

Aus dem Institut für Biochemie und Molekularbiologie II

der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Institutsleiter: Univ.- Prof. Dr. Jürgen Scheller

Charakterisierung und Inhibition von IL-11 *Cluster-*
und autokrinem klassischen *Signaling*

Dissertation

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

vorgelegt von

Franziska Rummel

2020

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. Jürgen Scheller

Zweitgutachter: PD Dr. Amin Polzin

*Diese Arbeit ist in großer Liebe und Dankbarkeit meinem Bruder und
meinen Eltern gewidmet.*

Publikation

Teile aus dieser Dissertation wurden veröffentlicht:

Originalbeiträge:

Lamertz, L.¹, **Rummel, F.**¹, Polz, R.¹, Baran, P.¹, Hansen, S.¹, Waetzig, G. H.², Moll, J. M.¹, Floss, D. M.¹ and Jürgen Scheller¹ (2018). „**Soluble gp130 prevents interleukin-6 and interleukin-11 cluster-signaling but not intracellular autocrine responses.**“ *Science Signaling*, 11 (550):eaa7388.

One-sentence summary:

Interleukine-6 and interleukine-11 cluster-signaling, but not intracellular autocrine signaling, is sensitive to blockade through soluble gp130.

Anteil der von mir durchgeführten Arbeiten in der Publikation:

- Klonierung von mbHIL-11 und mbHIL-11^{R355E}, sowie Subklonierungen
- Retrovirale Transduktion und Selektion von mbHIL-11, mbHIL-11^{R355E} und hIL-11R in Ba/F3 und Ba/F3-gp130 Zellen
- Oberflächenexpression von mbHIL-11, mbHIL-11^{R355E} und hIL-11R
- Zellviabilitätsassays von mbHIL-11 und mbHIL-11^{R355E}
- *Cluster-Signaling* in Western Blottings und Zellviabilitätsassays von mbHIL-11 und mbHIL-11^{R355E}
- Stimulationsassays von mbHIL-11 und mbHIL-11^{R355E}

¹ Institute of Biochemistry and Molecular Biology II, Medical Faculty, Heinrich-Heine-University, Düsseldorf 40225, Germany. ² CONARIS Research Institute AG, Kiel 24118, Germany.

Tagungsbeiträge:

Rummel F., Moll J., Scheller J. (2018). "Induktion von IL-11 Cluster-Signaling durch membrangebundenes Hyper-IL-11." Congress of the Medical Research School, Düsseldorf, Germany.

Zusammenfassung

Es ist beschrieben, dass Interleukin 6 *Site I*, *II* und *III* benötigt, um mit dem β -Rezeptor gp130 und IL-6 Rezeptor einen Komplex einzugehen und ein Signal zu induzieren. Bereits bekannte Mutationen an *Site II* und *III* können die biologische Aktivität von IL-6 nahezu vollständig inhibieren. In dieser Arbeit wurden erstmalig in den Hyperzytokinen HIL-6 und HIL-6Fc *Site II* und *III* mutiert und dadurch inaktiviert. Diese wurden dann auf ihre Fähigkeit als Inhibitor des IL-6 *Trans-Signalings* getestet. Zunächst als Überstände von transfizierten CHO Zellen. Dabei zeigte sich eine Inhibition der mit rekombinantem H-IL6 stimulierten Zellen durch die HIL-6/Fc Mutanten. Die Experimente wurden mit gereinigten Proteinen wiederholt. Auch hier war ein Inhibitionseffekt zu detektieren, allerdings erst bei sehr hohen Konzentrationen. Damit konnte gezeigt werden, dass HIL-6/Fc Varianten mit inaktiven *Sites II* oder *III* in der Lage sind, IL-6 *Trans-Signaling* zu inhibieren.

Die Zytokine IL-6 und IL-11 induzieren in Zielzellen Signale über die Interaktion mit spezifischen Rezeptoren (IL-6R / IL-11R), sowie gp130. Zusätzlich zu diesem als *Classic-Signaling* bezeichneten Signaltransduktionsmodus, ist das IL-6 *Trans-Signaling* über einen löslichen IL-6R gut dokumentiert. Analog zu IL-6 weisen kürzlich erschienene Studien darauf hin, dass auch ein löslicher IL-11R in humanem Serum existiert und IL-11 *Trans-Signaling* möglich ist. Kürzlich wurde eine dritte Möglichkeit der IL-6 vermittelten Signalweiterleitung beschrieben. Das sogenannte *Cluster-Signaling* erfolgt durch die Bildung eines IL-6:IL-6R Komplexes auf der Zelloberfläche der Transmitterzelle. Dieser präformierte Komplex kann an gp130 auf einer zweiten, sogenannten Receiverzelle binden und in dieser ein Signal induzieren. Für IL-11 war bislang nicht bekannt, ob *Cluster-Signaling* erfolgen kann. Um die Existenz eines möglichen IL-11 *Cluster-Signaling* Mechanismus zu untersuchen, wurden verschiedene Varianten eines membranständigen Hyperzytokins generiert. Zellen, die dieses Hyperzytokin aus löslichem IL-11R, der durch ein flexibles Linkersegment mit IL-11 und einer Transmembran-intrazellulären Domäne des IL-11R kovalent verbunden (mbHIL-11) ist, exprimieren, dienen als Modell für *Cluster-Signaling* assoziierte Transmitterzellen. Diese Transmitterzellen sind in der Lage, in IL-11R defizienten Receiverzellen ein Signal zu induzieren. Dabei konnte *Cluster-Signaling* klar vom *Trans-Signaling* differenziert und als eigener Signalmechanismus dokumentiert werden. Somit konnte in dieser Arbeit erstmalig der neue IL-11 Signalmechanismus *Cluster-Signaling* beschrieben werden.

Summary

It has been described that interleukin 6 requires distinct residues localized at sites I, II and III to bind to its receptors IL-6R and gp130. Mutations in sites II and III can completely inhibit the biological activity of IL-6. In this work, sites II and III were mutated and inactivated in the Hypercytokines HIL-6 and HIL-6Fc. These were then tested for their ability to inhibit IL-6 trans-signaling. First as supernatants from transfected CHO cells. An inhibition of recombinant H-IL6 stimulated cells by the HIL-6/Fc mutants was observed. The experiments were then repeated with purified proteins. Again, an inhibition effect has been detected, but only at very high concentrations. Thus, it was shown that HIL-6/Fc variants with inactive sites II or III are able to inhibit IL-6 trans-signaling.

The cytokines IL-6 and IL-11 induce signals in target cells via interaction with specific receptors (IL-6R / IL-11R), as well as gp130. In addition to this signal transduction mode, termed classic-signaling, IL-6 trans-signaling via soluble IL-6 complexes is well documented. Analogous to IL-6, recent studies indicate that soluble IL-11R also exists in human serum and that IL-11 trans-signaling is possible. Recently, a third possibility of IL-6 mediated signaling has been described. The so-called cluster-signaling occurs through the formation of an IL-6: IL-6R complex on the cell surface of the transmitter cell. This preformed complex can bind to gp130 on a second, so called receiver cell and induce signaling. Prior to this thesis it was not known if IL-11 cluster-signaling could occur. To investigate the existence of a possible IL-11 cluster signaling mechanism, various variants of a membrane-bound Hypercytokine from soluble IL-11R, which is covalently linked by a flexible linker segment with IL-11 and a transmembrane intracellular domain of IL-11R (mbHIL-11), were created. These transmitter cells are able to induce a signal in IL-11R deficient receiver cells, through cluster-signaling. In this work cluster-signaling could be clearly differentiated from trans-signaling and documented as a novel signaling mechanism.

Inhaltsverzeichnis

1	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	9
2	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	13
3	EINLEITUNG	15
3.1	ZYTOKINE DER INTERLEUKIN 6 FAMILIE: IL- 6 UND IL-11	15
3.2	DER IL-6 UND IL-11 REZEPTOR	17
3.3	INTRAZELLULÄRE SIGNALTRANSDUKTION DER INTERLEUKINE 6 UND 11	18
3.4	<i>CLASSIC-SIGNALING</i> VS. <i>TRANS-SIGNALING</i>	20
3.5	HYPERZYTOKINE ALS DESIGNERZYTOKINE UM SPEZIFISCH <i>TRANS-SIGNALING</i> ZU INDUZIEREN	22
3.6	KLINISCHE RELEVANZ UND AUSWIRKUNGEN VON <i>TRANS-SIGNALING</i>	24
3.7	INHIBITOREN DES SIGNALWEGS VON IL-6 UND IL-11	24
4	ZIELE DIESER ARBEIT	26
5	MATERIAL UND METHODEN	27
	MATERIAL	27
5.1	ANTIBIOTIKA	27
5.2	ANTI KÖRPER	27
5.3	CHEMIKALIEN	28
5.4	ENZYME	31
5.5	PLASMIDE	31
5.6	OLIGONUKLEOTIDE	33
5.7	MEDIEN ZUR KULTIVIERUNG VON PROKARYOTISCHEN ZELLEN	33
5.8	MEDIEN ZUR KULTIVIERUNG VON EUKARYOTISCHEN ZELLEN	34
5.9	GERÄTE	34
5.10	KITS	36
5.11	GRÖßENSTANDARDS	36
5.12	PUFFER UND LÖSUNGEN	36
5.13	REKOMBINANTE PROTEINE	39
5.14	VERBRAUCHSMATERIAL	39
5.15	ZELLINIEN	40
	METHODEN	42
5.16	MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	42
5.17	ZELLKULTURMETHODEN	47
5.18	PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN	50
5.19	STATISTISCHE METHODEN	54
6	ERGEBNISSE	55

