng/ml IL-11 wurden mit und ohne Zugabe von 3 μ M GW kultiviert. Außerdem wurden 10 μ g/ml sgp130Fc (sgp130Fc) hinzugegeben. Vor der Kokultivierung wurden die mit GW behandelten Zellen gewaschen und die Inhibitoren erneut hinzugegeben. Zur Analyse wurde der Antikörper pSTAT3 verwendet, wobei STAT3 als Ladekontrolle verwendet wurde. Das gleiche Experiment wurde analog für die Zelllinien Ba/F3-mbHIL-11 und Ba/F3-mbHIL-11_{R355E} durchgeführt. Dafür wurden 5×10^5 Ba/F3-gp130- und Ba/F3-mbHIL-11-Zellen/Ba/F3-mbHIL-11_{R355E}-Zellen kokultiviert. Ba/F3-mbHIL-11-Zellen/Ba/F3-mbHIL-11_{R355E}-Zellen wurden mit und ohne Zugabe von 3 μ M GW kultiviert. Außerdem wurden 10 μ g/ml sgp130Fc (sgp130Fc) hinzugegeben. Vor der Kokultivierung wurden die mit GW behandelten Zellen gewaschen und die Inhibitoren erneut hinzugegeben. Ba/F3-gp130- und Ba/F3-mbHIL-11-Zellen/Ba/F3-mbHIL-11_{R355E}-Zellen wurden für 30 Minuten kokultiviert. Zur Analyse wurde der Antikörper pSTAT3 verwendet, wobei STAT3 als Ladekontrolle verwendet wurde. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Experimenten (n=3). (C) Dargestellt ist die Stimulation von Ba/F3-gp130-Zellen mit den Zellkulturüberständen von dem Cluster-signaling von Ba/F3-IL-11R-Zellen, oder Ba/F3-mbHIL-11-Zellen oder Ba/F3-mbHIL-11_{R355E}-Zellen. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Experimenten (n=3).

Analog zu den Experimenten mit Ba/F3-IL-6R-Zellen und von Ba/F3-mbHIL-6-Zellen wurde durch Stimulation von Ba/F3-gp130-Zellen mit den Zellkulturüberständen des IL-11

Ergebnisse

Cluster-signaling untersucht, ob proteolytisch gespaltene Hyperzytokine *Cluster-signaling* induzieren (Abbildung 3.40 C). Hierbei wurde keine Phosphorylierung des STAT3 Proteins durch sHIL-11 Zellkulturüberstände detektiert. In diesem Abschnitt wurde gezeigt, dass IL-11 *Cluster-signaling* durch sgp130Fc inhibiert wird. Zudem wurde gezeigt, dass in den Zellkulturüberständen nicht ausreichend lösliches Hyperzytokin oder IL-11:sIL-11R-Komplexe vorhanden waren, um das *Cluster-signaling* auszulösen.

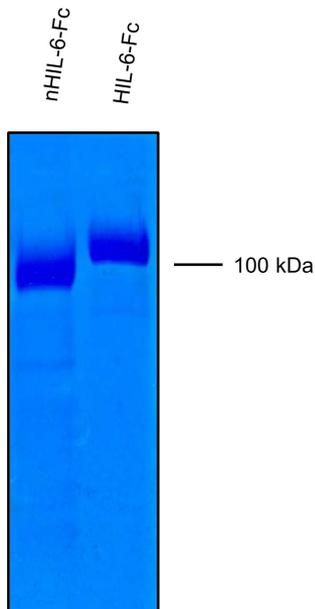


Abbildung 3.41: Coomassie-Färbung von gereinigtem nHIL-6-Fc. Für die Coomassie-Färbung wurden 5 μg nHIL-6-Fc (links) und 5 μg HIL-6-Fc (rechts) per SDS-PAGE analysiert

3.3 Rekombinantes nHIL-6-Fc stimuliert Zellen weniger stark, als rekombinantes HIL-6-Fc

Im Proliferationsassay von Ba/F3-gp130-Zellen mit den konditionierten Zellkulturüberständen von Ba/F3-mbHIL-6- und Ba/F3-nmbHIL-6-Zellen wurde gezeigt, dass snHIL-6 keine gleich starke Proliferation wie sHIL-6 induzierte (Abbildung 3.37). Daraus erfolgte die Fragestellung, ob nHIL-6 eine generelle geringere Aktivität wie HIL-6 besitzt. Es wurde rekombinantes nHIL-6-Fc hergestellt und mit HIL-6-Fc experimentell verglichen. Dafür wurden CHO-K1 Zellen stabil mit nHIL-6-Fc transfiziert und Einzelklone über eine Neomycinantibiotikaresistenz selektiert. Die Zellen wurden kultiviert und von einem Klon die Zellkulturüberstände über mehrere Wochen gesammelt. Aus diesen Zellkulturüberständen wurde das nHIL-6-Fc über Protein-A Affinitätschromatographie gereinigt. Vor der Verwendung von nHIL-6-Fc wurde die Reinheit des Proteins über eine SDS-PAGE mit anschließender Coomassie-Färbung analysiert (Abbildung 3.41). Dabei wurde 5 μg rekombinantes Protein aufgetragen und 5 μg HIL-6-Fc als Vergleich (Abbildung 3.41).

Ergebnisse

Es wurden keine unspezifischen Banden angefärbt, weshalb die Hyperzytokine als rein deklariert wurden. Durch einen Proliferationsassay wurden die gereinigte Hyperzytokine getestet. Es wurden verschiedene Konzentrationen eingesetzt. Zudem wurde HIL-6-Fc als Kontrolle mit den gleichen Konzentrationen untersucht, um beide Proteine zu vergleichen (Abbildung 3.42). Es wurde dazu die Inhibition durch 10 $\mu\text{g/ml}$ sgp130Fc analysiert (Abbildung 3.42).

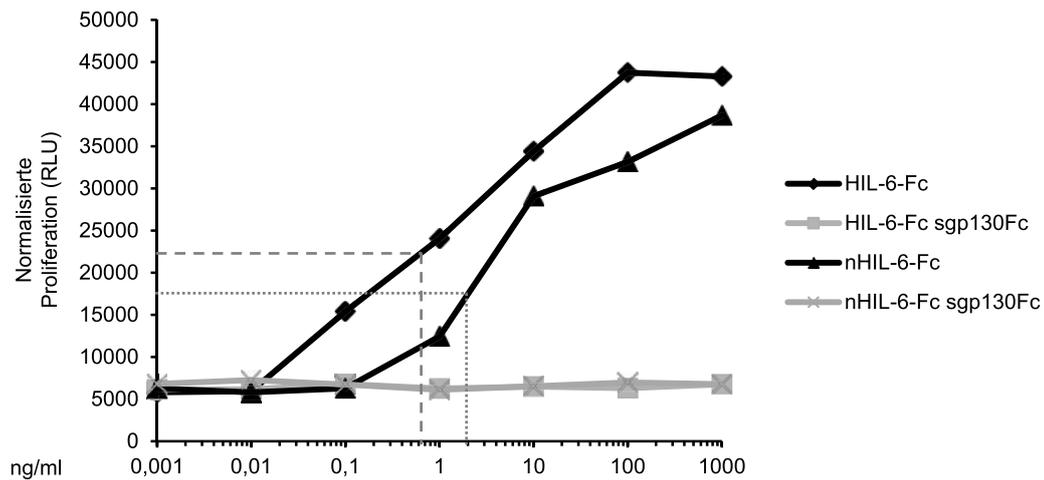


Abbildung 3.42: Proliferation von Ba/F3-gp130-Zellen durch HIL-6-Fc und nHIL-6-Fc. Für die Analyse von HIL-6-Fc und nHIL-6-Fc wurde ein Proliferationsassay mit Ba/F3-gp130-Zellen durchgeführt. Dafür wurden unterschiedliche Konzentrationen von HIL-6-Fc und nHIL-6-Fc im Vergleich analysiert. Die Inhibition durch 10 $\mu\text{g/ml}$ sgp130Fc wurde ebenfalls untersucht. Die Zellen wurden nach 72 Stunden gemessen. Die gestrichelten Linien geben die halbmaximale Proliferation der Zellen an. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis aus zwei unabhängigen Experimenten ($n=2$).

Die Zellen wurden für 72 Stunden mit den angegebenen Konzentrationen von HIL-6-Fc, nHIL-6-Fc und sgp130Fc kultiviert (Abbildung 3.42). Es wurde eine EC_{50} für nHIL-6-Fc und HIL-6-Fc errechnet (graue Linien). Die EC_{50} von HIL-6-Fc liegt bei 5,96 pM und von nHIL-6-Fc bei 65,5 pM. Die Halbmaximale Proliferation von Ba/F3-gp130-Zellen wurde durch eine Konzentration von 0,55 ng/ml HIL-6-Fc erreicht. Die Halbmaximale Proliferation von Ba/F3-gp130-Zellen wurde durch eine Konzentration von 2 ng/ml nHIL-6-Fc erreicht. Somit wurde bestimmt, dass Ba/F3-gp130-Zellen eine geringere Konzentration HIL-6-Fc benötigen, um die halbmaximale Proliferation zu erreichen, als durch nHIL-6-Fc.

Durch die Zugabe von 10 $\mu\text{g/ml}$ sgp130Fc wurde die Proliferation durch beide Zytokine inhibiert (Abbildung 3.42). Es wurde mit den rekombinanten Hyperzytokinen eine Analyse der STAT3-Phosphorylierung durchgeführt. Für die Stimulation von Ba/F3-gp130-Zellen wurden verschiedene Konzentrationen von HIL-6-Fc und nHIL-6-Fc eingesetzt. Es wurde

Ergebnisse

durch Zugabe von 10 µg/ml sgp130Fc die Inhibition von nHIL-6-Fc und HIL-6-Fc gezeigt (Abbildung 3.43).

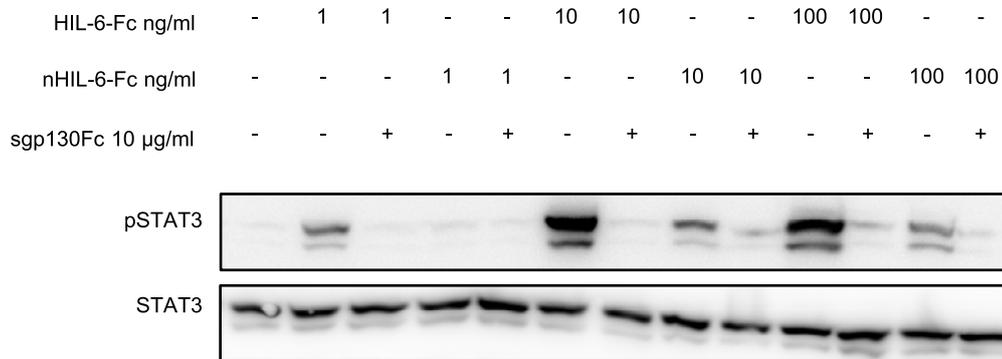


Abbildung 3.43: STAT3-Phosphorylierung durch die Stimualtion von Ba/F3-gp130-Zellen mit rekombinanten HIL-6-Fc und nHIL-6-Fc. Ba/F3-gp130-Zellen wurden mit HIL-6-Fc und nHIL-6-Fc für 30 Minuten stimuliert. Dabei wurden die Konzentrationen 1, 10 und 100 ng/ml von HIL-6-Fc oder nHIL-6-Fc eingesetzt. Es wurde in der ersten Probe zu den Zellen kein Zytokin hinzugegeben, um eine zytokinunabhängige STAT3-Phosphorylierung auszuschließen. Zusätzlich wurde bei allen Konzentrationen (1,10 und 100 ng/ml) 10 µg/ml sgp130Fc hinzugegeben, um die Inhibition der STAT3-Phosphorylierung zu untersuchen. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis aus zwei unabhängigen Experimenten (n=2).

Es wurde kein Zytokin hinzugegeben, um eine zytokinunabhängige STAT3-Phosphorylierung von Ba/F3-gp130-Zellen auszuschließen. Bei der Zugabe von 1 ng/ml HIL-6-Fc wurde eine schwache STAT3-Phosphorylierung detektiert. Diese wurde durch die Zugabe von 10 µg/ml sgp130Fc inhibiert. Durch die Zugabe von 10 ng/ml und 100 ng/ml HIL-6-Fc wurde eine viel stärkere STAT3-Phosphorylierung detektiert. Diese wurde durch 10 µg/ml sgp130Fc inhibiert. Erst bei einer Zugabe von 10 ng/ml nHIL-6-Fc wurde eine STAT3-Phosphorylierung detektiert. Diese wurde durch sgp130Fc inhibiert. Das gleiche wurde für 100 ng/ml nHIL-6-Fc ermittelt (Abbildung 3.43). Die STAT3-Phosphorylierung von nHIL-6-Fc wurde im Vergleich zu der von HIL-6-Fc, schwächer detektiert. nHIL-6-Fc wurde dadurch als weniger effektiv wie HIL-6-Fc eingestuft, dies wurde bereits für die Proliferation gezeigt. nHIL-6 zeigt somit eine um den Faktor 10 geringere Aktivität, als HIL-6.

3.4 Autokrines IL-6 und IL-11 signaling

Der Inhibitor sgp130Fc wurde in dieser Arbeit als effektiver Inhibitor des *Cluster-signaling*s identifiziert. Dabei wurde *Cluster-signaling* durch IL-6R/IL-11R-Zellen in Verbindung mit IL-6/IL-11 sowie durch mbHIL-6/mbHIL-11 von sgp130Fc inhibiert. Sgp130Fc wurde als Inhibitor des *Trans-signaling*s bereits charakterisiert. Es wurde für

Ergebnisse

sgp130Fc zeigt, dass es keine Inhibition des klassischen *signalings* vermittelt (Jostock, 2001 #40, Lokau, 2016 #159). Für die neuen membranständigen Designerzytokine mbHIL-6 sowie die Mutationsvarianten nmbHIL-6, mbHIL-11 und mbHIL-11_{R355E}, wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass sie auf der Zelle durch sgp130Fc gebunden werden, genauso wie IL-6R/IL-11R mit IL-6/IL-11, so dass ausgeschlossen werden kann, dass sgp130Fc das klassische *signaling* aufgrund einer sterischen Hinderung durch die Rezeptoren nicht binden und hemmen kann. In diesem Teil der Arbeit soll nun untersucht werden, ob eine Expression von gp130 und den neuen Hyperzytokinen in/auf der selben Zelle, also ein auto-krines *signaling*, eine Inhibition durch sgp130Fc zulässt.

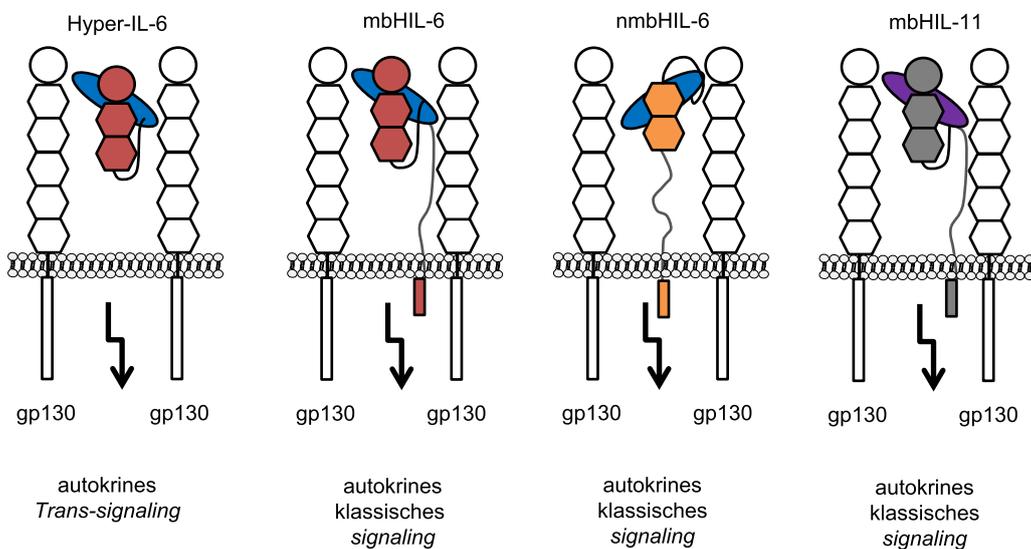


Abbildung 3.44: Schematische Übersicht über autokrines *Trans-signaling* und klassisches *signaling*. Für das autokrine *signaling* wurden verschiedene Zelllinien generiert. Es sind beispielhaft Ba/F3-gp130-HIL-6-Zellen für autokrines *Trans-signaling*, Ba/F3-gp130-mbHIL-6-Zellen für autokrines klassisches *signaling*, Ba/F3-gp130-nmbHIL-6-Zellen für autokrines klassisches *signaling* und Ba/F3-gp130-mbHIL-11-Zellen für autokrines klassisches *signaling* dargestellt. Dabei wurden in Ba/F3-gp130-Zellen die Hyperzytokine retroviral transduziert.

Zu diesem Zweck wurden Ba/F3-gp130-Zellen mit den folgenden Zytokinen retroviral transduziert, so dass gp130 mit z.B. mbHIL-6 einen Komplex auf oder in der gleichen Zelle eingehen kann (Abbildung 3.44).

Es wurden in dieser Arbeit folgende Zelllinien generiert:

- Ba/F3-gp130-HIL-6 sezernierende Zellen (autokrines *Trans-signaling*)
- Ba/F3-gp130-mbHIL-6 (autokrines klassisches *signaling*)
- Ba/F3-gp130-nHIL-6 sezernierende Zellen (autokrines *Trans-signaling*)
- Ba/F3-gp130-nmbHIL-6 (autokrines klassisches *signaling*)
- Ba/F3-gp130-hIL-11R als Kontrolle (autokrines klassisches *signaling*)

Ergebnisse

Ba/F3-gp130-mbHIL-11 (autokrines klassisches *signaling*)

Ba/F3-gp130-hIL-6R-IL-6 sezernierende Zellen (autokrines klassisches *signaling*)

3.4.1 Die membranständigen Hyperzytokine wurden auf Ba/F3-gp130-Zellen exprimiert

Als erstes wurde untersucht, ob die membranständigen Hyperzytokine nach der retroviralen Transduktion auf den Zellen exprimiert wurden. Außerdem wurde die Frage gestellt, ob eine gleichzeitige Expression von gp130 die Expression der Hyperzytokine beeinflusst. Zum Nachweis der Oberflächenexpression der Hyperzytokine wurde die Durchflusszytometrie angewendet. Durch spezifische Antikörperbindung wurde zunächst die Expression von mbHIL-6, nmbHIL-6, hIL-11R, mbHIL-11 und mbHIL-11_{R355E} nachgewiesen.

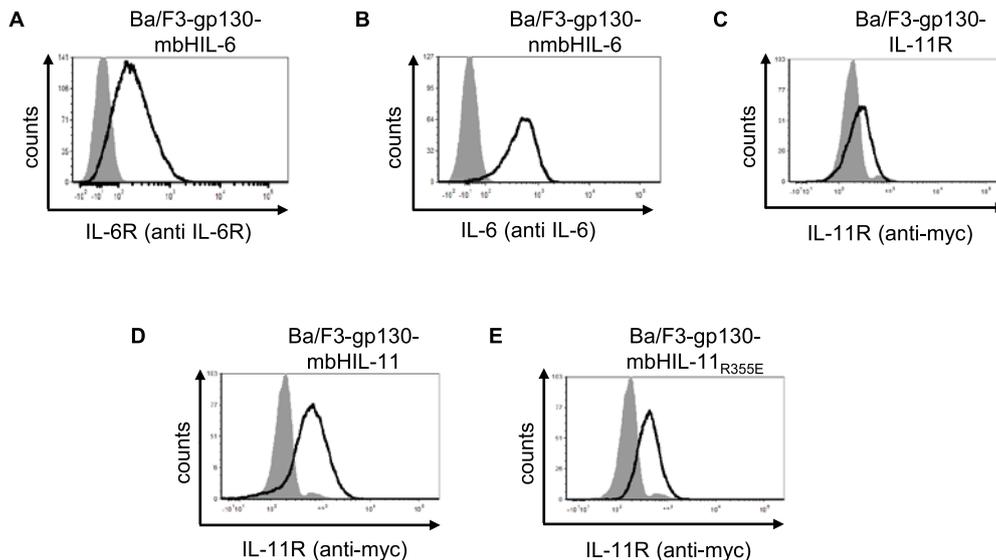


Abbildung 3.45: Nachweis der Rezeptoren mbHIL-6, nmbHIL-6, IL-11R, mbHIL-11 und mbHIL-11R355E auf der Zelloberfläche von Ba/F3-gp130-Zellen. Für die Analyse der Oberflächenexpression von mbHIL-6, nmbHIL-6, IL-11R, mbHIL-11 und mbHIL-11_{R355E} wurden 1×10^6 Zellen gewaschen und mit verschiedenen, primären Antikörpern in einer 1:100 Verdünnung für 2 Stunden auf Eis inkubiert. Nach erneutem Waschen wurden die Zellen mit sekundären Antikörpern in einer Verdünnung von 1:100 für eine Stunde bei 4°C inkubiert. **(A)** Für den Nachweis von mbHIL-6 wurde der IL-6R Antikörper (4-11) als primärer Antikörper benutzt. Der sekundäre Antikörper war ein APC-gekoppelter *goat anti-mouse* IgG polyklonaler Antikörper. **(B)** Für den Nachweis von nmbHIL-6 wurde der biotinylierter IL-6 mAb als primärer Antikörper benutzt. Der sekundäre Antikörper war APC-Streptavidin. **(C-E)** Für den Nachweis von IL-11R-myc/mbHIL-11-myc/mbHIL-11_{R355E}-myc wurde der Antikörper anti- myc (71D10) als primärer Antikörper benutzt. Der sekundäre Antikörper war Alexa-fluorTM 488 *goat anti-rabbit* IgG. Für alle Oberflächenexpressionen wurden Ba/F3-Zellen genauso behandelt, wie die entsprechende Zelllinie (graue Balken). Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Experimenten (n=3).

Ergebnisse

Dabei wurden die Zelllinien Ba/F3-gp130-HIL-6, Ba/F3-gp130-nHIL-6 und Ba/F3-gp130-L-6R-IL-6 nicht analysiert, da diese lösliche Hyperzytokine sezernieren und nicht auf der Zelloberfläche exprimieren (HIL-6, nHIL-6 und IL-6).

Für die Zelllinie Ba/F3-gp130-mbHIL-6 wurde als primärer Antikörper der IL-6R (4-11) Antikörper verwendet. Als sekundärer Antikörper wurde APC gekoppelter *goat anti-mouse* IgG polyklonaler Antikörper verwendet. Es wurde eine klare Oberflächenexpression von mbHIL-6 auf der Zelloberfläche detektiert (Abbildung 3.45).

Für die Zelllinie Ba/F3-gp130-nmbHIL-6 wurde durch den primären Antikörper anti-IL-6-Biotin verwendet. Als sekundärer Antikörper wurde APC-Streptavidin verwendet. NmbHIL-6 wurde auf der Zelloberfläche detektiert (Abbildung 3.45).

Für die Zelllinien Ba/F3-gp130-IL-11R, Ba/F3-gp130-mbHIL-11 und Ba/F3-gp130-mbHIL-11_{R355E} wurde die gleiche Antikörperkombination verwendet. Als primärer Antikörper wurde der anti-myc (71D10) und als sekundärer der Alexa-fluorTM 488 *goat anti-rabbit* IgG verwendet. Es wurde bei allen Zelllinien eine klare Detektion der Hyperzytokine auf der Oberfläche gezeigt (Abbildung 3.45). Ba/F3-Zellen wurden als Kontrolle verwendet (graue Balken). Dadurch wurde die Aussage getroffen, dass die Antikörper Ba/F3-Zellen nicht unspezifisch binden. Die Zellen zeigen eine Expression der Hyperzytokine, wodurch ausgesagt wird, dass die gleichzeitige Expression von gp130 keinen Einfluss auf die Expression der Hyperzytokine hat.

3.4.2 Die Zelllinien zeigen eine autokrine Proliferation

Nach der erfolgten Analyse der Oberflächenexpression folgte die Frage, ob eine gleichzeitige Expression von gp130 und der Hyperzytokine die Zellen autonom proliferieren lässt. Dafür wurde untersucht, ob die Zelllinien Ba/F3-gp130-mbHIL-6, Ba/F3-gp130-HIL-6, Ba/F3-gp130-nmbHIL-6, Ba/F3-gp130-nHIL-6, Ba/F3-gp130-mbHIL-11 und Ba/F3-mbHIL-11_{R355E} ohne externe Zytokine eine autostimulierende Proliferation zeigen. Als Kontrolle wurde die Proliferation von Ba/F3-gp130-Zellen durch die Zugabe von 10 ng/ml HIL-6 und bei Ba/F3-gp130-IL-11R durch die Zugabe von 10 ng/ml IL-11 verwendet.

Ergebnisse

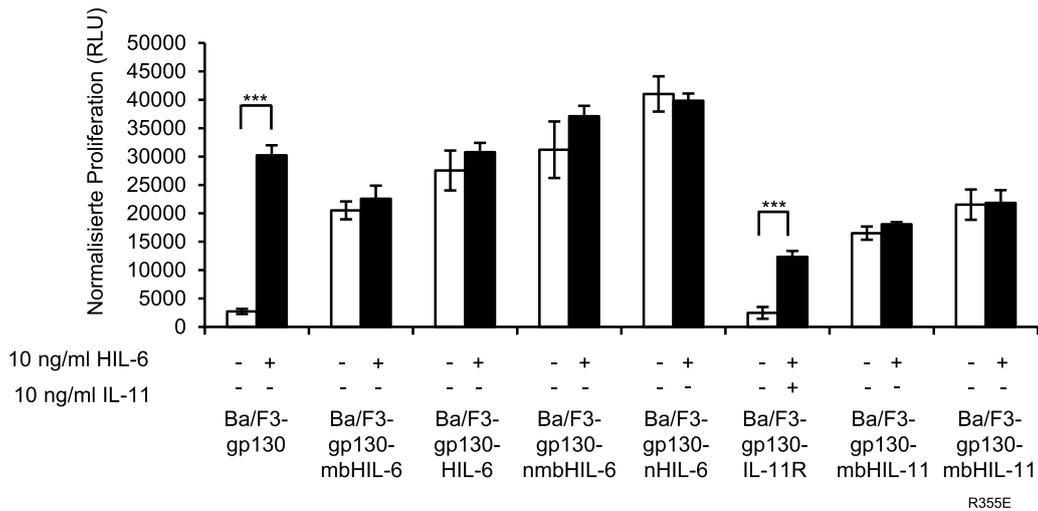


Abbildung 3.46: Autoproliferation durch autokrines *signaling*. Es wurden 5×10^3 Zellen pro Well für 72 Stunden mit 10 ng/ml HIL-6, 10 ng/ml IL-11 oder ohne Zytokinzugabe stimuliert. 10 ng/ml HIL-6 wurde für die Zelllinien Ba/F3-gp130, Ba/F3-gp130-mbHIL-6, Ba/F3-gp130-HIL-6, Ba/F3-gp130-nmbHIL-6, Ba/F3-gp130-nHIL-6, Ba/F3-gp130-mbHIL-11 und Ba/F3-gp130-mbHIL-11_{R355E} eingesetzt. Für die Zelllinie Ba/F3-gp130-IL-11R wurde 10 ng/ml IL-11 eingesetzt. Die Signifikanz wurde durch einen *Students-TTest* ermittelt und wurde zwischen signifikant (*) und sehr hoch signifikant (***) eingestuft. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Experimenten (n=3).

Für die Zelllinien Ba/F3-gp130 und Ba/F3-gp130-IL-11R wurde keine Autoproliferation detektiert, da diese kein autokrines *signaling* induzierten. Erst durch Zugabe von 10 ng/ml HIL-6 bzw. IL-11 wurde bei diesen Zelllinien eine Proliferation gemessen (Abbildung 3.46). Bei Ba/F3-gp130-HIL-6- und Ba/F3-gp130-nHIL-6-Zellen wurde hingegen eine Proliferation ohne externe Zugabe von Zytokinen gemessen (Abbildung 3.46). Diese Zellen sezernierten die beiden Hyper-IL-6-Zytokine und wurden als autokrine *Trans-signaling* Zellen definiert, da jene zwar eine autokrine Proliferation zeigten, welche aber nicht durch membrangebundene IL-6:IL-6R-Komplexe induziert wurde.

Eine autokrine klassische Proliferation wurde für die Zelllinien Ba/F3-gp130-mbHIL-6, Ba/F3-gp130-nmbHIL-6, Ba/F3-gp130-mbHIL-11 und Ba/F3-gp130-mbHIL-11_{R355E} gezeigt (Abbildung 3.46). Die Proliferation wurde als autokrines klassisches *signaling* definiert, da sie auf membrangebundene IL-6:IL-6R- bzw. IL-11:IL-11R-Komplexe basiert.

Somit wurde durch einen Proliferationsassay gezeigt, dass die Zelllinien Ba/F3-gp130-HIL-6, Ba/F3-gp130-nHIL-6, Ba/F3-gp130-mbHIL-6, Ba/F3-gp130-nmbHIL-6, Ba/F3-gp130-mbHIL-11 und Ba/F3-gp130-mbHIL-11_{R355E} ein autokrines *signaling* zeigten. Eine gleichzeitige Expression von gp130 und einem Hyperzytokin führt damit zur autokrinen Aktivierung der Rezeptoren.

3.4.3 Autokrine STAT3-Phosphorylierung wird durch den Januskinase Inhibitor P6 gehemmt

Es wurde gezeigt, dass durch eine gleichzeitige Expression von gp130 und einem Hyperzytokin eine autokrine *signaling* Variante entsteht. Es sollte weiter untersucht werden, ob eine Inhibition durch 10 µg/ml sgp130Fc, 10 µg/mlTocilizumab, 1 µg/ml B-R3 und 10 mM pan-Janus kinase inhibitor Pyridone 6 (P6) induziert wird. P6 ist ein Janus Kinase Inhibitor, der eine Inhibition der STAT3-Phosphorylierung bewirkt (Thompson, *et al.* 2002). Der gp130 spezifische Antikörper B-R3 hemmt die Zytokinaktivierung von gp130 (Wijdenes, *et al.* 1995). Alle Inhibitoren wurden verwendet, um autokrines *signaling* zu inhibieren. Sg130Fc kann die Hyperzytokine ohne gp130 auf der Zelloberfläche binden und inhibiert das *Cluster-signaling*, aber es bleibt die Frage offen, ob bei einer gleichzeitigen Expression von gp130 und einem Hyperzytokin sgp130Fc das *signaling* inhibieren kann. Dafür wurden die in 3.3.2 aufgeführten Zelllinien, zunächst mit 10 ng/ml HIL-6/IL-11 stimuliert, um das autokrine Potential der Zellen zu bestätigen. Ferner wurden Ba/F3-gp130-IL-6R-IL-6-Zellen generiert. Diese Zellen spiegeln das klassische *signaling* wider, da diese sowohl gp130, IL-6R und IL-6 exprimieren.

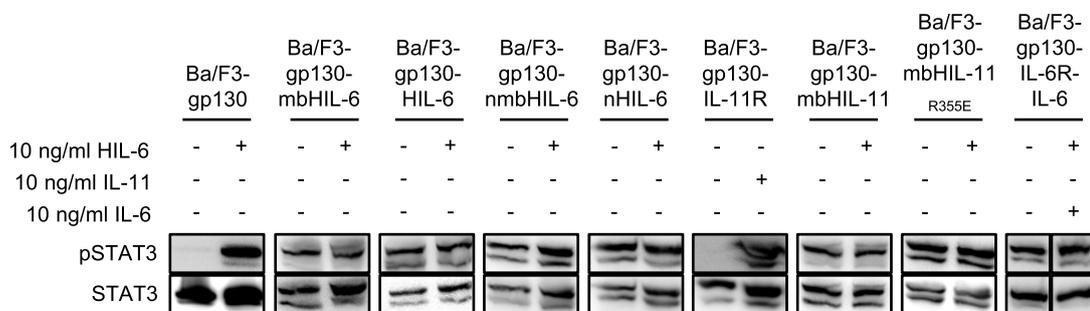


Abbildung 3.47: STAT3 Phosphorylierung durch autokrines- oder *Trans-signaling*. Bei den Zelllinien Ba/F3-gp130, Ba/F3-gp130-mbHIL-6, Ba/F3-gp130-HIL-6, Ba/F3-nmbHIL-6, Ba/F3-gp130-nHIL-6-, Ba/F3-gp130-IL-11R, Ba/F3-gp130-mbHIL-11 und Ba/F3-gp130-mbHIL-11_{R355E} wurde durch Zugabe von 10 ng/ml HIL-6/IL-11 STAT3 phosphoryliert. Beim autokrinen *signaling* wurde, ohne Zugabe von externem Zytokin, die Signalkaskade durch internes Zytokin angeschaltet. STAT3 wurde als Ladekontrolle verwendet. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Experimenten (n=3).

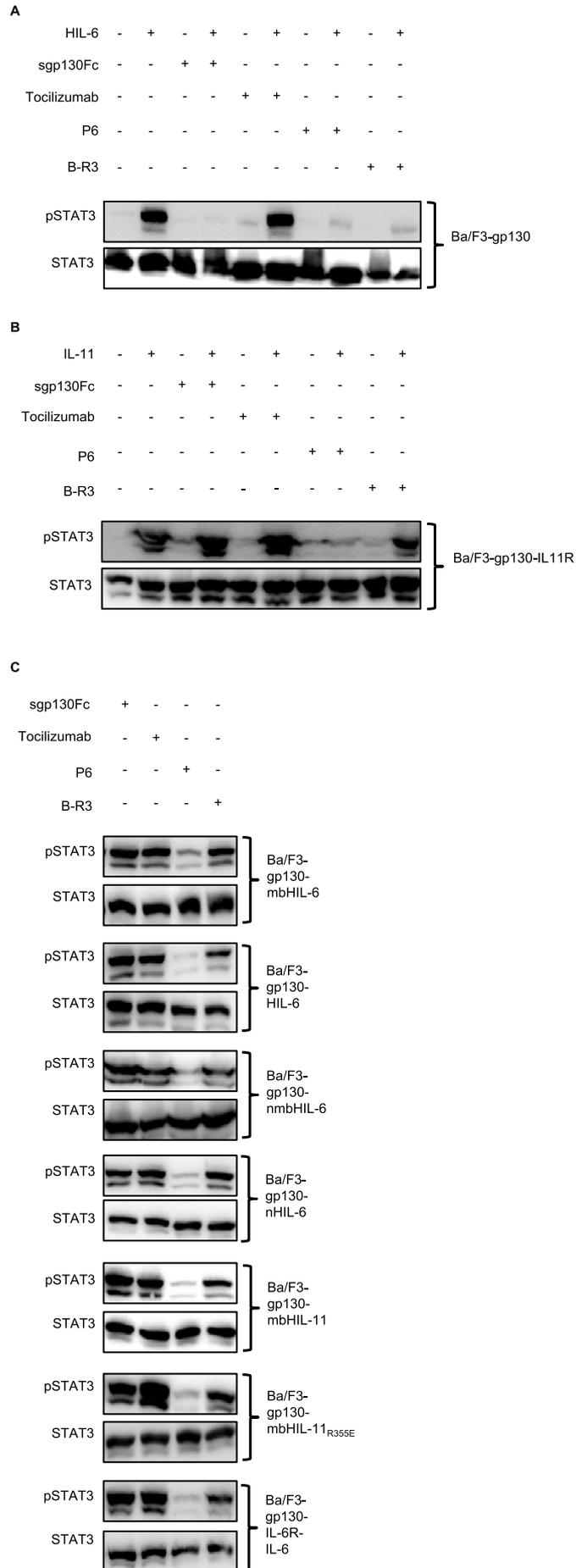
Bei Ba/F3-gp130- und Ba/F3-gp130-IL-11R-Zellen wurde durch externe Zytokinzugabe das STAT3 Protein phosphoryliert. Ohne Zugabe wurde keine STAT3-Phosphorylierung detektiert. Bei den restlichen Zelllinien wurde ohne Zytokinzugabe das STAT3 Protein phosphoryliert. Es wurde durch Zytokinzugabe nicht verstärkt (Abbildung 3.47). Die Aussage, dass in diesen Zellen autokrines *signaling* dafür verantwortlich war, wurde getroffen.

Ergebnisse

Im weiteren Verlauf wurde untersucht, ob die beschriebenen Inhibitoren (3.3.2) die STAT3-Phosphorylierung beeinflussen. Dabei wurde beachtet, dass Ba/F3-gp130- und Ba/F3-gp130-IL-11R-Zellen dennoch auf eine externe Zytokinzugabe angewiesen waren.

Während der Inkubationszeit ohne Zytokin wurden die Zellen mit 10 µg/ml sgp130Fc, 10 µg/ml Tocilizumab, 10 mM P6 und 1 µg/ml B-R3 inkubiert. Für die Zelllinien Ba/F3-gp130 und Ba/F3-gp130-IL-11R erfolgte hier eine Koinkubation von Zytokin und Inhibitor.

Ergebnisse



Ergebnisse

Abbildung 3.48: Inhibition der STAT3-Phosphorylierung durch autokrines oder Trans-signaling. 1×10^6 Ba/F3-gp130-, Ba/F3-gp130-mbHIL-6-, Ba/F3-gp130-HIL-6-, Ba/F3-nmbHIL-6-, Ba/F3-gp130-nHIL-6-, Ba/F3-gp130-IL-11R-, Ba/F3-gp130-mbHIL-11- und Ba/F3-gp130-mbHIL-11_{R355E}-Zellen wurden während der Inkubationszeit mit und ohne HIL-6/IL-11 entweder mit 10 $\mu\text{g/ml}$ sgp130Fc, 10 $\mu\text{g/ml}$ Tocilizumab, 10 mM P6 oder 1 $\mu\text{g/ml}$ B-R3 inkubiert. **(A)** Bei Ba/F3-gp130-Zellen wurden jeweils unstimuliert oder mit 10 ng/ml HIL-6 stimuliert und mit den abgebildeten Inhibitoren behandelt. Die Inkubation nur mit Inhibitoren ohne Zytokinzugabe war eine Kontrolle, um Inhibitor-abhängige STAT3-Phosphorylierung auszuschließen. Die Zellen wurden für 30 Minuten mit 10 ng/ml HIL-6 inkubiert und danach für die SDS-PAGE vorbereitet. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Experimenten ($n=3$). **(B)** Bei Ba/F3-gp130-IL-11R-Zellen wurden entweder unstimuliert oder mit 10 ng/ml IL-11 stimuliert und abgebildeten Inhibitoren behandelt. Die Inkubation nur mit den Inhibitoren ohne Zytokinzugabe war eine Kontrolle, um Inhibitor-abhängige STAT3 Phosphorylierung auszuschließen. Die Zellen wurden für 30 Minuten mit 10 ng/ml IL-11 inkubiert und danach für die SDS-PAGE vorbereitet. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis aus zwei unabhängigen Experimenten ($n=2$). **(C)** Ba/F3-gp130-mbHIL-6-, Ba/F3-gp130-HIL-6-, Ba/F3-gp130-nmbHIL-6-, Ba/F3-gp130-nHIL-6-, Ba/F3-gp130-mbHIL-11-, Ba/F3-gp130-mbHIL-11_{R355E}- und Ba/F3-gp130-IL-6R-IL-6-Zellen wurden nicht mit Zytokinen stimuliert. Es wurden lediglich die verwendeten Inhibitoren mitkultiviert. Die Zellen wurden zeitgleich mit den Zellen aus A und B für die SDS-PAGE vorbereitet. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Experimenten ($n=3$). Detektiert wurde pSTAT3, wobei STAT3 wurde als Kontrolle für die gleichmäßige Beladung der Gele detektiert wurde.

Die Zellen wurden mit 10 ng/ml HIL-6/IL-11 für 30 Minuten stimuliert. Durch 10 ng/ml HIL-6 wurde bei Ba/F3-gp130-Zellen STAT3 phosphoryliert. 10 $\mu\text{g/ml}$ sgp130Fc, 10 mM P6 und 1 $\mu\text{g/ml}$ B-R3 wurden wie erwartet als effektive Inhibitoren identifiziert. Tocilizumab wurde nicht als Inhibitor identifiziert (Abbildung 3.48 A).

Bei Ba/F3-gp130-IL-11R-Zellen wurde STAT3 durch die Zugabe von 10 ng/ml IL-11 phosphoryliert (Abbildung 3.48 B). Als einziger Inhibitor wurde erwartungsgemäß P6 identifiziert. Die anderen inhibierten die STAT3-Phosphorylierung nicht (Abbildung 3.48 B).

Zu allen anderen Zelllinien wurde kein Zytokin hinzugegeben, da für diese gezeigt wurde, dass durch die Rezeptorkonzeption auf der Zelloberfläche, eine autokrine STAT3 Phosphorylierung induziert wurde (Abbildung 3.48 C). Hier wurde interessanterweise nur durch Zugabe von 10 mM P6 die STAT3-Phosphorylierung inhibiert. Durch die anderen Inhibitoren wurde die STAT3-Phosphorylierung nicht inhibiert (Abbildung 3.48 C).

STAT3 wurde als Ladekontrolle verwendet um die gleichmäßige Beladung der Gele zu zeigen.

In diesem Abschnitt wurde gezeigt, dass die Zelllinien Ba/F3-gp130-mbHIL-6, Ba/F3-gp130-HIL-6, Ba/F3-gp130-nmbHIL-6, Ba/F3-gp130-nHIL-6, Ba/F3-gp130-mbHIL-11 und Ba/F3-gp130-mbHIL-11_{R355E} autokrines *signaling* durch die Rezeptoren auf der Zelloberfläche induzieren. Es wurde in diesem Abschnitt außerdem gezeigt, dass autokrines *signaling* durch den Inhibitor P6, aber nicht durch die anderen Inhibitoren gehemmt wurde. *Trans-signaling* dagegen wurde durch die Zugabe von sgp130Fc nur dann inhibiert, wenn das Zytokin von außen zu der Zelle gegeben wurde. Bei einer autokrinen *Trans-signaling*

stimulation, konnte sgp130Fc hingegen die Rezeptoraktivierung nicht hemmen. Bei einer gleichzeitigen Expression von gp130 und einem Hyperzytokin auf der Zelloberfläche, erfolgte keine Inhibition durch sgp130Fc, Tocilizumab oder B-R3 sondern nur durch P6.

3.4.4 Verhindern intrazelluläre präformierte Komplexe von gp130 und mbHIL-6 die extrazelluläre sgp130Fc Hemmung des autokrinen *Trans-signalings*?

In den vorangegangenen Abschnitten wurde bereits gezeigt, dass die membranständigen Hyper-Zytokine von sgp130Fc gebunden werden. Hierzu wurden zwei Theorien entwickelt, welche das Ausbleiben der Inhibition erklären könnten. Die erste Theorie besagte, dass IL-6:IL-6R-Komplexe auf der Zelloberfläche nicht durch sgp130Fc gebunden werden können. Diese Hypothese wurde jedoch widerlegt. Die zweite Theorie besagt, dass es bereits in der Zelle präformierte (autokrine) Rezeptor-Komplexe gibt, die dann extrazellulär eine Inhibition durch sgp130Fc verhindern. Durch diese präformierten Komplexe könnte es auch bereits in der Zelle zu einer intrazellulären Signaltransduktion kommen, welche durch nicht externe Zugabe von sgp130Fc, Tocilizumab oder B-R3 aber durch P6 inhibiert werden.

Durch die Posttranslationale Modifikation von Proteinen im Golgi-Apparat und die Verpackung der Proteine in Vesikel, für den Transport an die Zellmembran über den Golgi-Apparat, wurde ein Zeitfenster geschaffen, dass die Rezeptoren präformierte Komplexe bilden können (Abbildung 3.49).

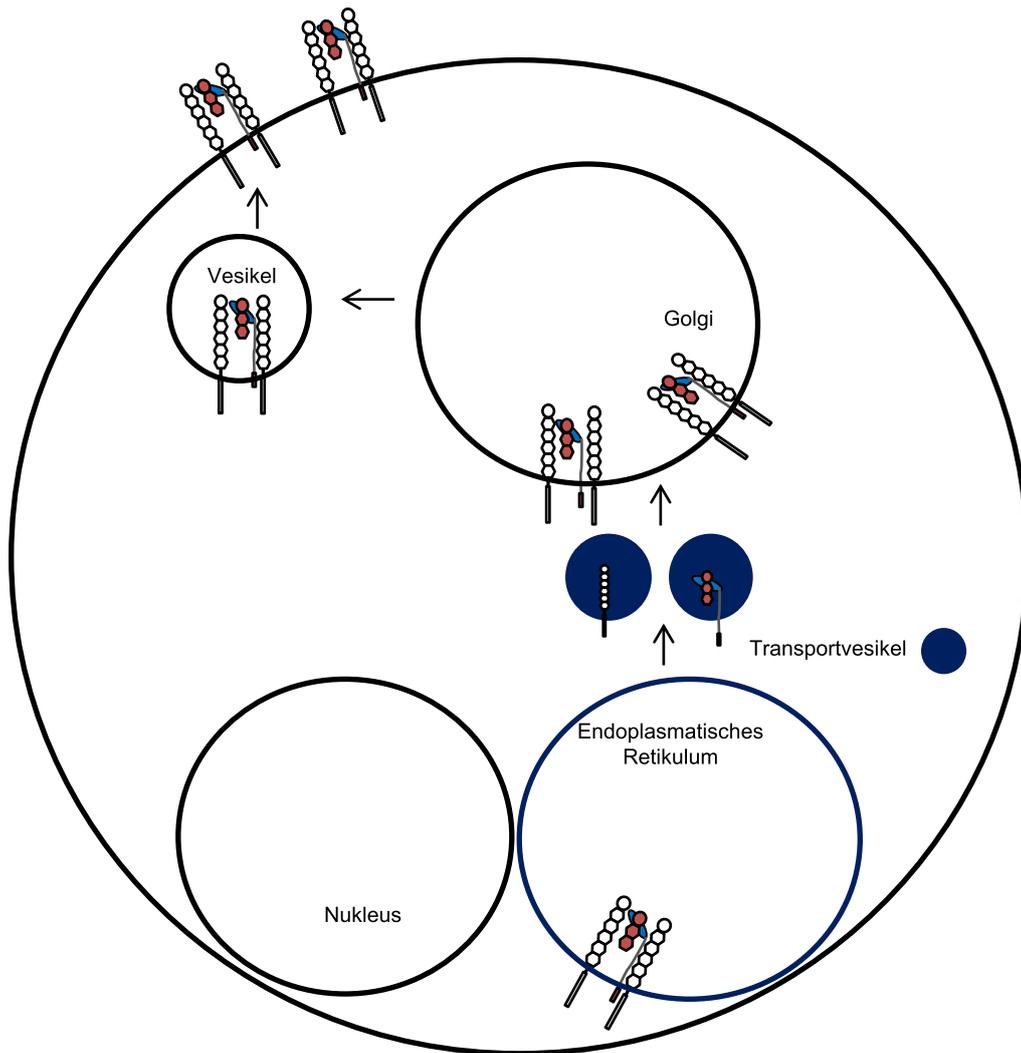


Abbildung 3.49: Schematische Darstellung wie präformierte Komplexe von mbHIL-6 und gp130 gebildet werden würden. Nach der Transkription von gp130 und mbHIL-6 im Nukleus werden die Proteine in das Endoplasmatische Retikulum transportiert. Diese werden im Anschluss in Transportvesikel verpackt und in den Golgi-Apparat geleitet. Im Golgi-Apparat wurden gp130 und mbHIL-6 modifiziert (z.B. Glykosylierung) und durch Vesikeltransport zur Zelloberfläche gebracht (präformierter Komplex).

Zunächst wurde diese Hypothese für HIL-6-Fc untersucht. Dafür wurden HEK-293-Zellen verwendet. Für die transiente Transfektion wurden die Plasmide pcDNA3.1-mbHIL-6 und pcDNA3.1-sgp130Fc verwendet. Nach der Transfektion wurden die Zellen für 48 Stunden kultiviert, um eine hohe Proteinexpression zu gewährleisten. Es wurden unterschiedliche Konditionen ausgewählt, wobei auch die externe Stimulation für 30 Minuten mit 10 ng/ml HIL-6Fc oder 10 µg/ml sgp130Fc 48 Stunden nach der Transfektion untersucht wurde. Es wurde die Phosphorylierung von STAT3 analysiert. Zur Kontrolle der Proteinexpression nach der Transfektion wurde ebenfalls der IL-6R (4-11) für die Kontrolle der HIL-6-Fc Transfektion verwendet. Anti-Fc wurde als Kontrolle für die Proteinexpression von sgp130Fc verwendet.

Ergebnisse

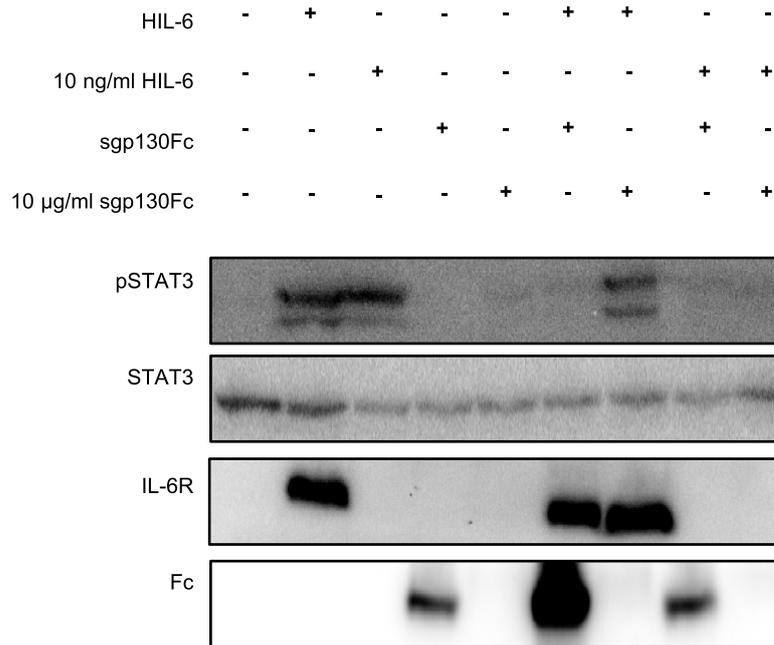


Abbildung 3.50: STAT3-Phosphorylierung durch internes oder externes HIL-6-Fc. 4×10^5 HEK-293-Zellen wurden transient mit 100 ng pcDNA3.1-HIL-6-Fc und/oder 1 µg pcDNA3.1-sgp130Fc (sgp130Fc) transfiziert. Als externe Stimuli wurden 10 ng/ml HIL-6-Fc (10 ng/ml HIL-6) oder 10 µg/ml sgp130Fc (10 µg/ml sgp130Fc) eingesetzt. Das „+“ markiert wie die Zellen behandelt wurden. Die Zellen wurden 48 Stunden nach der Transfektion für 30 Minuten stimuliert und im Anschluss für die SDS-PAGE vorbereitet. Der Nachweis erfolgte über einen pSTAT3 Antikörper, STAT3 wurde als Kontrolle für die gleichmäßige Beladung der Gele verwendet. Ebenso wurden die Antikörper gegen den IL-6R (4-11) und gegen den Fc-tag verwendet. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Experimenten (n=3).

Als Kontrolle wurden untransfizierte Zellen verwendet, um eine unspezifische STAT3-Phosphorylierung auszuschließen. Zudem wurde ausgeschlossen, dass es von HEK-293-Zellen unspezifische Signale durch Bindung des IL-6R (4-11) oder Fc Antikörpers gab.

Die STAT3-Phosphorylierung durch transfiziertes HIL-6-Fc wurde detektiert, genauso wie für externes HIL-6-Fc (Abbildung 3.50 pSTAT3). Transfiziertes HIL-6-Fc wurde durch anti-IL-6R (4-11) nachgewiesen (Abbildung 3.50 IL-6R).

Durch transfiziertes oder extern substituiertes sgp130Fc wurde keine STAT3 Phosphorylierung ausgelöst und es wurden somit keine unspezifischen Signale durch sgp130Fc detektiert (Abbildung 3.50 pSTAT3). Durch anti-Fc-Antikörper wurde für die Transfektion von sgp130Fc eine Proteinexpression detektiert. Die Lysate mit externer Zugabe von sgp130Fc zeigten keine hohe Expression (Abbildung 3.50).

Bei der Doppeltransfektion von HIL-6-Fc und sgp130Fc wurde keine STAT3-Phosphorylierung aktiviert. Durch anti-IL-6R und anti-Fc-Antikörper wurde untersucht, ob beide Proteine exprimiert wurden. Es wurde für beiden Proteine Signale detektiert (Abbildung 3.50 IL-6R, Fc). Wurde nur HIL-6-Fc transfiziert und sgp130Fc extern hinzugegeben, wurde STAT3 phosphoryliert (Abbildung 3.50 pSTAT3). HIL-6-Fc wurde in diesen

Ergebnisse

Lysaten durch anti-IL-6R (4-11) detektiert (IL-6R). Wurde sgp130Fc transfiziert und extern HIL-6-Fc hinzugegeben, wurde keine STAT3-Phosphorylierung detektiert, was mit den Ergebnissen der Stimulation von Ba/F3-gp130-Zellen konfirm war (Abbildung 3.50 pSTAT3). Die Expression von sgp130Fc wurde in diesen Lysaten durch anti-Fc nachgewiesen. Als Kontrolle wurden beide Proteine extern hinzugegeben. Es wurde keine STAT3-Phosphorylierung detektiert, was mit den Ergebnissen der Ba/F3-gp130-Zellen Stimulation mit HIL-6 konfirm war (Abbildung 3.50 pSTAT3).

Für mbHIL-6 wurde dieses Experiment ebenfalls durchgeführt. Dafür wurden U4C-Zellen verwendet. Für die transiente Transfektion wurden die Plasmide pcDNA3.1-mbHIL-6 und pcDNA3.1-sgp130Fc verwendet. Nach der Transfektion wurden die Zellen für 48 Stunden kultiviert um eine hohe Proteinexpression zu gewährleisten. Es wurden unterschiedliche Konditionen ausgewählt, wobei auch die externe Stimulation für 30 Minuten mit 10 µg/ml sgp130Fc 48 Stunden nach der Transfektion untersucht wurde. Es wurde die Phosphorylierung von STAT3 analysiert. Zur Kontrolle der Proteinexpression nach der Transfektion wurde ebenfalls der IL-6R (4-11) für die Kontrolle der mbHIL-6 Transfektion verwendet. Anti-Fc wurde als Kontrolle für die Proteinexpression von sgp130Fc verwendet.

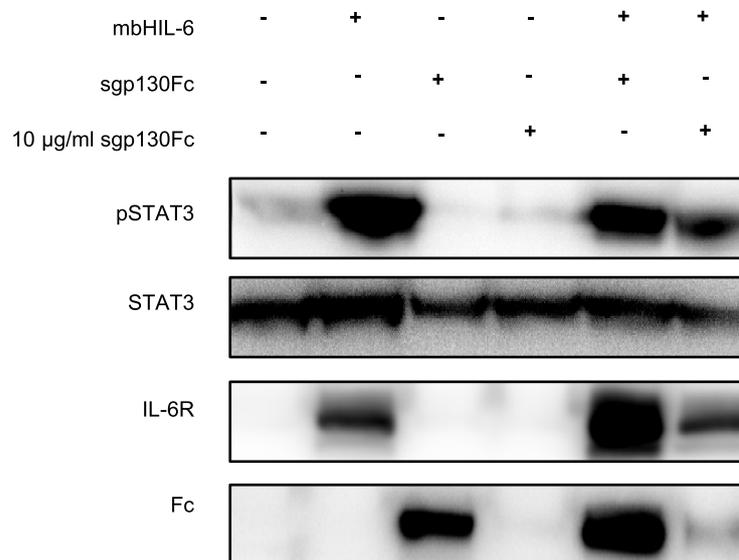


Abbildung 3.51: STAT3-Phosphorylierung durch internes mbHIL-6 wird nicht durch internes sgp130Fc inhibiert. 4×10^5 U4C wurden transient mit 1 µg pcDNA3.1-mbHIL-6 und/oder 1 µg pcDNA3.1-sgp130Fc transfiziert. Als externe Stimuli wurde 10 µg/ml sgp130Fc (10 µg/ml sgp130Fc) eingesetzt. Das „+“ markiert, wie die Zellen behandelt wurden. Die Zellen wurden 48 Stunden nach der Transfektion für 30 Minuten stimuliert und im Anschluss für die SDS-PAGE vorbereitet. Der Nachweis erfolgte über einen pSTAT3 Antikörper, STAT3 wurde als Kontrolle für die gleichmäßige Beladung der Gele verwendet. Ebenso wurden die Antikörper gegen den IL-6R (4-11) und gegen den Fc-tag verwendet. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis aus zwei unabhängigen Experimenten (n=2).

Ergebnisse

Als Kontrolle wurden untransfizierte Zellen verwendet, um eine unspezifische STAT3-Phosphorylierung auszuschließen. Zudem wurde ausgeschlossen, dass es durch U4C-Zellen unspezifische Signale durch Bindung des IL-6R (4-11) oder Fc-Antikörpers gab.

Die STAT3-Phosphorylierung durch transfiziertes mbHIL-6 wurde detektiert (Abbildung 3.51 pSTAT3). Transfiziertes mbHIL-6 wurde durch anti-IL-6R (4-11) nachgewiesen (Abbildung 3.51 IL-6R).

Durch transfiziertes oder extern substituiertes sgp130Fc wurde keine STAT3-Phosphorylierung ausgelöst und es wurden somit keine unspezifischen Signale durch sgp130Fc detektiert (Abbildung 3.51 pSTAT3). Durch anti-Fc-Antikörper wurde für die Transfektion von sgp130Fc eine Proteinexpression detektiert.

Bei der Doppeltransfektion von mbHIL-6 und sgp130Fc wurde eine STAT3-Phosphorylierung aktiviert. Durch anti-IL-6R- und anti-Fc-Antikörper wurde untersucht, ob beide Proteine exprimiert wurden. Es wurde für beiden Proteine Signale detektiert (Abbildung 3.51 IL-6R, Fc). Wurde nur mbHIL-6 transfiziert und sgp130Fc extern hinzugegeben, wurde STAT3 phosphoryliert (Abbildung 3.51 pSTAT3). MbHIL-6 wurde in diesen Lysaten durch anti-IL-6R (4-11) detektiert (IL-6R). Die äußere Zugabe von mbHIL-6 wurde nicht untersucht, da proteolytisch gespaltenes mbHIL-6 benutzt worden wäre, welches HIL-6 entspricht und somit untersucht wurde (Abbildung 3.51).

In diesem Abschnitt wurde untersucht, ob intrazelluläre (autokrine) präformierte Komplexe extrazellulär eine Inhibition durch sgp130Fc verhindern. Dafür wurde das mbHIL-6 verwendet, das laut der Theorie einen intrazellulären präformierten Komplex mit gp130 eingeht. Durch die erfolgte intrazelluläre Bindung, kann sgp130Fc extern und intern den Komplex nicht mehr binden und es wird keine Inhibition durch sgp130Fc stattfinden. Die HIL-6-Fc Variante wurde als Kontrolle verwendet, da dieses nicht membrangebunden vorliegt und keine präformierten Komplexe mit gp130 gebildet werden. Durch die gleichzeitige intrazelluläre Expression von sgp130Fc und HIL-6-Fc wird keine STAT3 Phosphorylierung induziert, da die beiden löslichen Proteine bereits intrazellulär aneinander binden. Diese Hypothese wurde durch die oben gezeigten Experimente bestätigt. MbHIL-6 kann auch durch intrazelluläres sgp130Fc nicht inhibiert werden, da es bereits zu gp130 im Endoplasmatischen Retikulum sortiert wird und als Komplex mit gp130 an die Zelloberfläche transportiert wird. Externes sgp130Fc kann durch die geschlossene Bindung zwischen gp130 und mbHIL-6 nicht mehr an das mbHIL-6 binden. Bei HIL-6-Fc wird sgp130Fc intrazellulär dazusortiert, wodurch eine intrazelluläre Inhibition stattfindet.

3.5 Herstellung von konstitutiv aktiven, Ligandenunabhängigen gp130

Rezeptoren durch Deletion der Stalkregion und der Domänen 4-6

Das zweite Projekt dieser Arbeit basierte auf dem ubiquitär exprimierten Protein gp130. Gp130 ist ein wichtiger Rezeptor der Interleukin-6 Familie und an der Signalweiterleitung vieler Zytokine der IL-6 Familie beteiligt (Dodington, *et al.* 2018). Die Dimerisierung des Rezeptors ist dabei wichtig für die Signalweiterleitung durch Interleukin-6 und Interleukin-11 (Fourcin, *et al.* 1996). Im Vorfeld wurde veröffentlicht, dass eine Mutation in der Stalkregion des IL-23R zu einer konstitutiv aktiven Form führt (Hummel, *et al.* 2017). Dieser Mutationsansatz wurde in dieser Arbeit auf gp130 übertragen und analysiert.

3.5.1 Aufbau von gp130

Gp130 besteht aus sechs extrazellulären Domänen, welche durch eine kurze Stalkregion von 6 Aminosäuren mit der Transmembrandomäne und der intrazellulären Domäne verknüpft sind. Die erste Domäne ist eine Ig-ähnliche Domäne (D₁₂₆₋₁₂₀), gefolgt von zwei Zytokinbindedomänen (Domäne 2₁₂₅₋₂₁₆ und 3₂₂₄₋₃₂₄). Die letzten drei Domänen sind Fibronectin III-ähnliche Domänen (Bravo, *et al.* 1998) (Abbildung 3.52 Domäne 4₃₂₉ bis 6₆₁₃). Intrazellulär befinden sich zwei Sequenzen (Box 1 und Box 2 Motiv), wobei das Box 1 Motiv essentiell für die Bindung der Januskinase ist (Heinrich, *et al.* 2003) (Abbildung 3.52). Die Stalkregion von gp130 umfasst 6 Aminosäuren mit der Sequenz AQGEIE.

Ergebnisse

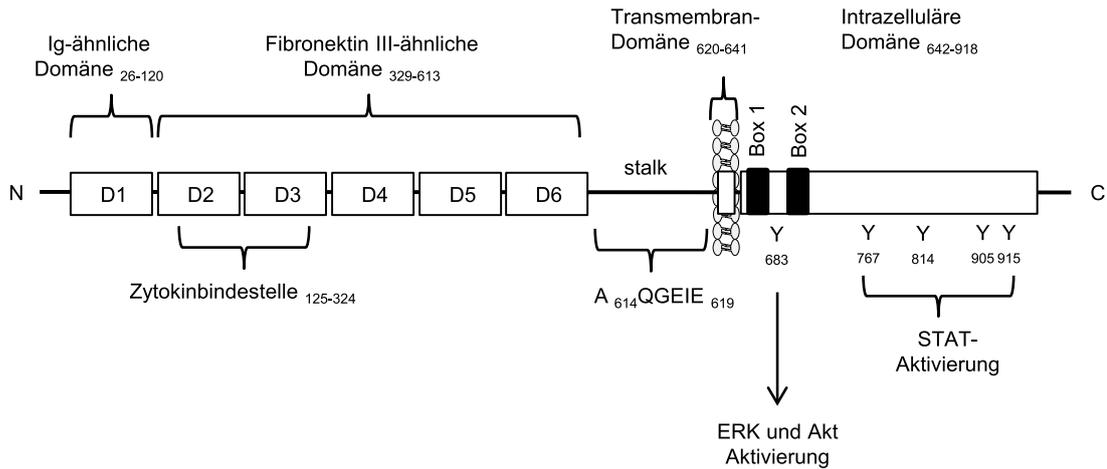


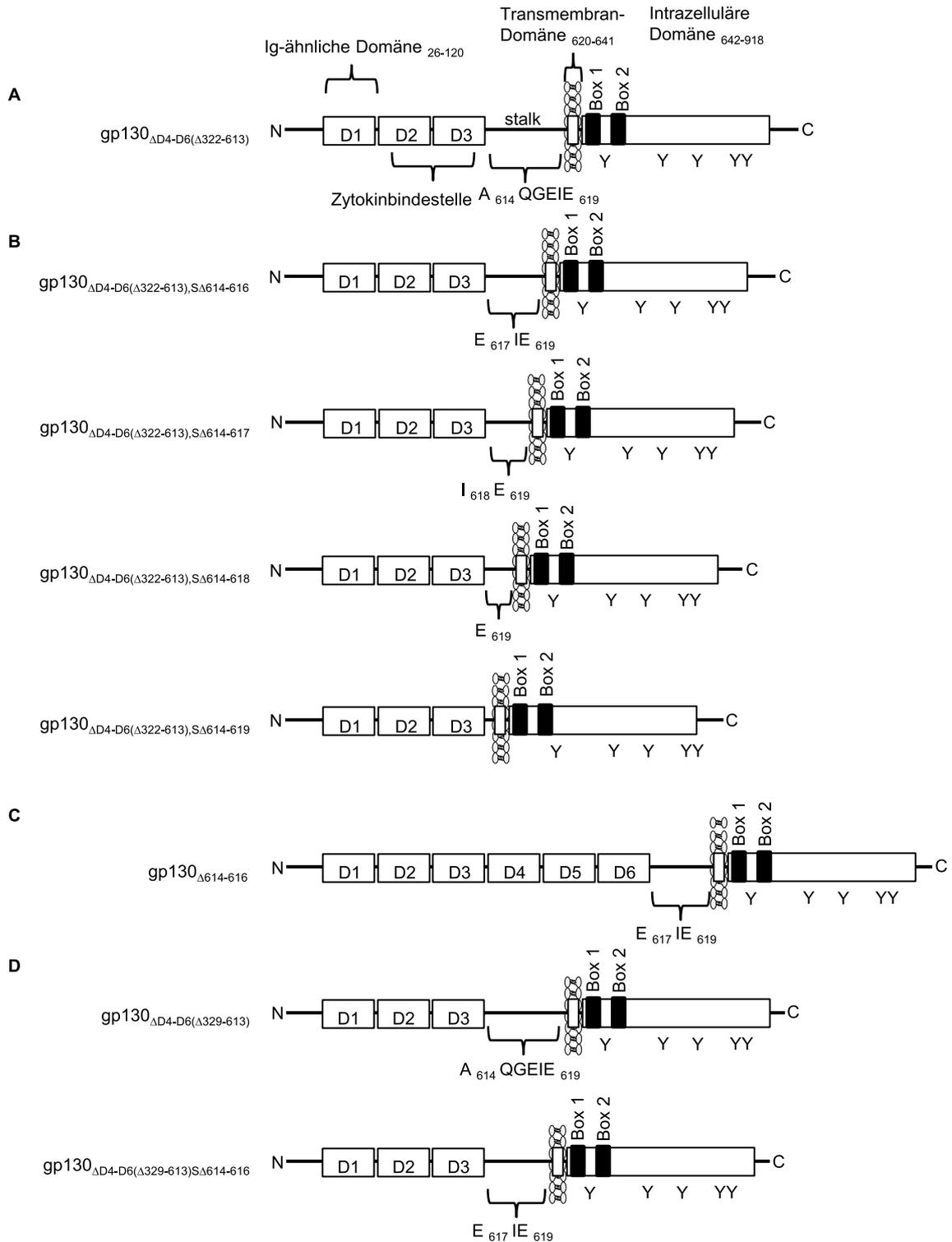
Abbildung 3.52: Schematische Darstellung von gp130. Gp130 besteht aus sechs extrazellulären Domänen. Domäne 1 ist eine Ig-ähnliche Domäne. Domäne 2 und 3 sind Zytokinbindedomänen. Domäne 4 bis 6 sind Fibronectin III-ähnliche Domänen. Eine aus sechs Aminosäuren bestehende Stalkregion verbindet Domäne 1 bis 6 mit der Transmembrandomäne. Danach folgt die intrazelluläre Domäne. Die intrazelluläre Domäne beinhaltet das Box 1 und Box 2 Motiv, welches für die Bindung der Januskinasen essentiell ist. In der intrazellulären Domäne befinden sich außerdem Tyrosine (Y) die für die Phosphorylierung von STAT3 oder ERK wichtig sind.

In dieser Arbeit wurden verschiedene Varianten von gp130 erstellt. Es wurden Deletionen im gp130 erstellt, welche zu einer konstitutiv aktiven Form führen sollten (Abbildung 3.53). Da STAT3 als Onkogen identifiziert wurde und die Mutation von gp130 als Krebsauslösend, wie z.B. im Leberkarzinom (Pilati, *et al.* 2011), beschrieben wurde ist eine konstitutiv aktive Variante für weitere Analysen und Untersuchungen äußerst wertvoll. Gp130 könnte durch verschiedene genetische Veränderungen für viele Krebsarten auslösend sein, wodurch eine nähere Untersuchung von gp130 wichtig ist (Stuhlmann-Laeisz, *et al.* 2006). Es wurden bereits einige konstitutiv aktive Varianten generiert, wobei gezeigt wurde, dass die Domäne 4 bis 6 für die Signaltransduktion wichtig sind (Kurth, *et al.* 2000, Sommer, *et al.* 2012, Stuhlmann-Laeisz, *et al.* 2006).

Es wurden die Fibronectin III-ähnlichen Domänen (Domäne 4 bis 6) deletiert. Die sechs Aminosäuren lange Stalkregion von gp130 verblieb dabei unverändert. Diese Variante wurde als gp130 $_{\Delta D4-D6(\Delta 322-613)}$ bezeichnet (Abbildung 3.53 A). Als nächstes wurden die sechs Aminosäuren lange Stalkregion um die Hälfte verkürzt. Die Variante wurde als gp130 $_{\Delta D4-D6(\Delta 322-613),\Delta 614-616}$ bezeichnet. Danach erfolgte eine sukzessive Verkürzung um jeweils eine Aminosäure (Abbildung 3.53 B). Diese Varianten wurden gp130 $_{\Delta D4-D6(\Delta 322-613),\Delta 614-617}$, gp130 $_{\Delta D4-D6(\Delta 322-613),\Delta 614-618}$ und gp130 $_{\Delta D4-D6(\Delta 322-613),\Delta 614-619}$ genannt. Als Kontrolle, ob eine Verkürzung der Stalkregion zur konstitutiven Aktivierung von gp130 führt, wurde eine Variante erstellt, welche Domäne 1 bis 6 umfasste und nur die halbe Stalkregi-

Ergebnisse

on. Diese Variante wurde $gp130_{\Delta 614-616}$ bezeichnet (Abbildung 3.53 C). Die einzelnen Domänen von gp130 wurden durch sehr kurze Linker Sequenzen miteinander verbunden. Um auszuschließen, dass diese Sequenzen essentiell waren, wurde diese für zwei weitere Varianten hinzugefügt (Abbildung 3.53 D). Es wurden dadurch die Varianten $gp130_{\Delta D4-D6(\Delta 329-613)}$ und $gp130_{\Delta D4-D6(\Delta 329-613),S\Delta 614-616}$ generiert (Abbildung 3.53 D).



Ergebnisse

Abbildung 3.53: Schematische Darstellung der gp130 Deletionsvarianten. (A) Es wurden die Fibronektin III-ähnliche Domänen (Domäne 4 bis 6) deletiert. Die sechs Aminosäuren lange Stalkregion wurden dabei intakt gelassen. Diese Variante wurde als gp130_{ΔD4-D6(Δ322-613)} bezeichnet. (B) Als nächstes wurde die Stalkregion um die Hälfte gekürzt, was als gp130_{ΔD4-D6(Δ322-613),SΔ614-616} bezeichnet wurde. Danach erfolgte eine sukzessive Verkürzung um jeweils eine Aminosäure. Diese Varianten wurden gp130_{ΔD4-D6(Δ322-613),SΔ614-617}, gp130_{ΔD4-D6(Δ322-613),SΔ614-618} und gp130_{ΔD4-D6(Δ322-613),SΔ614-619} genannt. (C) Danach wurde eine Variante erstellt, die die Domäne 1 bis 6 umfasste, aber nur die halbe Stalkregion. Diese wurde als gp130_{Δ614-616} bezeichnet. (D) Zur Verbindung von den einzelnen Domänen 1 bis 6 wurden sehr kurze Linkersequenzen verwendet. Diese wurden für die letzten Varianten intakt gelassen. Es wurden dadurch die Varianten gp130_{ΔD4-D6(Δ329-613)} und gp130_{ΔD4-D6(Δ329-613),SΔ614-616} generiert.

Diese Varianten wurden retroviral in Ba/F3-Zellen transduziert. Die Varianten gp130_{ΔD4-D6(Δ322-613),SΔ614-616}, gp130_{ΔD4-D6(Δ322-613),SΔ614-617}, gp130_{ΔD4-D6(Δ322-613),SΔ614-618} und gp130_{ΔD4-D6(Δ322-613),SΔ614-619} wurden zudem in Ba/F3-gp130-Zellen retroviral transduziert. Alle Varianten wurden mit einem C-terminal liegenden myc-Tag versehen.

3.5.2 Alle gp130 Varianten werden exprimiert

Die Varianten gp130_{ΔD4-D6(Δ322-613)}, gp130_{ΔD4-D6(Δ322-613),SΔ614-616}, gp130_{ΔD4-D6(Δ322-613),SΔ614-617}, gp130_{ΔD4-D6(Δ322-613),SΔ614-618}, gp130_{ΔD4-D6(Δ322-613),SΔ614-619}, gp130_{Δ614-616}, gp130_{ΔD4-D6(Δ329-613)} und gp130_{ΔD4-D6(Δ329-613),SΔ614-616} wurden initial kloniert und deswegen als erstes die Proteinexpression untersucht. Dafür wurden die gp130 Varianten in CHO-K1 Zellen transient transfiziert. Es wurden die Plasmide pcDNA3.1-gp130_{ΔD4-D6(Δ322-613),SΔ614-616}, pcDNA3.1-gp130_{ΔD4-D6(Δ322-613),SΔ614-617}, pcDNA3.1-gp130_{ΔD4-D6(Δ322-613),SΔ614-618}, pcDNA3.1-gp130_{ΔD4-D6(Δ322-613),SΔ614-619}, pcDNA3.1-gp130_{Δ614-616}, pcDNA3.1-gp130_{ΔD4-D6(Δ322-613)}, pcDNA3.1-gp130_{ΔD4-D6(Δ329-613)} und pcDNA3.1-gp130_{ΔD4-D6(Δ329-613),SΔ614-616} verwendet. Es wurden CHO-K1 Zellen für 48 Stunden mit 5 µg DNA inkubiert und im Anschluss für die SDS-PAGE vorbereitet.