6.1	HIL-6Fc <i>SITE</i> 2 UND <i>SITE</i> 3 MUTANTEN SIND INHIBITOREN VON IL-6	55
6.2	GENERIERUNG VON HIL-6Fc UND HIL-6 MIT INAKTIVER <i>SITE</i> II ODER III	56
6.3	EXPRESSION DER HIL-6Fc UND HIL-6 <i>SITE</i> II UND III IN CHO K1-ZELLEN	57
6.4	ÜBERPRÜFUNG DER DIMERISIERUNG VON Fc FUSIONIERTEN HYPERZYTOKINVARIANTEN	58
6.5	HIL-6/Fc <i>SITE</i> II UND III ALS IL-6 <i>SIGNALING</i> INHIBITOREN	59
6.6	EXPRESSION DER HIL-6Fc MUTEINE DURCH STABIL TRANSDUZIERTES CHO-K1 ZELLEN	61
6.7	INHIBITIONSVERHALTEN DER HIL-6Fc MUTANTEN ZU IL-6	63
6.8	EIN NEUER IL-11 SIGNALMECHANISMUS: <i>CLUSTER-SIGNALING</i>	65
6.9	GENERIERUNG EINES MEMBRANGEBUNDENEN HIL-11	66
6.10	EXPRESSION VON MBHIL-11 IN STABIL TRANSDUZIERTEN BA/F3 ZELLEN	69
6.11	BA/F3-MBHIL-11 ZELLEN INDUZIEREN <i>CLUSTER-SIGNALING</i>	71
6.12	BA/F3-GP130-MBHIL-11 ZELLEN PROLIFERIEREN AUTONOM DURCH AUTOKRINE STIMULATION UND SIND NICHT DURCH SGP130Fc INHIBIERBAR	73
6.13	DIFFERENZIERUNG ZWISCHEN <i>TRANS-SIGNALING</i> UND <i>CLUSTER-SIGNALING</i>	74
6.14	IL-11 <i>CLUSTER-SIGNALING</i> IST DURCH SGP130Fc INHIBIERBAR	77
6.15	IL-11 <i>CLUSTER-SIGNALING</i> LÄSST SICH VON <i>TRANS-SIGNALING</i> ABGRENZEN	80
6.16	BA/F3-HIL-11R ZELLEN ALS MODELL DES <i>CLUSTER-SIGNALINGS</i>	84
7	DISKUSSION UND AUSBLICK	86
7.1	NUTZEN VON HIL-6Fc <i>SITE</i> II UND III ALS KOMPETITIVE INHIBITOREN	86
7.2	ETABLIERUNG EINES ROBUSTEN <i>CLUSTER-SIGNALING</i> MODELLS BASIEREND AUF MEMBRANSTÄNDIGEN HYPERZYTOKINEN FÜR IL-11	86
7.3	IL-11 <i>CLUSTER-SIGNALING</i> IST DURCH SGP130Fc INHIBIERBAR	88
7.4	DIFFERENZIERUNG VON MBHIL-11 INDUZIERTEM <i>CLUSTER-SIGNALING</i> UND IL-11 <i>TRANS-SIGNALING</i>	88
7.5	KANN ES EIN <i>IN VIVO CLUSTER-SIGNALING</i> GEBEN?	89
7.6	WARUM IST AUTOKRINES KLASSISCHES <i>SIGNALING</i> NICHT DURCH SGP130Fc INHIBIERBAR?	90
8	DANKSAGUNG	91
9	LITERATURVERZEICHNIS	92
10	PLASMIDKARTEN	100

1 Abkürzungsverzeichnis

ADAM	A Disintegrin and Metalloproteinase
AS	Aminosäure(n)
AK	Antikörper
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
CHO K1 Zellen	Chinese hamster ovary K1 Zellen
CON A	Concavalin A Sepharose
D1-D3	Domäne 1-3
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EF	Ejektionsfraktion
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbant Assay
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FCS	Fetales Kälberserum
fw	Forward
GFP	Green fluorescent protein
gp130	Glykoprotein 130
h	human/ Stunde
HIL-11	Hyper-IL-11
HIL-6	Hyper-IL-6
ICD	Intrazelluläre Domäne
IL-11	Interleukin-11
IL-11R	Interleukin-11 Rezeptor
IL-6	Interleukin-6
IL-6R	Interleukin-6 Rezeptor

IgG	Immunglobulin G
Iono	Ionomycin
kDa	Kilodalton
mb	<i>membrane bound</i>
μl	Mikroliter
min	Minuten
ml	Milliliter
MLB	Miled Lysis Buffer
m/v	Masse pro Volumen
ng	Nanogramm
ns	Nicht sinifikant
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
pg	Picogramm
POD	Peroxidase
P-STAT	Phosphorylated signal transducer and activator of transcription
Puro	Puromycin
R	Rezeptor/ Arginin
Rec	Rekombinant
RLU	Relative light units
RNA	Ribonukleinsäure
Rpm	Rotationen pro Minute
Rcf	Relative centrifugal force
RT	Raumtemperatur
rv	Reverse
s	<i>soluble</i>
SDS	Sodium dodecyl sulphate

SDS-PAGE	<i>sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
sec	Sekunden
sIL-6R	Löslicher Interleukin-6 Rezeptor
sIL-11R	Löslicher Interleukin-11 Rezeptor
SN	<i>Supernatant</i> / Überstand
SOCS	<i>Suppressor of cytokine Signaling</i>
SOE-PCR	<i>Splicing by overlapping extension-PCR</i>
STAT	<i>Signal transducer and activator of transcription</i>
TBS	<i>Tris Buffered Saline</i>
T	Transmembran
TM	Transmembran Domäne
Tregs	Regulatorische T-Zellen
U	Units
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
WF	Waschfraktion
YFP	<i>Yellow fluorescent protein</i>

Aminosäuren

A	Alanin	Ala
R	Arginin	Arg
N	Aspargin	Asn
D	Asparginsäure	Asp
C	Cystein	Cys
Q	Glutamin	Gln
E	Glutaminsäure	Glu
G	Glycin	Gly
H	Histidin	His
I	Isoleucin	Ile

L	Leucin	Leu
K	Lysin	Lys
M	Methionin	Met
F	Phenylalanin	Phe
P	Prolin	Pro
S	Serin	Ser
T	Threonin	Thr
W	Tryptophan	Trp
Y	Tyrosin	Tyr
V	Valin	Val

2 Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1: PROTEINSTRUKTUREN VON IL-11 UND IL-6.	16
ABBILDUNG 2: SCHEMATISCHER AUFBAU DER IL-6 UND IL-11 REZEPTOREN.	18
ABBILDUNG 3: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES IL-6 / IL-11 SIGNALWEGS.	19
ABBILDUNG 4: SCHEMATISCHE ABBILDUNG DES <i>CLASSIC</i> - UND <i>TRANS-SIGNALINGS</i> .	21
ABBILDUNG 5: SCHEMATISCHE ÜBERSICHT DER PRO- UND ANTI-INFLAMMATORISCHEN EIGENSCHAFTEN VON IL-6.	22
ABBILDUNG 6: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG VON HYPERZYTOKINEN AUF GP130 EXPRIMIERENDEN ZELLEN.	23
ABBILDUNG 7: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG VON <i>IN VIVO CLUSTER-SIGNALING</i> .	24
ABBILDUNG 8: PROTEINSTRUKTUR DES IL-6.	56
ABBILDUNG 9: SCHEMATISCHE ÜBERSICHT ÜBER DIE KLONIERUNG VON HIL-6 / FC <i>SITE II</i> UND <i>III</i> .	57
ABBILDUNG 10: HIL-6/FC <i>SITE II</i> UND <i>III</i> WERDEN VON CHO-K1 ZELLEN EXPRIERT, IN DEN ÜBERSTAND SEKRETIERT UND DIMERISIEREN ÜBER IHREN FC-TAG.	59
ABBILDUNG 11: MUTIERTE HYPERZYTOKINE AGIEREN ALS <i>TRANS-SIGNALING</i> INHIBITOREN.	61
ABBILDUNG 12: KLONALE SELEKTION UND REINIGUNG VON HYPERZYTOKINARIANTEN.	63
ABBILDUNG 13: INHIBITIONSVERHALTEN VON MUTIERTEN HYPERZYTOKINEN IM VERGLEICH ZU SGP130Fc.	64
ABBILDUNG 14: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES <i>CLUSTER-SIGNALINGS</i> .	66
ABBILDUNG 15: SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DES AUFBAUS VON MEMBRANGEBUNDENEN HIL-11, HIL-11 FC UND DEM IL-11 REZEPTOR.	67
ABBILDUNG 16: KLONIERUNG VON MBHIL-11.	68
ABBILDUNG 17: MBHIL-11 UND HIL-11 WURDEN EXPRIERT. MBHIL-11 WURDE DEUTLICH WENIGER IN DEN ÜBERSTAND SEKRETIERT BZW. <i>GESHEDDED</i> ALS HIL-11.	70
ABBILDUNG 18: SCHEMATISCHE ABBILDUNG VON AUTOKRINEN KLASSISCHEN <i>SIGNALING</i> , <i>TRANS</i> - UND <i>CLUSTER-SIGNALING</i> .	71
ABBILDUNG 19: MEMBRANSTÄNDIGES HIL-11 INDUZIERT <i>CLUSTER-SIGNALING</i> UND AUTOKRINES KLASSISCHES <i>SIGNALING</i> .	72
ABBILDUNG 20: BA/F3-GP130-MBHIL-11 ZELLEN SIND AUTOKRIN PROLIFERATIV UND NICHT DURCH SGP130Fc INHIBIERBAR.	74
ABBILDUNG 21: AUFBAU, KLONIERUNG UND EXPRESSION DES MBHIL-11 ^{R355E} .	76
ABBILDUNG 22: <i>CLUSTER-SIGNALING</i> IST MIT MBHIL-11 ^{R355E} IM P-STAT3 WESTERN BLOT UND ZELLVIABILITÄTSASSAY DETEKTIERBAR UND DURCH SGP130Fc INHIBIERBAR.	79
ABBILDUNG 23: <i>CLUSTER-SIGNALING</i> IST IM WESTERN BLOT UND ZELLVIABILITÄTSASSAY VON <i>TRANS-SIGNALING</i> DIFFERENZIERBAR.	83
ABBILDUNG 24: HIL-11R ZELLEN ALS <i>IN VIVO</i> MODELL DES <i>CLUSTER-SIGNALINGS</i> .	85
ABBILDUNG 25: PLASMIDKARTE DES pCDNA3.1-HIL-6Fc.	100
ABBILDUNG 26: PLASMIDKARTE DES pCDNA3.1-HIL-6.	100
ABBILDUNG 27: PLASMIDKARTE DES pCDNA3.1-HIL-6Fc <i>SITE III</i> .	100

ABBILDUNG 28: PLASMIDKARTE DES pCDNA3.1-HIL-6 SITE III.	101
ABBILDUNG 29: PLASMIDKARTE DES pCDNA3.1-HIL-6Fc SITE II.	101
ABBILDUNG 30: PLASMIDKARTE DES pCDNA3.1-HIL-6 SITE II.	101
ABBILDUNG 31: PLASMIDKARTE DES pCDNA3.1-HIL-11Fc.	102
ABBILDUNG 32: PLASMIDKARTE DES pCDNA3.1-sIL-11R-STALK-T/ICD.	102
ABBILDUNG 33: PLASMIDKARTE DES pCDNA3.1-MBHIL-11.	102
ABBILDUNG 34: PLASMIDKARTE DES pCDNA3.1-MBHIL-11^{R355E}.	103
ABBILDUNG 35: PLASMIDKARTE DES pMOWS- MBHIL-11.	103
ABBILDUNG 36: PLASMIDKARTE DES pMOWS- MBHIL-11^{R355E}.	103

3 Einleitung

3.1 Zytokine der Interleukin 6 Familie: IL- 6 und IL-11

Zytokine sind Botenstoffe, welche verschiedene Vorgänge des Körpers modulieren. Unterteilt werden Zytokine in Interleukine (IL), Interferone, Chemokine und Wachstumsfaktoren. Interleukine sind körpereigene Botenstoffe des Immunsystems. Sie vermitteln die Kommunikation zwischen Zellen, die an Immunreaktionen beteiligt sind. Diese Arbeit wird sich hauptsächlich mit IL-6 und IL-11 beschäftigen.

Interleukine der IL-6 Familie spielen eine wichtige Rolle in vielen physiologisch und pathophysiologischen Vorgängen. Zum einen sind sie an embryonaler und neuronaler Entwicklung, T-Zell Differenzierung und regenerativen Prozessen beteiligt. Zum anderen auch an entzündlichen Prozessen (Tanaka and Kishimoto, 2014). Mitglieder der IL-6 Familie sind IL-6, IL-11, IL-27, IL-30, Leukämie inhibierender Faktor (LIF), Onkostatin M (OSM), ziliärer neurotropher Faktor (CNTF) und Cardiotrophin (CT)-1 (Heinrich et al., 1998). Interleukin 6 und 11 haben eine Sequenzhomologie von etwa 24% (Hilton et al., 1994). Trotz dieser geringen Homologie besitzen beide Proteine ähnliche Strukturen. Wie alle Interleukine der IL-6 Familie besitzen IL-6 und IL-11 eine 4-Helixbündelstruktur mit einer charakteristischen *up-up-down-down* Topologie (siehe Abbildung 1). Die Helix A ist mit der Helix B über einen langen *Loop* verbunden und liegen parallel zueinander. Helix B und Helix C sind durch einen kurzen *Loop* voneinander abgegrenzt und sind antiparallel. Helix C und D sind wieder über einen langen *Loop* verbunden und parallel (Heinrich et al., 1998). Der Signalweg beider Interleukine funktioniert über eine Bindung an das β -Rezeptor Glykoprotein 130 – kurz gp130. Dabei bilden sie ein Homodimer aus zwei gp130 Molekülen. IL-6 und 11 sind die einzigen Zytokine aus der IL-6 Familie, die den Signalweg auf diese Weise aktivieren. Ebenfalls teilen sie gemeinsame Signalwege, hauptsächlich über STAT3 (*Signal transducer and activator of transcription 3*) (Rose-John, 2018) .

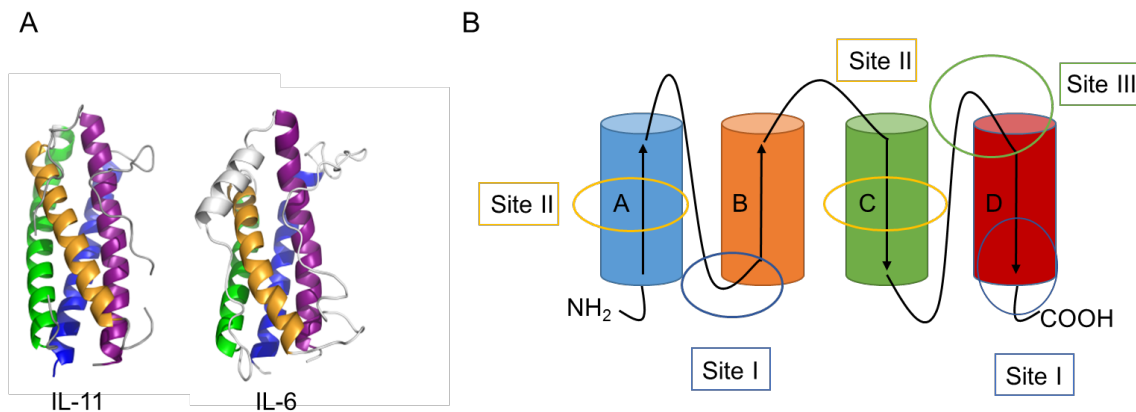


Abbildung 1: **Proteinstrukturen von IL-11 und IL-6.**

A) Typische 4 Helixbündelstruktur von IL-11 und IL-6. Dargestellt sind Kristallstrukturen als Cartoonrepräsentation. Proteinstruktur des IL-11 (PDB 4mhl) links. Proteinstruktur des IL-6 (PDB 1IL-6) rechts.
B) Schematische Darstellung der up-up-down-down Topologie von IL-6 und IL-11. Sites I-III sind jeweils farblich umrandet.

IL-6 besitzt drei *Sites*, die alle essentiell für die Bildung des Komplexes mit gp130 und dem IL-6 Rezeptor sind. *Site I*, bestehend aus Teilen der Helix B und D, ist wichtig für die Bindung an den IL-6Ra. *Site II*, bestehend aus Teilen der Helix A und C, ist essentiell für die Bindung an gp130 (Savino et al., 1994). *Site III*, bestehend aus dem terminalen Teil des C-D loops, wird benötigt, um ein zweites gp130 Molekül mit dem Komplex aus IL-6/IL-6R und eine gp130 Einheit zu verknüpfen (Paonessa et al., 1995). Erst durch die Rekrutierung eines zweiten gp130 Moleküls kann eine gp130-dimerisierungsabhängige Signaltransduktion erfolgen. (Paonessa et al., 1995). *Site II* und III sind für diese Dimerisierung essentiell (Barton et al., 2000).

Die Funktionen und Effekte von IL-6 und IL-11 sind vielseitig. Interleukin 6 ist an der Akuten-Phase-Reaktion, Stimulation von Lymphozyten, Embryonalentwicklung, T-Zell Differenzierung, Neuronalentwicklung, Hämatopoese und dem Knochenmetabolismus beteiligt (Kamimura et al., 2003). Diese pleiotropen Effekte können sowohl pro- als auch antiinflammatorisch sein (Scheller et al., 2011). IL-11 ist hauptsächlich an regenerativen Funktionen, wie zum Beispiel Wundheilung, Knochenmarksproliferation und Differenzierung, Stimulation von Plasmazellen, Megakaryozytenformation, Proliferation und Regeneration von Darmmukosazellen beteiligt (Kobayashi et al., 1994) (Putoczki and Ernst, 2010). Ebenfalls gibt es im Tierversuch Hinweise darauf, dass IL-11 wichtig für die Fertilität und Schwangerschaftserhaltung ist (Paiva et al., 2009). Andererseits sind hohe IL-11 Serumkonzentrationen auch mit einer ungünstigeren Brustkrebsprognose assoziiert

(Johnstone et al., 2015). Des Weiteren hat IL-11 einen Einfluss auf die Pathogenese von Krankheiten, die durch eine deregulierte Mukosahomöostase entstehen. Dazu gehören gastrointestinale Tumore. IL-11 beeinflusst dabei das Überleben, die Metastasierung und die Kapazität der Tumorzellen (Putoczki and Ernst, 2015).