Ergebnisse

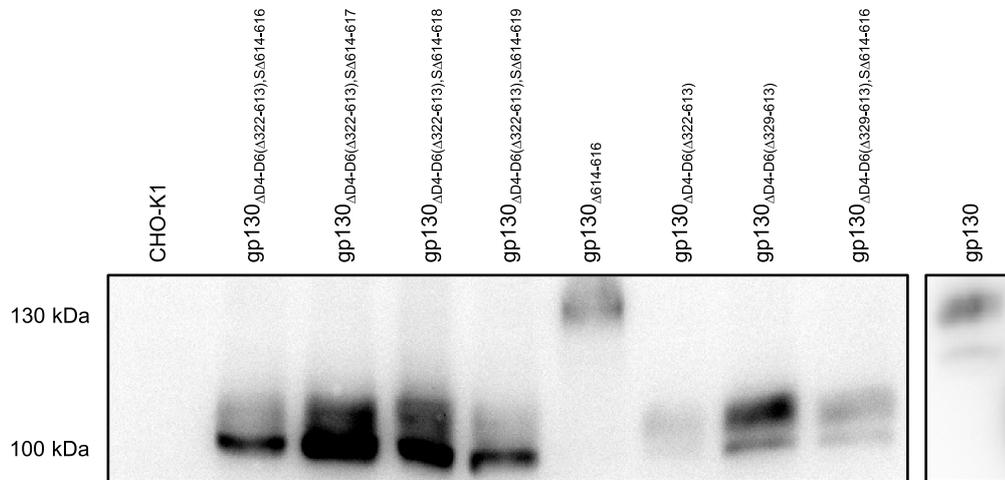


Abbildung 3.54: Expression von gp130 und den Deletionsvarianten aus CHO-K1 Zellen. CHO-K1 Zellen wurden mit 5 µg Plasmid DNA, die für gp130_{AD4-D6(Δ322-613),SA614-616}, gp130_{AD4-D6(Δ322-613),SA614-617}, gp130_{AD4-D6(Δ322-613),SA614-618}, gp130_{AD4-D6(Δ322-613),SA614-619}, gp130_{Δ614-616}, gp130_{AD4-D6(Δ322-613)}, gp130_{AD4-D6(Δ329-613)} und gp130_{AD4-D6(Δ329-613),SA614-616} und gp130 kodierten transient transfiziert. Nach der Transfektion wurden diese für 48 Stunden inkubiert, um eine hohe Proteinexpression zu gewährleisten. Die Zelllysate wurden für die SDS-PAGE vorbereitet und 50 µg Gesamtprotein analysiert. Für den Nachweis von gp130 und der Deletionsvarianten wurde der Antikörper anti- myc (71D10) als primärer Antikörper benutzt. Der sekundäre Antikörper war Alexa-fluorTM 488 *goat anti-rabbit* IgG. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis aus zwei unabhängigen Experimenten (n=2).

Es wurden 50 µg Gesamtprotein aufgetragen. Als Kontrolle, dass CHO-K1 Zellen keine unspezifische Antikörperbindung induzieren, wurde das Lysat von untransfizierten CHO-K1 Zellen auch aufgetragen. Es wurde die Expression über einen myc-Antikörper (71D10) detektiert. Für die Varianten, bei denen die Domänen 4 bis 6 deletiert wurden, wurde eine ca. 100 kDa große Bande detektiert (Abbildung 3.54). Vorausgesagt wurde eine Proteingröße von ca. 72 kDa. Für gp130-Wildtyp (gp130) und gp130_{Δ614-616} wurde eine ca. 130 kDa große Bande detektiert, da bei diesen Varianten Domäne 4 bis 6 nicht deletiert wurde (Abbildung 3.54). Vorausgesagt wurde eine Proteingröße von ca. 105 kDa. Der Unterschied zwischen den vorausgesagten Proteingrößen und der detektierten Proteingrößen liegt an der Posttranslationalen Modifikation von Proteinen, z.B. durch Glykosilierungen. Dadurch wird zum einen die nicht Glykosilierte Variante und die Glykosilierte Variante detektiert. Aus diesem Experiment ging hervor, dass alle Varianten in CHO-K1 Zellen exprimiert wurden.

3.5.3 Die gp130 Varianten werden auf der Zelloberfläche von Ba/F3-Zellen exprimiert

Nach der retroviralen Transduktion der Varianten in Ba/F3-Zellen wurde die Oberflächenexpression der Proteine über die Methode der Durchflusszytometrie ermittelt. Dadurch konnte geklärt werden, ob die exprimierten Proteine auch zur Zelloberfläche transportiert werden. Dafür wurden 1×10^6 Zellen mit dem primären Antikörper B-R3 inkubiert, welcher ein gp130 spezifischer Antikörper ist. APC gekoppelte *goat anti-mouse* IgG pab sekundäre Antikörper wurden als sekundäre Antikörper verwendet.

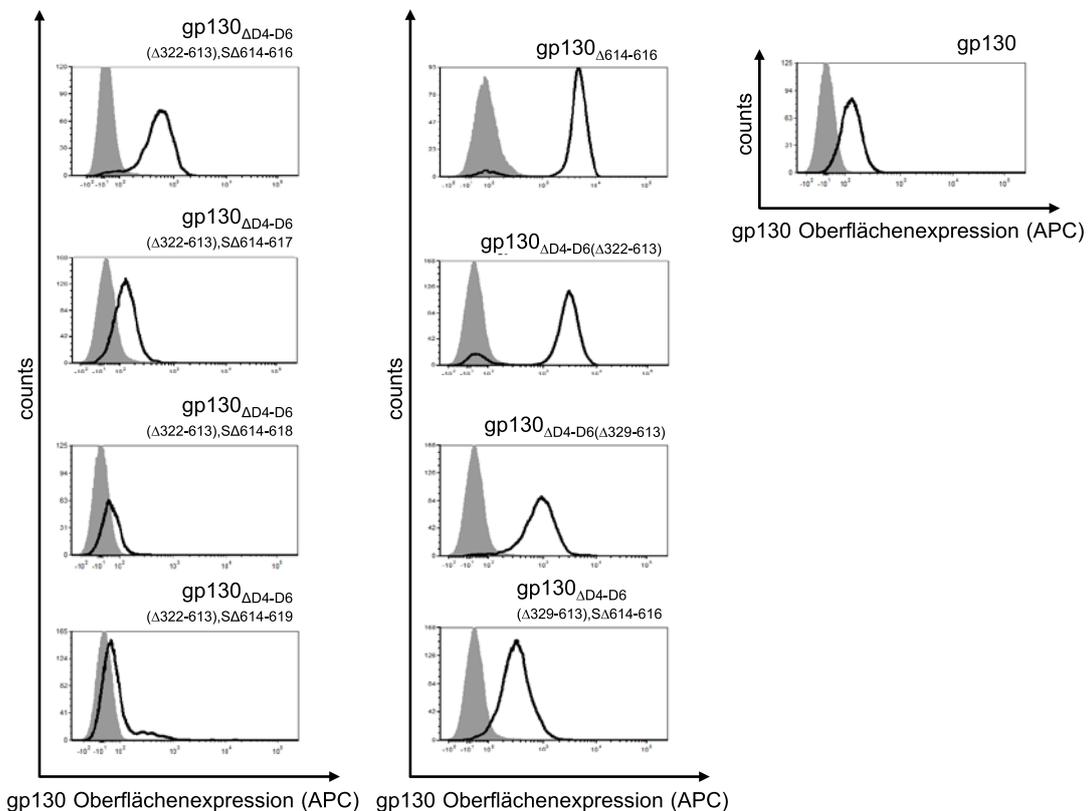


Abbildung 3.55: Durchflusszytometrie von Ba/F3-gp130-Zellen und gp130 Deletionsvarianten. Es wurde für die Durchflusszytometrie jeweils 1×10^6 Zellen verwendet. Diese wurden für zwei Stunden auf Eis mit dem primären Antikörper B-R3 in einer Verdünnung von 1:100 inkubiert. Danach erfolgte eine Inkubation mit dem sekundären Antikörper APC-gekoppelten *goat anti-mouse* IgG pab in einer Verdünnung 1:100 für eine Stunde bei 4°C. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Experimenten ($n=3$).

Ba/F3-gp130-Zellen wurden als Kontrolle verwendet (Abbildung 3.55). Zuerst wurden die Varianten nachgewiesen, bei denen die drei Fibronectin III-ähnlichen Domänen deletiert und die Stalkregion verkürzt wurde (Abbildung 3.55, $gp130_{\Delta D4-D6, SA614-616}$, $gp130_{\Delta D4-D6, SA614-617}$, $gp130_{\Delta D4-D6, SA614-618}$ und $gp130_{\Delta D4-D6, SA614-619}$). Danach erfolgte eine Detektion der Variante, die Domäne 1 bis 6 hatte, aber die Stalkregion Verkürzung trug (Abbildung 3.55 $gp130_{\Delta 614-616}$). Als nächstes wurde die Variante nachgewiesen, die die Deletion der

Domänen 4 bis 6 trug, aber die komplette Stalkregion besaß (Abbildung 3.55, gp130_{ΔD4-D6(Δ322-613)}). Es folgten die Varianten, bei denen die Linkersequenz zwischen Domäne 3 und 4 intakt gelassen wurde (Abbildung 3.57, gp130_{ΔD4-D6(Δ329-613)} und gp130_{ΔD4-D6(Δ329-613),SA614-616}). Als letztes wurde der gp130 Wildtyp nachgewiesen. Alle Varianten wurden somit auf der Zelloberfläche nachgewiesen, wodurch die Frage nach der Expression der neu erstellten Varianten und ob diese auf der Zelloberfläche exprimiert werden, geklärt wurde.

3.5.4 Die gp130 Varianten mit kombinierter Deletion der D4 bis D6 und der Stalkregion induzieren eine Zytokin-unabhängige STAT3 Phosphorylierung

Die gp130 Deletionsvarianten wurden konstruiert, um eine konstitutiv aktive Variante zu erhalten. Zur Analyse, welche gp130 Varianten konstitutiv aktiv sind, wurde die STAT3-Phosphorylierung von allen Varianten untersucht, da für konstitutiv aktives gp130 gezeigt wurde, dass STAT3 permanent phosphoryliert wird. Dafür wurden 1×10^6 Ba/F3-gp130-, Ba/F3-gp130_{ΔD4-D6,SA614-616}-, Ba/F3-gp130_{ΔD4-D6,SA614-617}-, Ba/F3-gp130_{ΔD4-D6,SA614-618}-, Ba/F3-gp130_{ΔD4-D6,SA614-619}-, Ba/F3-gp130_{Δ614-616}-, Ba/F3-gp130_{ΔD4-D6}-, Ba/F3-gp130_{Δ329-614}- und Ba/F3-gp130_{Δ329-614ΔS614-616}-Zellen pro Kondition eingesetzt. Danach wurden diese mit 10 ng/ml HIL-6 stimuliert. Dafür wurden die Zeitpunkte 0, 5, 15, 30, 60 und 120 Minuten gewählt. 0 Minuten wurde gewählt, da zu diesem Zeitpunkt noch keine Zytokinzugabe erfolgte und somit eine Kontrolle geschaffen wurde, um eine zytokinunabhängige STAT3-Phosphorylierung feststellen zu können. Ba/F3-gp130-Zellen wurden als Kontrolle für eine zytokinabhängige STAT3-Phosphorylierung analysiert. Dabei wurde ohne Zytokinzugabe keine STAT3-Phosphorylierung detektiert. Bis 30 Minuten nahm die STAT3-Phosphorylierung zu. Danach nahm sie ab (Abbildung 3.56 links und rechts oben).

Für die Varianten gp130_{ΔD4-D6,SA614-616}, gp130_{ΔD4-D6,SA614-617}, gp130_{ΔD4-D6,SA614-618} und gp130_{ΔD4-D6,SA614-619} wurde eine zytokinunabhängige STAT3-Phosphorylierung detektiert (Abbildung 3.56 links). Es wurde keine Zu- oder Abnahme in der Intensität der STAT3 Phosphorylierung nach HIL-6 stimulation detektiert.

Für die Variante gp130_{Δ614-616} wurde eine STAT3-Phosphorylierung detektiert, die vergleichbar war, mit der von Ba/F3-gp130-Zellen (Abbildung 3.56 rechts).

Für die Varianten gp130_{ΔD4-D6(Δ322-613)}, gp130_{ΔD4-D6(Δ329-613)} und gp130_{ΔD4-D6(Δ329-613)SA614-616} wurde keine STAT3-Phosphorylierung detektiert, auch nicht nach HIL-6 Stimulation (Abbildung 3.56 rechts). STAT3 wurde als Ladekontrolle für alle Western Blots verwendet.

Ergebnisse

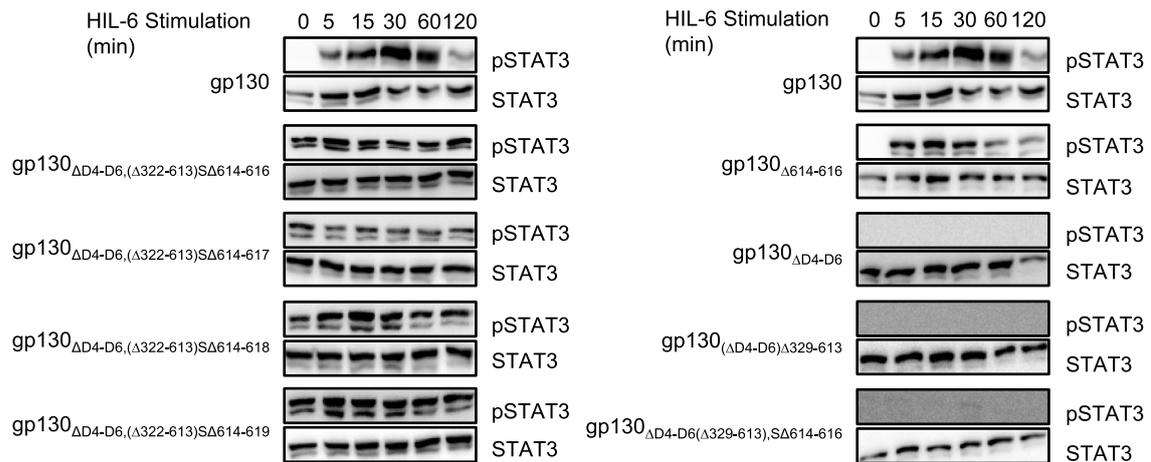


Abbildung 3.56: STAT3-Phosphorylierung von gp130 und den gp130 Deletionsvarianten. Jeweils 1×10^6 Ba/F3-gp130-, Ba/F3-gp130 $_{\Delta D4-D6,SA\Delta 614-616}$ -, Ba/F3-gp130 $_{\Delta D4-D6,SA\Delta 614-617}$ -, Ba/F3-gp130 $_{\Delta D4-D6,SA\Delta 614-618}$ -, Ba/F3-gp130 $_{\Delta D4-D6,SA\Delta 614-619}$ -, Ba/F3-gp130 $_{\Delta 614-616}$ -, Ba/F3-gp130 $_{\Delta D4-D6}$ -, Ba/F3-gp130 $_{\Delta 329-614}$ - und Ba/F3-gp130 $_{\Delta 329-614,SA\Delta 614-616}$ -Zellen wurden für die STAT3-Phosphorylierung pro Kondition eingesetzt. Die Zellen wurden für 5, 15, 30, 60 und 120 Minuten mit 10 ng/ml HIL-6 stimuliert. Dabei wurde der 0 Minutenwert ohne zugabe von Zytokin erhoben, um eine zytokinunabhängige STAT3-Phosphorylierung zu detektieren. Die Zellen wurden danach für die SDS-PAGE vorbereitet. Für den Western Blot wurden 50 μ g Gesamtprotein aufgetragen. Detektiert wurde pSTAT3, wobei STAT3 wurde als Kontrolle für die gleichmäßige Beladung der Gele detektiert wurde. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Experimenten ($n=3$).

Es wurde zudem die STAT3-Phosphorylierung in CHO-K1 Zellen untersucht. Da CHO-K1 Zellen endogen gp130 tragen, wurde durch Zugabe von 10 ng/ml HIL-6 das endogene gp130 stimuliert. Allerdings sollte nach der Transfektion von 5 μ g von ausgewählten konstitutiv aktiven Varianten, eine zytokinunabhängige STAT3-Phosphorylierung stattfinden. Es wurde in CHO-K1 Zellen eine Variante mit zytokinunabhängiger STAT3-Phosphorylierung untersucht (gp130 $_{\Delta D4-D6,SA\Delta 614-616}$), eine gp130 signalisierende (gp130 $_{\Delta 614-616}$), eine, die keine STAT3-Phosphorylierung zeigte (gp130 $_{\Delta D4-D6}$) und gp130-Wildtyp (gp130). Zudem wurde die STAT3-Phosphorylierung von untransfizierten CHO-K1 Zellen gezeigt, um eine zytokinunabhängige STAT3-Phosphorylierung bei diesen Zellen auszuschließen.

Ergebnisse

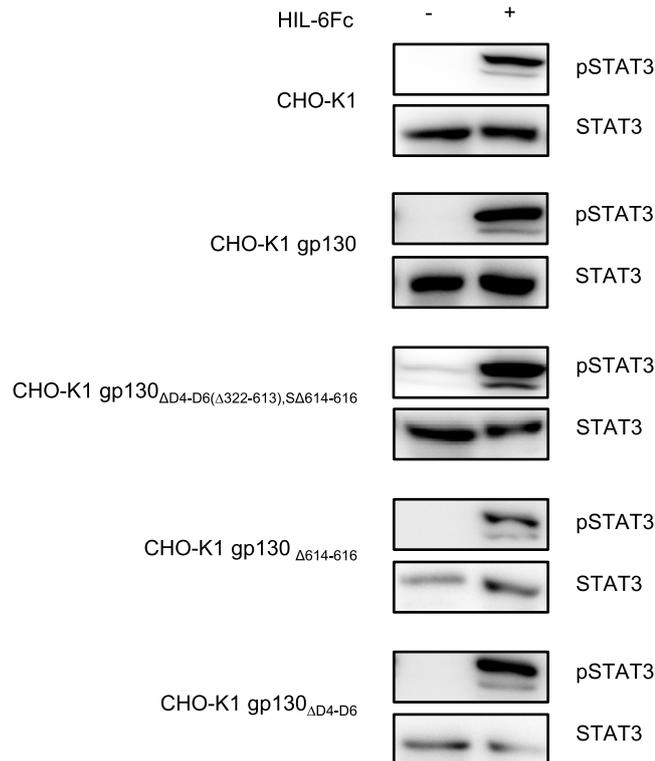


Abbildung 3.57: STAT3-Phosphorylierung ausgewählter gp130 Deletionsvarianten transfiziert in CHO-K1 Zellen. CHO-K1 Zellen wurden transient mit 5 μ g DNA der Plasmide pcDNA3.1-gp130, pcDNA3.1-gp130 Δ D4-D6, Δ S Δ 614-616, pcDNA3.1-gp130 Δ 614-616 und pcDNA3.1-gp130 Δ D4-D6 transfiziert. Dabei wurde gp130-Wildtyp, gp130 Δ D4-D6, Δ S Δ 614-616 als zytokinunabhängige STAT3-Phosphorylierungsvariante, gp130 Δ 614-616 als gp130 ähnliche Variante und gp130 Δ D4-D6 als nicht induzierbare Variante transfiziert. Die Zellen wurden 48 Stunden nach der Transfektion mit 10 ng/ml HIL-6 für 30 Minuten stimuliert. Im Anschluss wurden diese für die SDS-PAGE vorbereitet. Für den Western Blot wurden 50 μ g Gesamtprotein aufgetragen. Detektiert wurde pSTAT3, wobei STAT3 wurde als Kontrolle für die gleichmäßige Beladung der Gele detektiert wurde. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis aus zwei unabhängigen Experimenten (n=2).

Es wurde nur bei der Variante gp130 Δ D4-D6, Δ S Δ 614-616 eine schwache zytokinunabhängige STAT3-Phosphorylierung gezeigt, was mit den Ergebnissen aus den Ba/F3-Zellen in Einklang ist. Bei den anderen Varianten wurde erst nach Zugabe von 10 ng/ml eine STAT3-Phosphorylierung induziert. Auch dies stimmt mit den Ergebnissen aus Ba/F3-gp130-Zellen überein (Abbildung 3.57). Es wurden zum einen gp130 Deletionsvarianten generiert, die konstitutiv aktiv sind. Zum anderen wurden Deletionsvarianten generiert, die gar keine STAT3 Phosphorylierung induzieren.

3.5.5 Die konstitutiv aktiven gp130 Varianten induzieren liganden unabhängige ERK1/2 Phosphorylierung

Es wurde für einige konstitutiv aktive Varianten von gp130 bereits gezeigt, dass sie keine ERK1/2-Phosphorylierung induzieren (Rebouissou, *et al.* 2009). Daher wurden die hier

Ergebnisse

beschriebenen konstitutiv aktiven gp130 Varianten ebenfalls auf die Phosphorylierung der ERK1/2-Proteine untersucht. Da nur die Varianten gp130_{ΔD4-D6,SA614-616}, gp130_{ΔD4-D6,SA614-617}, gp130_{ΔD4-D6,SA614-618} und gp130_{ΔD4-D6,SA614-619} eine zytokinunabhängige STAT3-Phosphorylierung zeigten (Abbildung 3.58), wurde die Variante gp130_{ΔD4-D6,SA614-616} exemplarisch im Vergleich mit Wildtyp-gp130 untersucht. Die gp130-ähnliche Varianten (gp130_{Δ614-616}) wurde ebenfalls untersucht, da diese eine gleiche ERK-Phosphorylierung wie gp130 zeigen sollte, analog zu den Ergebnissen der STAT3-Phosphorylierung. Zudem wurde die Variante gp130_{ΔD4-D6} mit untersucht, da diese keine STAT3-Phosphorylierung zeigte. Diese sollte ebenfalls keine ERK-Phosphorylierung zeigen. Dafür wurden 1x10⁶ Ba/F3-gp130-, Ba/F3-gp130_{ΔD4-D6,SA614-616}-, Ba/F3-gp130_{Δ614-616}- und Ba/F3-gp130_{ΔD4-D6}-Zellen pro Kondition eingesetzt. Die Zellen wurden für 30 Minuten mit 10 ng/ml HIL-6-Fc stimuliert. Es wurde bei 0 Minuten eine Kontrolle ohne Zytokinzugabe erhoben, um einen Vergleich zwischen stimuliert und unstimuliert zu erhalten.

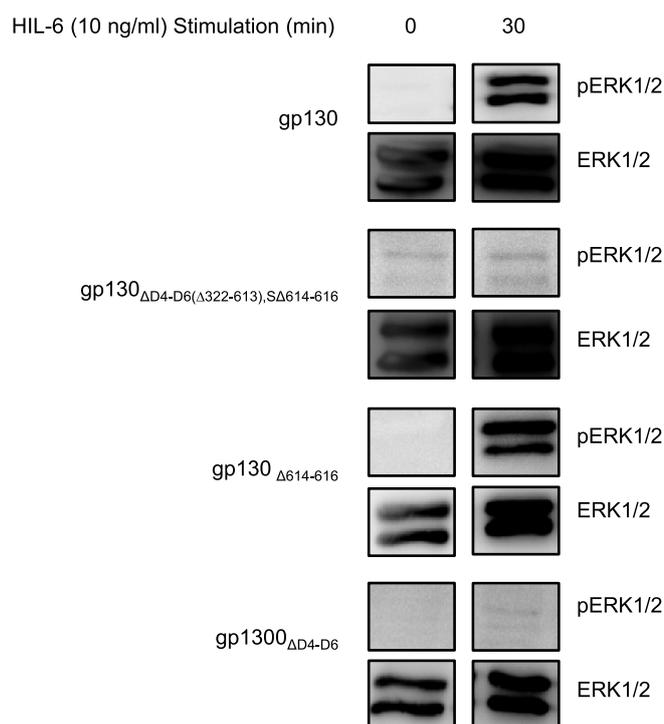


Abbildung 3.58: Phosphorylierung der *extracellular regulated kinasen* (ERK1/2). Für dieses Experiment wurden 1x10⁶ Ba/F3-gp130-, Ba/F3-gp130_{ΔD4-D6,SA614-616}-, Ba/F3-gp130_{Δ614-616}- und Ba/F3-gp130_{ΔD4-D6}-Zellen pro Kondition eingesetzt. Die Zellen wurden entweder nicht stimuliert (0 Min), um eine inaktive Kontrolle zu erhalten. Die anderen Zellen wurden für 30 Minuten mit 10 ng/ml HIL-6 stimuliert. Die Zellen wurden im Anschluss für die SDS-PAGE vorbereitet. Es wurde 50 µg Gesamtprotein für den Western Blot aufgetragen. Der Nachweis erfolgte über den pERK1/2 Antikörper. Als Ladekontrolle wurde der Antikörper gegen ERK1/2 verwendet. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Experimenten (n=3).

Für die Kontrollzellen Ba/F3-gp130 wurde nach Zytokinzugabe eine ERK-Phosphorylierung detektiert. Dies zeigte sich ebenfalls für die Zelllinien Ba/F3-gp130_{Δ614-616} (Abbildung 3.58). Für die Zelllinien Ba/F3-gp130_{ΔD4-D6,SΔ614-616} und Ba/F3-gp130_{ΔD4-D6} wurde keine ERK-Phosphorylierung detektiert (Abbildung 3.58). Bei den Zelllinien Ba/F3-gp130_{ΔD4-D6,SΔ614-616} und Ba/F3-gp130_{ΔD4-D6} fehlen die Domänen D4 bis D6. Hier kann ausgesagt werden, dass diese für die Phosphorylierung des ERK1/2 Proteins essentiell sind, wodurch bei einer Deletion dieser Domänen keine ERK1/2 Phosphorylierung erfolgt (Kurth, *et al.* 2000).

3.5.6 Die STAT3 Phosphorylierung wird durch den Janus Kinase Inhibitor P6 inhibiert

Durch die vorangegangenen Experimente wurde die Erkenntnis gewonnen, dass die Aktivierung der Januskinasen für die zytokinunabhängige STAT3-Phosphorylierung verantwortlich ist. Um dies zu untersuchen, wurde die Januskinaseaktivität durch den pan-Jak Inhibitor Pyridone 6 (P6) inhibiert (Thompson, *et al.* 2002). Für dieses Experiment wurden 1×10^6 Zellen pro Kondition verwendet. Die Zellen, welche mit 10 mM P6 behandelt wurden, wurden während der Zytokinenzugsphase bereits mit P6 präinkubiert. Es wurden die Konditionen unstimuliert (0 Minuten), unstimuliert mit P6 (0 Minuten + P6), stimuliert (30 Minuten), stimuliert mit P6 (30 Minuten, + P6) und DMSO als Bedingungen festgesetzt. DMSO wurde als Kontrolle verwendet, da P6 in DMSO gelöst wurde und so ausgeschlossen wurde, dass durch DMSO eine STAT3-Phosphorylierung induziert wurde. Unstimulierte Zellen wurden mituntersucht, da zum einen eine zytokinunabhängige STAT3-Phosphorylierung detektiert wurde und zum anderen um auszuschließen, dass P6 alleine eine STAT3-Phosphorylierung induziert. Die Stimulation mit 10 ng/ml HIL-6 bei Ba/F3-gp130-Zellen wurde als Kontrolle für die Induzierbarkeit der Zellen untersucht. Zudem wurde eine Kontrolle mit einbezogen, die eine zytokinabhängige STAT3-Phosphorylierung und die damit verbundene Inhibition durch Zugabe von P6 zeigen konnte bei einigen Zelllinien. Die Zugabe von 10 ng/ml HIL-6 mit P6 wurde als Inhibitionsprobe angesehen.

Ergebnisse

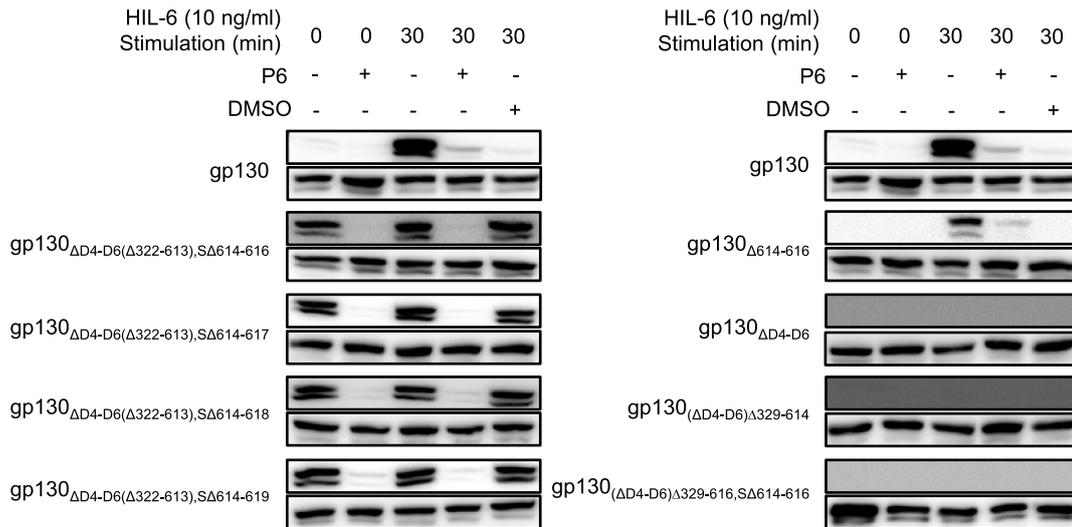


Abbildung 3.59: Inhibition der STAT3-Phosphorylierung von gp130 und gp130 Deletionsvarianten durch P6. Es wurden 1×10^6 Ba/F3-gp130-, Ba/F3-gp130_{ΔD4-D6,SΔ614-616}-, Ba/F3-gp130_{ΔD4-D6,SΔ614-617}-, Ba/F3-gp130_{ΔD4-D6,SΔ614-618}-, Ba/F3-gp130_{ΔD4-D6,SΔ614-619}-, Ba/F3-gp130_{Δ614-616}-, Ba/F3-gp130_{ΔD4-D6}-, Ba/F3-gp130_{Δ329-614}- und Ba/F3-gp130_{Δ329-614,SΔ614-616}-Zellen pro Kondition eingesetzt. Die mit dem Inhibitor behandelten Zellen wurden mit dem Inhibitor präkultiviert (10 mM P6). Es wurde eine Kontrolle mit DMSO angesetzt, da der Inhibitor in DMSO gelöst wurde und somit eine mögliche DMSO abhängige STAT3-Phosphorylierung detektiert worden wäre. Die Zellen wurden durch Zugabe von 10 ng/ml HIL-6 für 30 Minuten stimuliert. Es wurden zudem unstimulierte Zellen verwendet (0 Min), um eine zytokinunabhängige STAT3-Phosphorylierung anzuzeigen. Ebenfalls wurde P6 zu unstimulierten Zellen hinzugegeben, um eine Inhibition bei manchen Varianten anzuzeigen, die zytokinunabhängig STAT3 phosphorylieren. Für den Western Blot wurden 50 µg Gesamtprotein aufgetragen. Detektiert wurde pSTAT3, wobei STAT3 wurde als Kontrolle für die gleichmäßige Beladung der Gele detektiert wurde. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Experimenten (n=3).

Die Zelllinie Ba/F3-gp130 wurde als Kontrollzelllinie verwendet und ist deswegen links und rechts abgebildet (Abbildung 3.59). Für Ba/F3-gp130 wurde eine zytokinabhängige STAT3-Phosphorylierung detektiert. Diese wurde durch die Zugabe des Inhibitors P6 (10 mM) inhibiert. Durch DMSO wurde keine STAT3-Phosphorylierung aktiviert (Abbildung 3.59). Bei den Zelllinien Ba/F3-gp130_{ΔD4-D6,SΔ614-616}, Ba/F3-gp130_{ΔD4-D6,SΔ614-617}, Ba/F3-gp130_{ΔD4-D6,SΔ614-618} und Ba/F3-gp130_{ΔD4-D6,SΔ614-619} wurde bereits im Vorfeld eine zytokinunabhängige STAT3-Phosphorylierung detektiert (Abbildung 3.59). Dies wurde auch hier gezeigt. Durch P6 wurde auch ohne Zugabe von 10 ng/ml HIL-6 die STAT3-Phosphorylierung in diesen Zelllinien inhibiert. (Abbildung 3.59). Die Zelllinie Ba/F3-gp130_{Δ614-616} zeigte die gleiche STAT3-Phosphorylierung wie Ba/F3-gp130-Zellen nach HIL-6 stimulation. Die restlichen Zelllinien Ba/F3-gp130_{ΔD4-D6}, gp130_{ΔD4-D6(Δ329-613)} und gp130_{ΔD4-D6(Δ329-613),SΔ614-616} zeigten nach HIL-6 stimulation keine STAT3 Phosphorylierung und somit auch keine Inhibition durch P6 (Abbildung 3.59). Hier wurde gezeigt, dass das beobachtete *signaling* der konstitutiv aktiven gp130 Varianten über die Januskinasen induziert wird.

3.5.7 Inhibition der Proliferation durch den Januskinase Inhibitor P6

Ergänzend zu den Ergebnissen der STAT3-Phosphorylierung wurde auch untersucht, ob die Proliferation von Ba/F3-Zellen durch P6 inhibiert wurde. Dafür wurde in Ba/F3-gp130-Zellen die Konstrukte gp130_{ΔD4-D6,SA614-616}, gp130_{ΔD4-D6,SA614-617}, gp130_{ΔD4-D6,SA614-618} und gp130_{ΔD4-D6,SA614-619} retroviral transduziert. Ba/F3-Zellen proliferieren Interleukin-3 abhängig (Gearing, *et al.* 1994). Ba/F3-gp130-Zellen wurden umgewöhnt von einer IL-3 abhängigen (pSTAT5) auf eine HIL-6 abhängige (pSTAT3) Proliferation. Dadurch wurde zu einer Zelllinie, welche bereits eine gp130-abhängige Zellproliferation zeigte, eine weitere gp130 Variante transduziert. Als Kontrolle wurden gp130-Wildtyp exprimierende Zellen verwendet. 5x10³ Zellen wurden für 72 Stunden inkubiert. Dabei wurden verschiedene Konditionen angesetzt. Die erste Kondition waren die Zellen ohne Zugabe von 10 ng/ml HIL-6 oder 10 mM P6. Danach wurde bei der zweiten Kondition 10 ng/ml HIL-6 hinzugefügt, um eine Proliferation zu detektieren. Als letztes wurde zu der Zugabe von 10 ng/ml HIL-6 noch 10 mM P6 hinzugefügt, um die Inhibition der Proliferation zu zeigen.

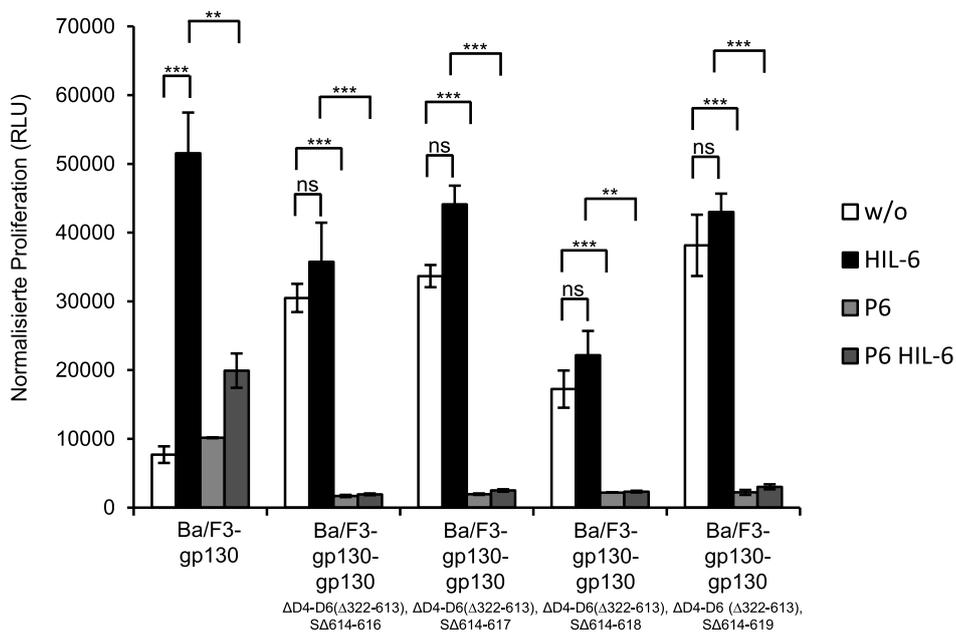


Abbildung 3.60: Inhibition der Proliferation von gp130 und gp130 Deletionsvarianten durch P6. 5x10³ Ba/F3-gp130-, Ba/F3-gp130-gp130_{ΔD4-D6,SA614-616}-, Ba/F3-gp130-gp130_{ΔD4-D6,SA614-617}-, Ba/F3-gp130-gp130_{ΔD4-D6,SA614-618}- und Ba/F3-gp130-gp130_{ΔD4-D6,SA614-619}-Zellen wurden für 72 Stunden unter verschiedenen Konditionen inkubiert. Die erste Kondition war ohne Zytokinzugabe (weiß w/o). Bei der zweiten Kondition wurde 10 ng/ml HIL-6 hinzugegeben (schwarz (HIL-6)). Bei der dritten Kondition wurde 10 mM P6 hinzugegeben (hellgrau P6). Bei der vierten Kondition wurde 10 mM P6 und 10 ng/ml HIL-6 hinzugegeben (dunkelgrau P6 HIL-6). Die Signifikanz wurde durch einen *Students-TTest* ermittelt und wurde zwischen signifikant (*) und sehr hoch signifikant (***) eingestuft. Die Absorption wurde im Tecan Reader bei einer Wellenlänge von 560 nm gemessen. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Experimenten (n=3).