Vergleicht man beide Interleukine im Hinblick auf verschiedene Krankheitsbilder miteinander, lassen sich einige Unterschiede feststellen (Garbers and Scheller, 2013). Bei kardiovaskulären Erkrankungen ist IL-6 für Hypertrophie und Fibrotisierung der Myokardzellen verantwortlich (Mir et al., 2012). IL-11 weist dabei regenerative Eigenschaften auf (Obana et al., 2010). Bei asthmatischen Erkrankungen sorgt IL-6 für einen Anstieg der T₂-Helferzellen während IL-11 für eine Depression dieser Zellen verantwortlich ist (Wang et al., 2000) (Doganci et al., 2005). In der Knochenhämostase stimuliert IL-6 Osteoklasten, während IL-11 Osteoblasten zur Proliferation anregt (Takeuchi et al., 2002) (Poli et al., 1994).

3.2 Der IL-6 und IL-11 Rezeptor

Die bereits erwähnten IL-6 artigen Zytokine sind Polypeptide mit einem Molekulargewicht von ungefähr 20 kDa. IL-6 und IL-11 sind klassisch sekretorische Proteine mit N-terminalen Signalpeptiden. Die Rezeptoren von IL-6 und 11 sind Typ I Membranproteine und haben einen extrazellulären N-Terminus und eine Transmembrandomäne (siehe Abbildung 2). Die Rezeptoren sind aus drei extrazellulären Domänen aufgebaut. Domäne 1 (D1) besteht aus einer IgG-ähnlichen Domäne am N-Terminus. D2 und D3 sind die zytokinbindenden Regionen, bestehend aus dem zytokinbindenden Modul (CBM) (Heinrich et al., 1998). Dieses besteht aus zwei Fibronectin-*TypeIII-like* Domänen, die am N-Terminus vier Cysteinreste und am C-Terminus ein WSXWS Motiv beinhalten (Bazan, 1990) (Sprecher et al., 1998). Es folgen dann eine flexible Stalkregion, an die sich eine transmembran und intrazelluläre Domäne (ICD) anschließen (Lupardus et al., 2011). Der wesentliche Unterschied zwischen dem IL-6R und IL-11R ist die verschieden lange ICD. Während sie beim IL-6R 82 Aminosäuren beträgt, ist sie beim IL-11R 31 Aminosäuren lang (Heinrich et al., 1998). Auch wenn sich die beiden Zytokine im Aufbau sehr ähneln, beträgt die sequenzielle Übereinstimmung nur etwa 24% (Hilton et al., 1994).

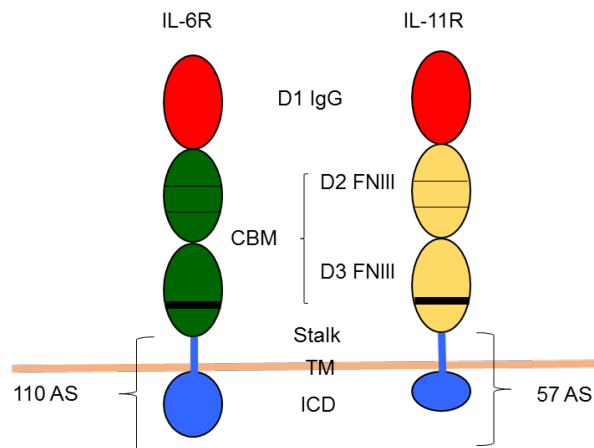


Abbildung 2: **Schematischer Aufbau der IL-6 und IL-11 Rezeptoren.**

In Rot sind die IgG-ähnlichen Domänen dargestellt. In Gelb bzw. grün sind die zwei Fibronektin III Domänen, die zusammen das *Cytokine-binding module* (CBM) bilden, gezeigt. Die dünnen schwarzen Linien stellen die Cysteinreste und die dicke Linie das WSXWS Motiv dar. In blau sind der *Stalk*, die Transmembrandomäne und die intrazelluläre Domäne mit ihrer Aminosäureanzahl dargestellt. Schema selbst erstellt, basierend auf (Heinrich et al., 1998).

Während gp130 ubiquitär auf fast allen Zelltypen exprimiert wird (außer dendritischen Zellen (Heink et al., 2017)), werden zytokinspezifische Rezeptoren zellspezifisch exprimiert. Der IL-6 Rezeptor wird hauptsächlich auf T- und B-Lymphozyten, Monozyten, Makrophagen, Adipozyten und Hepatozyten exprimiert (Kishimoto et al., 1995). Auch auf Zellen des Pankreas konnte der IL-6 Rezeptor nachgewiesen werden. Dort soll es die Regression von Diabetes mellitus Typ II bewirken (Ellingsgaard et al., 2008). Der IL-11 Rezeptor befindet sich auf hämatopoetischen Zellen, Lymphozyten, B-Zellen, Makrophagen, epithelialen Zellen, Osteoklasten und Kardiomyozyten (Putoczki and Ernst, 2010).

3.3 Intrazelluläre Signaltransduktion der Interleukine 6 und 11

Da weder der IL-6 noch der IL-11 Rezeptor alleine signalkompetent sind, sind IL-6 und IL-11 auf das Glykoprotein130 (gp130) angewiesen (Nandurkar et al., 1996). Dieses besteht aus sechs Domänen. Wie von den IL-6 / IL-11 Rezeptoren bekannt, ist D1 die IgG-ähnliche Domäne und D2 und D3 sind die zytokinbindenden Regionen; D4-6 sind die Fibronektin-III-ähnlichen Domänen (Lupardus et al., 2011). Intrazellulär befinden sich Bindungsstellen für die *signal transducer and activator of transcription* (STAT) und rezeptorassoziierte Tyrosinkinasen. Alle Mitglieder der IL-6 Familie rekrutieren gp130 für ihre Signaltransduktion. IL-6 und IL-11 binden an die α -Untereinheit ihres Rezeptors. Dieser Komplex rekrutiert zwei gp130 Moleküle (Heinrich et al., 1998). Dadurch können eine

Vielzahl von Signalwegen aktiviert werden. Dabei kann gp130 bereits als vorgeformter Dimer auf der Zelloberfläche existieren, um eine schnelle Signalinduktion nach IL-6-Bindung zu ermöglichen (Tenhumberg et al., 2006) (Giese et al., 2005).

Im Folgenden wird der für diese Arbeit wichtige JAK/STAT-Signalweg beschrieben. Janus Kinasen (JAK) sind intrazelluläre Tyrosinkinase. Nach Bildung des IL-6:IL-6 Rezeptor Komplexes, sowie der Dimerisierung der gp130 Moleküle, wird insbesondere JAK1 aktiviert. Es kommt zur Phosphorylierung des zyttoplasmatischen Teils von gp130. JAKs binden hierbei an N-terminale Tyrosinreste und phosphorylieren diese. Dadurch entstehen Bindestellen für die STAT Moleküle. STAT1 und 3 werden daraufhin ebenfalls von den JAKs phosphoryliert, wodurch die STATs dimerisieren. Dimerisierte STAT Homo- und Heterodimere gelangen in den Nukleus und induzieren dort Genexpression (Heinrich et al., 1998). Dies ist in Abbildung 3 schematisch dargestellt. Die wichtigste negative Regulation des IL-6 Signalwegs erfolgt über *suppressor of cytokine signaling 3* (SOCS3). SOCS3 wird nach der Aktivierung von gp130 durch IL-6 hochreguliert und sorgt durch JAK Inaktivierung und Ubiquitinierung des Signalkomplexes für eine Abschaltung des IL-6 Signals (Babon et al., 2014).

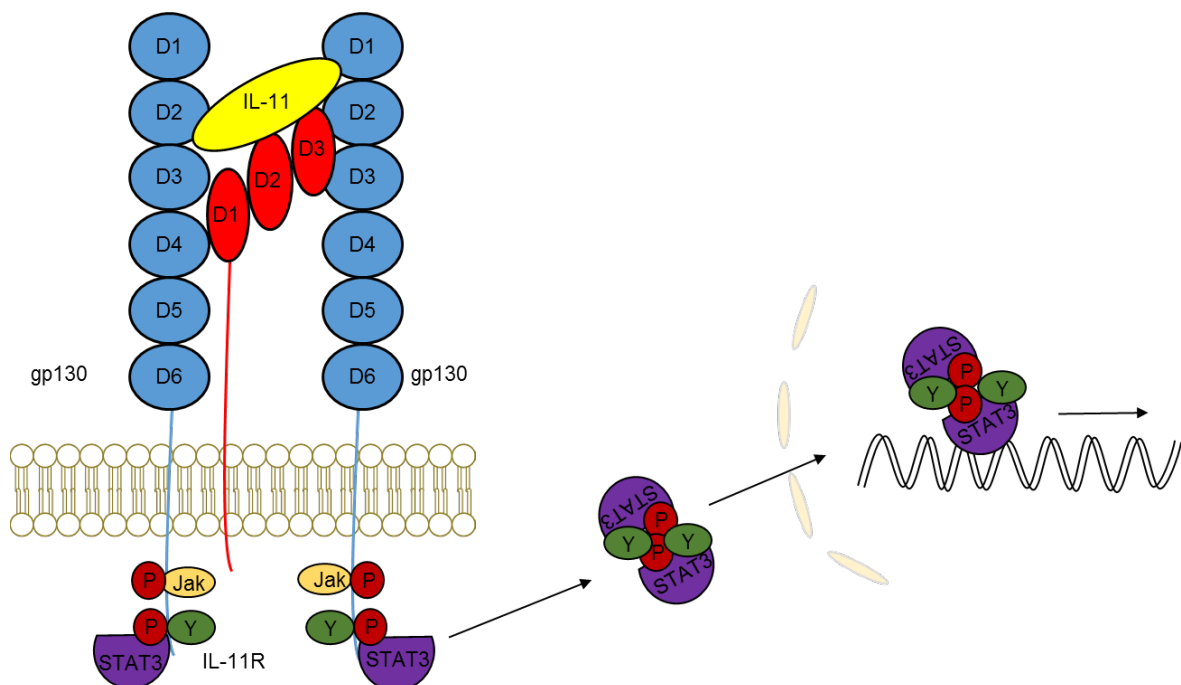


Abbildung 3: **Schematische Darstellung des IL-6 / IL-11 Signalwegs.**

Das Zytokin IL-11 / IL-6 bindet an seinen Rezeptor und rekrutiert daraufhin zwei gp130 Moleküle. Diese bilden ein Homodimer. Die Januskinasen (JAK) autophosphorylieren, daraufhin erfolgt eine Phosphorylierung von intrazellulären Tyrosinresten der gp130 Moleküle. Dadurch entsteht eine Bindungsstelle für STAT3 Moleküle. Die STAT3 können an den Komplex binden und werden phosphoryliert. Phosphorylierte STAT3 Proteine bilden Homodimere, die in den Zellkern gelangen und dort als Transkriptionsfaktor aktiv sind.

3.4 Classic-Signaling vs. Trans-Signaling

Bisher sind zwei Wege bekannt, über die IL-6/ IL-11 rezeptortragende Zellen Signale transduzieren können. Über den membrangebundenen Rezeptor wird das *Classic-Signaling* und über eine lösliche Form des Zytokinrezeptors das *Trans-Signaling* aktiviert. Für das *Classic-Signaling* bindet IL-6 bzw. IL-11 an seinen membrangebundenen α -Rezeptor. Im Anschluss werden zwei gp130 Moleküle rekrutiert. Nur der Komplex aus dem Zytokin und seinem membranständigen α -Rezeptor kann gp130 binden, die zwei Komponenten allein nicht. Beim *Trans-Signaling* wird der IL-6 Rezeptor durch proteolytische Prozesse, z.B. *Ectodomain Shedding* oder alternativ *Splicing*, in seine lösliche Form gebracht. Die dafür hauptsächlich verantwortlichen Proteasen sind ADAM10 und 17. Diese sind Mitglieder der *A Disintegrin and Metalloproteinase* (ADAM) Familie (Garbers et al., 2011a). Daraufhin kann ein Komplex aus löslichem (s)IL-6R und IL-6 entstehen (Müllberg et al., 1993, Matthews et al., 2003). Dieser bindet an Zellen, die keinen IL-6R aufweisen. Auf der Zelloberfläche bindet der Komplex an zwei gp130 Rezeptoren und aktiviert intrazelluläre Signalwege (siehe Abbildung 4). Diese Kaskaden sind hauptsächlich der *Janus kinase/signal transducer and activator of transcription* (JAK/STAT) und *mitogenactivated protein kinase* (MAPK) Signalweg (Rose-John, 2012). Der sIL-6R:IL-6 Komplex bindet mit einer etwa 100-fach höheren Affinität an gp130 als IL-6 an seinen Rezeptor (Rose-John, 2012). Die Signaltransduktion über den löslichen IL-6 Rezeptor wird *Trans-Signaling* genannt (Rose-John and Heinrich, 1994). Hinweise auf einen sIL-11R waren dokumentiert (Robb et al., 1996). Für IL-11 ist bislang nur das *Classic-Signaling* untersucht. Kürzlich wurde allerdings ADAM10 als *Sheddase* für den IL-11R in humanem Serum beschrieben. Damit ist es sehr wahrscheinlich, dass es neben IL-6 *Trans-Signaling* auch IL-11 *Trans-Signaling* gibt. Analog zu IL-6 *Trans-Signaling* ist auch IL-11 *Trans-Signaling* durch sgp130 inhibierbar (Lokau et al., 2016).

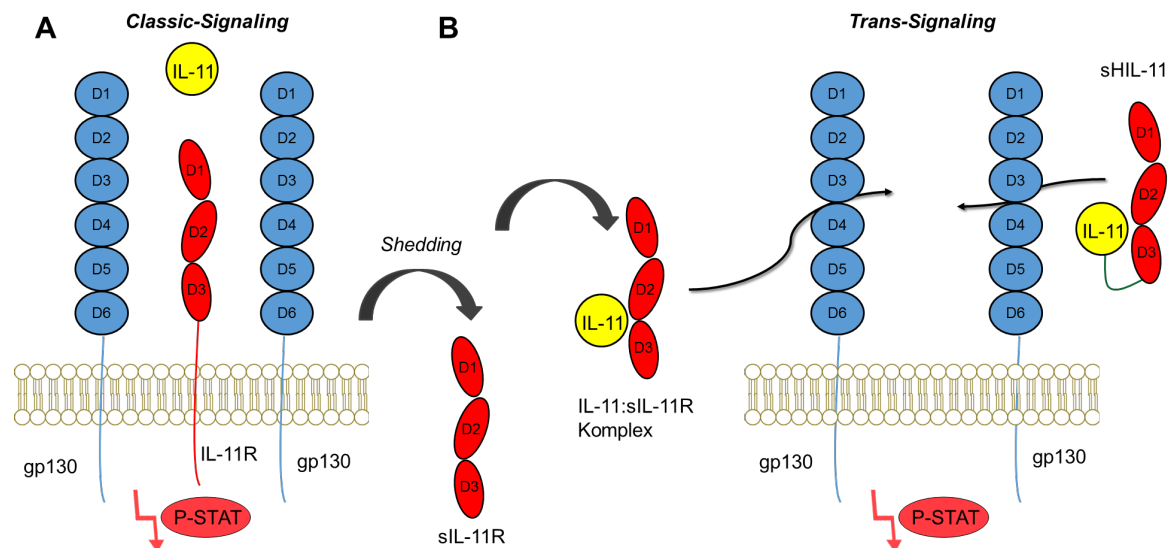


Abbildung 4: **Schematische Abbildung des Classic- und Trans-Signaling.**

A) Classic-Signaling: IL-11 bindet den membrangebundenen IL-11 Rezeptor und bildet einen Komplex mit zwei gp130 Molekülen. **B) Trans-Signaling:** Der membrangebundene IL-11 Rezeptor wird durch limitierte Proteolyse (oder alternative Mechanismen) in eine lösliche Form gebracht. Der sIL-11R formt nun mit IL-11 einen Komplex und kann Zellen stimulieren, die gp130, aber keinen IL-11R, auf ihrer Oberfläche exprimieren.

Wie in Abbildung 5 dargestellt, ist IL-6 *Classic-Signaling* mit regenerativen Funktionen wie epitheliale Regeneration assoziiert (Scheller et al., 2011). Weitere wichtige Funktionen sind die Verteidigung gegen bakterielle Infektionen durch die akute Phase Reaktion (Xing et al., 2009) (Garbers et al., 2015). Auch die Beteiligung des IL-6 *Classic-Signaling* an der Kontrolle chronisch viraler Erkrankungen konnte gezeigt werden (Harker et al., 2011). Gp130 wird ubiquitär in fast allen humanen Zellen exprimiert. Damit entscheidet beim *Classic-Signaling* die Tatsache, ob ein membrangebundener IL-6/-11 Rezeptor auf der Zelloberfläche vorhanden ist, darüber, ob ein Signalweg über IL-6/-11 stattfindet. Dies sind bei IL-6 z.B. Hepatozyten, Makrophagen, Monozyten, neutrophile Granulozyten und Adipozyten (Mackiewicz et al., 1992). Während beim *Classic-Signaling* nur diese IL-6R/-11R tragenden Zellen aktiviert werden können, können durch *Trans-Signaling* im Prinzip alle Zellen auf IL-6 / IL-11 reagieren. Dies ist mit verschiedenen inflammatorischen und autoimmunen Erkrankungen assoziiert, zum Beispiel der Entwicklung von kolorektalen Karzinomen (Becker et al., 2005), rheumatoider Arthritis, Multipler Sklerose, Enzephalomyelitis und Morbus Crohn (Scheller et al., 2014). Das Gleichgewicht zwischen *Classic-* und *Trans-Signaling* wird hauptsächlich über die Aktivität der ADAM Proteasen aufrechterhalten und entscheidet maßgeblich darüber, ob die anti-inflammatorischen oder pro-inflammatorischen Eigenschaften des IL-6 überwiegen (Drucker et al., 2010) (Scheller et al., 2011). Dies ist in Abbildung 5 schematisch dargestellt.