Ergebnisse

Bei Ba/F3-gp130-Zellen wurde ohne die Zugabe von 10 ng/ml HIL-6 keine Proliferation induziert. Erst durch Zugabe von 10 ng/ml HIL-6 wurde eine Proliferation induziert (Abbildung 3.60). Wurde 10 ng/ml HIL-6 zusammen mit 10 mM P6 kultiviert, wurde eine Hemmung der Proliferation gemessen (Abbildung 3.60). P6 alleine induzierte keine Proliferation. Für die Zelllinien Ba/F3-gp130-gp130 Δ D4-D6,S Δ 614-616, Ba/F3-gp130-gp130 Δ D4-D6,S Δ 614-617, Ba/F3-gp130-gp130 Δ D4-D6,S Δ 614-618 und Ba/F3-gp130-gp130 Δ D4-D6,S Δ 614-619 wurde eine zytokinunabhängige Proliferation gemessen, welche durch die Zugabe von 10 ng/ml HIL-6 nicht verstärkt wurde (Abbildung 3.60). Durch Zugabe von 10 mM P6 wurde trotz Zugabe von HIL-6 die Proliferation sehr stark inhibiert (Abbildung 3.60). Auch bei der alleinigen Zugabe von 10 mM P6 wurde die Proliferation inhibiert. Die Zelllinien zeigten eine zytokinunabhängige STAT3 Phosphorylierung, die durch HIL-6 nicht verstärkt wurde. Durch die Inhibition über den Januskinase Inhibitor P6 wurde gezeigt, dass eine Hemmung nur durch Inhibition der mit gp130 agierenden Proteine möglich war. Es bleibt die Frage offen, ob HIL-6 den konstitutiv aktiven Komplex binden kann und ob eine Inhibition von gp130 z.B. durch den gp130 Antikörper B-R3 eine Auswirkung auf die konstitutive Aktivierung hat.

3.5.8 HIL-6-Fc bindet an den gp130-Komplex

Für die Analyse, ob HIL-6-Fc weiterhin die konstitutiv aktiven gp130 Δ D4-D6,S Δ 614-616 Deletionsvariante binden kann, wurde eine Präzipitation über den Fc-Teil von HIL-6 mit Protein-A Agarose *beads* durchgeführt. Damit wurde auch ausgesagt, ob gp130 korrekt gefaltet war. Als Kontrolle wurden Ba/F3-gp130-myc-Zellen verwendet. Die Zellen wurden für die Analyse durch eine SDS-PAGE vorbereitet.

Ergebnisse

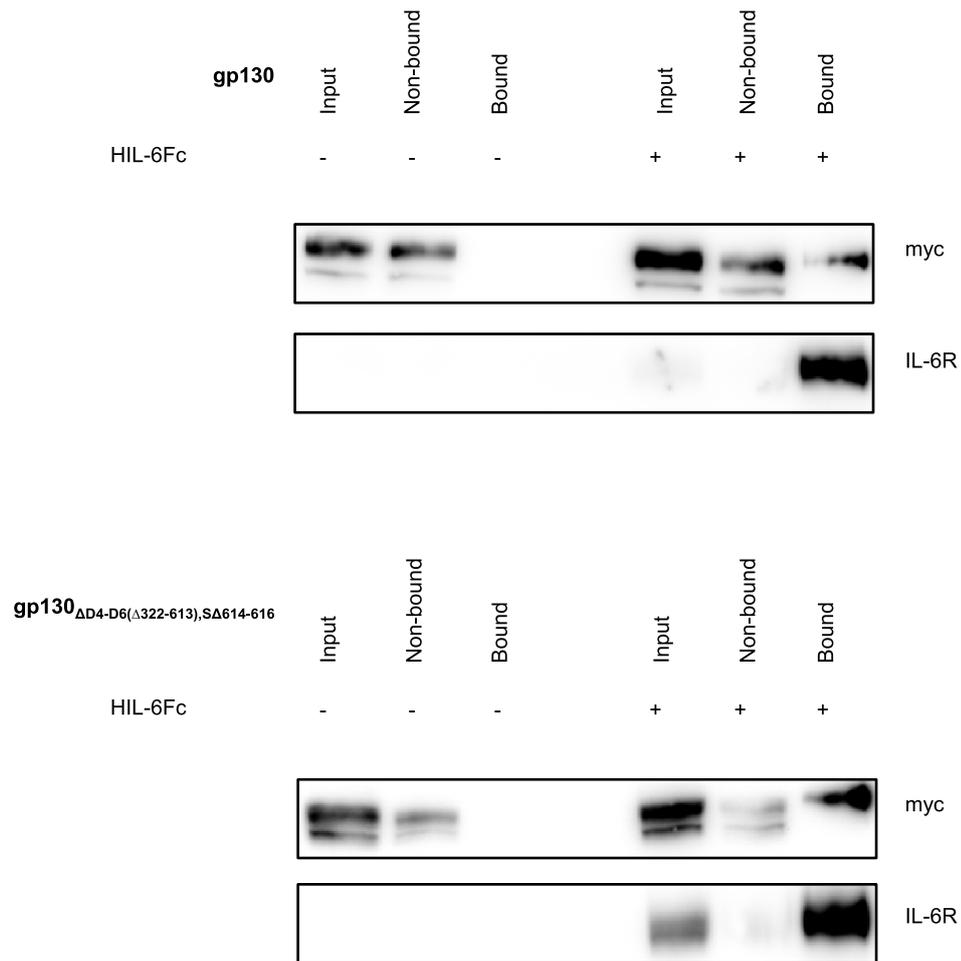


Abbildung 3.61: Kopräzipitation von gp130 und HIL-6-Fc durch Protein-A Agarose beads. 1×10^7 Zellen wurden für die Kopräzipitation verwendet. Dafür wurden die Zellen für 30 Minuten mit oder ohne 5 $\mu\text{g/ml}$ HIL-6-Fc inkubiert. Danach wurden die Zellen lysiert und über Protein A-Agarose beads präzipitiert. Im Anschluss wurden die Zellen für die SDS-PAGE vorbereitet. Es wurde im Western Blot durch den myc Antikörper (71D10) nachgewiesen, dass gp130 bzw. gp130_{ΔD4-D6,SA614-616} von HIL-6-Fc gebunden wurde. Der anti-IL-6R Antikörper wurde für den Nachweis von HIL-6-Fc verwendet. Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis aus drei unabhängigen Experimenten ($n=3$).

Es wurde die *Input*-Fraktion aufgetragen. Dort wurden alle verwendeten Proteine detektiert (Abbildung 3.61). Ohne Zugabe von HIL-6-Fc wurde durch den anti-IL-6R Antikörper kein Signal detektiert. Bei der Zugabe von 5 $\mu\text{g/ml}$ HIL-6-Fc wurde ein Signal detektiert. Bei der anti-myc-Antikörper Detektion wurden in allen gezeigten Blots Proteine detektiert, da gp130 bzw. gp130_{ΔD4-D6,SA614-616} in allen Lysaten vorhanden war (Abbildung 3.61). Bei der *Nonbound*-Fraktion wurden die Proteine detektiert, die nicht an die *beads* gebunden hatten. Hier wurde durch den anti-myc-Antikörper eine Bande detektiert, da gp130 in allen Lysaten vorhanden war. Durch den anti-IL-6R-Antikörper wurde nur bei der Zugabe von HIL-6Fc eine Bande detektiert (Abbildung 3.61).

Ergebnisse

Bei der *Bound*-Fraktion wurden nur die an die *beads* gebundenen Proteine detektiert. Es wurde durch den anti-myc-Antikörper gp130 in den Lysaten, bei denen HIL-6-Fc hinzugegeben wurde, detektiert. Dieses Ergebnis wurde auch für den anti-IL-6R-Antikörper detektiert (Abbildung 3.61).

Es wurde für HIL-6-Fc festgestellt, dass der Komplex gp130_{ΔD4-D6,SA614-616} auf der Zelloberfläche von HIL-6-Fc gebunden wurde. Somit wurde bei der STAT3 Phosphorylierung trotz Bindung von HIL-6-Fc das maximale Signal detektiert und konnte nicht durch HIL-6-Fc verstärkt werden. STAT3 wurde durch die konstitutiv aktiven Varianten maximal phosphoryliert.

Insgesamt wurde in diesem Abschnitt der Arbeit gezeigt, dass durch Deletionen der Stalkregion und der Domäne 4 bis 6 gp130 konstitutiv aktiv wird. Das konstitutiv aktive *signaling* induziert die STAT3 Phosphorylierung. Die Phosphorylierung der ERK1/2 Proteins wird dabei nicht aktiviert ausgesetzt. Die *signaling* Aktivität wird über die Januskinasen vermittelt. HIL-6-Fc kann den gp130 Komplex auf der Zelloberfläche zwar binden, beeinflusst das *signaling* allerdings nicht.

Es wurden zudem Deletionsvarianten von gp130 erstellt, die keine STAT3 und ERK1/2 Phosphorylierung mehr induzieren.

4 Diskussion

4.1 Warum ist sgp130(Fc) ein selektiver Inhibitor des IL-6 *Trans-signalings*?

Sgp130Fc hat die einzigartige Eigenschaft, dass es selektiv IL-6/IL-11 *Trans-signaling* hemmt (Jostock, *et al.* 2001, Lokau, *et al.* 2016). Warum sgp130(Fc) nicht dazu in der Lage ist, klassisches IL-6 *signaling* zu hemmen, war zu Beginn dieser Studie völlig unklar (Jostock, *et al.* 2001). Insbesondere da sich sgp130(Fc) aktuell in einer klinischen Phase II Studie bei Patienten mit Colitis Ulcerosa und Morbus Crohn befindet, ist es von höchster Bedeutung, das Hemmprinzip von sgp130Fc zu verstehen (EudraCT Nummer: 2016-000205-36).

Die einzige Hypothese ging bislang davon aus, dass sgp130(Fc) aus sterischen Gründen nicht an membranständige IL-6:IL-6R- und IL-11:IL-11R-Komplexe binden kann (Heink, *et al.* 2017). Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde mittels Durchflusszytometrie untersucht, ob sgp130Fc an membranständige IL-6:IL-6R Komplexe binden kann. Dieses sehr einfache Experiment zeigte eindeutig, dass die fehlende Hemmung des klassischen *signalings* durch sgp130Fc nicht durch eine sterische Unzugänglichkeit an membranständige IL-6:IL-6R-Komplexe begründet sein kann, da eine Bindung von sgp130Fc an den membranständigen IL-6:IL-6R-Komplex nachgewiesen wurde. Zur Untermauerung dieser Ergebnisse wurden neuartige membranständige IL-6:IL-6R-Fusionsproteine geschaffen, in denen IL-6 durch flexible Peptidlinker an den membranständigen IL-6R fusioniert und damit in der klassischen *signaling* Position fixiert ist (Chen, *et al.* 2013). Auch an diese membranständigen Hyper-IL-6-Proteine konnte sgp130Fc binden.

Kürzlich wurde gezeigt, dass neben IL-6 auch IL-11 über den löslichen IL-11R durch *Trans-signaling* Zellen über gp130 aktivieren kann (Lokau, *et al.* 2016). Wie beim IL-6 *Trans-signaling* ist sgp130(Fc) auch ein selektiver Inhibitor des IL-11 *Trans-signalings* (Lokau, *et al.* 2016). Mittels membranständigen IL-11:IL-11R-Komplexen und membranständigen Hyper-IL-11-Fusionsproteinen konnte in dieser Arbeit auch eindeutig gezeigt werden, dass gp130Fc an diese membranständigen IL-11-Komplexe binden kann.

Vorangegangene Arbeiten haben gezeigt, dass eine Verkürzung der Stalkregion des IL-6R zu einem Funktionsverlust des Rezeptors führt, da eine Mindestlänge von 15 Aminosäuren

benötigt wird, um IL-6 in einer korrekten Art und Weise dem gp130 Rezeptor zu präsentieren (Baran, *et al.* 2013).

Um zu untersuchen, ob eine Verkürzung der Stalkregion zu einem Verlust der sgp130Fc Bindung an membranständige Hyper-IL-6-Proteine führt, wurde der Stalk um 15, 30 oder 45 Aminosäuren gekürzt. Es zeigte sich, dass die Varianten mbHIL-6 Δ 30 und stärker ausgeprägt mbHIL Δ 45 zu einem geringeren Maß als mbHIL-6 Δ 15 und der Ausgangsvariante mbHIL-6 auf der Oberfläche exprimiert wurden (Baran, *et al.* 2013). Zwar wurde auch eine geringere Bindung von sgp130Fc an mbHIL-6 Δ 30 und mbHIL-6 Δ 45 Varianten beobachtet, jedoch kann nicht abschließend beurteilt werden, ob die geringere Bindung an der verminderten Oberflächenexpression von mbHIL-6 Δ 30 und mbHIL-6 Δ 45 lag, oder der verminderten Fähigkeit von sgp130Fc diese Komplexe zu binden.

Interessanterweise waren die Varianten mbHIL-6 Δ 30 und mbHIL-6 Δ 45 nicht mehr biologisch aktiv. Das bedeutet, dass sie anders als mbHIL-6 und mbHIL-6 Δ 15 bei einer Koexpression mit gp130 zu keiner Aktivierung des JAK/STAT Signalweges führten.

Die durchgeführten Experimente schließen demnach aus, dass es sich bei der fehlenden Hemmung des klassischen *signalings* durch sgp130(Fc) um ein sterisches Bindungsproblem zwischen IL-6:IL-6R-Komplexen und sgp130(Fc) handelt. Andere bislang nicht identifizierte Ursachen müssen demnach verantwortlich sein.

4.2 sgp130Fc hemmt das *Cluster-signaling*

Kürzlich wurde als dritter Weg der Rezeptoraktivierung über IL-6 das *Cluster-signaling* beschrieben. Hierbei trägt eine Transmitter-Zelle membranständige IL-6:IL-6R-Komplexe, die in der Lage sind, über Zell-Zell-Kontakte Empfänger-Zellen, die gp130 exprimieren, zu aktivieren (Heink, *et al.* 2017). Interessanterweise wurde beschrieben, dass IL-6 und der IL-6R das *Cluster-signaling* zwar initiieren, aber sgp130Fc nicht dazu in der Lage ist, das *Cluster-signaling* zu hemmen (Heink, *et al.* 2017). Unsere Daten aus den vorangegangenen Abschnitten legten nun die Vermutung nahe, dass sgp130Fc aufgrund der Interaktion mit membranständigen IL-6:IL-6R-Komplexen sehr wohl auch *Cluster-signaling* hemmen sollte.

Zu diesem Zweck wurde ein Kokultivierungssystem etabliert, welches auf den Transmitter-Zellen Ba/F3-IL-6R + IL-6 oder Ba/F3-mbHIL-6 (und Varianten) und den Empfänger-Zellen Ba/F3-gp130 basierte. Dieses System war mit kleinen Modifikationen nahezu iden-

tisch mit dem zuvor von Heink *et al.*, 2017 beschriebenen Verfahren (Heink, *et al.* 2017) und daher sehr gut mit unserem System vergleichbar.

Die Kokultivierungsexperimente zeigten eindeutig, dass die Empfänger-Zellen durch die Transmitter-Zellen aktiviert werden können. Die Aktivierung zeigte sich zum einen in einer STAT3 Phosphorylierung und zum anderen in einer pSTAT3-induzierten zellulären Proliferation der Empfänger-Zellen. Alle Experimente zeigten darüber hinaus, dass sgp130Fc dazu in der Lage war, *Cluster-signaling* zu hemmen.

In einem nächsten Schritt konnte dann gezeigt werden, dass auch IL-11 *Cluster-signaling* induzieren kann. Hierfür wurden sowohl membranständige IL-11:IL-11R-Komplexe, als auch membranständiges Hyper-IL-11 untersucht. Auch IL-11 *Cluster-signaling* ließ sich eindeutig durch sgp130Fc hemmen.

Da sowohl der IL-6R als auch der IL-11R durch ADAM-Proteasen gespalten werden können, musste experimentell ausgeschlossen werden, dass das *Cluster-signaling* nicht durch lösliche IL-6:IL-6R- und IL-11:IL-11R-Komplexe gestört wird bzw. ein Teil des *Cluster-signaling*s eigentlich auf *Trans-signaling* zurückzuführen war.

Um eine „Verunreinigung“ des *Cluster-signaling*s durch *Trans-signaling* auszuschließen, wurde zum einen während der Kokultivierung das *shedding* des IL-6R und des IL-11R über einen ADAM10/17 Inhibitor (GW) gehemmt. Zum anderen wurden eine Reihe von membranständigen Hyper-IL-6 und Hyper-IL-11-Varianten erstellt (Hyper-IL-6 Δ 15, Hyper-IL-6 Δ 30, Hyper-IL-6 Δ 45, Hyper-IL-6_{V563E}, Hyper-IL-6_{V563G} und Hyper-IL-11_{R355E}), die nicht mehr oder in deutlich geringerem Maße proteolytisch gesheddet werden können (Baran, *et al.* 2013, Lokau, *et al.* 2016, Riethmueller, *et al.* 2017).

Alle Experimente zeigten, dass lösliche IL-6:IL-6R-Komplexe keinen Einfluss auf das *Cluster-signaling* gehabt haben.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass sgp130(Fc) sowohl das bereits beschriebene IL-6-*Cluster-signaling* als auch das hier beschriebene IL-11-*Cluster-signaling* effektiv hemmt.

4.3 Autokrines klassisches und *Trans-signaling* lässt sich nicht durch sgp130(Fc) hemmen

Die überraschende Entdeckung, dass sgp130Fc an membranständige IL-6:IL-6R- und IL-11:IL-11R-Komplexe binden kann, wirft die Frage auf, welcher Mechanismus denn nun hinter der selektiven Hemmung des *Trans-signaling*s durch sgp130Fc steckt.

Daher wurde als nächstes untersucht, welchen Einfluss sgp130Fc und andere Inhibitoren des IL-6 Weges auf ein mögliches autokrines IL-6-Signal haben. Zu diesem Zweck wurden Ba/F3-Zellen erstellt, die eine Koexpression von gp130 und entweder IL-6:IL-6R, des membranständigen, oder löslichen Hyper-IL-6 Proteins aufwiesen. Wie erwartet, führte die Koexpression zur autokrinen Stimulation über klassisches *signaling* (IL-6:IL-6R und mbHIL-6) oder *Trans-signaling* (HIL-6). Interessanterweise konnte die zelluläre Inhibition in allen Fällen nur durch den Januskinaseinhibitor P6 erfolgen. Die externe Zugabe von Tocilizumab, IL-6R-Nanobodies oder sgp130Fc hatte hingegen keine hemmende Auswirkung. Vorangegangene Studien mit viralem IL-6 (vIL-6) hatten bereits nahegelegt, dass dieses virale Protein bereits eine gp130 Rezeptoraktivierung innerhalb der Zelle induziert (Meads and Medveczky 2004). VIL-6 stammt aus dem Humanen Herpesvirus 8 (HHV8) und ist ein wichtiger Pathogenitätsfaktor des Karposi-Sarkoms (Molden, *et al.* 1997, Müllberg, *et al.* 2000). Es aktiviert gp130 Rezeptoren auch in Abwesenheit des IL-6R (Molden, *et al.* 1997). Anti-vIL-6 neutralisierende ScFvs (single chain Fv antibodies) die zusammen mit vIL-6 koexprimiert wurden, konnten die gp130 Rezeptoraktivität unterdrücken, wurden sie allerdings von außen zu den Zellen gegeben, konnte vIL-6 nicht gehemmt werden (Kovaleva, *et al.* 2006).

In dieser Arbeit wurde nun gezeigt, das auch für IL-6:IL-6R und HIL-6-induzierten Komplexe eine Signaltransduktionsinitiation ebenfalls bereits im Inneren der Zelle erfolgte. Unerwarteterweise war koexprimiertes sgp130Fc jedoch nur dazu in der Lage, intrazelluläres *Trans-signaling* ausgelöst durch HIL-6 zu hemmen, jedoch erneut nicht das klassische *signaling* durch mbHIL-6.

Damit wurde gezeigt, dass neben vIL-6 auch humane IL-6:IL-6R-Komplexe bereits im Inneren der Zelle zu einer Aktivierung des gp130 Rezeptors führen können. Unklar ist weiterhin, ob diese Aktivierung bereits im Endoplasmatischen Retikulum, im Golgi-Apparat oder erst in der Membran der Transportvesikel erfolgt. Weiterhin bleibt unklar, warum sgp130Fc das klassische Signal nicht hemmt. Zukünftige Studien werden untersuchen, ob nicht nur gp130 Rezeptoren in der Membran als präformierte Komplexe vorliegen

Diskussion

(Tenhumberg, *et al.* 2006), sondern auch der IL-6R Teil dieser Komplexe ist und daher sgp130Fc aufgrund der einzigartigen Bindungsstöchiometrie und Abfolge der Bindung (IL-6 *site I* bindet initial an den IL-6R und erst dann bindet *site II* von IL-6 an die Domäne 1 von gp130 und *site III* von IL-6 an die Domäne 2 und 3 von gp130) einfach gesprochen keine Gelegenheit hat, an einmal gebildete IL-6:IL-6R:gp130 Komplexe auf der Zelloberfläche zu binden.

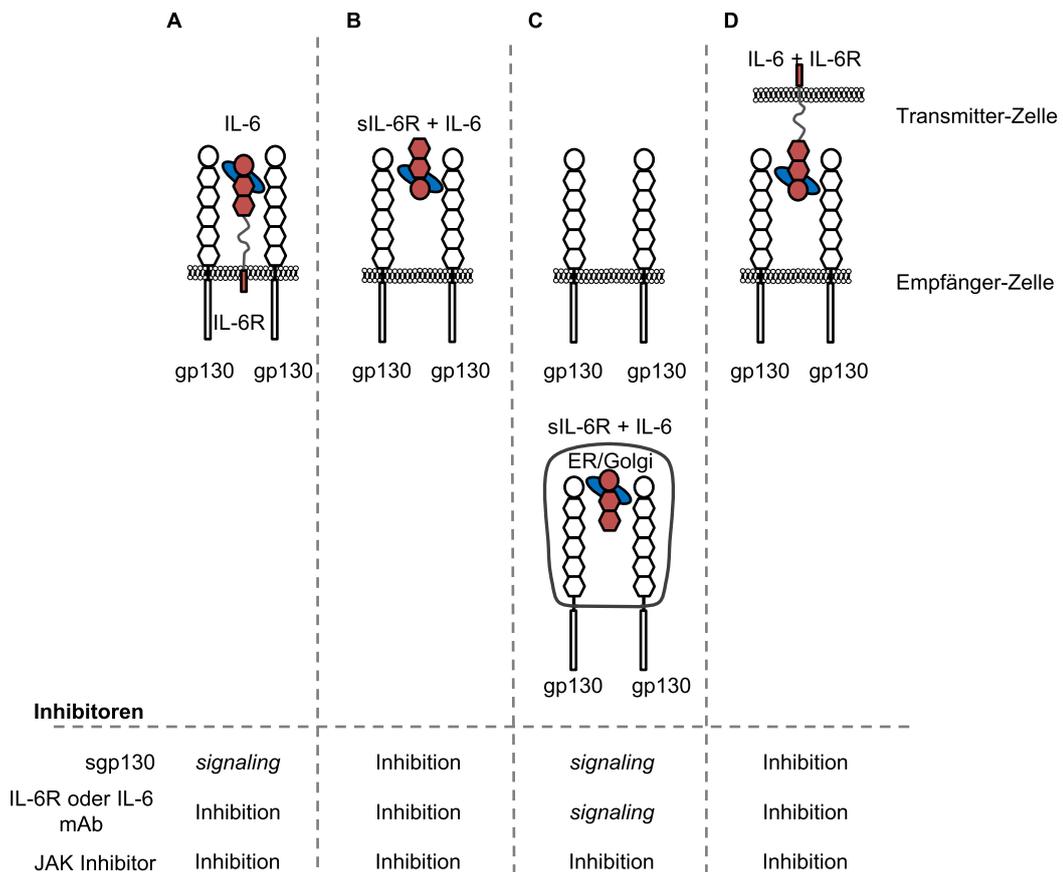


Abbildung 4.1: Übersicht über die Rezeptoraktivierungsarten und Wirkung der Inhibitoren. (A) Das klassische *signaling* wird über einen membranständigen IL-6R vermittelt, der nach der Bindung von IL-6 einen Komplex mit gp130 eingeht. Das klassische *signaling* wird durch sgp130Fc nicht inhibiert, aber durch IL-6R- oder IL-6-Antikörper und den Januskinaseinhibitor (B). *Trans-signaling* wird durch einen löslichen IL-6R mit IL-6 vermittelt. Sgp130Fc, IL-6R- oder IL-6-Antikörper und der Januskinaseinhibitor können *Trans-signaling* inhibieren (C). Aus den Experimenten geht hervor, dass der Komplex aus IL-6:IL-6R:gp130 bereits im Endoplasmatischen Retikulum (ER) oder Golgi-Apparat gebildet wird, wodurch bis auf P6 keiner der Inhibitoren das *signaling* hemmen kann (D). *Cluster-signaling* von einer Transmitter-Zelle zu einer Empfänger-Zelle wird durch die Inhibitoren sgp130, IL-6R- oder IL-6-Antikörper und den Januskinaseinhibitor gehemmt.

4.4 Deletion der Fibronectin-III Domänen und der Stalkregion resultiert in einen ligandenunabhängigen konstitutiv aktiven gp130 Rezeptor

Im zweiten Teil dieser Arbeit sollte untersucht werden, ob durch gezielte Deletionen im extrazellulären Bereich von gp130, ligandenunabhängige konstitutiv aktive gp130 Varianten erzeugt werden können.

Vorherige Arbeiten haben gezeigt, dass durch den Austausch des gesamten extrazellulären Bereichs von gp130 durch kurze Leucin-Zipper, ligandenunabhängige, konstitutiv aktive synthetische gp130 Rezeptoren erzeugt werden konnten (Stuhlmann-Laeisz, *et al.* 2006).

Interessanterweise führte eine komplette Deletion der extrazellulären Domäne zu keiner dauerhaft aktiven gp130 Variante (Stuhlmann-Laeisz, *et al.* 2006). Später wurde gezeigt, dass kleine *in-frame* Deletionen in der Domäne 2 von gp130 ebenfalls zu konstitutiv aktiven gp130 Rezeptoren führen. Diese Varianten wurden in Patienten mit inflammatorischen Leberzelladenom (IHCA) gefunden und waren an der Progression der Adenome beteiligt (Rebouissou, *et al.* 2009).

Hier wurde eine andere Strategie verfolgt, die auf einer Beobachtung im IL-23R beruht. Der IL-23R ist ein Teil des Rezeptorkomplexes des Zytokins IL-23 (Parham, *et al.* 2002). IL-23 gehört zur IL-12-Familie, die sehr eng mit der IL-6 Familie verwandt ist (Garbers, *et al.* 2012). Der IL-23R besitzt jedoch nur 3 extrazelluläre Domänen und eine 37 Aminosäuren lange Stalkregion und hat daher große strukturelle Ähnlichkeiten zum IL-6R (Franke, *et al.* 2016, Hummel, *et al.* 2017) (Abbildung 4.2). Der IL-23R ist jedoch anders als der IL-6R direkt an der Vermittlung der Signaltransduktion beteiligt. Für den IL-23R wurde nun kürzlich gezeigt, dass die Deletion der Stalkregion zu einer ligandenunabhängigen, konstitutiven Aktivierung eines homodimeren IL-23R-Komplexes führt (Hummel, *et al.* 2017) (Abbildung 4.2).

Es sollte daher untersucht werden, ob auch der verwandte gp130 Rezeptor durch Deletionen der Domänen 4 bis 6 mit oder ohne Deletion der Stalkregion konstitutiv aktiviert werden kann.

Im Unterschied zum IL-23R mit einer Stalkregion von 37 Aminosäuren, besitzt gp130 nur einen sehr kurzen Stalk mit einer Länge von 6 Aminosäuren. Interessanterweise führte die Verkürzung der gp130 Stalkregion um 3 Aminosäuren zu keiner funktionalen Beeinträchtigung des Rezeptors während die alleinige Deletion der Domänen 4 bis 6 zur Inaktivie-

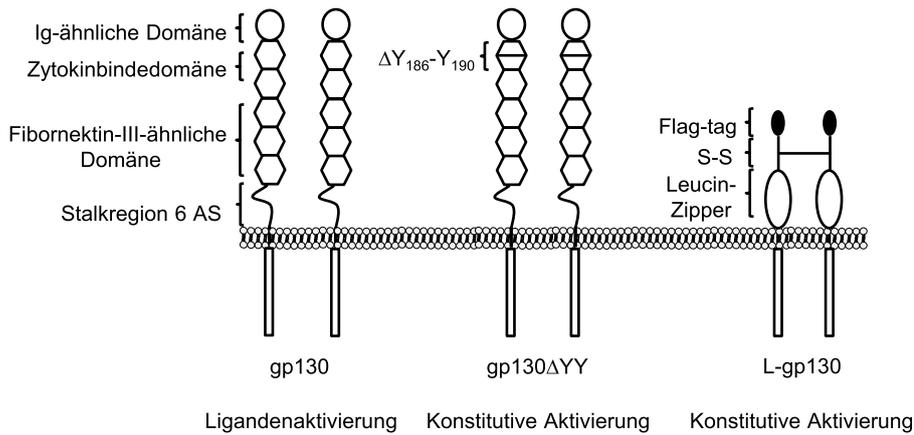
Diskussion

rung des Rezeptors führte. Nur die kombinierte Deletion der Domänen 4 bis 6 zusätzlich mit der Verkürzung der Stalkregion um 3 Aminosäuren führte zur konstitutiven Aktivierung der gp130 Rezeptorvarianten (Hummel, *et al.* 2017, Lamertz, 2018 #180) (Abbildung 4.2). Mittels Kopräzipitation konnte dann abschließend gezeigt werden, dass die konstitutiv aktive Variante gp130 $_{\Delta D4-D6(\Delta 322-613),S\Delta 614-616}$ immer noch in der Lage war, an das Zytokin HIL-6 zu binden. Dieser Befund legt den Schluss nahe, dass die Deletionsvariante gp130 $_{\Delta D4-D6(\Delta 322-613),S\Delta 614-616}$ im Bereich der Zytokinbindestellen der Domäne 1 bis 3 korrekt gefaltet war.

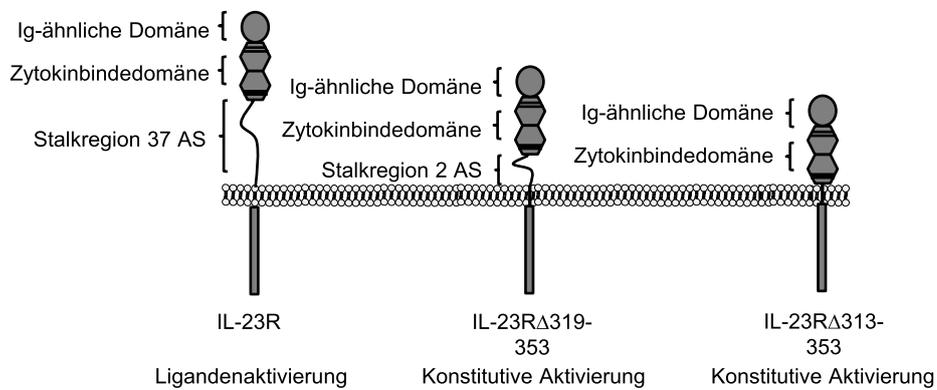
Zusammenfassend könnten die Ergebnisse in dieser Studie zu gp130 und in der Studie von Hummel *et al.*, zum IL-23R, einen neuartigen Weg aufzeigen, wie konstitutiv aktive Rezeptoren durch Deletionen im extrazellulären Rezeptorbereich erstellt werden können.

Diskussion

A



B



C

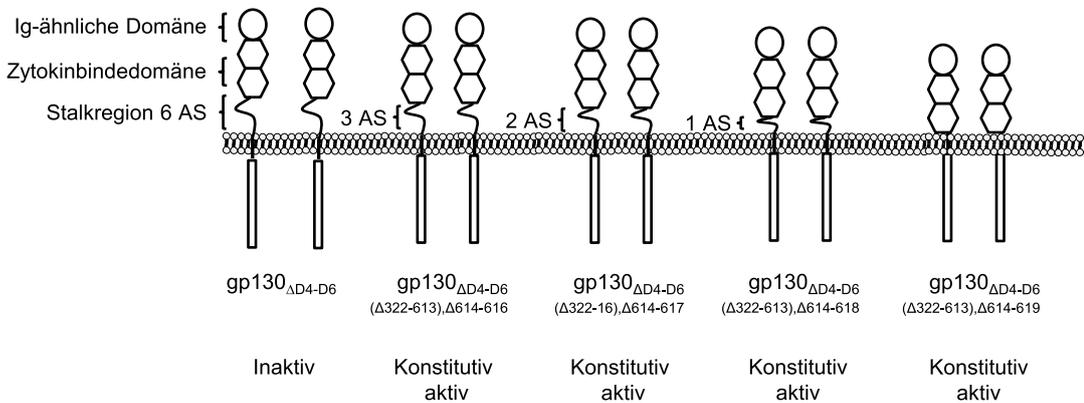


Abbildung 4.2: Vergleichende Darstellung der konstitutiv aktiven Varianten von gp130 und dem IL-23R. (A) Gp130 Wildtyp besteht aus einer Ig-ähnlichen Domäne, 2 Zytokinbindedomänen und 3 Fibronectin III-ähnlichen Domänen. Die Stalkregion ist 6 Aminosäuren lang, gefolgt von der Transmembrandomäne und der intrazellulären Domäne. Es wurden verschiedene konstitutiv aktive Varianten von gp130 experimentell erfasst. Zum einen gibt es im inflammatorischen Leberzelladenom (IHCA) eine Mutation in der Domäne 2, die eine Deletion von Y₁₈₆ bis Y₁₉₀ umfasst (Rebouissou, *et al.* 2009). Zum anderen wurde der extrazelluläre Teil vom gp130 abgetrennt und durch einen Leucin-Zipper ersetzt. Dieser wurde zur Detektion mit einem Flag-tag versehen (Stuhlmann-Laeisz, *et al.* 2006). **(B)** Für den IL-23R wurde gezeigt, dass eine Deletion der Stalkregion zu konstitutiv aktiven Varianten führt. Dabei wurde die 37 Aminosäuren lange Stalkregion zuerst um 35 Aminosäuren und dann komplett deletiert (Hummel, *et al.* 2017). **(B)** Diese Überlegung wurde auf gp130 übertragen, wobei dort zusätzlich noch die Domänen 4 bis 6 deletiert wurden. Eine Schrittweise Verkürzung der 6 Aminosäuren langen Stalkregion um zuerst 3, 4, 5 und allen Aminosäuren führte dazu, dass konstitutiv aktive Varianten entstanden (Lamertz, *et al.* 2018) **(C)**.

5 Zusammenfassung

Interleukin (IL-)6 ist ein wichtiger Regulator von entzündlichen Prozessen. Die Signalweiterleitung von IL-6 erfolgt über den membrangebundenen (klassisches *signaling*) oder den löslichen (*Trans-signaling*) Interleukin-6 Rezeptor (IL-6R). Dieser Komplex aus IL-6:IL-6R bindet an das signalweiterleitende, ubiquitär exprimierte Glykoproteine gp130. Kürzlich wurde gezeigt, dass es eine dritte *signaling* Art gibt, das *Cluster-signaling*. Es wird vermittelt durch IL-6:IL-6R Transmitter-Zellen, die gp130 auf Empfänger-Zellen aktivieren. Lösliches gp130 ist der spezifische Inhibitor des *Trans-signalings*. Warum sgp130(Fc) nicht dazu in der Lage ist, klassisches IL-6 *signaling* zu hemmen, war zu Beginn dieser Studie völlig unklar. In dieser Arbeit wurde die Interaktion von sgp130Fc mit natürlichen membrangebundenen IL-6:IL-6R Komplexen gezeigt. Diese Interaktion vermittelte die Hemmung des *Cluster-signalings* durch sgp130Fc. Zur Untermauerung dieser Ergebnisse wurden neuartige membranständige IL-6:IL-6R-Fusionsproteine geschaffen, in denen das IL-6 durch flexible Peptidlinker an den IL-6R fusioniert und damit in der klassischen *signaling* Position fixiert ist (Chen et al., 2013). Auch an diese membranständigen Hyper-IL-6-Proteine konnte sgp130Fc binden.

Interleukin-11 gehört zur Interleukin-6 Familie und wurde in dieser Arbeit untersucht. Dabei wurde gezeigt, dass sgp130Fc auch membranständige IL-11:IL-11R-Komplexe und Hyper-IL-11-Komplexe binden und hemmen kann. Somit ist sgp130Fc auch ein Inhibitor des *Trans-signalings* und *Cluster-signalings* von IL-11. Durch die Untersuchung wurde gezeigt, dass keine sterische Hinderung bei der Bindung von sgp130Fc an membrangebundene IL-6:IL-6R bzw. IL-11:IL-11R Komplexe vorliegt. Für die weitere Untersuchung, warum sgp130Fc klassisches *signaling* nicht hemmt, wurde das autokrine *signaling* durch die Koexpression von gp130 und entweder IL-6:IL-6R, membranständigem Hyper-IL-6 oder löslichem Hyper-IL-6 auf Zellen untersucht. Interessanterweise konnte autokrines *signaling* durch externe Inhibitoren wie sgp130Fc nicht gehemmt werden. Jedoch wurde eine Inhibition durch intrazelluläre Inhibitoren gezeigt. Dadurch kam die Vermutung auf, dass es hierbei bereits in der Zelle zur Signalinitiation kommt. Zukünftige Studien werden untersuchen, ob nicht nur gp130 in der Membran als präformierte Komplexe vorliegt, sondern auch der IL-6R Teil dieser Komplexe ist und daher sgp130Fc aufgrund der einzigartigen Bindungsstöchiometrie und Abfolge (IL-6 *site I* bindet an den IL-6R und dann bindet *site II* von IL-6 Domäne 1 von gp130 und *site III* Domäne 2 und 3 von gp130) keine Gele-

Zusammenfassung

genheit hat, an einmal gebildete IL-6:IL-6R:gp130 Komplexe auf der Zelloberfläche zu binden.