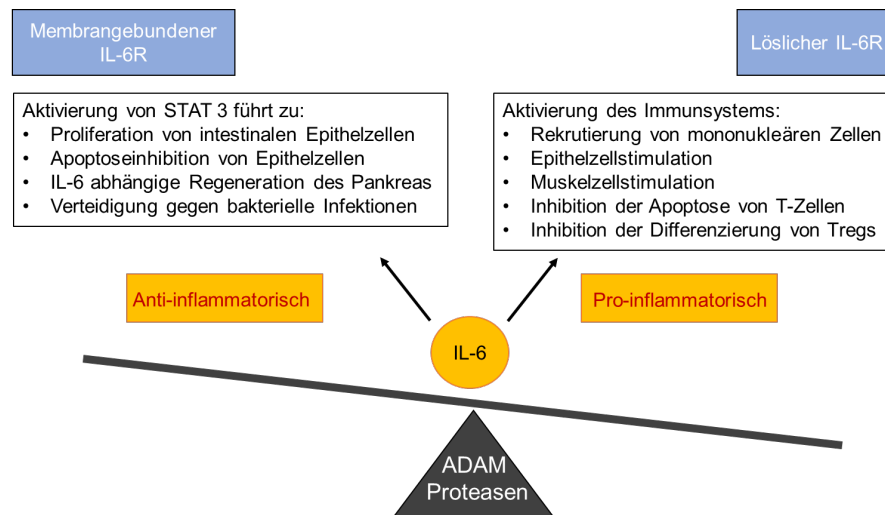


Abbildung 5: **Schematische Übersicht der pro- und anti-inflammatorischen Eigenschaften von IL-6.**

Während das *Classic-Signaling* über den membrangebundenen IL-6R anti-inflammatorischen Eigenschaften hat, ist das *Trans-Signaling* über den löslichen IL-6R mit pro-inflammatorischen Eigenschaften assoziiert. Schema selbst erstellt, basierend auf (Scheller et al., 2011).

3.5 Hyperzytokine als Designerzytokine um spezifisch *Trans-Signaling* zu induzieren

Ein Hyperzytokin besteht aus einem Zytokin, welches durch einen flexiblen Linker kovalent mit seinem α -Rezeptor verknüpft ist. Das erste Hyperzytokin wurde 1997 von (Fischer et al., 1997) beschrieben. Dafür wurde der sIL-6R über einen flexiblen Peptidlinker aus 13 Aminosäuren mit IL-6 verbunden. Dieses Designerzytokin kann Zellen stimulieren, die gp130, aber keinen IL-6R, exprimieren. Solche Zellen würden normalerweise nicht auf IL-6 reagieren. Auf gp130 exprimierenden Zellen zeigte sich, dass Hyper-IL-6 (HIL-6) um 100-1000fach effizienter in der Induktion von Proliferation der gp130-Zellen ist, als nicht verbundenes IL-6 und IL-6R (Fischer et al., 1997). In dieser Arbeit wurde ein membranständiges Hyper-IL-6 nach dem Schema von Fisher et. al. hergestellt. Hanna Dams-Kozłowska generierte 2012 ein HIL-11, welches nur aus nativen Sequenzen ohne artifiziellen Linker bestand. Dazu wurde der sIL-11R- α mit IL-11 durch natürlich vorkommende Sequenzen verbunden. Auch dieses Hyperzytokin erwies sich als proliferationinduzierend auf gp130 exprimierenden Zellen (Dams-Kozłowska et al., 2012). Die Motivation, ein HIL-11 Molekül nur aus natürlichen Sequenzen zu generieren, bestand darin, mit HIL-11 Krankheiten, wie Thrombozytopenien, Multiple Sklerose, kardiovaskuläre und inflammatorische Erkrankungen zu behandeln. Denn bekannt ist, dass HIL-11 megakaryopoetische Zellen stimulieren kann (Dams-Kozłowska, 2013). Für diese

Arbeit wurde HIL-11 basierend auf HIL-6 subkloniert. Hierbei blieb der artifizielle Linker erhalten. Bislang konnten keine funktionellen Einschränkungen gefunden werden. In Abbildung 6 sind die zwei Hyperzytokine schematisch dargestellt.

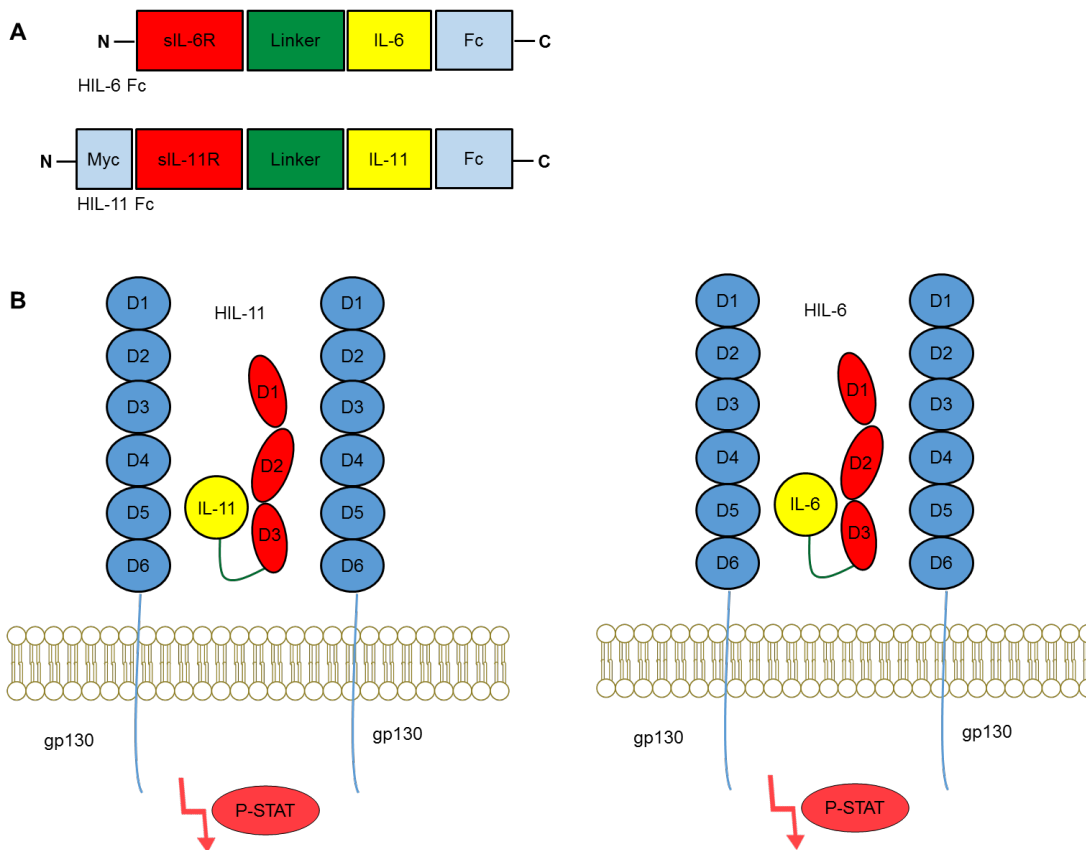


Abbildung 6: **Schematische Darstellung von Hyperzytokinen auf gp130 exprimierenden Zellen.**

A) Schematischer Aufbau des HIL-6Fc und HIL-11Fc. Der Rezeptor ist über einen Linker an das Zytokin gebunden. Daran befindet sich ein Fc-Tag zur Detektion. HIL-11Fc hat zusätzlich vor dem IL-11R einen Myc Tag. **B)** Das Zytokin ist über einen Peptidlinker mit seinem löslichen Rezeptor verbunden und bildet einen Komplex – das sogenannte Hyperzytokin. Dieses kann in gp130 exprimierenden Zellen den P-STAT3 Signalweg aktivieren. Links: Hyper-IL-11. Rechts: Hyper-IL-6.

Dieser Komplex aus Zytokin und seinem löslichen Rezeptor kann nun Zellen stimulieren, die keinen IL-6R / IL-11R exprimieren. Deshalb sind Hyperzytokine ein potentes Tool, um *Trans-Signaling* zu induzieren.

Kürzlich wurde von Heink et. al. ein dritter IL-6 Signaltransduktionsmechanismus beschrieben, das *Cluster-Signaling*. Dabei kann eine Transmitterzelle, die kein gp130 exprimiert, eine Receiverzelle aktivieren. Hierbei transpräsentiert die dendritische Zelle präformierte IL-6:IL-6R Komplexe an die Zelloberfläche. Dieser Komplex kommt der Receiverzelle, T-Zelle, sterisch so nah, dass er an die gp130 Moleküle der Receiverzelle binden und aktivieren kann. Diese Bindung verursacht eine molekulare Reaktion in der T-

Zelle, woraufhin sie zur pathologischen TH₁₇ Zelle wird. Diese Bildung der pathologischen TH₁₇ Zellen war essentiell für die pathogene T-Zell Antwort im murinen Modell der Multiplen Sklerose (EAE) (Heink et al., 2017, Quintana, 2016).

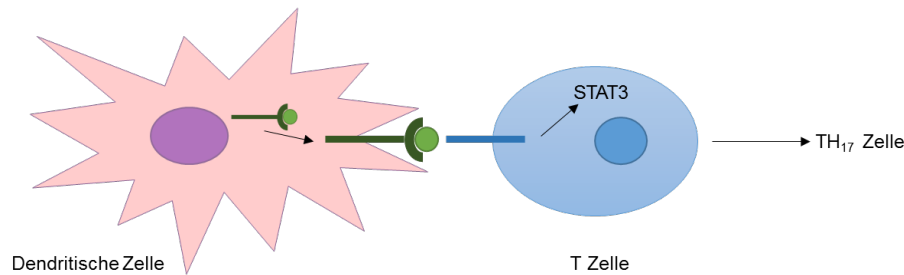


Abbildung 7: **Schematische Darstellung von *in vivo* Cluster-Signaling.**

Die dendritische Zelle transpräsentiert präformierte IL-6:IL-6R Komplexe an ihre Zelloberfläche und aktiviert dadurch in der T Zelle den STAT3 Signalweg. Diese wird daraufhin zur pathologischen TH₁₇ Zelle.