Ein wichtiges Mitglied der IL-6 Familie ist der gp130 Rezeptor. Gp130 besteht aus 6 extrazellulären Domänen, die über eine Stalkregion von 6 Aminosäuren mit der Transmembrandomäne und der intrazellulären Domäne verknüpft sind. Domäne 1 bis 3 werden für die Bindung der Zytokine benötigt. Domäne 4 bis 6 werden für die Aktivierung von gp130 benötigt, damit die Januskinasen nach erfolgter Bindung des Zytokins aktiviert werden können. Es wurde vorher gezeigt, dass durch den Austausch des gesamten extrazellulären Bereichs von gp130 durch kurze Leucin-Zipper, ligandenunabhängige, konstitutiv aktive synthetische gp130 Rezeptoren erzeugt werden konnten. Später wurde gezeigt, dass kleine *in-frame* Deletionen in der Domäne 2 von gp130 ebenfalls zu konstitutiv aktiven gp130 Rezeptoren führt. Für den IL-23R wurde nun kürzlich gezeigt, dass die Deletion der Stalkregion zu einer ligandenunabhängigen, konstitutiven Aktivierung eines homodimeren IL-23R-Komplexes führt. Es sollte daher untersucht werden, ob auch der verwandte gp130 Rezeptor durch Deletionen der Domänen 4 bis 6 mit oder ohne Deletion der Stalkregion konstitutiv aktiviert werden kann. In dieser Arbeit wurde nun gezeigt, dass Deletionen ab der Hälfte der Stalkregion in Kombination mit der Deletion der Domänen 4 bis 6 zu konstitutiv aktiven gp130 Varianten führt. Eine weitere Erkenntnis dieser Arbeit ist, dass die alleinige Deletion der Stalkregion um 3 Aminosäuren keine Auswirkung auf die *signaling* Aktivität von gp130 hat. Zudem wurde gezeigt, dass die Deletion der Domäne 4 bis 6 zu inaktiven gp130 Varianten führt. Für die konstitutiv aktiven Varianten wurde gezeigt, dass HIL-6-Fc immer noch in der Lage ist, den Komplex zu binden. Die Ergebnisse in dieser Studie zu gp130 zeigen einen neuartigen Weg, wie konstitutiv aktive Rezeptoren durch Deletionen im extrazellulären Rezeptorbereich erstellt werden können.

6 Summary

Interleukin-6 (IL-6) is a very important regulator of inflammatory processes. IL-6 signals via a membrane-bound or soluble IL-6 receptor (IL-6R) and the signal transducing gp130, which is referred to as classic or trans-signaling, respectively. Recently, cluster signaling was discovered, which is mediated by membrane-bound IL-6:IL-6R-complexes on transmitter cells triggering gp130 receptor activation on neighboring receiver cells. The soluble form of gp130 (sgp130) emerged as selective trans-signaling inhibitor. It is not affecting classic signaling, but the reason for this is not known. Here we demonstrate interaction of sgp130 with membrane-bound IL-6:IL-6R complexes, which resulted in inhibition of cluster-signaling. In addition to these results, we designed synthetic membrane bound IL-6:IL-6R fusion proteins, in which IL-6 is fused to IL-6R by a flexible peptide linker, so that this complex is fixed in a classic-signaling position. Also the interaction of sgp130Fc and blockade of cluster-signaling for this complex was shown.

Interleukin-11 is a member of the Interleukin-6 Family and was also analyzed here. In line, sgp130Fc can interact with membrane-bound IL-11:IL-11R complexes and membrane-bound HIL-11 complexes. So sgp130Fc also inhibits trans- and cluster-signaling of IL-11. The first outcome is that there is no steric hindrance in the interaction of sgp130Fc with IL-6:IL-6R or IL-11:IL-11R complexes. To further investigation, why sgp130Fc cannot affect classic signaling, we coexpressed gp130 and IL-6:IL-6R, membrane bound HIL-6 or soluble HIL-6 in the same cell to mimic an autocrine signaling. Interestingly, autocrine classic signaling was not inhibited by extracellular inhibitors such as sgp130 or antibodies directed against IL-6R or gp130. Interestingly intracellular JAK inhibitors suppressed autocrine signaling. We concluded that signal initiation occurs already from within the cell. Future studies have to investigate, if there are not only preformed gp130 complexes, but preformed gp130:IL-6R complexes. This might be the reason why sgp130Fc cannot inhibit classic signaling, because of the unique binding stoichiometry (IL-6 site I binds to the IL-6R and then IL-6 site II binds domain 1 of gp130 and then site III binds domain II and III of gp130) suggesting an intracellular activation mode of gp130 for autocrine signaling depending on that there is no chance for sgp130Fc to bind IL-6:IL-6R:gp130 complexes on the cell surface.

Summary

One major player of the IL-6 family of cytokines is gp130. Gp130 consists of 6 extracellular domains, which are bound via a 6 amino acid long stalk region to the transmembrane domain and the intracellular domain of gp130. For the binding of cytokines the domain 1 to 3 is needed. Domain 4 to 6 is used for the activation of gp130, so that the janus kinases can get activated after cytokine binding. Previously it was shown, that exchange of the extracellular part of gp130 to short leucin-zippers generates ligand independent, constitutive active synthetic gp130 receptors. Later it was shown, that small in-frame deletions in domain 2 resulted in constitutive activation of gp130 receptors. Recently, it was shown for the IL-23R that deletion of the stalk region resulted in a ligand independent constitutive active form of the homodimeric IL-23R. It was investigated, if the gp130 receptor gets constitutive active, when domain 4 to 6 with or without the stalk region is deleted. Here we show that deletions of more than half of the stalk region in combination with a deletion of the domains 4 to 6 resulted in constitutive active variant of gp130. A second outcome was that the deletion of the half of the stalk region has no effect on the signaling activity of gp130. Additionally it was shown, that deletion of domain 4 to 6 resulted in inactive forms of gp130. For the constitutive active variant of gp130 it was shown, that HIL-6-Fc is still able to bind the complex on the cell surface. Here we showed a new way to create constitutive active cytokine receptor variants, caused by deletions in the extracellular part of the receptor.

7 Literaturverzeichnis

Adams, R., Burnley, R. J., Valenzano, C. R., Qureshi, O., Doyle, C., Lumb, S., Del Carmen Lopez, M., Griffin, R., McMillan, D., Taylor, R. D., Meier, C., Mori, P., Griffin, L. M., Wernery, U., Kinne, J., Rapecki, S., Baker, T. S., Lawson, A. D., Wright, M. and Ettore, A. (2017). "Discovery of a junctional epitope antibody that stabilizes IL-6 and gp80 protein:protein interaction and modulates its downstream signaling." Scientific Reports. **7**, 1-15

Alonzi, T., Fattori, E., Lazzaro, D., Costa, P., Probert, L., Kollias, G., De Benedetti, F., Poli, V. and Ciliberto, G. (1998). "Interleukin 6 is required for the development of collagen-induced arthritis." The Journal of Experimental Medicine. **187** (4), 461-468

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

Barton, V. A., Hall, M. A., Hudson, K. R. and Heath, J. K. (2000). "Interleukin-11 signals through the formation of a hexameric receptor complex." The Journal of Biological Chemistry. **275** (46), 36197-36203

Bazan, F. J. (1990). "Structural design and molecular evolution of a cytokine receptor superfamily." Proceedings of the National Academy of Sciences. **87**, 6934-6938

Boulanger, M. J., Chow, D.-C., Brevnova, E. E. and Garcia, K. C. (2003). "Hexameric structure and assembly of the interleukin-6/IL-6 -receptor/gp130 complex." Science. **300** (5628), 2101-2104

Bravo, J., Staunton, D., Heath, J. K. and Jones, E. Y. (1998). "Crystal structure of a cytokine-binding region of gp130." The EMBO Journal. **17** (6), 1665-1674

Calabrese, L. H. and Rose-John, S. (2014). "IL-6 biology: implications for clinical targeting in rheumatic disease." Nature Reviews Rheumatology. **10** (12), 720-727

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

Chen, X., Zaro, J. and Shen, W.-C. (2013). "Fusion protein linkers: Property, design and functionality." Advanced drug delivery reviews. **65** (10), 1357-1369

Davis, S., Aldrich, T., Valenzuela, D., Wong, V., Furth, M., Squinto, S. and Yancopoulos, G. (1991). "The receptor for ciliary neurotrophic factor." Science. **253** (5015), 59-63

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

Dodington, D. W., Desai, H. R. and Woo, M. (2018). "JAK/STAT - Emerging players in metabolism." Trends in Endocrinology and Metabolism. **29 (1)**, 55-65

Dominitzki, S., Fantini, M. C., Neufert, C., Nikolaev, A., Galle, P. R., Scheller, J., Monteleone, G., Rose-John, S., Neurath, M. F. and Becker, C. (2007). "Cutting edge: Trans-signaling via the soluble IL-6R abrogates the induction of FoxP3 in naive CD4+CD25- T cells." The Journal of Immunology. **179 (4)**, 2041-2045

Ehlers, M., Grötzinger, J., deHon, F. D., Müllberg, J., Brakenhoff, J. P., Liu, J., Wollmer, A. and Rose-John, S. (1994). "Identification of two novel regions of human IL-6 responsible for receptor binding and signal transduction." The Journal of Immunology. **153**, 1744-1753

Fischer, M., Goldschmitt, J., Peschel, C., Brakenhoff, J. P. G., Kallen, K.-J., Wollmer, A., Grötzinger, J. and Rose-John, S. (1997). "A bioactive designer cytokine for human hematopoietic progenitor cell expansion." Nature Biotechnology. **15**, 142-145

Floss, D. M., Mrotzek, S., Klöcker, T., Schröder, J., Grötzinger, J., Rose-John, S. and Scheller, J. (2013). "Identification of canonical tyrosine-dependent and non-canonical tyrosine-independent STAT3 activation sites in the intracellular domain of the interleukin 23 receptor." The Journal of Biological Chemistry. **288 (27)**, 19386-19400

Fourcin, M., Chevalier, S., Guillet, C., Robledo, O., Froger, J., Pouplard-Barthelaix, A. and Gascan, H. (1996). "gp130 transducing receptor cross-linking is sufficient to induce interleukin-6 type responses." The Journal of Biological Chemistry. **271 (20)**, 11756-11760

Franke, M., Schröder, J., Monhasery, N., Ackfeld, T., Hummel, T. M., Rabe, B., Garbers, C., Becker-Pauly, C., Floss, D. M. and Scheller, J. (2016). "Human and murine interleukin 23 receptors are novel substrates for a disintegrin and metalloproteases ADAM10 and ADAM17." The Journal of Biological Chemistry. **291 (20)**, 10551-10561

Galun, E., Zeira, E., Pappo, O., Peters, M. and Rose-John, S. (2000). "Liver regeneration induced by a designer human IL-6/sIL-6R fusion protein reverses severe hepatocellular injury." The FASEB Journal. **14 (13)**, 1979-1987

Garbers, C., Hermanns, H. M., Schaper, F., Müller-Newen, G., Grötzinger, J., Rose-John, S. and Scheller, J. (2012). "Plasticity and cross-talk of interleukin 6-type cytokines." Cytokine and Growth Factor Reviews. **23 (3)**, 85-97

Garbers, C., Janner, N., Chalaris, A., Moss, M. L., Floss, D. M., Meyer, D., Koch-Nolte, F., Rose-John, S. and Scheller, J. (2011). "Species specificity of ADAM10 and ADAM17 proteins in interleukin-6 (IL-6) trans-signaling and novel role of ADAM10 in inducible IL-6 receptor shedding." The Journal of Biological Chemistry. **286 (17)**, 14804-14811

Gauldie, J., Richards, C., Harnish, D., Lansdorp, P. and Baumann, H. (1987). "Interferon f32/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." Proceedings of the National Academy of Sciences. **84**, 7251-7255

Gearing, D., Comeau, M., Friend, D., Gimpel, S., Thut, C., McGourty, J., Brasher, K., King, J., Gillis, S., Mosley, B. and et, al. (1992). "The IL-6 signal transducer, gp130: an oncostatin M receptor and affinity converter for the LIF receptor." Science. **255 (5050)**, 1434-1437

Gearing, D. P., Ziegler, S. F., Comeau, M. R., Friend, D., Thoma, B., Cosman, D., Park, L. and Mosley, B. (1994). "Proliferative responses and binding properties of hematopoietic cells transfected with low-affinity receptors for leukemia inhibitory factor, oncostatin M, and ciliary neurotrophic factor." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. **91 (3)**, 1119-1123

Grötzinger, J., Kernebeck, T., Kallen, K.-J. and Rose-John, S. (1999). "IL-6 type cytokine receptor complexes: Hexamer, tetramer or both?" Biological Chemistry. **380**, 803-813

Grötzinger, J., Kurapkat, G., Wollmer, A., Kalai, M. and Rose-John, S. (1997). "The family of the IL-6-type cytokines: specificity and promiscuity of the receptor complexes." Proteins. **27 (1)**, 96-109

Hecht, N., Pappo, O., Shouval, D., Rose-John, S., Galun, E. and Axelrod, J. H. (2001). "Hyper-IL-6 gene therapy reverses fulminant hepatic failure." Molecular Therapy. **3 (5 Part 1)**, 683-687

Heink, S., Yogev, N., Garbers, C., Herwerth, M., Aly, L., Gasperi, C., Husterer, V., Croxford, A. L., Moller-Hackbarth, K., Bartsch, H. S., Sotlar, K., Krebs, S., Regen, T., Blum, H., Hemmer, B., Misgeld, T., Wunderlich, T. F., Hidalgo, J., Oukka, M., Rose-John, S., Schmidt-Supprian, M., Waisman, A. and Korn, T. (2017). "Trans-presentation of IL-6 by dendritic cells is required for the priming of pathogenic TH17 cells." Nature Immunology. **18 (1)**, 74-85

Heinrich, P. C., Behrmann, I., Haan, S., Hermanns, H. M., Müller-Newen, G. and Schaper, F. (2003). "Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation." Biochemical Journal. **374**, 1-20

Heinrich, P. C., Behrmann, I., Müller-Newen, G., Schaper, F. and Graeve, L. (1998). "Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway." Biochemical Journal. **334**, 297-314

Hemann, U., Gerhartz, C., Heesel, B., Sasse, J., Kurapkat, G., Görtzinger, J., Wollmer, A., Zhong, Z., Darnell, J. E., Graeve, L., Heinrich, P. C. and Horn, F. (1996). "Differential activation of acute phase response factor/Stat3 and Stat1 via the cytoplasmic domain of the Interleukin 6 signal transducer gp130." The Journal of Biological Chemistry. **271 (22)**, 12999-13007

Hibi, M., Murakami, M., Saito, M., Toshio, H., Taga, T. and Kishimoto, T. (1990). "Molecular cloning and expression of an IL-6 signal transducer, gp130." Cell. **63**, 1149-1157

Hilton, D. J., Hilton, A. A., Raicevic, A., Rakar, S., Harrison-Smith, M., M.Gough, N., Begley, G., Metcalf, D., Nicola, N. A. and Willson, T. A. (1994). "Cloning of a murine IL-11 receptor a-chain; requirement for gp130 for high affinity binding and signal transduction." The EMBO Journal. **13 (20)**, 4765-4775

Hummel, T. M., Achfeld, T., Schönberg, M., Ciupka, G., Schulz, F., Oberdoerster, A., Grötzinger, J., Scheller, J. and Floss, D. M. (2017). "Synthetic deletion of the Interleukin 23 receptor (IL-23R) stalk region led to autonomous IL-23R homodimerization and activation." Molecular and Cellular Biology. **37 (17)**, 1-19

Hundhausen, C., Misztela, D., Berkhout, T. A., Broadway, N., Saftig, P., Reiss, K., Hartmann, D., Fahrenholz, F., Postina, R., Matthews, V., Kallen, K.-J., Rose-John, S. and Ludwig, A. (2003). "The disintegrin-like metalloproteinase ADAM10 is involved in constitutive cleavage of CX3CL1 (fractalkine) and regulates CX3CL1-mediated cell-cell adhesion." Blood. **102 (4)**, 1186-1195

Ip, N. Y., Nye, S. H., Boulton, T. G., Davis, S., Taga, T., Li, Y., Birren, S. J., Yasukawa, K., Kishimoto, T., Anderson, D. J., Stahl, N. and Yancopoulos, G. D. (1992). "CNTF and LIF act on neuronal cells via shared signaling pathways that involve the IL-6 signal transducing receptor component gp130." Cell. **69 (7)**, 1121-1132

Jostock, T., Müllberg, J., Özbek, S., Atreya, R., Blinn, G., Voltz, N., Fischer, M., Neurath, M. F. and Rose-John, S. (2001). "Soluble gp130 is the natural inhibitor of soluble interleukin-6 receptor." European Journal of Cell Biology. **268**, 160-167

Kershaw, N. J., Murphy, J. M., Liao, N. P. D., Varghese, L. N., Laktyushin, A., Whitlock, E. L., Lucet, I. S., Nicola, N. A. and Babon, J. J. (2013). "SOCS3 binds specific receptor-JAK complexes to control cytokine signaling by direct kinase inhibition." Nature Structural & Molecular Biology. **20 (4)**, 469-476

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

Keul, R., Heinrich, P. C., Müller-Newen, G., Muller, K. and Woo, P. (1998). "A possible role for soluble IL-6 receptor in the pathogenesis of systemic onset juvenile chronic arthritis " Cytokine. **10 (9)**, 729-734

Kovaleva, M., Bussmeyer, I., Rabe, B., Grotzinger, J., Sudarman, E., Eichler, J., Conrad, U., Rose-John, S. and Scheller, J. (2006). "Abrogation of viral interleukin-6 (vIL-6)-induced signaling by intracellular retention and neutralization of vIL-6 with an anti-vIL-6 single-chain antibody selected by phage display." Journal of Virology. **80** (17), 8510-8520

Kurth, I., Horsten, U., Pflanz, S., Timmermann, A., Kuster, A., Dahmen, H., Tacke, I., Heinrich, P. C. and Müller-Newen, G. (2000). "Importance of the membrane-proximal extracellular domains for activation of the signal transducer glycoprotein 130." The Journal of Immunology. **164** (1), 273-282

Lamertz, L., Floss, D. M. and Scheller, J. (2018). "Combined deletion of the fibronectin-type III domains and the stalk region results in ligand-independent, constitutive activation of the Interleukin 6 signal-transducing receptor gp130." Cytokine. **110**, 428-434

Lokau, J., Nitz, R., Agthe, M., Monhasery, N., Aparicio-Siegmund, S., Schumacher, N., Wolf, J., Möller-Hackbarth, K., Waetzig, G. H., Grötzinger, J., Müller-Newen, G., Rose-John, S., Scheller, J. and Garbers, C. (2016). "Proteolytic cleavage governs interleukin-11 trans-signaling." Cell Reports. **14** (7), 1761-1773

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

Lutticken, C., Wegenka, U., Yuan, J., Buschmann, J., Schindler, C., Ziemiecki, A., Harpur, A., Wilks, A., Yasukawa, K., Taga, T. and et, a. (1994). "Association of transcription factor APRF and protein kinase Jak1 with the interleukin-6 signal transducer gp130." Science. **263** (5143), 89-92

Mackiewicz, A., Schooltink, H., Heinrich, P. C. and Rose-John, S. (1992). "Complex of soluble human IL-6-receptor/IL-6 up-regulates expression of acute-phase proteins." The Journal of Immunology. **149** (6), 2021-2027

Marie, C., Losser, M.-R., Fitting, C., Kermarrec, N., Payen, D. and Cavaillon, J.-M. (1997). "Cytokines and soluble cytokine receptors in pleural effusions from septic and nonseptic patients." American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine. **156**, 1515-1522

Meads, M. B. and Medveczky, P. G. (2004). "Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-encoded viral interleukin-6 is secreted and modified differently than human interleukin-6: evidence for a unique autocrine signaling mechanism." Journal of Biological Chemistry. **279** (50), 51793-51803

Molden, J., Chang, Y., You, Y., Moore, P. S. and Goldsmith, M. A. (1997). "A kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-encoded cytokine homolog (vIL-6) activates signaling through the shared gp130 receptor subunit." The Journal of Biological Chemistry. **272** (31), 19625-19631

Müllberg, J., Geib, T., Jostock, T., Hoischen, S. H., Vollmer, P., Voltz, N., Heinz, D., Galle, P. R., Klouche, M. and Rose-John, S. (2000). "IL-6 receptor independent stimulation of human gp130 by viral IL-6." The Journal of Immunology. **164 (9)**, 4672-4677

Müllberg, J., Schooltink, H., Stoyan, T., Günther, M., Graeve, L., Buse, G., Mackiewicz, Andrzej, Heinrich, P. C. and Rose-John, S. (1993). "The soluble interleukin-6 receptor is generated by shedding." European Journal of Cell Biology. **23**, 473-480

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

Narazaki, M., Yasukawa, K., Saito, T., Oshugi, Y., Yannopoulos, G. D., Taga, T. and Kishimoto, T. (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

Nowell, M. A., Richards, P. J., Horiuchi, S., Yamamoto, N., Rose-John, S., Topley, N., Williams, A. S. and Jones, S. A. (2003). "Soluble IL-6 Receptor Governs IL-6 Activity in Experimental Arthritis: Blockade of Arthritis Severity by Soluble Glycoprotein 130." The Journal of Immunology. **171 (6)**, 3202-3209

Ohshima, S., Saeki, Y., Mima, T., Sasai, M., Nishioka, K., Nomura, S., Kopf, M., Katada, Y., Tanaka, T., Suemura, M. and Kisimoto, T. (1998). "Interleukin 6 plays a key role in the development of antigen-induced arthritis." Proceedings of the National Academy of Sciences. **95**, 8222-8226

Okuda, Y., Sakoda, S. and Yanagihara, T. (1998). "The pattern of cytokine gene expression in lymphoid organs and peripheral blood mononuclear cells of mice with experimental allergic encephalomyelitis." Journal of Neuroimmunology. **87 (1)**, 147-155

Parham, C., Chirica, M., Timans, J., Vaisberg, E., Travis, M., Cheung, J., Pflanz, S., Zhang, R., Singh, K. P., Vega, F., To, W., Wagner, J., O'Farrell, A.-M., McClanahan, T., Zurawski, S., Hannum, C., Gorman, D., Rennick, D. M., Kastelein, R. A., de Waal Malefyt, R. and Moore, K. W. (2002). "A receptor for the heterodimeric cytokine IL-23 is composed of IL-12R β 1 and a novel cytokine receptor subunit, IL-23R." The Journal of Immunology. **168 (11)**, 5699-5708

Pennica, D., King, K. L., Shaw, K. J., Luis, E., Rullamas, J., Luoh, S.-M., Darbonnei, W. C., Knutzon, D. S., Yen, R., Chien, K. R., Baker, J. B. and Wood, W. I. (1995). "Expression cloning of cardiotrophin 1, a cytokine that induces cardiac myocyte hypertrophy." Proceedings of the National Academy of Sciences. **92**, 1142-1146

Peters, M., Blinn, G., Jostock, T., Schirmacher, P., Büschenfelde, K. H. M. Z., Galle, P. R. and Rose-John, S. (2000). "Combined interleukin 6 and soluble interleukin 6 receptor accelerates murine liver regeneration." Gastroenterology. **119 (6)**, 1663-1671

Pflanz, S., Hibbert, L., Mattson, J., Rosales, R., Vaisberg, E., Bazan, J. F., Phillips, J. H., McClanahan, T. K., de Waal Malefyt, R. and Kastelein, R. A. (2004). "WSX-1 and glycoprotein 130 constitute a signal-transducing receptor for IL-27." The Journal of Immunology. **172** (4), 2225-2231

Pilati, C., Amessou, M., Bihl, M. P., Balabaud, C., Van Nhieu, J. T., Paradis, V., Nault, J. C., Izard, T., Bioulac-Sage, P., Couchy, G., Poussin, K. and Zucman-Rossi, J. (2011). "Somatic mutations activating STAT3 in human inflammatory hepatocellular adenomas." The Journal of Experimental Medicine. **208** (7), 1359-1366

Rabe, B., Chalaris, A., May, U., Waetzig, G. H., Seeger, D., Williams, A. S., Jones, S. A., Rose-John, S. and Scheller, J. (2007). "Transgenic blockade of interleukin 6 transsignaling abrogates inflammation." Blood. **111** (3), 1021-1028

Rakemann, T., Niehof, M., Stefan, K., Fischer, M., Manns, M. P., Rose-John, S. and Trautwein, C. (1999). "The designer cytokine hyper-interleukin-6 is a potent activator of STAT3-dependent gene transcription in vivo and in vitro." The Journal of Biological Chemistry. **274**, 1257-1266

Rassow, J., Hauser, K., Netzke, R. and Deutzmann, R. Biochemie. Duale Reihe. Vol. 3. 2012. ed.), Stuttgart: Thieme

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

Riethmueller, S., Somasundaram, P., Ehlers, J. C., Hung, C. W., Flynn, C. M., Lokau, J., Agthe, M., Dusterhoft, S., Zhu, Y., Grotzinger, J., Lorenzen, I., Koudelka, T., Yamamoto, K., Pickhinke, U., Wichert, R., Becker-Pauly, C., Radisch, M., Albrecht, A., Hessefort, M., Stahnke, D., Unverzagt, C., Rose-John, S., Tholey, A. and Garbers, C. (2017). "Proteolytic origin of the soluble human IL-6R in vivo and a decisive role of N-glycosylation." PLoS Biology. **15** (1), 2435-2444

Romero, L. I. and Pincus, S. H. (1992). "In situ localization of Interleukin-6 in normal skin and atrophic cutaneous disease." International Archives of Allergy and Immunology. **99** (1), 44-49

Sato, K., Tsuchiya, M., Saldanha, J., Koishihara, Y., Ohsugi, Y., Kishimoto, T. and Bendig, M. M. (1993). "Reshaping a human antibody to inhibit the interleukin 6-dependent tumor cell growth." Cancer Research. **53**, 851-856

Schaeffer, H. J. and Weber, M. J. (1999). "Mitogen-activated protein kinases: Specific messages from ubiquitous messengers." Molecular and Cellular Biology. **19** (4), 2435-2444

Scheller, J., Chalaris, A., Schmidt-Arras, D. and Rose-John, S. (2011). "The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6." Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research. **1813** (5), 878-888

Scheller, J., Garbers, C. and Rose-John, S. (2014). "Interleukin-6: from basic biology to selective blockade of pro-inflammatory activities." Seminars in Immunology. **26 (1)**, 2-12

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

Stahl, N., Farruggella, T., Boulton, T., Zhong, Z., Darnell, J. and Yancopoulos, G. (1995). "Choice of STATs and other substrates specified by modular tyrosine-based motifs in cytokine receptors." Science. **267 (5202)**, 1349-1353

Stuhlmann-Laeisz, C., Lang, S., Chalaris, A., Krzysztof, P., Enge, S., Eichler, J., Klingmuller, U., Samuel, M., Ernst, M., Rose-John, S. and Scheller, J. (2006). "Forced dimerization of gp130 leads to constitutive STAT3 activation, cytokine-independent growth, and blockade of differentiation of embryonic stem cells." Molecular Biology of the Cell. **17 (7)**, 2986-2995

Taga, T., Hibi, M., Hirata, Y., Yamasaki, K., Yasukawa, K., Matsuda, T., Hirano, T. and Kishimoto, T. (1989). "Interleukin-6 triggers the association of its receptor with a possible signal transducer, gp130." Cell. **58**, 573-581

Tanner, W. J., Chen, W., Young, R. L., Longmore, G. D. and Shaw, A. S. (1995). "The conserved Box 1 motif of cytokine receptors is required for association with JAK kinases." The Journal of Biological Chemistry. **12**, 6523-6530

Tenhuberg, S., Schuster, B., Zhu, L., Kovaleva, M., Scheller, J., Kallen, K.-J. and Rose-John, S. (2006). "gp130 dimerization in the absence of ligand: Preformed cytokine receptor complexes." Biochemical and Biophysical Research Communications. **346**, 649-657

Thompson, J. E., Cubbon, R. M., Cummings, R. T., Wicker, L. S., Frankshun, R., Cunningham, B. R., Cameron, P. M., Meinke, P. T., Liverton, N., Weng, Y. and DeMartino, J. A. (2002). "Photochemical preparation of a pyridone containing tetracycline: A JAK protein kinase inhibitor." Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters. **12 (8)**, 1219-1223

Wijdenes, J., Heinrich, P. C., Müller-Newen, G., Roche, C., Gu, Z.-J., Clément, C. and Klein, B. (1995). "Interleukin-6 signal transducer gp130 has specific binding sites for different cytokines as determined by antagonistic and agonistic anti-gp130 monoclonal antibodies." European Journal of Immunology. **25 (12)**, 3474-3481

Xing, Z., Cardona, C. J., Adams, S., Yang, Z., Li, J., Perez, D. and Woolcock, P. R. (2009). "Differential regulation of antiviral and proinflammatory cytokines and suppression of Fas-mediated apoptosis by NS1 of H9N2 avian influenza virus in chicken macrophages." Journal of General Virology. **90 (Part 5)**, 1109-1118

Literaturverzeichnis

Yamasaki, K., Taga, T., Hirata, Y., Yawata, H., Kawanishi, Y., Seed, B., Taniguchi, T., Hirano, T. and Kishimoto, T. (1988). "Cloning and expression of the human interleukin-6 (BSF-2/IFN beta 2) receptor." Science. **241 (4867)**, 825-828

8 Anhang

8.1 Klonierungsstrategien

Die nachfolgenden Klonierungsschemata wurden für die Erstellung der Plasmide in dieser Arbeit verwendet. Für HIL-6 wurde die nachfolgende Strategie verwendet:

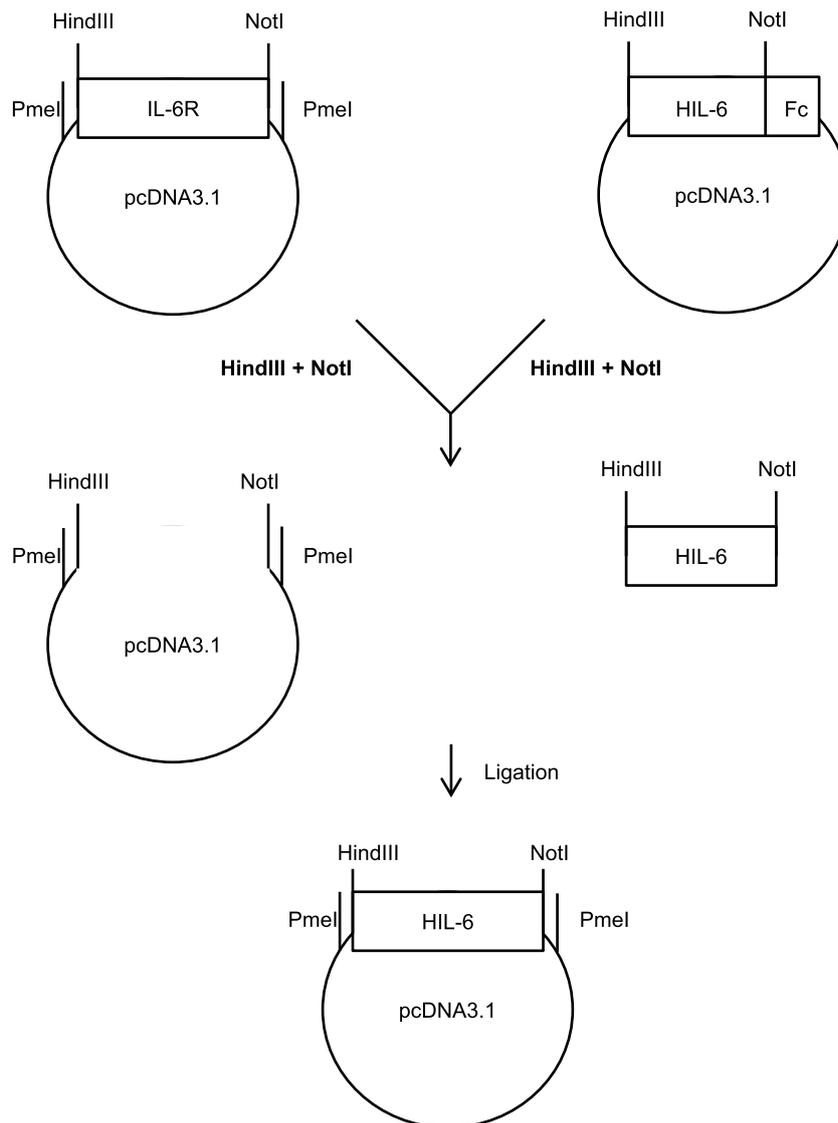


Abbildung 8.1: Klonierungsstrategie für pcDNA3.1-HIL-6. Zuerst wurden die Plasmide pcDNA3.1-hIL-6R und pcDNA3.1-HIL-6-Fc durch die Endonukleasen HindIII und NotI geschnitten. Es entstand das Plasmid pcDNA3.1 und die cDNA kodierend für HIL-6 ohne den Fc tag. Die HIL-6 cDNA wurde in das pcDNA3.1 Plasmid ligiert.

Hier ist die Klonierungsstrategie für mbHIL-6 dargestellt. Sie umfasst mehrere Klonierungsschritte. Zuerst wurden die Plasmide pcDNA3.1-hIL-6R und pcDNA3.1-HIL-6 durch

die Endonukleasen HindIII und NotI geschnitten. Es entstand das Plasmid pcDNA3.1 und die cDNA für HIL-6 ohne den Fc tag. HIL-6 wurde mit dem leeren pcDNA3.1 Plasmid ligiert (Abbildung 8.1).

Der nächste Schritt war die Einbringung der hIL-6R Stalkregion DNA am Ende der HIL-6 cDNA. Dafür wurde die Stalkregion des hIL-6R durch eine PCR mit der Schnittstelle NotI generiert. Die Sequenz der IL-6R Stalkregion, Transmembrandomäne und intrazellulären Domäne wurde durch eine Sequenzierung kontrolliert und war fehlerfrei. Das Plasmid pcDNA3.1-HIL-6 wurde mit der Endonuklease Not I geschnitten, wodurch das geschnittene Plasmid mit der IL-6R Stalkregion ligiert wurde. Es entstand das Plasmid pcDNA3.1-mbHIL-6 (Abbildung 8.2).

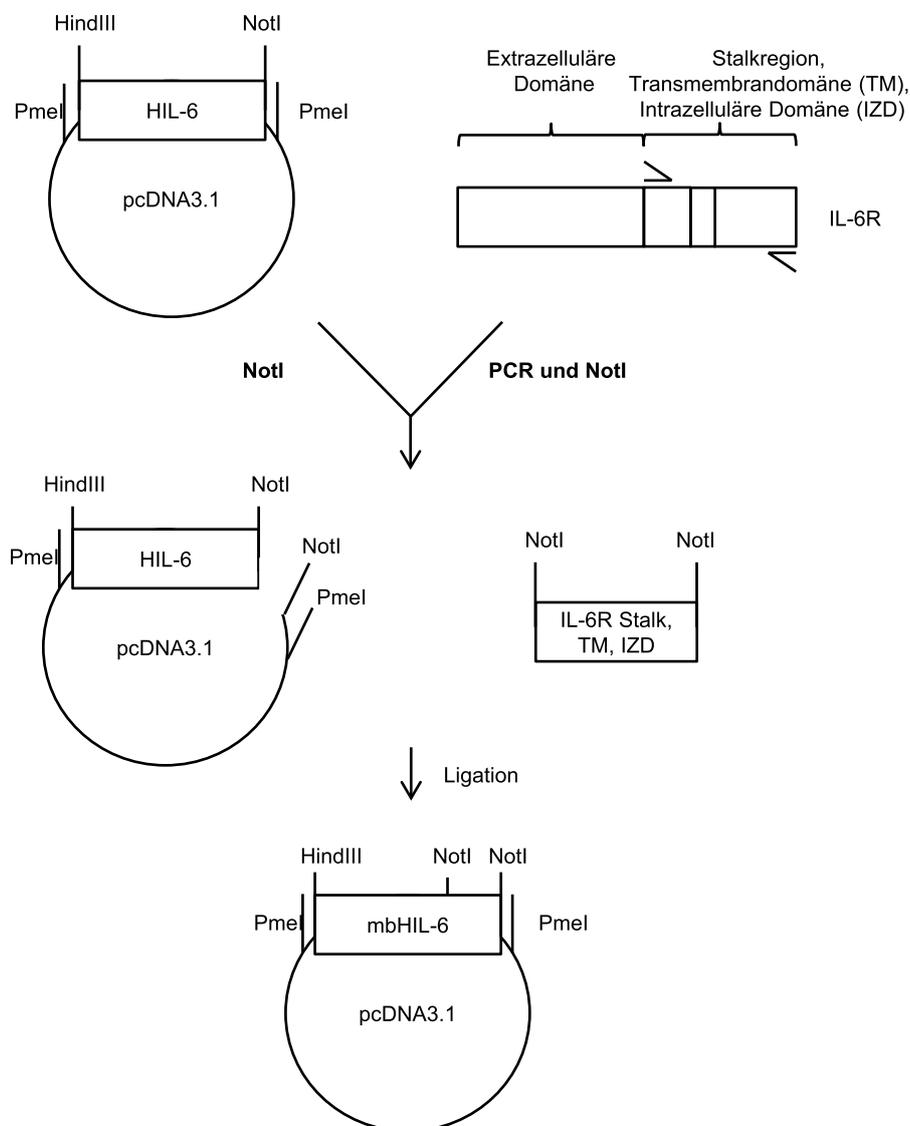


Abbildung 8.2: Klonierungsstrategie für pcDNA3.1-mbHIL-6. Es wurde die Stalkregion des IL-6R durch eine PCR amplifiziert und mit den endständigen NotI Schnittstellen versehen. Das Plasmid pcDNA3.1-HIL-6 wurde mit der Endonuklease NotI geschnitten, wodurch das geschnittene Plasmid mit der cDNA codierend für die IL-6R Stalkregion ligiert wurde. Es entstand das Plasmid pcDNA3.1-mbHIL-6.

Anhang

Für die Subklonierung von pMows-puro, welches für die retrovirale Transduktion verwendet wird, wurde das Plasmid pcDNA3.1-mbHIL-6 mit der Endonuklease PmeI geschnitten. Damit wurde die cDNA für mbHIL-6 aus dem Plasmid pcDNA3.1-mbHIL-6 herausgeschnitten, um diese in das Plasmid pMows-puro hineinzubringen. PMows-puro-GFP wurde mit EcoNI und BamHI geschnitten. Da durch beide Endonukleasen ein *sticky-end* Überhang entsteht, wurde die Klenow Polymerase für die Auffüllung der *sticky-end* Fragmente verwendet. Dadurch entstanden *blunt-end* Fragmente (Abbildung 8.3).

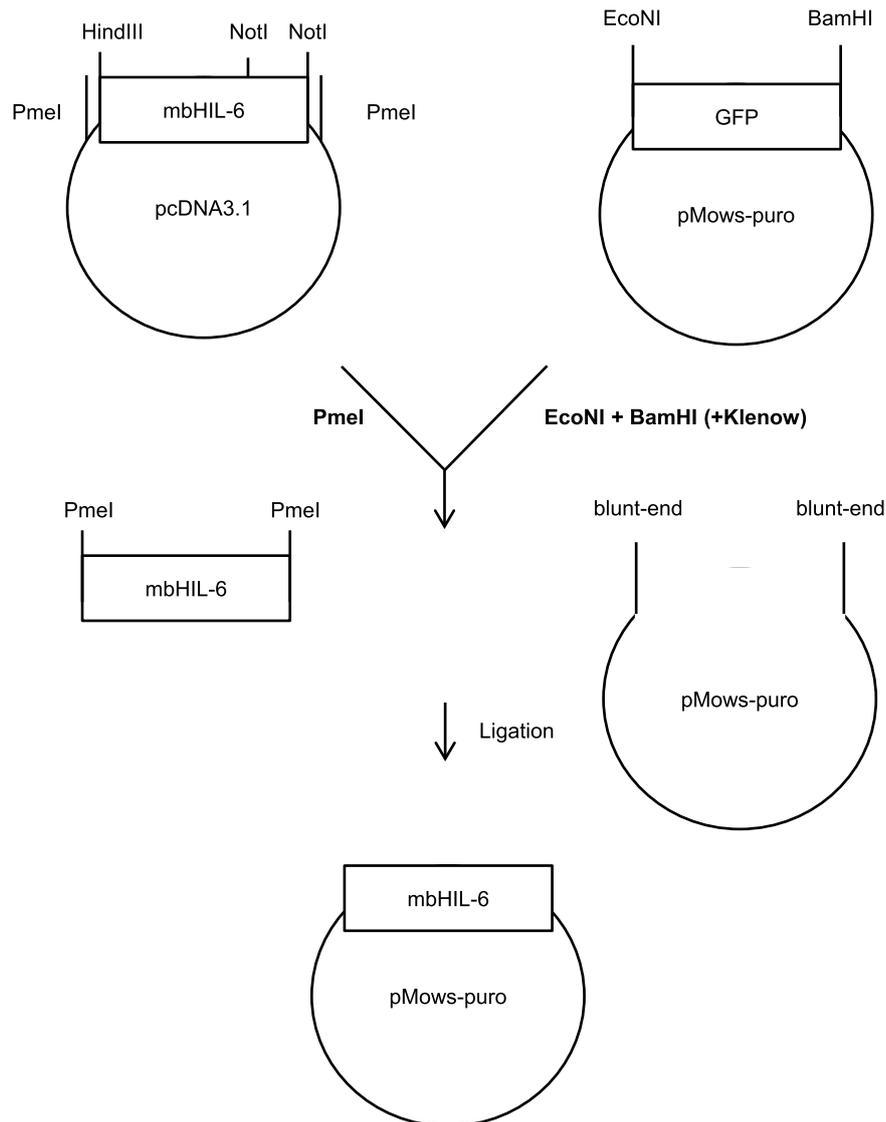


Abbildung 8.3: Subklonierung von mbHIL-6 in ein pMows-puro Plasmid. Für die Subklonierung von mbHIL-6 aus pcDNA3.1 in pMows-puro wurde zuerst die GFP kodierende cDNA über die Endonukleasen EcoNI und BamHI aus dem Plasmid pMows-puro-GFP herausgeschnitten. Die *sticky-ends* wurden über die Klenow Polymerase aufgefüllt und wurden damit zu glatten Enden (*blunt-ends*). Die für mbHIL-6 kodierende cDNA wurde aus dem Plasmid pcDNA3.1-mbHIL-6 über die Endonuklease PmeI herausgeschnitten und die mbHIL-6 cDNA in das Plasmid pMows-puro ligiert.

Für mbHIL-6 Δ 15 wurde die nachfolgende Strategie angewandt:

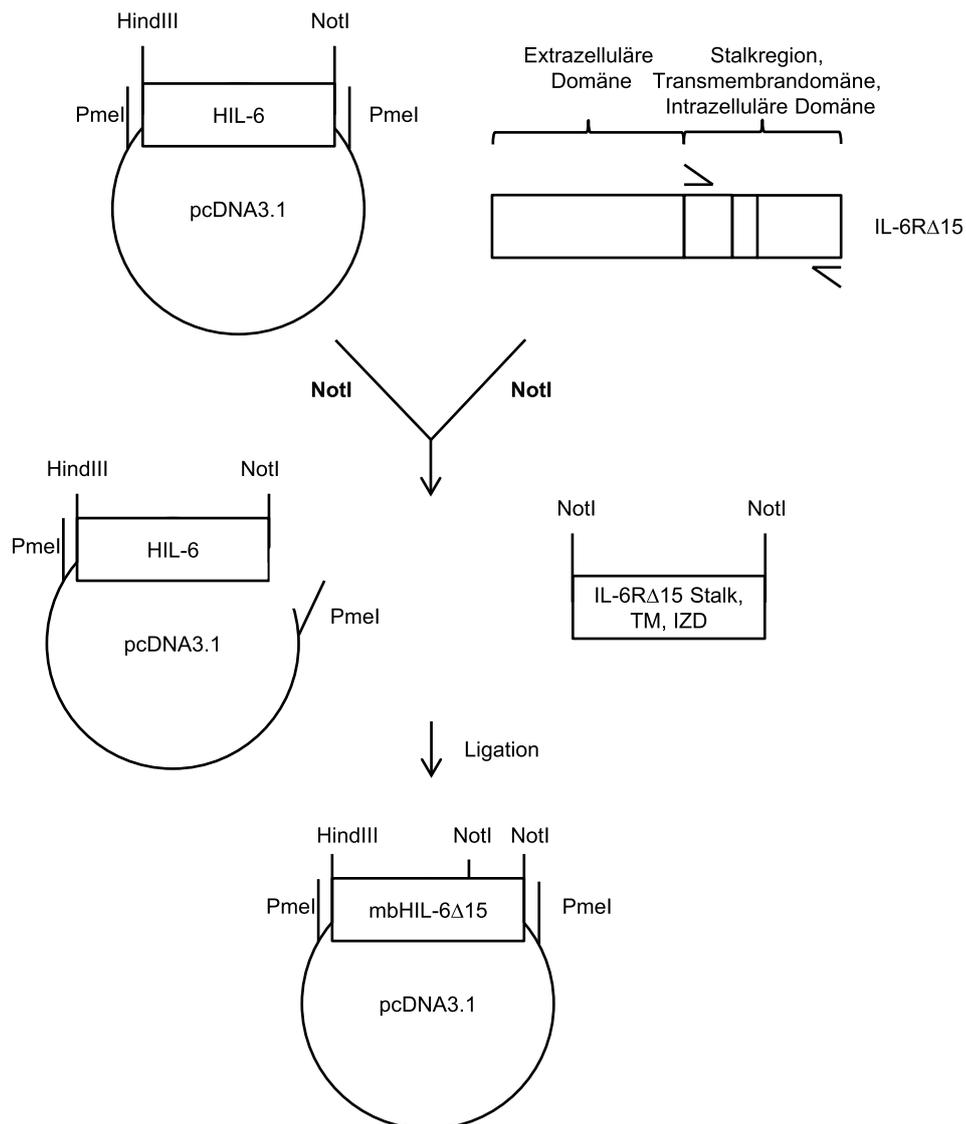


Abbildung 8.4: Klonierungsstrategie für pcDNA3.1-mbHIL-6 Δ 15. Es wurde die Stalkregion des IL-6R Δ 15 durch eine PCR amplifiziert und mit den endständigen NotI Schnittstellen versehen. Das Plasmid pcDNA3.1-HIL-6 wurde mit der Endonuklease NotI geschnitten, wodurch das geschnittene Plasmid mit der cDNA codierend für die IL-6R Δ 15 Stalkregion ligiert wurde. Es entstand das Plasmid pcDNA3.1-mbHIL-6 Δ 15.

Hier ist die Klonierungsstrategie für mbHIL-6 Δ 15 dargestellt. Sie umfasst mehrere Klonierungsschritte.

Der nächste Schritt war die Einbringung der IL-6R Δ 15 Stalkregion cDNA am Ende der HIL-6 cDNA. Dafür wurde die Stalkregion des IL-6R Δ 15 durch eine PCR mit den NotI Schnittstellen versehen. Die Sequenz wurde durch eine Sequenzierung überprüft und war fehlerfrei. Das Plasmid pcDNA3.1-HIL-6 wurde mit der Endonuklease Not I geschnitten, wodurch das geschnittene Plasmid mit der IL-6R Δ 15 Stalkregion ligiert wurde. Es entstand das Plasmid pcDNA3.1-mbHIL-6 Δ 15 (Abbildung 8.4).

Anhang

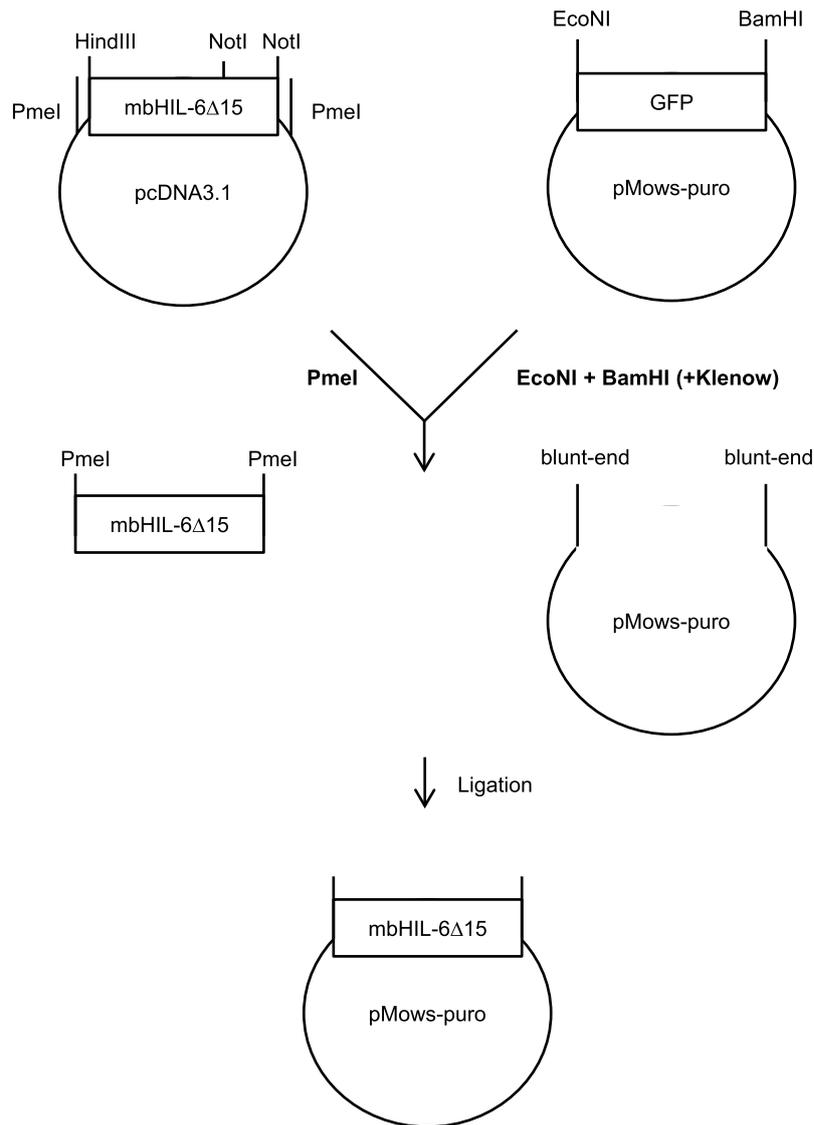


Abbildung 8.5: Subklonierung von *mbHIL-6Δ15* in ein *pMows-puro* Plasmid. Für die Subklonierung von *mbHIL-6Δ15* aus *pcDNA3.1* in *pMows-puro* wurde zuerst die GFP kodierende cDNA über die Endonukleasen *EcoNI* und *BamHI* aus dem Plasmid *pMows-puro-GFP* herausgeschnitten. Die *sticky-ends* wurden über die Klenow Polymerase aufgefüllt und wurden damit zu glatten Enden (*blunt-ends*). Die für *mbHIL-6Δ15* kodierende cDNA wurde aus dem Plasmid *pcDNA3.1-mbHIL-6Δ15* über die Endonuklease *PmeI* herausgeschnitten und die *mbHIL-6Δ15* cDNA in das Plasmid *pMows-puro* ligiert.

Für die Subklonierung von *pMows-puro*, welches für die retrovirale Transduktion verwendet wird, wurde das Plasmid *pcDNA3.1-mbHIL-6Δ15* mit der Endonuklease *PmeI* geschnitten. Damit wurde die cDNA kodierend für *mbHIL-6Δ15* aus dem Plasmid *pcDNA3.1-mbHIL-6Δ15* herausgeschnitten, um diese in das Plasmid *pMows-puro* zu ligieren. *pMows-puro-GFP* wurde mit *EcoNI* und *BamHI* geschnitten. Da durch beide Endonukleasen ein *sticky-end* Überhang entsteht, wurde die Klenow Polymerase für die Auffüllung der *sticky-end* Fragmente verwendet. Dadurch entstanden *blunt-ends* (Abbildung 8.5).

Für *mbHIL-6Δ30* wurde eine andere Strategie angewandt:

Anhang

Hierbei wurde als Template pcDNA3.1-mbHIL-6 Δ 15 für die PCR genommen. MbHIL-6 Δ 30 wurde in einer *splicing by overlapping extension polymerase chain reaction* generiert und in pcDNA3.1 und pMows-puro kloniert (Abbildung 8.6). Die Sequenz von mbHIL-6 Δ 30 wurde durch eine Sequenzierung überprüft.

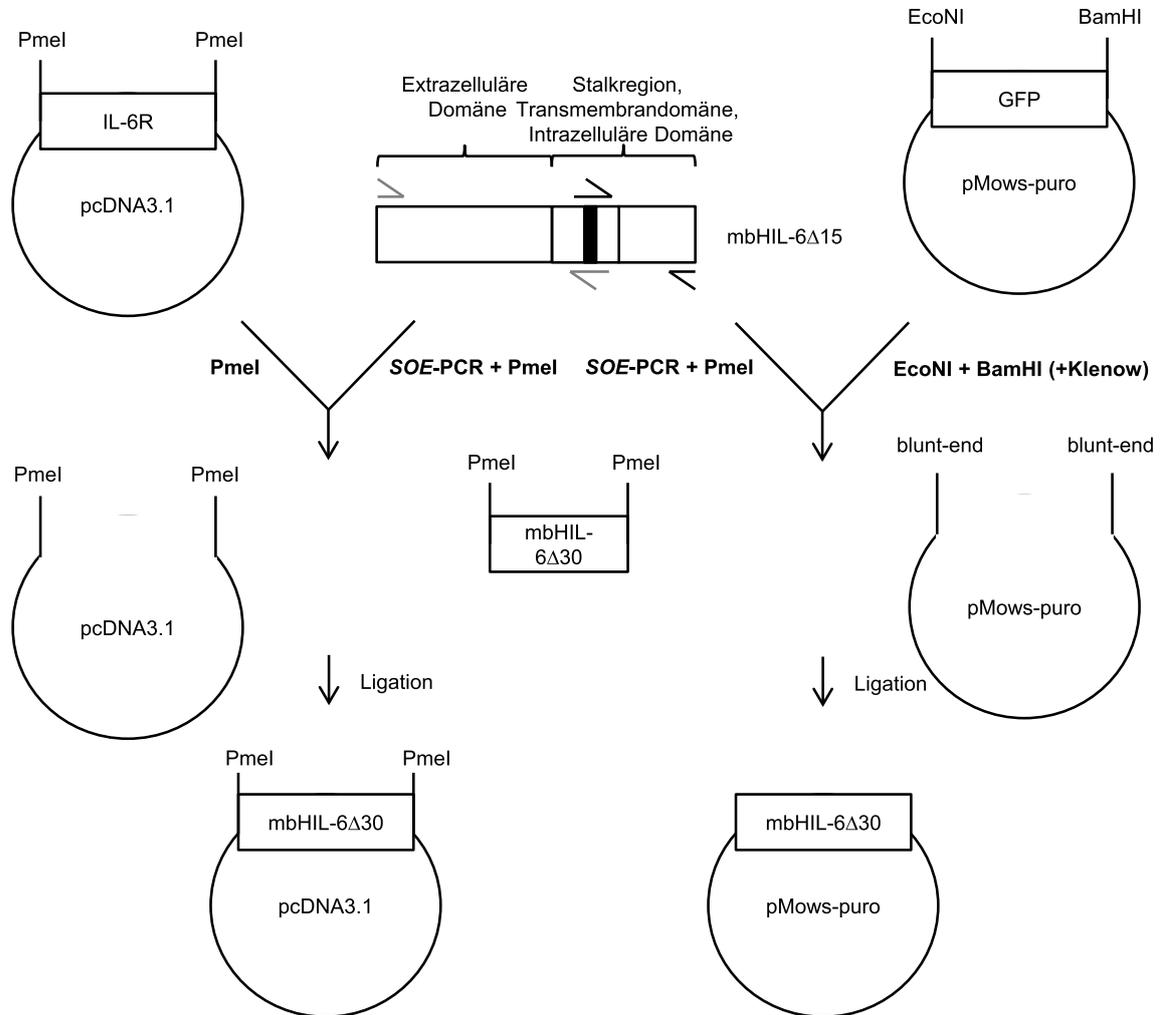


Abbildung 8.6: Generierung von mbHIL-6 Δ 30 über eine SOE-PCR. Zuerst wurde aus pcDNA3.1-IL-6R die cDNA kodierend für den IL-6R über die Endonuklease PmeI herausgeschnitten und das Plasmid für die Ligation vorbereitet. Für die SOE-PCR, um mbHIL-6 Δ 30 zu generieren, wurde die cDNA von mbHIL-6 Δ 15 als Template verwendet. Es erfolgte eine Deletion der kodierenden Region kodierend für 15 Aminosäuren in der Stalkregion durch die SOE-PCR. Gleichzeitig wurde das Plasmid pMOWS-puro-GFP vorbereitet, indem die GFP kodierende cDNA über die Endonukleasen EcoNI und BamHI herausgeschnitten wurde. Die *sticky-ends* wurden über die Klenow Polymerase aufgefüllt und wurden damit zu glatten Enden (*blunt-ends*). pMows-puro wurde für die Ligation mit mbHIL-6 Δ 30 verwendet.

Aus dem Plasmid pcDNA3.1-IL-6R wurde durch die Endonuklease PmeI die cDNA für den IL-6R herausgeschnitten und das Plasmid für die Ligation mit mbHIL-6 Δ 30 vorbereitet (Abbildung 8.6).

pMows-puro-GFP wurde mit EcoNI und BamHI geschnitten. Da durch beide Endonukleasen ein *sticky-end* Überhänge entstehen, wurde die Klenow Polymerase für das Auffüllen

Anhang

der *sticky-ends* verwendet. Dadurch entstanden *blunt-ends* (Abbildung 8.6). Es entstand pMows-puro-mbHIL-6Δ30

Das gleiche Verfahren wurde für die Generierung von mbHIL-6Δ45 durchgeführt. Hierbei wurde die cDNA kodierend für mbHIL-6Δ30 als Template eingesetzt (Abbildung 8.7). MbHIL-6Δ45 wurde in einer *splicing by overlapping extension polymerase chain reaction* (SOE-PCR) generiert (Abbildung 8.7). Die Sequenz von mbHIL-6Δ45 wurde durch eine Sequenzierung überprüft und war fehlerfrei.

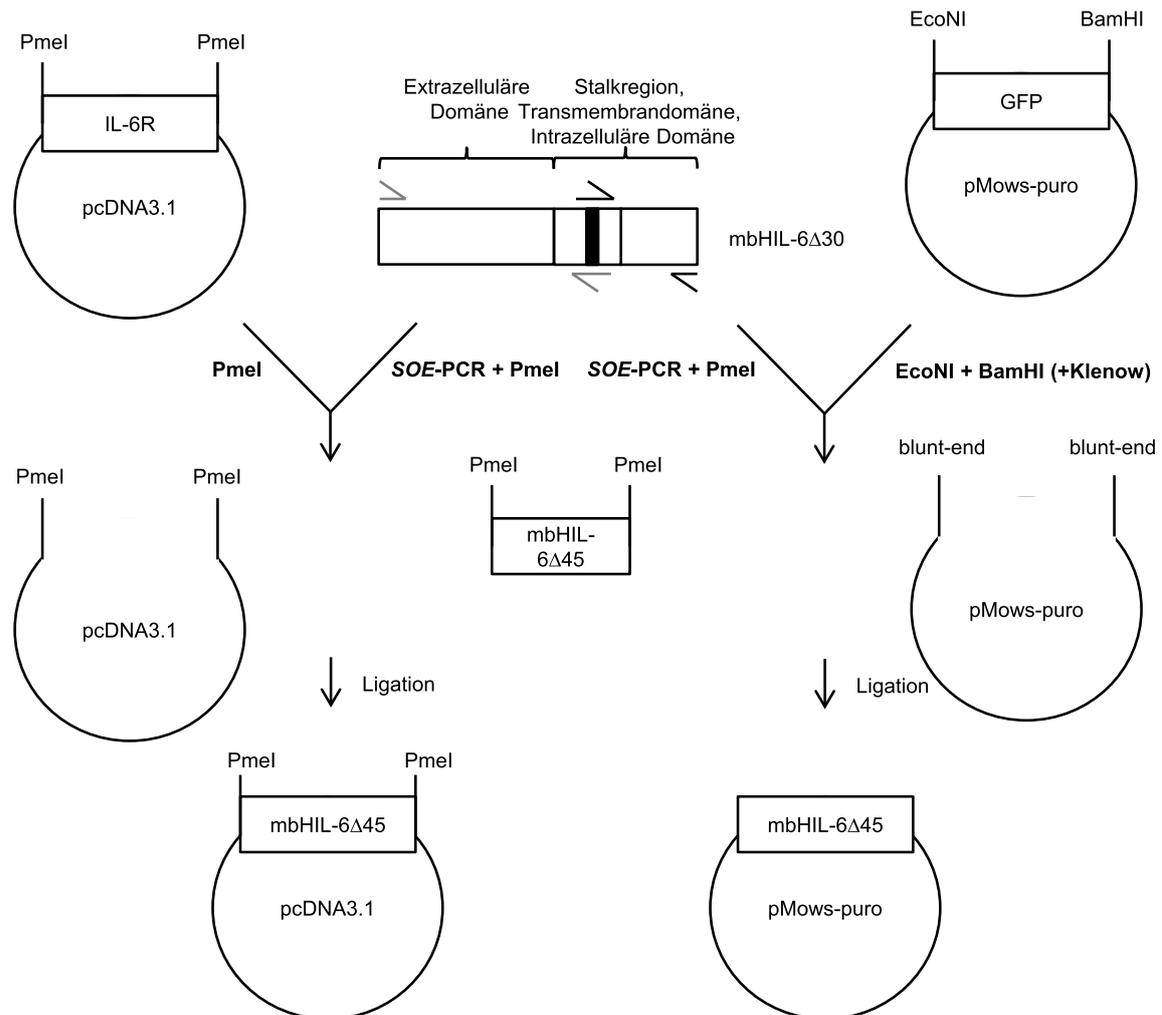


Abbildung 8.7: Generierung von mbHIL-6Δ45 über eine SOE-PCR. Zuerst wurde aus pcDNA3.1-IL-6R die cDNA kodierend für den IL-6R über die Endonuklease PmeI herausgeschnitten und das Plasmid für die Ligation vorbereitet. Für die SOE-PCR, um mbHIL-6Δ45 zu generieren, wurde die cDNA von mbHIL-6Δ30 als Template verwendet. Es erfolgte eine Deletion der kodierenden Region kodierend für 15 Aminosäuren in der Stalkregion durch die SOE-PCR. Gleichzeitig wurde das Plasmid pMOWS-puro-GFP vorbereitet, indem die GFP kodierende cDNA über die Endonukleasen EcoNI und BamHI herausgeschnitten wurde. Die *sticky-ends* wurden über die Klenow Polymerase aufgefüllt und wurden damit zu glatten Enden (*blunt-ends*). PMows-puro wurde für die Ligation mit mbHIL-6Δ45 verwendet.

Anhang

Aus dem Plasmid pcDNA3.1-IL-6R wurde durch die Endonuklease PmeI die cDNA für den IL-6R herausgeschnitten und das Plasmid für die Ligation mit mbHIL-6 Δ 45 vorbereitet (Abbildung 8.7).

pMows-puro-GFP wurde mit EcoNI und BamHI geschnitten. Da durch beide Endonukleasen ein *sticky-end* Überhang entstehen, wurde die Klenow Polymerase für das Auffüllen der *sticky-ends* verwendet. Dadurch entstanden *blunt-ends* (Abbildung 8.7). Es entstand pMows-puro-mbHIL-6 Δ 45

Für die Generierung der Punktmutationsvarianten wurde eine *site-directed mutagenesis*-PCR angewendet. Dabei wurde als Template pcDNA3.1-mbHIL-6 verwendet. Bei dieser PCR wird über einen Nukleotidaustausch während der PCR eine Punktmutation eingebaut. Die Sequenz wurde im Anschluss durch eine Sequenzierung überprüft und war fehlerfrei (Abbildung 8.8 A). Die neue Variante, mbHIL-6_{V563E} konnte dann in das Plasmid pMows-puro ligiert werden (Abbildung 8.8 B).

Anhang

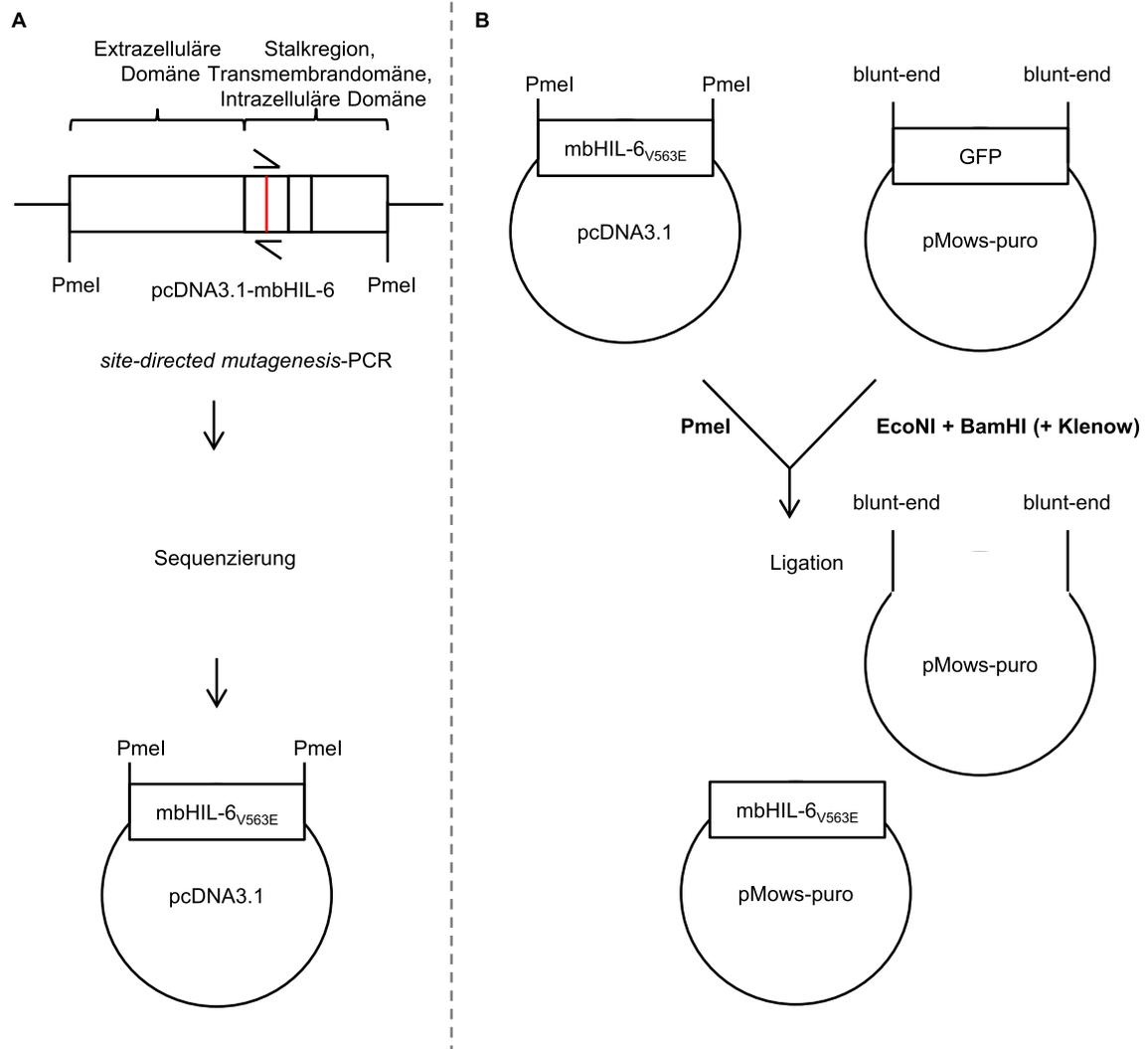


Abbildung 8.8: Generierung der Punktmutation mbHIL-6_{V563E} über eine site-directed mutagenesis-PCR. (A) Für die Generierung der Punktmutation von mbHIL-6_{V563E} wurde pcDNA3.1-mbHIL-6 als Template verwendet. **(B)** Nach erfolgter Sequenzierung wurde die Ligation mit pMows-puro durchgeführt.

Das gleiche Verfahren wurde für die Mutation mbHIL-6_{V563G} angewendet (Abbildung 8.9 A und B).

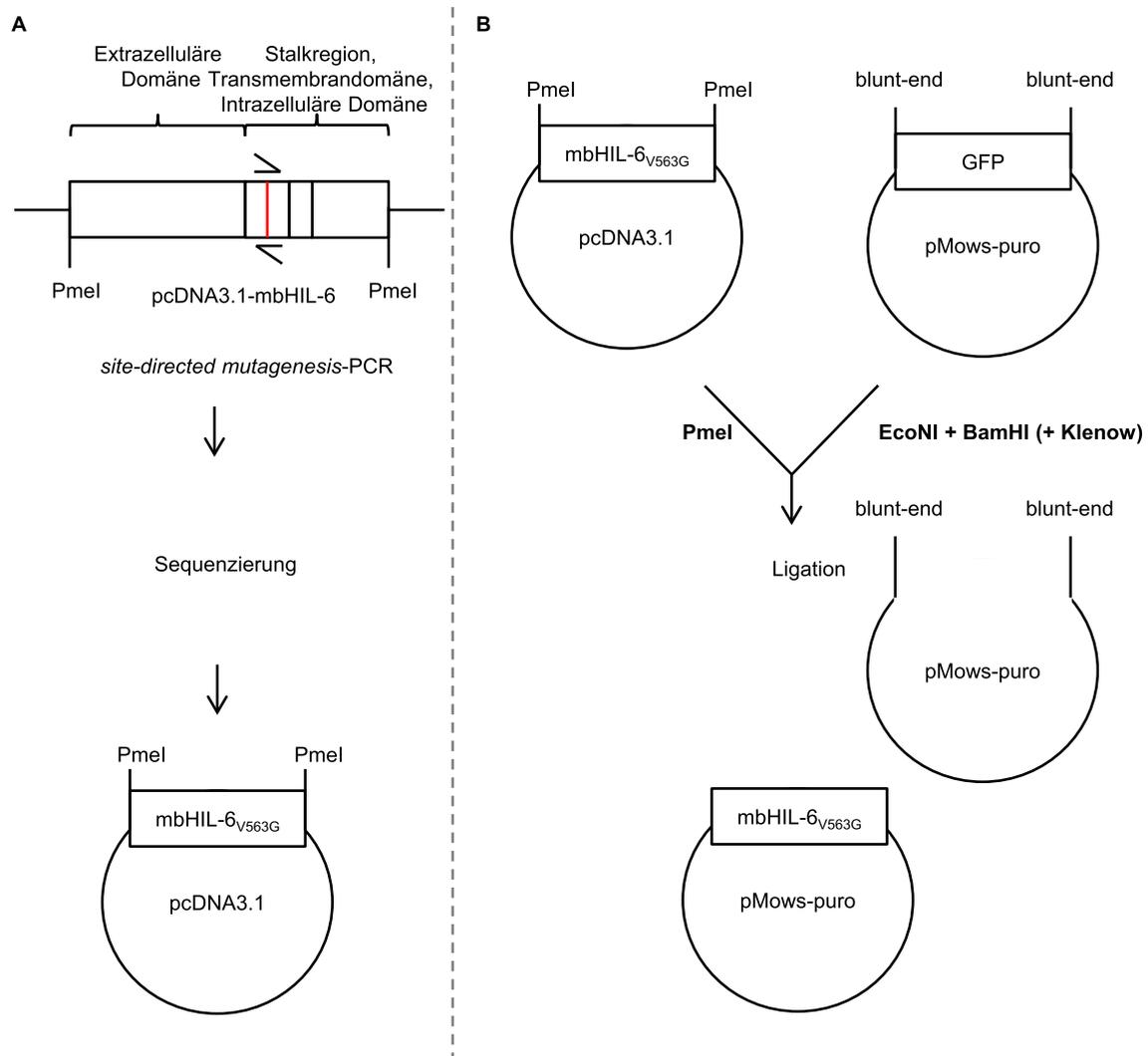


Abbildung 8.9: Generierung der Punktmutation mbHIL-6_{V563G} über eine site-directed mutagenesis-PCR. (A) Für die Generierung der Punktmutation von mbHIL-6_{V563G} wurde pcDNA3.1-mbHIL-6 als Template verwendet. (B) Nach erfolgter Sequenzierung wurde die Ligation mit pMows-puro durchgeführt.

Die cDNA von nmbHIL-6 wurde über die Firma GeneArt synthetisiert. Für die Verwendung im Labor wurde nmbHIL-6 aus dem Plasmid pmat-nmbHIL-6 über die Endonuklease PmeI herausgeschnitten. Das Plasmid pcDNA3.1-hIL-6R wurde wie zuvor beschrieben vorbereitet für die Ligation mit der cDNA von nmbHIL-6 (Abbildung 8.10).

Ebenfalls wurde, wie zuvor beschrieben das Plasmid pMows-puro vorbereitet für die Ligation mit der cDNA von nmbHIL-6 (Abbildung 8.10).