3.6 Klinische Relevanz und Auswirkungen von *Trans-Signaling*

In vivo hat *Trans-Signaling* einen großen Einfluss auf verschiedene Prozesse (Jones et al., 2005). *Trans-Signaling* ist an einer Vielzahl von Erkrankungen beteiligt. Darunter Morbus Crohn, rheumatoide Arthritis, Asthma bronchiale, Peritonitis und Kolonkarzinome (Rose-John et al., 2006). Bei gesunden Menschen findet man 25 – 50 ng/ml sIL-6R im Serum (Scheller et al., 2014). Pathophysiologisch kann die Konzentration des sIL-6R bis zu einem dreifachen davon ansteigen (Gaillard et al., 1993). Krankheiten, die mit einer erhöhten sIL-6 Konzentration in Verbindung gebracht werden, sind z.B. rheumatoide Arthritis (Nowell et al., 2003) oder eine bakterielle Sepsis (Marie et al., 1997). Deshalb ist es von großer medizinischer Bedeutung einen Weg zu finden, *Trans-Signaling* spezifisch zu inhibieren ohne den für regenerative Prozesse wichtigen Signalweg *Classic-Signaling* zu beeinflussen.

3.7 Inhibitoren des Signalwegs von IL-6 und IL-11

1993 wurde eine lösliche Form der Rezeptoruntereinheit gp130 (sgp130) gefunden, die dazu in der Lage ist, IL-6:IL-6R Komplexe zu binden und dadurch zu inhibieren (Narazaki et al., 1993). Die Rezeptoruntereinheit gp130 zeigt keine Affinität zu IL-6 oder (s) IL-6R alleine. Ausschließlich der Komplex aus IL-6 und IL-6R kann an gp130 binden und den Signalweg aktivieren. Sgp130 fungiert als kompetitiver Antagonist des IL-6/sIL-6R Komplexes und interagiert nur mit dem sIL-6R in Anwesenheit von IL-6 (Jostock et al., 2001). Deshalb blockiert sgp130 selektiv das *Trans-Signaling* ohne den Signalweg über membrangebundenen IL-6R zu beeinflussen, während andere Inhibitoren immer auch das

Classic-Signaling inhibieren. (Jones et al., 2011). Somit ist sgp130 ein selektiver *Trans-Signaling* Inhibitor (Rose-John et al., 2007). Allerdings kann sgp130 auch IL-6 *Classic-Signaling* inhibieren. Dies geschieht allerdings nur unter Bedingungen mit einem großen Überschuss von sIL-6R gegenüber IL-6. Dies geschieht indem die wenigen IL-6-Moleküle mit einem Überschuss an sIL-6R:sgp130-Bindungspartnern abgefangen und damit inaktiviert werden (Garbers et al., 2011b). Mäuse, die mit sgp130 behandelt wurden, sind gegen IL-6 induzierte Sepsis weitgehend geschützt (Greenhill et al., 2011). Bei einem weiteren Mausmodell mit induzierter Sepsis zeigte sich, dass die Behandlung mit sgp130Fc zum Überleben der Mäuse führte und die globale Blockade mit monoklonalen Antikörpern von *Classic-* und *Trans-Signaling* keine begünstigenden Effekte hat. Bei sgp130Fc handelt es sich um sgp130, welches mit dem Fc-Teil eines humanen IgG Antikörpers fusioniert ist. Daraus lässt sich schließen, dass die selektive Hemmung des *Trans-Signalings* der globalen Blockade beider Signalwege durch neutralisierende Antikörper überlegen ist (Barkhausen et al., 2011). Momentan wird sgp130Fc in Phase II Studien getestet, so zum Beispiel zur Behandlung der autoimmunen Darmerkrankung Colitis ulcerosa (Atreya et al., 2000).

Eine weitere therapeutische Blockade der IL-6/IL-11 Signalwege sind monoklonale Antikörper (*antibodys*), sogenannte mAB. Bei rheumatoider Arthritis fand man im Patientenserum stark erhöhte IL-6 und sIL-6R Werte (Robak et al., 1998). So war es im Mausexperiment möglich, durch IL-6R α neutralisierende mABs Mausmodelle der rheumatoiden Arthritis zu lindern. Die intraartikuläre Inhibition von *Trans-Signaling* konnte die lokalen inflammatorischen Vorgänge minimieren (Lissilaa et al., 2010). Ein spezifischer IL-6R mAB, der die Bindung von IL-6 an seinen Rezeptor blockiert, ist Tocilizumab (Sato et al., 1993). Er verhindert sowohl *Classic-* als auch *Trans-Signaling*. Dieser ist bereits in über 100 Ländern zur Therapie von Rheumatoider Arthritis anerkannt (Tanaka et al., 2012). Es gab ebenfalls Erfolge in der Therapie des Lupus erythematoses (Illei et al., 2010). In Japan wurde er auch zur Therapie der Castleman Krankheit zugelassen (Tanaka et al., 2014). Ein weiterer Antikörper ist Clazakizumab, der gegen IL-6 wirkt. Er konnte in Studien bereits eine Verbesserung der Symptomatik bei Patienten mit rheumatoider Arthritis erreichen (Mease et al., 2016). Ein Problem dieser monoklonalen Antikörper ist allerdings, dass sie generell die Signalwege des IL-6 blockieren, anstelle des, für die Erkrankung verantwortlichen *Trans-Signalings*.

4 Ziele dieser Arbeit

Ein Ziel dieser Arbeit ist es herauszufinden, inwieweit Mutationen der IL-6 Erkennungssequenz für gp130 an *Site II* und *III* auf das Hyperzytokin IL-6 übertragbar sind, um zu testen, ob sie sich als Inhibitoren des *Trans-Signalings* eignen. Dazu werden fünf bereits bekannte Punktmutationen der *Sites* von IL-6 verwendet und in HIL-6 und HIL-6Fc punktmutiert (Paonessa et al., 1995, Savino et al., 1994). Nachdem die biologische Inaktivität der HIL-6/Fc *Site II* und *III* Mutanten geprüft ist, gilt es sie auf ihren Nutzen als kompetitive Antagonisten zum Wildtyp HIL-6 und damit des *Trans-Signalings* zu testen. Dazu wird das gereinigte Protein der HIL-6 Mutanten mit Ba/F3-gp130 Zellen inkubiert, welche vorher mit rekombinantem HIL-6 stimuliert wurden.

Ein zweites Ziel dieser Arbeit ist es, erstmalig einen möglichen neuen IL-11 Signalmechanismus im Zellkulturexperimenten zu beschreiben. In der Einleitung wurden zwei Wege vorgestellt, über die IL-6 und IL-11 *in vivo* Signaltransduktion vermitteln können: *Classic-* und *Trans-Signaling*. Die für diese Arbeit durchgeführten Zellexperimente gaben Hinweise darauf, dass es einen möglichen dritten Weg geben könnte. Dieser ist wie folgt vorzustellen: Die Transmitterzelle hat ausschließlich gp130 auf seiner Zelloberfläche exprimiert und keinen Zytokinrezeptor. Die Receiverzelle hat wiederum nur ein membranständiges Hyperzytokin und kein gp130. Alleine sind die Zelllinien nicht fähig, einen Signalweg über phosphoryliertes (P-)STAT3 zu aktivieren und dadurch zu proliferieren. Die Co-Inkubation beider Zelllinien führte zur Proliferation und Detektion von P-STAT3 mittels *Western Blottingting*. Das führt zu der Annahme, dass es einen dritten Signalweg neben *Classic-* und *Trans-Signaling* geben kann. Diese gegenseitige Aktivierung beider Zelllinien wird im Weiteren als *Cluster-Signaling* bezeichnet. Das Ziel ist es, das *Cluster-Signaling* in einem Zellkultursystem nachzuweisen und vom *Trans-Signaling* zu differenzieren. Dazu wird erstmalig ein membrangebundenes HIL-11 generiert: das sogenannte mbHIL-11. Bestehend aus löslichem IL-11R, der durch ein flexibles Linkersegment mit IL-11 und einer Transmembran-intrazellulären Domäne des IL-11Rezeptors kovalent verbunden ist. Es entsteht mbHIL-11. Es ist zudem eine Punktmutation (R355E) bekannt, die das *Shedding* durch ADAM Proteasen am *Stalk* verhindert (Lokau et al., 2016). Ziel ist es, diese in ein mbHIL-11 zu integrieren und auch mit dieser Variante *Cluster-Signaling* in Zellen nachzuweisen, um den Signalmechanismus klar von *Trans-Signaling* abzugrenzen.

5 Material und Methoden

Material

5.1 Antibiotika

Antibiotikum	Stammkonzentration	Arbeitskonzentration	Hersteller
Ampicillin	100 mg/ml	Agarplatten: 200 µg/ml Flüssigmedium: 100 µg/ml	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Geneticin (G418)	50 mg/ml	Variabel	Genaxxon, Ulm
Puromycin	1,5 µg/ml	Flüssigmedium	PAA Laboratories GmbH, Cölbe

5.2 Antikörper

Primäre Antikörper

α -humaner IL-6 Rezeptor	Monoklonaler Antikörper aus der Maus, Herstellung beschrieben in Chalaris et al., 2007. Konzentration 1 mg/ml, Western Blotting 1:1000, ELISA 1:1000.
Phospho-STAT3	Monoklonaler Antikörper aus dem Kaninchen, Konzentration 150 µg/ml, Western Blotting: 1:1000, Cell Signaling Technology, Inc., Danvers (USA).
STAT3	Monoklonaler Antikörper aus der Maus, Konzentration 79 µg/ml, Western Blotting: 1:1000, Cell Signaling Technology, Inc. Danvers (USA).
Myc-Tag 71D10	Monoklonaler Antikörper aus dem Kaninchen, Konzentration 125 µg/ml, Western Blotting: 1:1000, Cell Signaling Technology, Inc., Danvers (USA).