Anhang

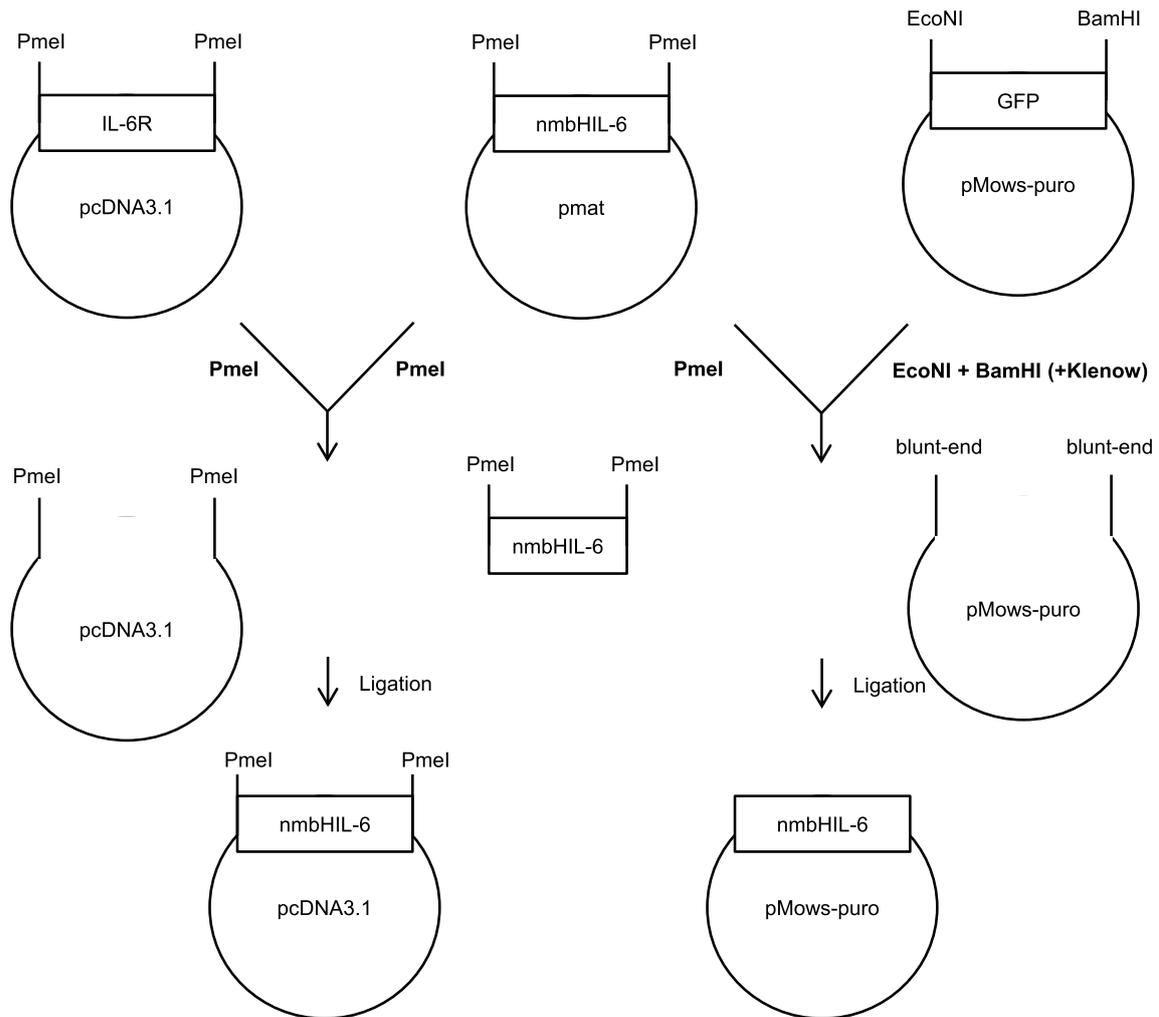


Abbildung 8.10: Subklonierung von der cDNA nmbHIL-6 aus pmat von GeneArt in die Plasmide pcDNA3.1 und pMows-puro. Zuerst wurde aus pcDNA3.1-IL-6R die kodierende cDNA vom hIL-6R über die Endonuklease PmeI herausgeschnitten und das Plasmid für die Ligation vorbereitet. Das synthetisierte Plasmid pmat-nmbHIL-6 wurde ebenfalls mit der Endonuklease PmeI geschnitten und die kodierende cDNA für nmbHIL-6 herausgelöst. Danach erfolgte die Ligation in pcDNA3.1. Gleichzeitig wurde das Plasmid pMows-puro-GFP vorbereitet, indem die kodierende cDNA für GFP über die Endonukleasen EcoNI und BamHI herausgeschnitten wurde. Die *sticky-ends* wurden über die Klenow Polymerase aufgefüllt und wurden damit zu glatten Enden (*blunt-ends*). pMows-puro wurde für die Ligation mit nmbHIL-6 verwendet.

Für die Generierung der Plasmide pcDNA3.1-nHIL-6-Fc und pMows-puro-nHIL-6-Fc wurde das Plasmid pcDNA3.1-HIL-6-Fc mit den Endonukleasen HindIII und NotI geschnitten. Es entstand pcDNA3.1-Fc. Das Plasmid nmbHIL-6 wurde als Template für eine PCR verwendet, um nHIL-6 zu generieren. Die Sequenz wurde über eine Sequenzierung überprüft und war fehlerfrei. Dieses wurde mit pcDNA3.1-Fc ligiert (Abbildung 8.11).

Ebenfalls wurde, wie zuvor beschrieben das Plasmid pMows-puro für die Ligation mit der cDNA von nHIL-6 vorbereitet (Abbildung 8.11).

Anhang

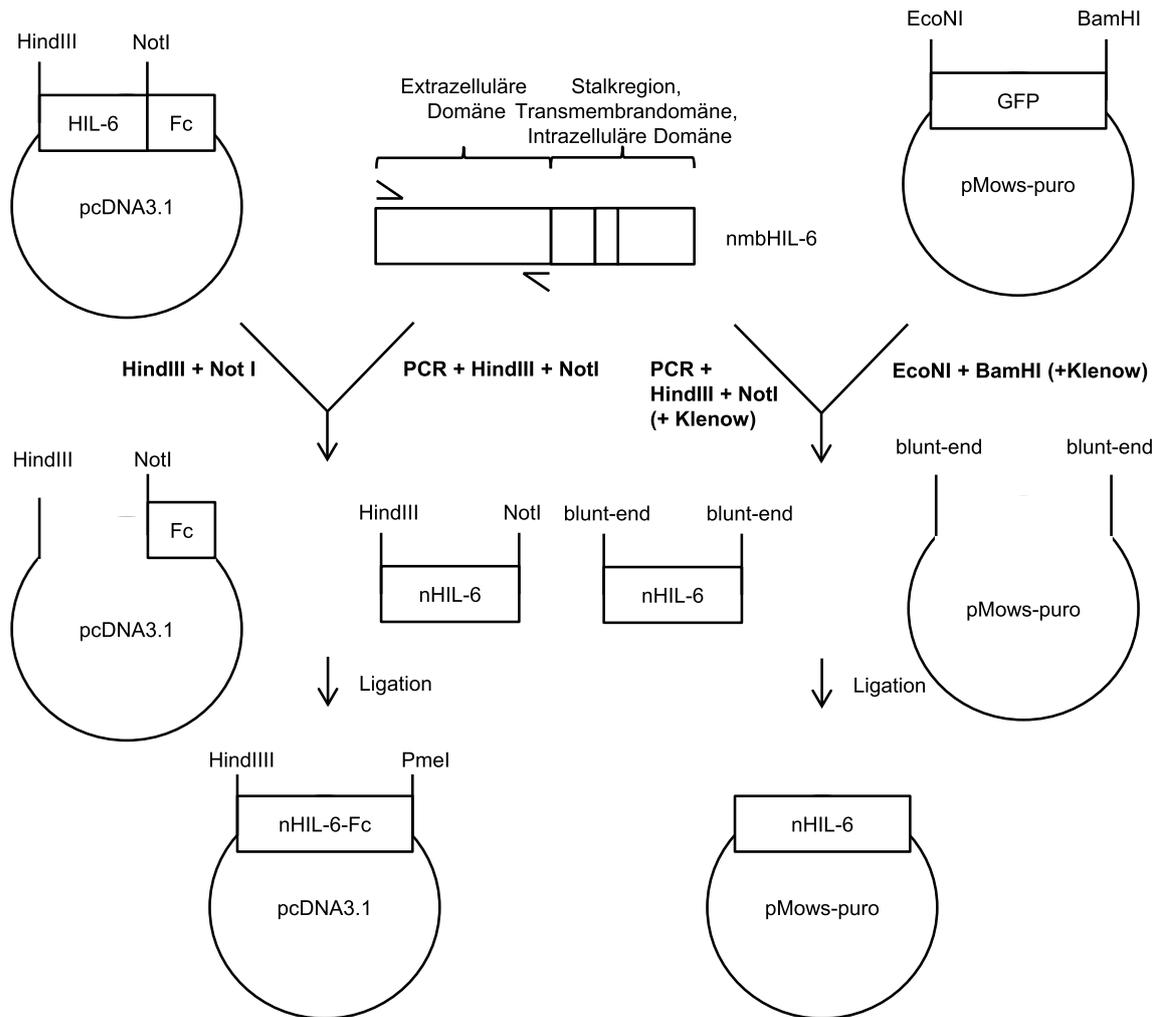


Abbildung 8.11: Erstellung von pcDNA3.1-nHIL-6-Fc und pMows-puro-nHIL-6-Fc. Zuerst wurde aus pcDNA3.1-HIL-6-Fc die kodierende cDNA vom HIL-6 über die Endonukleasen HindIII und NotI herausgeschnitten und das Plasmid für die Ligation vorbereitet. Das Plasmid pcDNA3.1-nmbHIL-6 wurde für die PCR als Template eingesetzt und nHIL-6 mit den endständigen Endonukleasen HindIII und NotI daraus generiert. Danach erfolgte die Ligation in pcDNA3.1-Fc. Gleichzeitig wurde das Plasmid pMows-puro-GFP vorbereitet, indem die kodierende cDNA für GFP über die Endonukleasen EcoNI und BamHI herausgeschnitten wurde. Die *sticky-ends* wurden über die Klenow Polymerase aufgefüllt und wurden damit zu glatten Enden (*blunt-ends*). PMows-puro wurde für die Ligation mit nHIL-6 verwendet.

Analog zum mbHIL-6 wurde ein mbHIL-11-myc generiert. Hierfür wurde die gleiche Klonierungsstrategie angewendet, wie für das mbHIL-6

Anhang

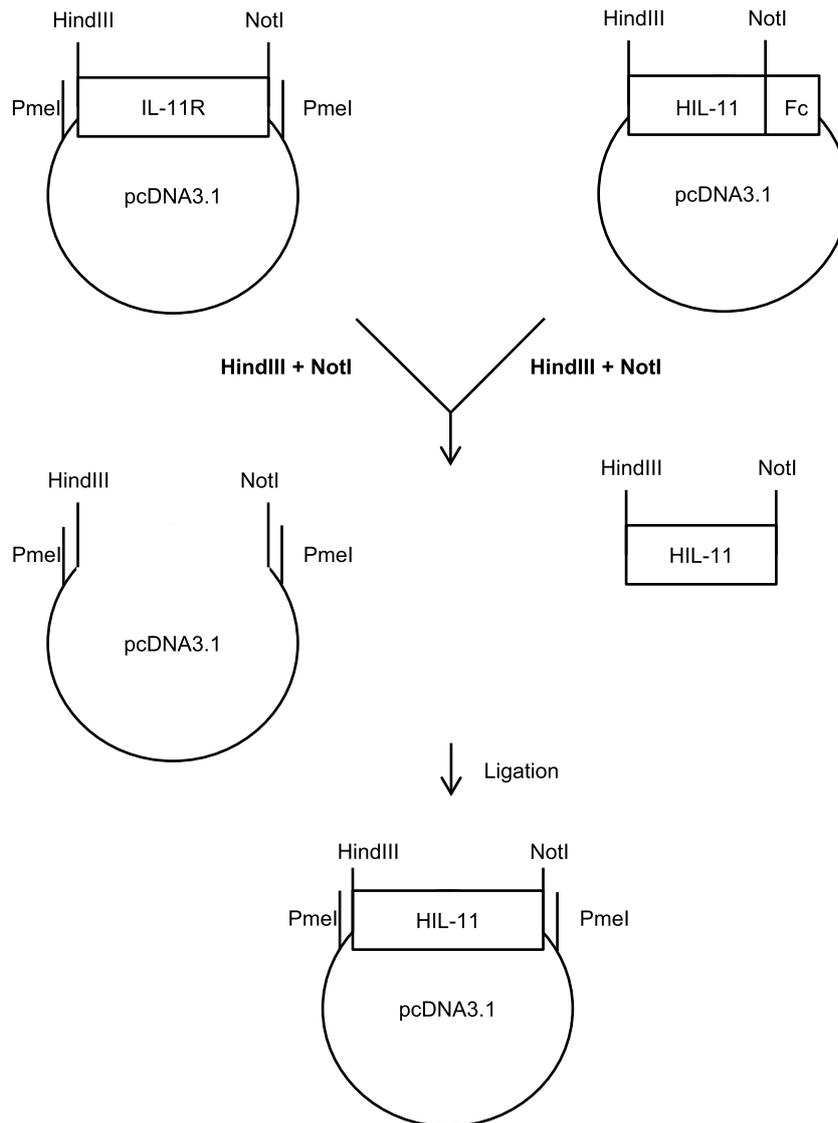


Abbildung 8.12: Klonierungsstrategie für pcDNA3.1-HIL-11. Zuerst wurden die Plasmide pcDNA3.1-IL-11R-myc und pcDNA3.1-HIL-11-Fc durch die Endonukleasen HindIII und NotI geschnitten. Es entstand das Plasmid pcDNA3.1 und die kodierende cDNA für HIL-11 ohne den Fc tag. HIL-11 wurde in das leere pcDNA3.1 Plasmid ligiert.

Hier ist die Klonierungsstrategie für mbHIL-11-myc dargestellt. Zuerst wurden die Plasmide pcDNA3.1-IL-11R und pcDNA3.1-HIL-11-Fc durch die Endonukleasen HindIII und NotI geschnitten. Es entstand das Plasmid pcDNA3.1 und die kodierende cDNA für HIL-11 ohne den Fc tag. HIL-11 wurde mit dem leeren pcDNA3.1 Plasmid ligiert (Abbildung 8.12).

Der nächste Schritt war die Einbringung der IL-11R-myc Stalkregion kodierenden DNA am Ende der HIL-11 kodierenden cDNA. Dafür wurde die Stalkregion des IL-11R-myc durch eine PCR mit den endständigen Schnittstellen von NotI versehen. Der myc-tag wurde intakt gelassen. Die Sequenz wurde durch eine Sequenzierung überprüft und war fehler-

frei. Das Plasmid pcDNA3.1-HIL-11 wurde mit den Endonukleasen Not I geschnitten, wodurch das geschnittene Plasmid mit der IL-11R Stalkregion ligiert wurde. Es entstand das Plasmid pcDNA3.1-mbHIL-11-myc (Abbildung 8.13).

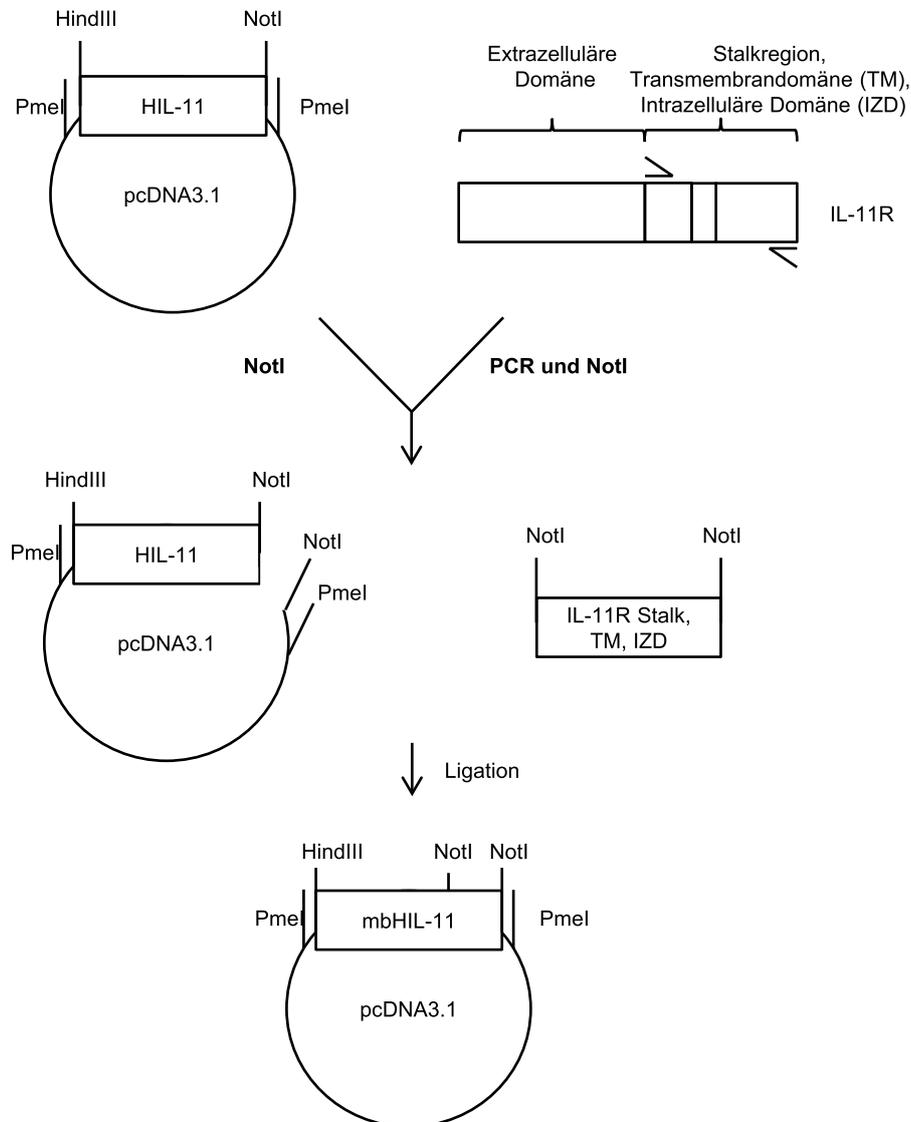


Abbildung 8.13: Klonierungsstrategie für pcDNA3.1-mbHIL-11. Es wurde die Stalkregion des IL-11R durch eine PCR amplifiziert und mit den endständigen NotI Schnittstellen versehen. Das Plasmid pcDNA3.1-HIL-11 wurde mit der Endonuklease NotI geschnitten, wodurch das geschnittene Plasmid mit der cDNA codierend für die IL-11R Stalkregion ligiert wurde. Es entstand das Plasmid pcDNA3.1-mbHIL-11.

Für die Subklonierung von pMows-puro, welches für die retrovirale Transduktion verwendet wird, wurde das Plasmid pcDNA3.1-mbHIL-11 mit der Endonuklease PmeI geschnitten. Damit wurde die cDNA für mbHIL-11 aus dem Plasmid herausgeschnitten, um diese in das Plasmid pMows-puro zu ligieren. pMows-puro-GFP wurde mit EcoNI und BamHI geschnitten. Da durch beide Endonukleasen ein *sticky-end* Überhang entsteht, wurde die

Anhang

Klenow Polymerase für die Auffüllung der *sticky-end* Fragmente verwendet. Dadurch entstanden *blunt-ends* (Abbildung 8.14).

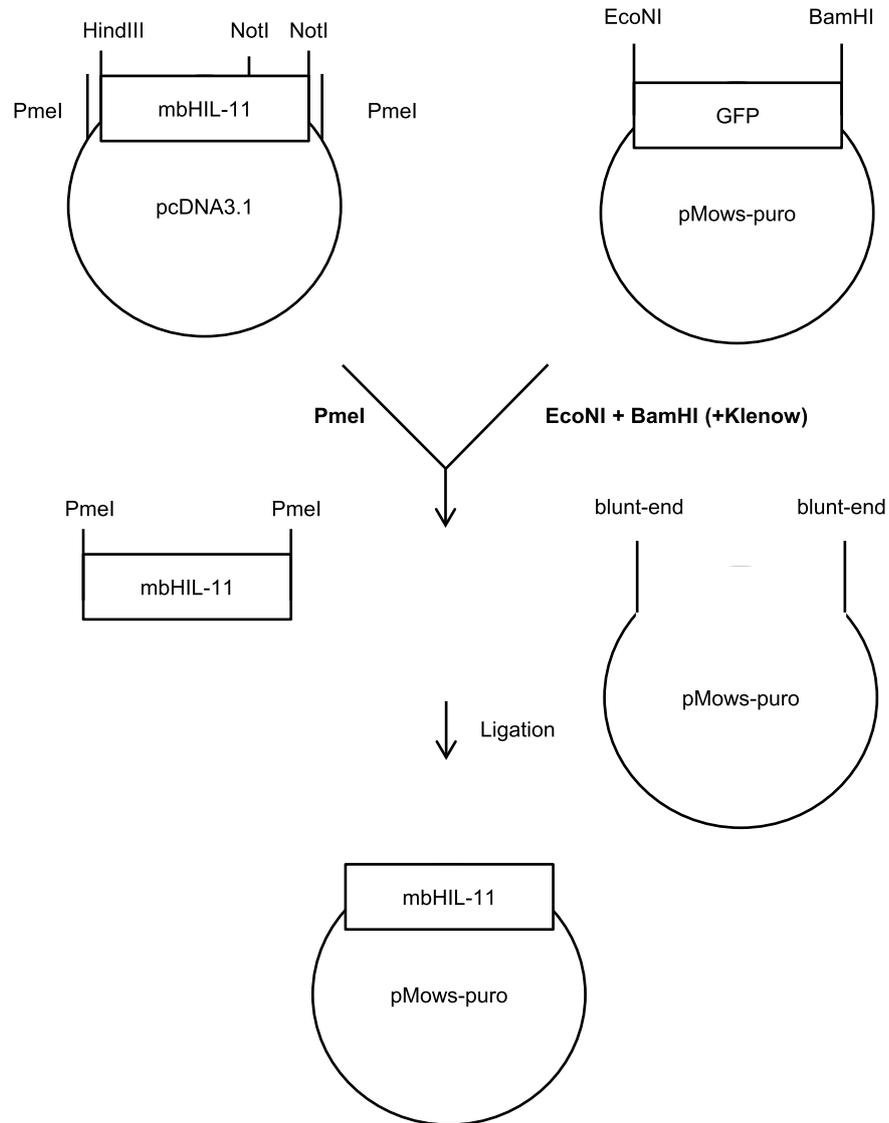


Abbildung 8.14: Subklonierung von mbHIL-11 in ein pMows-puro Plasmid. Für die Subklonierung von mbHIL-11 aus pcDNA3.1 in pMows-puro wurde zuerst die GFP kodierende cDNA über die Endonukleasen EcoNI und BamHI aus dem Plasmid pMows-puro-GFP herausgeschnitten. Die *sticky-ends* wurden über die Klenow Polymerase aufgefüllt und wurden damit zu glatten Enden (*blunt-ends*). Die für mbHIL-11 kodierende cDNA wurde aus dem Plasmid pcDNA3.1-mbHIL-11 über die Endonuklease PmeI herausgeschnitten und die mbHIL-11 cDNA in das Plasmid pMows-puro ligiert.

Es wurde zusätzlich eine Punktmutation in das mbHIL-11 eingebaut, wodurch mbHIL-11_{R355E} entstanden ist (Abbildung 8.15). Dies wurde über eine *site-directed mutagenesis-PCR* erreicht.

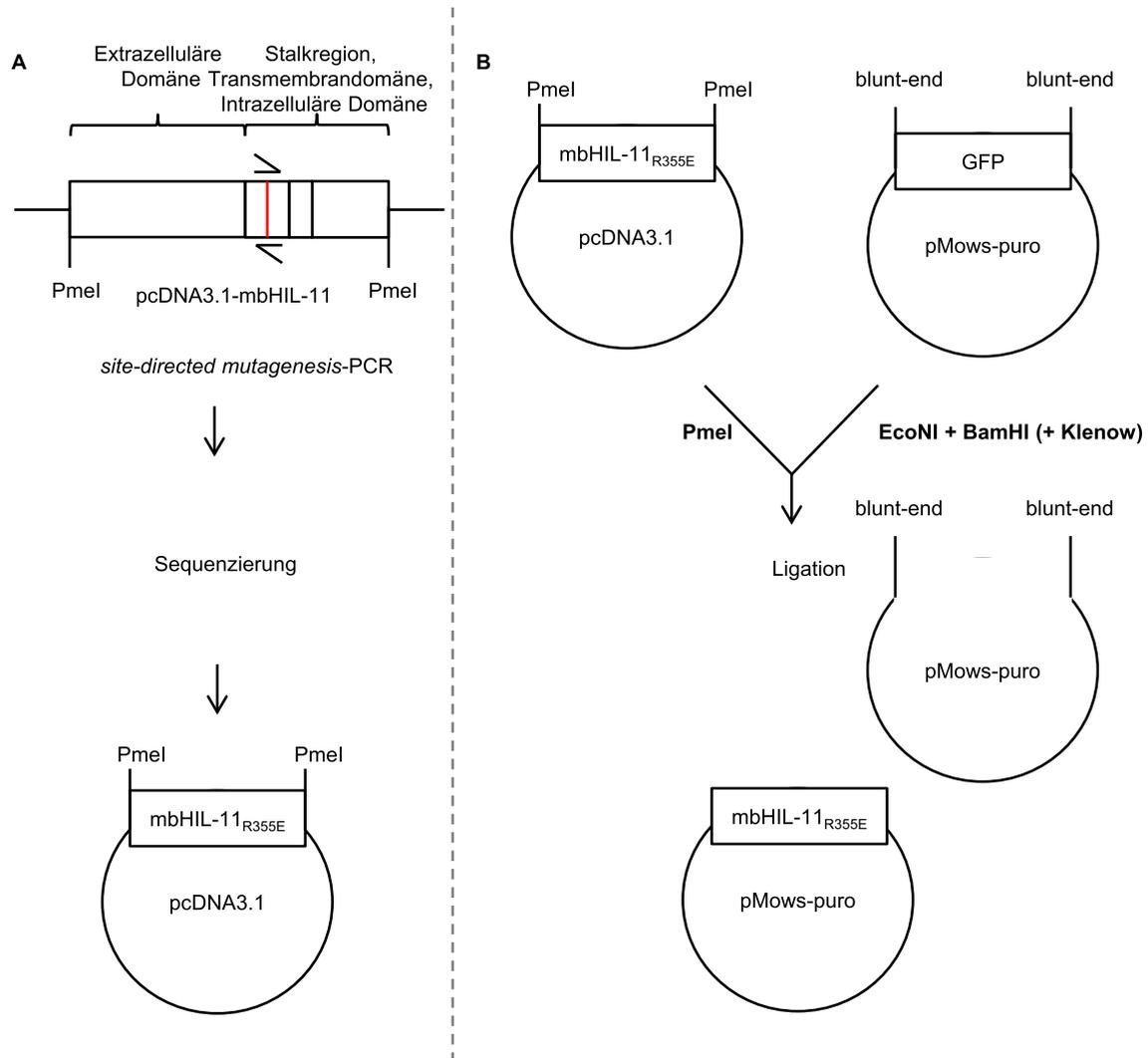


Abbildung 8.15: Generierung der Punktmutation mbHIL-11_{R355E} über eine *site-directed mutagenesis-PCR*. (A) Für die Generierung der Punktmutation von mbHIL-11_{R355E} wurde pcDNA3.1-mbHIL-11 als Template verwendet. (B) Nach erfolgter Sequenzierung wurde die Ligation mit pMows-puro durchgeführt.

Nach der Sequenzierung wurde die Umklonierung in ein vorbereitetes pMows-puro Plasmid vorgenommen (Abbildung 8.15).

Die im zweiten Teil dieser Arbeit generierten gp130 Deletionsvarianten wurden aufbauend auf dem Plasmid pcDNA3.1-gp130-myc generiert. Aufgrund der Länge der Namen wurde in den Abbildungen darauf verzichtet den myc-tag zu nennen. Er ist aber C-terminal angelegt.

Zuerst wurde die Variante gp130_{ΔD4-D6(Δ322-613),SΔ614-616} generiert. Dies erfolgte über eine *splicing by overlapping extension polymerase chain reaction (soe-PCR)* (Abbildung 8.16). Die Sequenz wurde über eine Sequenzierung überprüft und war fehlerfrei.

Für die Umklonierung von gp130_{ΔD4-D6(Δ322-613),SΔ614-616} in pMows-puro wurde wie bereits zuvor beschrieben pMows-puro vorbereitet (Abbildung 8.16).

Anhang

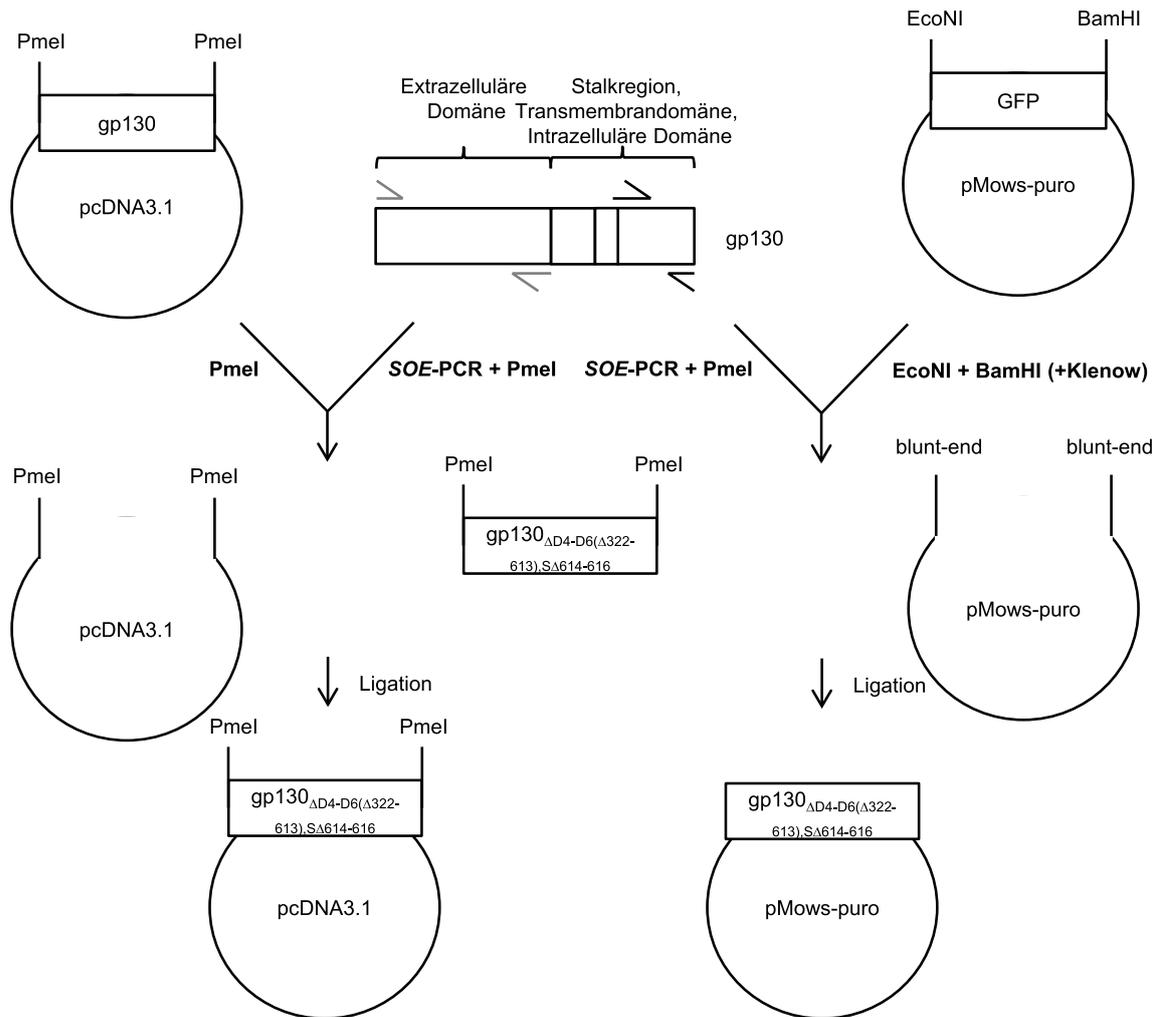


Abbildung 8.16: Generierung von gp130 $_{\Delta D4-D6(\Delta 322-613), S\Delta 614-616}$ über eine SOE-PCR. Für die PCR, um gp130 $_{\Delta D4-D6(\Delta 322-613), S\Delta 614-616}$ zu generieren, wurde die kodierende cDNA von gp130 als Template verwendet. Es erfolgte eine Deletion von Domäne 4 bis Domäne 6 und den ersten drei Aminosäuren der Stalkregion durch die SOE-PCR. Gleichzeitig wurde das Plasmid pMows-puro-GFP vorbereitet, indem die kodierende cDNA für GFP über die Endonukleasen EcoNI und BamHI herausgeschnitten wurde. Die *sticky-ends* wurden über die Klenow Polymerase aufgefüllt und wurden damit zu glatten Enden (*blunt-ends*). pMows-puro wurde für die Ligation mit gp130 $_{\Delta D4-D6(\Delta 322-613), S\Delta 614-616}$ verwendet.

Als nächstes wurden die Varianten gp130 $_{\Delta D4-D6(\Delta 322-613), S\Delta 614-617}$, gp130 $_{\Delta D4-D6(\Delta 322-613), S\Delta 614-618}$ und gp130 $_{\Delta D4-D6(\Delta 322-613), S\Delta 614-619}$ genauso generiert (Abbildung 8.17, 8.18 und 8.19).

Anhang

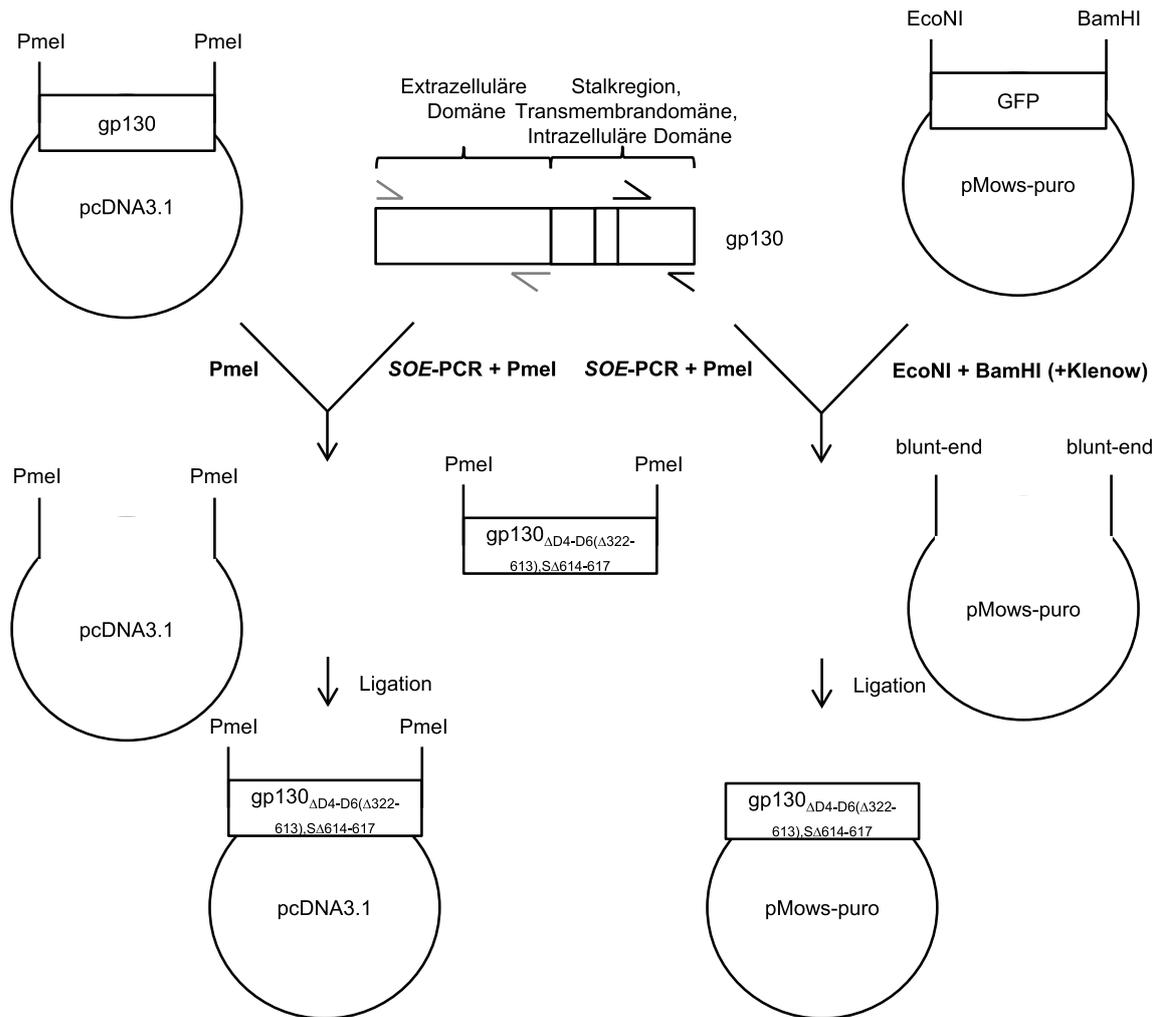


Abbildung 8.17: Generierung von $gp130_{\Delta D4-D6(\Delta 322-613), S\Delta 614-617}$ über eine *SOE-PCR*. Für die PCR, um $gp130_{\Delta D4-D6(\Delta 322-613), S\Delta 614-617}$ zu generieren, wurde die kodierende cDNA von gp130 als Template verwendet. Es erfolgte eine Deletion von Domäne 4 bis Domäne 6 und den ersten drei Aminosäuren der Stalkregion durch die *SOE-PCR*. Gleichzeitig wurde das Plasmid pMows-puro-GFP vorbereitet, indem die kodierende cDNA für GFP über die Endonukleasen EcoNI und BamHI herausgeschnitten wurde. Die *sticky-ends* wurden über die Klenow Polymerase aufgefüllt und wurden damit zu glatten Enden (*blunt-ends*). pMows-puro wurde für die Ligation mit $gp130_{\Delta D4-D6(\Delta 322-613), S\Delta 614-617}$ verwendet.

Dies erfolgte über eine *splicing by overlapping extension polymerase chain reaction (soe-PCR)* (Abbildung 8.17). Die Sequenz wurde über eine Sequenzierung überprüft und war fehlerfrei.

Für die Umklonierung von $gp130_{\Delta D4-D6(\Delta 322-613), S\Delta 614-617}$ in pMows-puro wurde wie bereits zuvor beschrieben pMows-puro vorbereitet (Abbildung 8.17).

Anhang

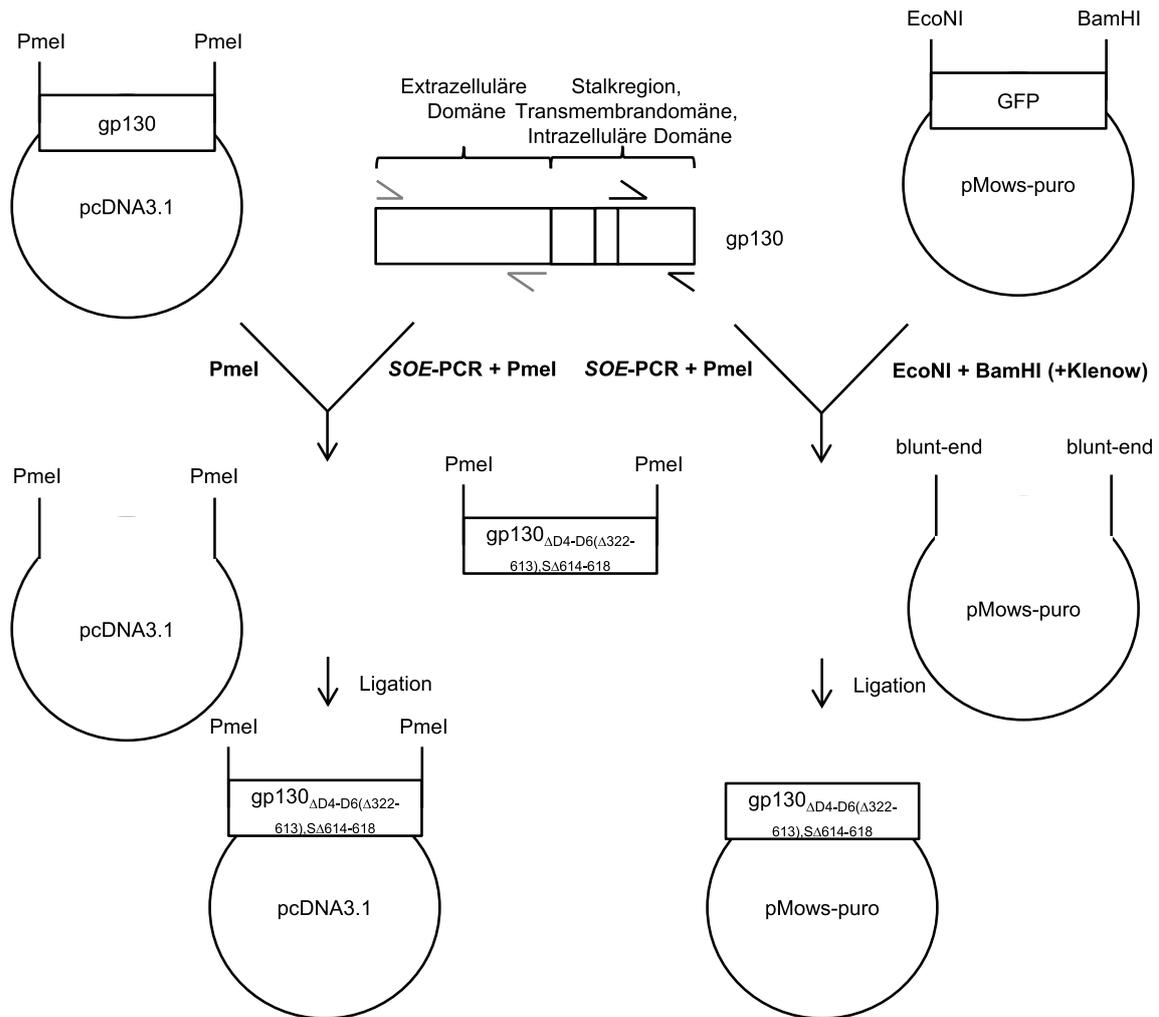


Abbildung 8.18: Generierung von gp130 Δ D4-D6(Δ 322-613),S Δ 614-618 über eine SOE-PCR. Für die PCR, um gp130 Δ D4-D6(Δ 322-613),S Δ 614-618 zu generieren, wurde die kodierende cDNA von gp130 als Template verwendet. Es erfolgte eine Deletion von Domäne 4 bis Domäne 6 und den ersten drei Aminosäuren der Stalkregion durch die SOE-PCR. Gleichzeitig wurde das Plasmid pMows-puro-GFP vorbereitet, indem die kodierende cDNA für GFP über die Endonukleasen EcoNI und BamHI herausgeschnitten wurde. Die *sticky-ends* wurden über die Klenow Polymerase aufgefüllt und wurden damit zu glatten Enden (*blunt-ends*). pMows-puro wurde für die Ligation mit gp130 Δ D4-D6(Δ 322-613),S Δ 614-618 verwendet.

Auch diese Deletionsvariante wurde über eine *splicing by overlapping extension polymerase chain reaction* (*soe-PCR*) (Abbildung 8.18). Die Sequenz wurde über eine Sequenzierung überprüft und war fehlerfrei.

Für die Umklonierung von gp130 Δ D4-D6(Δ 322-613),S Δ 614-618 in pMows-puro wurde wie bereits zuvor beschrieben pMows-puro vorbereitet (Abbildung 8.18).

Anhang

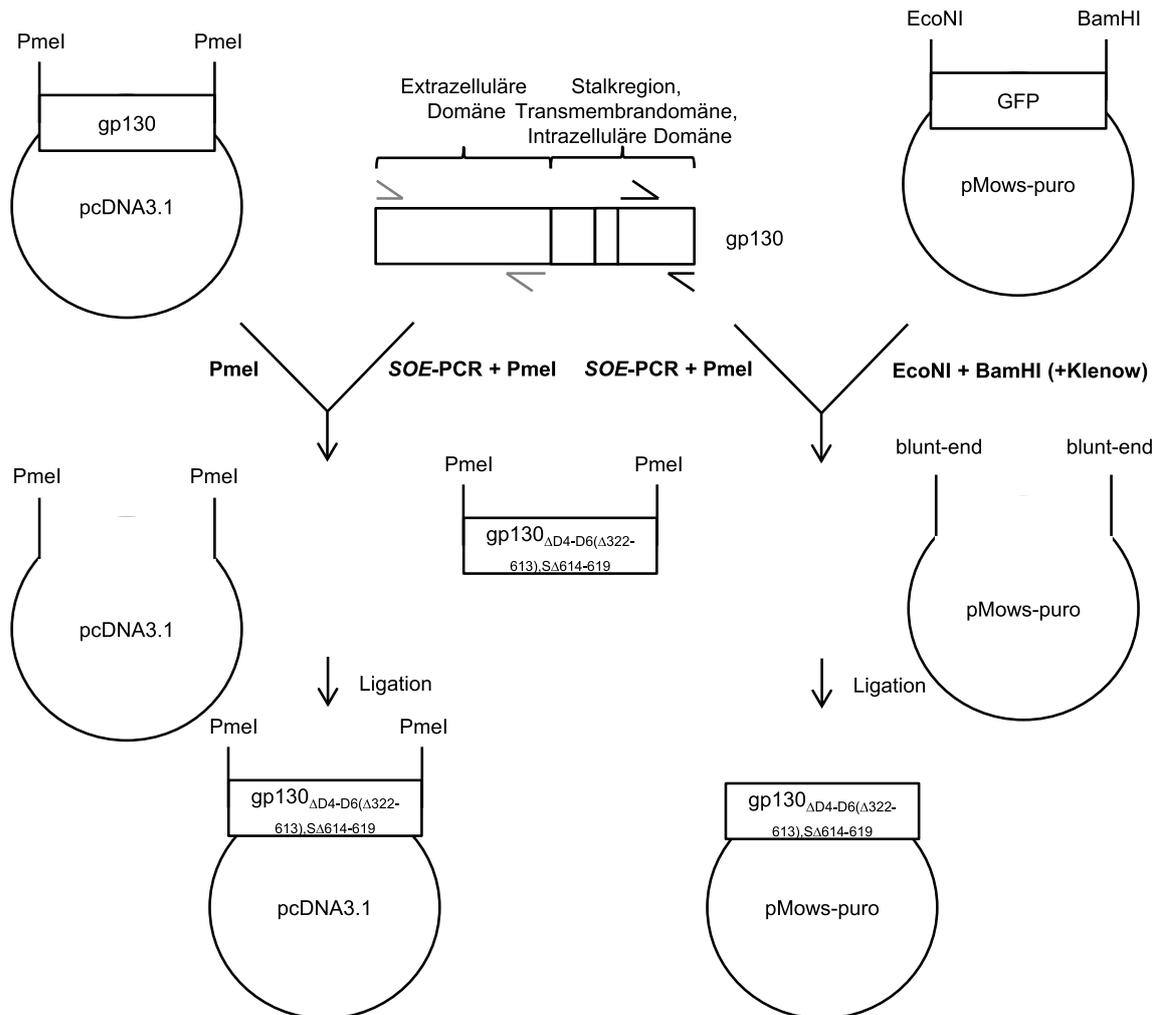


Abbildung 8.19: Generierung von $gp130_{\Delta D4-D6(\Delta 322-613),SA614-619}$ über eine *SOE-PCR*. Für die PCR, um $gp130_{\Delta D4-D6(\Delta 322-613),SA614-619}$ zu generieren, wurde die kodierende cDNA von gp130 als Template verwendet. Es erfolgte eine Deletion von Domäne 4 bis Domäne 6 und den ersten drei Aminosäuren der Stalkregion durch die *SOE-PCR*. Gleichzeitig wurde das Plasmid pMows-puro-GFP vorbereitet, indem die kodierende cDNA für GFP über die Endonukleasen EcoNI und BamHI herausgeschnitten wurde. Die *sticky-ends* wurden über die Klenow Polymerase aufgefüllt und wurden damit zu glatten Enden (*blunt-ends*). pMows-puro wurde für die Ligation mit $gp130_{\Delta D4-D6(\Delta 322-613),SA614-619}$ verwendet.

Auch diese Deletionsvariante wurde über eine *splicing by overlapping extension polymerase chain reaction (soe-PCR)* (Abbildung 8.19). Die Sequenz wurde über eine Sequenzierung überprüft und war fehlerfrei.

Für die Umklonierung von $gp130_{\Delta D4-D6(\Delta 322-613),SA614-619}$ in pMows-puro wurde wie bereits zuvor beschrieben pMows-puro vorbereitet (Abbildung 8.19).

Als nächstes wurde die Deletionsvariante von gp130 generiert, bei der die Domäne 4 bis 6 deletiert wurde, aber die Stalkregion intakt gelassen wurde ($gp130_{\Delta D4-D6}$). Dafür wurde auch die Methode der *SOE-PCR* angewendet (Abbildung 8.20).

Anhang

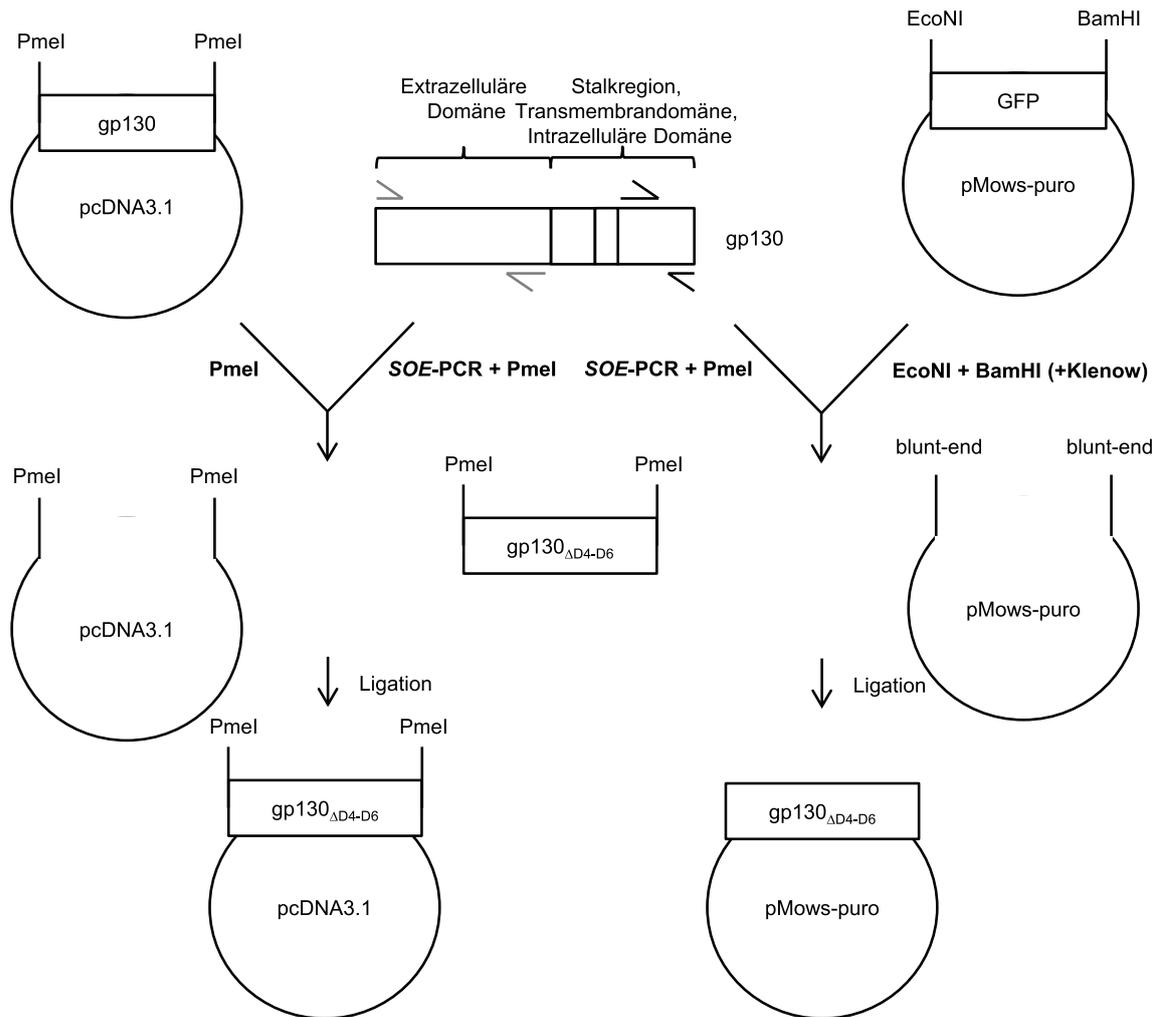


Abbildung 8.20: Generierung von gp130 Δ D4-D6 über eine SOE-PCR. Für die PCR, um gp130 Δ D4-D6 zu generieren, wurde die kodierende cDNA von gp130 als Template verwendet. Es erfolgte eine Deletion von Domäne 4 bis Domäne 6 und den ersten drei Aminosäuren der Stalkregion durch die SOE-PCR. Gleichzeitig wurde das Plasmid pMows-puro-GFP vorbereitet, indem die kodierende cDNA für GFP über die Endonukleasen EcoNI und BamHI herausgeschnitten wurde. Die *sticky-ends* wurden über die Klenow Polymerase aufgefüllt und wurden damit zu glatten Enden (*blunt-ends*). pMows-puro wurde für die Ligation mit gp130 Δ D4-D6 verwendet.

Für die Umklonierung in pMows-puro wurde wie bereits zuvor beschrieben pMows-puro vorbereitet (Abbildung 8.20). Die Sequenz wurde über eine Sequenzierung überprüft und war fehlerfrei.

Ebenso wurde die Variante mit einer Verkürzung der Stalkregion aber mit allen Domänen von gp130 generiert (gp130 Δ 614-616). Dafür wurde eine *site-directed mutagenesis*-PCR durchgeführt (Abbildung 8.21).

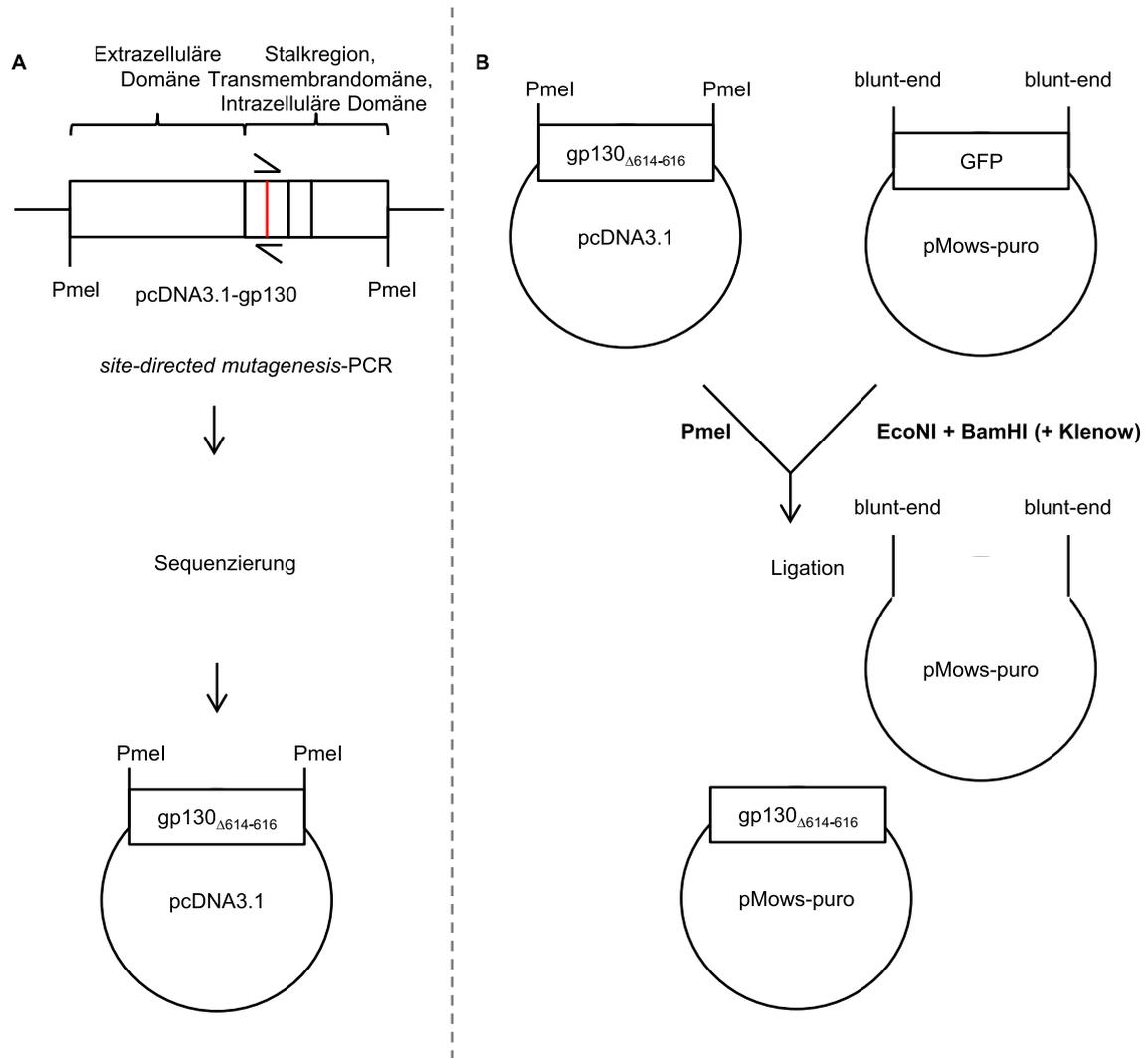


Abbildung 8.21: Generierung von gp130_{Δ614-616} über eine *site-directed mutagenesis*-PCR. (A) Für die Generierung der Punktmutation von gp130_{Δ614-616} wurde pcDNA3.1-gp130 als Template verwendet. (B) Nach erfolgter Sequenzierung wurde die Ligation mit pMows-puro durchgeführt.

Es wurde als nächstes die Variante gp130_{ΔD4-D6(Δ329-613)} generiert. Dies erfolgte über eine *SOE*-PCR (Abbildung 8.22). Die Sequenz wurde durch eine Sequenzierung überprüft und war fehlerfrei.

Für die Umklonierung von gp130_{ΔD4-D6(Δ329-613)} in pMows-puro wurde wie bereits zuvor beschrieben pMows-puro vorbereitet (Abbildung 8.22).

Anhang

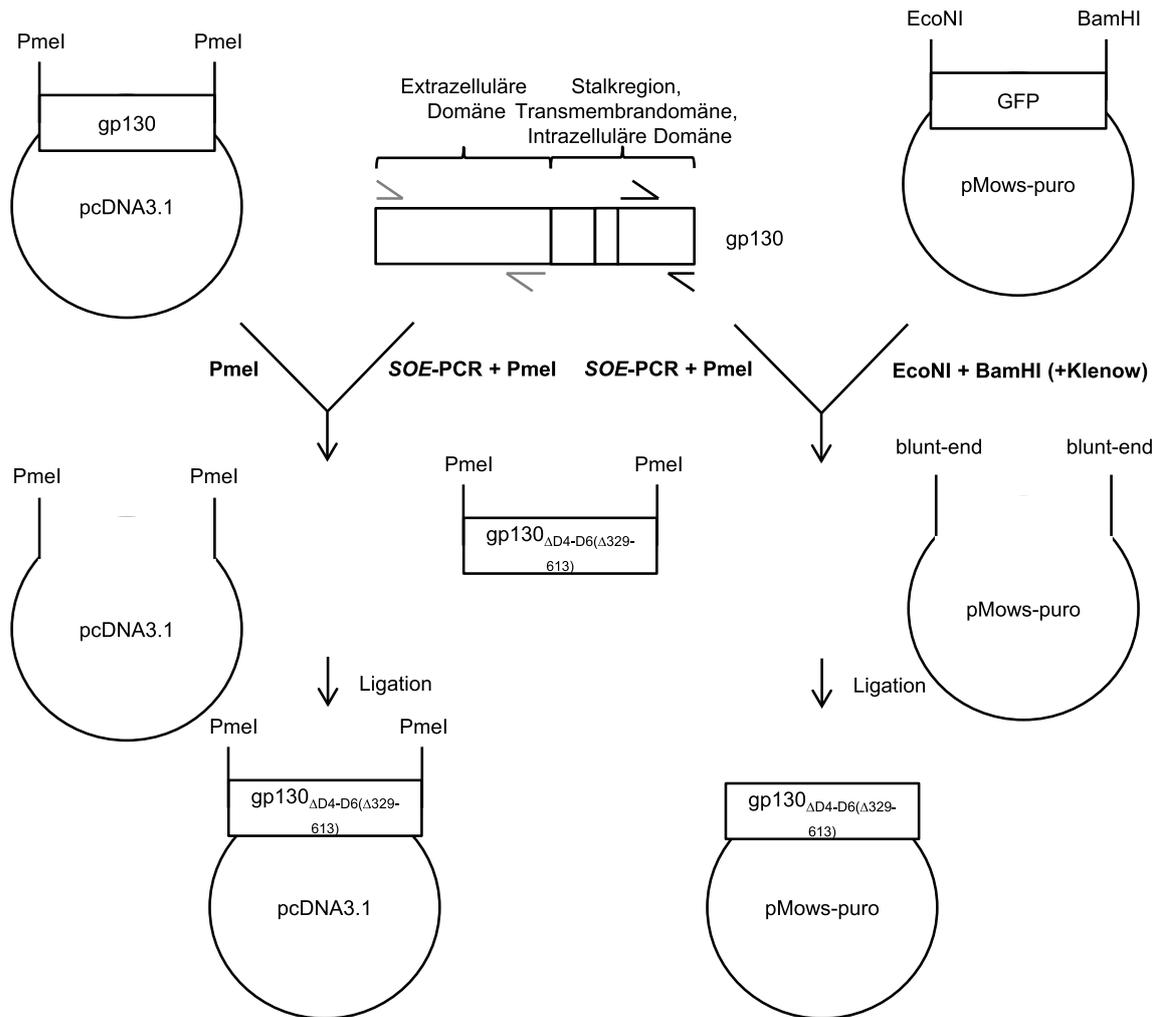


Abbildung 8.22: Generierung von gp130 Δ D4-D6(Δ 329-613) über eine SOE-PCR. Für die PCR, um gp130 Δ D4-D6(Δ 329-613) zu generieren, wurde die kodierende cDNA von gp130 als Template verwendet. Es erfolgte eine Deletion von Domäne 4 bis Domäne 6 und den ersten drei Aminosäuren der Stalkregion durch die SOE-PCR. Gleichzeitig wurde das Plasmid pMows-puro-GFP vorbereitet, indem die kodierende cDNA für GFP über die Endonukleasen EcoNI und BamHI herausgeschnitten wurde. Die *sticky-ends* wurden über die Klenow Polymerase aufgefüllt und wurden damit zu glatten Enden (*blunt-ends*). pMows-puro wurde für die Ligation mit gp130 Δ D4-D6(Δ 329-613) verwendet.

Als letztes wurde die Variante gp130 Δ D4-D6(Δ 329-613) Δ S Δ 614-616 generiert. Dies erfolgte über eine *soe*-PCR (Abbildung 8.23). Die Sequenz wurde durch eine Sequenzierung überprüft und war fehlerfrei.

Für die Umklonierung von gp130 Δ D4-D6(Δ 329-613) in pMows-puro wurde wie bereits zuvor beschrieben pMows-puro vorbereitet (Abbildung 8.23).

Anhang

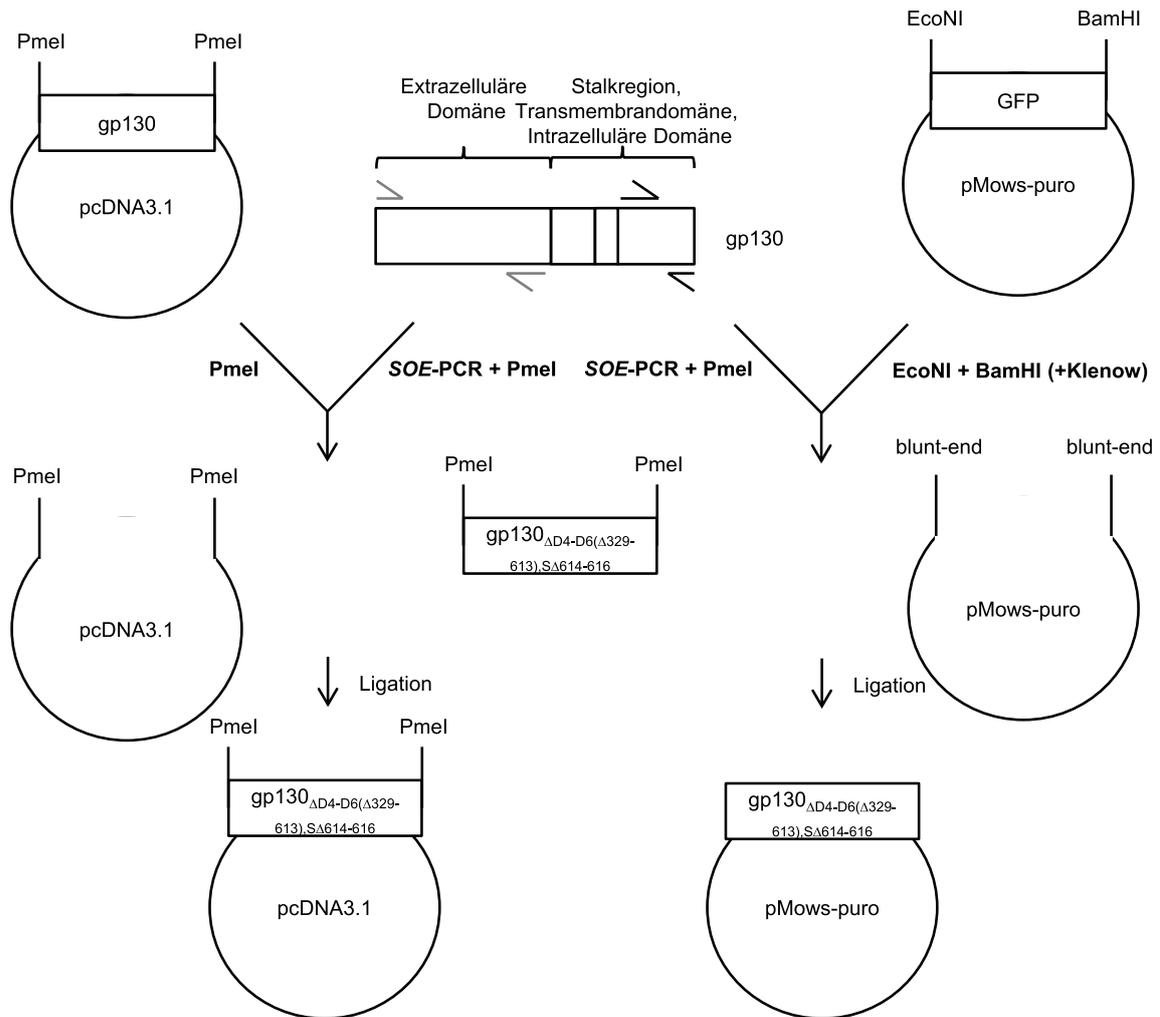


Abbildung 8.23: Generierung von $gp130_{\Delta D4-D6(329-613), \Delta S614-616}$ über eine SOE-PCR. Für die PCR, um $gp130_{\Delta D4-D6(329-613), \Delta S614-616}$ zu generieren, wurde die kodierende cDNA von gp130 als Template verwendet. Es erfolgte eine Deletion von Domäne 4 bis Domäne 6 und den ersten drei Aminosäuren der Stalkregion durch die SOE-PCR. Gleichzeitig wurde das Plasmid pMows-puro-GFP vorbereitet, indem die kodierende cDNA für GFP über die Endonukleasen EcoNI und BamHI herausgeschnitten wurde. Die *sticky-ends* wurden über die Klenow Polymerase aufgefüllt und wurden damit zu glatten Enden (*blunt-ends*). pMows-puro wurde für die Ligation mit $gp130_{\Delta D4-D6(329-613), \Delta S614-616}$ verwendet.

8.2 Publikationsverzeichnis

Publikationen, die in dieser Dissertation beschrieben wurden:

Lamertz, L., Floss, D. M. and Scheller, J. (2018). "Combined deletion of the fibronectin-type III domains and the stalk region results in ligand-independent, constitutive activation of the Interleukin 6 signal-transducing receptor gp130." *Cytokine*. **110** (428-434)

Lamertz, L., Rummel, F., Baran, P., Hansen, S., Waetzig, G. H., Moll, J., Floss, D. M. and Scheller, J. (2018). "Soluble gp130 prevents interleukin-6 and interleukin-11 cluster signaling but not intracellular autocrine responses."

Publiziert in: Science Signaling

Impact factor: 7,4

Eigener Anteil an dieser Arbeit: 75 %

- ➔ Klonierung von mbHIL-6 und Mutationsvarianten, sowie Subklonierungen
- ➔ Retrovirale Transduktion und Selektion von mbHIL-6, nmbHIL-6 und Mutationsvarianten
- ➔ Oberflächenexpression der Rezeptoren IL-6R, mbHIL-6, nmbHIL-6 und Mutationsvarianten
- ➔ Proliferationsassays von IL-6R, mbHIL-6, nmbHIL-6 und Mutationsvarianten
- ➔ Transaktivierungsassays von IL-6R, mbHIL-6, nmbHIL-6 und Mutationsvarianten
- ➔ Stimulationsassays von IL-6R, mbHIL-6, nmbHIL-6 und Mutationsvarianten
- ➔ Statistische Analyse

Die Experimente zu Interleukin-11 wurden initial von Franziska Rummel durchgeführt.

Weitere Publikationen:

Baran, P., Hansen, S., Waetzig, G. H., Akbarzadeh, M., Lamertz, L., Huber, H. J., Ahmadian, M. R., Moll, J. M. and Scheller, J. (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." *Journal of Biological Chemistry*. **293**, 6762-6775

Moll, J. M., Wehmöller, M., Frank, N. C., Homey, L., Baran, P., Garbers, C., Lamertz, L., Axelrod, J. H., Galun, E., Mootz, H. D. and Scheller, J. (2017). "Split2 protein-ligation generates active IL-6-type hyper-cytokines from inactive precursors." *American Chemical Society Synthetic Biology*. **6**, 2260-2272

Floss, D. M., Klöcker, T., Schröder, J., Lamertz, L., Mrotzek, S., Strobl, B., Hermanns, H. and Scheller, J. (2016). "Defining the functional binding sites of interleukin 12 receptor β 1 and interleukin 23 receptor to janus kinases." *Molecular Biology of the Cell*. **27**, 2301-2316

Monhasery, N., Moll, J., Cuman, C., Franke, M., Lamertz, L., Nitz, R., Görg, B., Häussinger, D., Lokau, J., Floss, Doreen M., Piekorz, R., Dimitriadis, E., Garbers, C. and Scheller, J. (2016). "Transcytosis of IL-11 and apical redirection of gp130 is mediated by IL-11 receptor." Cell Reports. **16**, 1067-1081

8.3 Danksagung

Viele Menschen haben mich bei der Verwirklichung dieser Arbeit unterstützt, denen ich Danke sagen möchte. Ohne sie hätte ich diese Arbeit nicht durchführen können.

An erster Stelle möchte ich meinem Doktorvater, Herr Prof. Dr. Jürgen Scheller, für die Möglichkeit zur Ausarbeitung meiner Dissertation am Institut für Biochemie und Molekularbiologie II bedanken. Neben seiner Rolle als Erstgutachter, hat er mir insbesondere als Betreuer während meiner Arbeit, immer mit einem offenen Ohr und konstruktiven Gesprächen sowie Anregungen zu Lösungsansätzen zur Seite gestanden. Zudem möchte ich mich herzlich für seine tatkräftige Unterstützung bedanken. Ich habe das nie als selbstverständlich erachtet und danke ihm dafür herzlich.

Mir ist es ebenso ein wichtiges Anliegen, Herrn Prof. Dr. William F. Martin für seinen Einsatz als Mastervater während meiner Masterarbeit und seinen Einsatz als Zweitgutachter für diese Arbeit zu danken.

Viele hilfreiche Tipps und tatkräftige Unterstützung beim Durchführen hier angewandter Untersuchungsmethoden habe ich von meinen Laborpartnern Frau Dr. Doreen Floss und Herr Dr. Jens Moll erfahren dürfen. Ich bedanke mich bei beiden herzlichst für den Wissensaustausch und ihre Geduld.

Größten Dank empfinde ich für die Hilfe vieler hilfsbereiter Arbeitskollegen des Institutes für Biochemie und Molekularbiologie II. Die durchweg positive, freundliche und motivierende Laboratmosphäre mit zahlreichen Ideen hat mich bei der Durchführung dieser Arbeit massiv unterstützt. In besonderem Umfang möchte ich meinen nächsten Laborkollegen Paul Baran, Erika Engelowski, Ramona Clemen, Sofie Beier, Manuel Franke und Nastaran Fazel danken. Ihr habt mir täglich und in scheinbar ausweglosen Situationen zur Seite gestanden. Wir hatten immer sehr viel Spaß zusammen. Ich freue mich, euch zu meinen Freunden zu zählen und bedanke mich bei euch herzlich.

Die wichtigste Person im Labor und die Koordinatorin des Laborlebens, Petra Oprée-Jeremic. Du warst und bist das Bindeglied, das entscheidende Zahnrad. Du warst uns allen immer eine unglaubliche Hilfe bei der Organisation im Labor und allen Lebenslagen abseits des Laborlebens. Dein großzügiger Einsatz ist einmalig, vielen herzlichen Dank für die gemeinsame Zeit!

Für den Ausgleich zum Laboralltag haben meine Freunde und Verwandte außerhalb des Labors tapfer meine Klagen ertragen und mir stets mit Rat zur Seite gestanden. Jeder einzelne hat mir den Rücken gestärkt, vielen Dank für eure Unterstützung. Besonders kreative

Anhang

und vielfältige Ideen zum Abschalten nach der Arbeit hatte meine langjährige Freundin und Weggefährtin Nadine Reinartz immer in der Hinterhand. Sie ist in schwierigen Zeiten ein wichtiger Mensch während und abseits meiner Arbeit. Ich danke dir vielmals für deine Hilfe und deinen Frohsinn.

Sehr danken möchte ich auch meinem Verlobten, Fabian Joslowski. Du hast mir mit seelischer, tatkräftiger und liebevoller Unterstützung den Alltag so angenehm wie möglich gestaltet. Als unerschöpflicher Diskussionspartner hast du, auch als völlig Fachfremder, mit mir jede Idee diskutiert und hinterfragt. „Was man anfängt, bringt man auch zu Ende.“ und „Aufgeben gibt’s nicht“, dein Motto, hat mich enorm angespornt. Vielen herzlichen Dank dafür und ich freue mich auf alles, was uns unser gemeinsames Leben noch vorhält.

Abschließend, aber nicht mit weniger Gewichtung, möchte ich meinen Eltern für die mein ganzes Leben andauernde Unterstützung und Motivation danken. Euer unerschöpflicher Vorrat an Geduld in allen Lebenslagen ist für mich, wie auch eure wertvollen Ratschläge, mit nichts aufzuwiegen. Ich danke euch von ganzem Herzen, dass ihr mich bei allen Unwegheiten unterstützt und zum guten Gelingen dieser Arbeit beigetragen habt.

8.4 Eidesstattliche Versicherung

Ich, Frau M.Sc. Larissa Lamertz, versichere an Eides statt, dass die vorliegende Dissertation mit dem Titel „Klassisches, *trans*- und *cluster-signaling* durch HIL-6 und membrangebundene HIL-6 (mbHIL-6) Varianten und Identifizierung von neuen konstitutiven gp130 Varianten“ von mir selbstständig 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 bei keiner anderen Institution eingereicht. Weiterhin habe ich bisher keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf, den _____

Unterschrift