Sekundäre Antikörper

α -humaner IL-6R (Baf227)	Biotinylierter IgG Antikörper aus der Ziege, Konzentration: 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, ELISA: 1:1000 R&D Systems GmbH, Minneapolis, USA
<i>mouse</i> -POD	ImmunoPure Peroxidase Conjugated Goat Anti- <i>mouse</i> IgG (H+L), Konzentration 0,8 mg/ml, Western Blotting 1:5000 Thermo Fisher Scientific, Perbio, Science Deutschland, Bonn.
<i>rabbit</i> -POD	ImmunoPure Peroxidase Conjugated Goat Anti- <i>rabbit</i> IgG (H+L), Konzentration 0,8 mg/ml, Western Blotting 1:5000. Thermo Fisher Scientific, Perbio, Science Deutschland, Bonn.
Alexa Fluor 488	Antikörper aus dem Kaninchen Anti- <i>rabbit</i> IgG (H+L) Konzentration: 2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, Immunohistochemie: 1:500 Life Technologies, Eugene, USA

5.3 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Acrylamid-Mix 30%	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Agar	AppliChem GmbH, Darmstadt
Agarose	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf
Albumin Fraktion V (8076.3)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat (APS)	Merck KGaA, Darmstadt
Ampicillin	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Bovine Serum Albumin A7030	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Brillant-Blau R250	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
β - Mercaptoethanol	AppliChem GmbH, Darmstadt

Citronensäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Complete Protease Inhibitor Tablettes	Roche Diagnostics, Mannheim
Concanavalin-A-Sepharose	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
dATP	Thermo Scientific, St. LeonRot
dCTP	Thermo Scientific, St. LeonRot
dGTP	Thermo Scientific, St. LeonRot
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck KGaA, Darmstadt
dTTP	Thermo Scientific, St. LeonRot
<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> (DMEM)	Thermo Scientific, St. LeonRot
Essigsäure	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Ethanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Ethidiumbromid	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Ethylenglycol-bis(aminoethylether)- N,N,N',N'-tetraessigsäure (EGTA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Geneticin (G418)	Genaxxon, Ulm, Deutschland
<i>Gibco® fetal bovine serum</i> (FBS)	Thermo Scientific, St. LeonRot
Glycerol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Glycin	Merck KGaA, Darmstadt
GW280264X (GW)	Glaxo Smith Kline, Stevenage, UK
Immobilon Western HRP Substrat	Merck KGaA, Darmstadt
Isopropanol	AppliChem GmbH, Darmstadt
Kaliumacetat	Merck KGaA, Darmstadt

Kaliumchlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Kaliumdihydrogenphosphat	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Kaliumhydrogenphosphat	Merck KGaA, Darmstadt
LB-Medium	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
<i>Loading-Dye Solution (6x)</i>	Thermo Scientific, St. LeonRot
Magermilchpulver	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Methanol	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumchlorid	AppliChem GmbH, Darmstadt
Natriumcitrat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Natriumhydroxid	Merck KGaA, Darmstadt
Orange G	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Penicillin	Genaxxon, Ulm
Phorbol 12-myristate 13-acetate(PMA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
POD Substrat	Roche Holding GmbH, Mannheim
Protein A Agarose	Roche Holding GmbH, Mannheim
RNase A	QIAGEN, Hilden
Roswell Park Memorial Institute (RPMI) Medium 1640	Thermo Scientific, St. LeonRot
Schwefelsäure	AppliChem GmbH, Darmstadt
Streptavidin-HRP Lösung	R&D Systems, Wiesbaden
Streptomycin	Genaxxon, Ulm
Succrose	Merck KGaA, Darmstadt
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich, München
Tris	Bethesda Research Laboratories, USA

Triton X-100	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Trypan Blue Dye, 0,4%	BioRad Laboratories GmbH, München
Trypsin/EDTA (10x)	Life Technologies, Darmstadt
TurboFect™ Transfektionsreagenz	Thermo Scientific, St. LeonRot
Tween-20	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

5.4 Enzyme

Die in dieser Arbeit verwendeten Enzyme stammen von der Firma Thermo Scientific, St. LeonRot.

5.5 Plasmide

Die detaillierten Klonierungsstrategien befinden sich im zugehörigen Ergebnisteil dieser Dissertation.

pcDNA3.1	Vektor für transiente und stabile Proteinexpression in Säugetierzellen von Invitrogen (Carlsbad, California (USA)).
pcDNA3.1-HIL-11Fc	Expressionsplasmid, dessen Insert für ein sHIL-11Fc codiert (erstellt in AG Scheller).
pcDNA3.1-HIL-11	Expressionsplasmid, dessen Insert für ein sHIL-11 codiert (erstellt von Franziska Rummel).
pcDNA3.1-HIL-6Fc	Expressionsplasmid, dessen Insert für ein sHIL-6Fc codiert (erstellt in AG Scheller).
pcDNA3.1-HIL-6Fc <i>Site III</i>	Expressionsplasmid, dessen Insert für ein sHIL-6Fc mit einer punktmultierten <i>Site III</i> (W157R/D160R) codiert (erstellt von Franziska Rummel).
pcDNA3.1-HIL-6Fc <i>Site II</i>	Expressionsplasmid, dessen Insert für ein sHIL-6Fc mit einer punktmultierten <i>Site II</i>

	(S118R/V121D/Y31D) codiert (erstellt von Franziska Rummel).
pcDNA3.1-HIL-6	Expressionsplasmid, dessen Insert für ein sHIL-6 codiert (erstellt in AG Scheller).
pcDNA3.1-HIL-6 <i>Site III</i>	Expressionsplasmid, dessen Insert für ein sHIL-6Fc mit einer punktmultierten <i>Site III</i> (W157R/D160R) codiert (erstellt von Franziska Rummel).
pcDNA3.1-HIL-6 <i>Site II</i>	Expressionsplasmid, dessen Insert für ein sHIL-6 mit einer punktmultierten <i>Site II</i> (S118R/V121D/Y31D) codiert (erstellt von Franziska Rummel).
pcDNA3.1-mbHIL-11	Expressionsplasmid, dessen Insert für ein mbHIL-11 codiert (erstellt von Franziska Rummel).
pcDNA3.1-mbHIL-11 ^{R355E}	Expressionsplasmid, dessen Insert für ein mbHIL-11 mit einer Punktmutation im <i>Stalk</i> (R355E) codiert (erstellt von Franziska Rummel).
pMOWS-(puro)-GFP	Expressionsvektor für retrovirale Transduktion von murinen Zellen; enthält Resistenzgene für Ampicillin und Puromycin zur Selektion (vorhanden in AG Scheller) (Ketteler et al.,2002)
pMOWS-mbHIL-11	Expressionsplasmid, dessen Insert für ein mbHIL-11 codiert (erstellt von Franziska Rummel).
pMOWS-mbHIL-11 ^{R355E}	Expressionsplasmid, dessen Insert für ein mbHIL-11 mit einer Punktmutation im <i>Stalk</i> (R355E) codiert (erstellt von Franziska Rummel).

pMOWS-sHIL-11	Expressionsplasmid, dessen Insert für ein sHIL-11 codiert (erstellt von Franziska Rummel).
pMOWS-hIL-11R	Expressionsplasmid, dessen Insert für einen hIL-11R codiert (erstellt in AG Scheller).
p409-YFP	Expressionsplasmid für die Expression von YFP, welches eine gelbe Fluoreszenz in Säugetierzellen zeigt (erstellt in AG Scheller).

5.6 Oligonukleotide

Die zur Klonierung verwendeten Oligonukleotide stammen von der Firma Eurofins MWG Operon GmbH, Ebersberg.

Name	<u>Nukleotidsequenz</u>
HIL-6/Fc Y31D fw	5'GCAGATCCGGGACATCCTGGATGGCATCAGC3'
HIL-6/Fc Y31D rv	5'GCTGATGCCATCCAGGATGTCCCGGATCTGC3'
HIL-6/Fc S118R/V121D fw	5'GCCGTGCAGATGAGGACCAAAGAGCTGATCCA GTTCC3'
HIL-6/Fc S118R/V121D rv	5'GGAAGTGGATCAGCTCTTTGGTCCTCATCTGCA CGGC3'
HIL-6/Fc W157R/D160R fw	5'GCCCAGAATCAGCGGCTGCAGAGGATGACCAC CCACC3'
HIL-6/Fc W157R/D160R rv	5'GGTGGGTGGTCATCCTCTGCAGCCGCTGATTCT GGGC3'
HIL-11 Insert fw	5'AAACTTAAGACCATGAGCAGC3'
HIL-11 Insert rv	5'GATCTGAACTCTGCGGCCGCCAG3'
hIL-11R fw	5'GCGGCCGCAGGGACCATAACCAAAGGAGATACC3'
hIL-11R rv	5'GCGGCCGCCTACAGGTTTG3'

5.7 Medien zur Kultivierung von prokaryotischen Zellen

Lysogeny-Broth (LB)-Medium mit 1% NaCl, 0,5% Hefeextrakt, 1% Trypton

LB-Agar mit 1% NaCl, 0,5% Hefeextrakt, 1% Trypton, 1,5% Agar

5.8 Medien zur Kultivierung von eukaryotischen Zellen

DMEM -/-	Dulbecco's Modified Eagle's Medium, high Glucose (4,5 g/l), with stable Glutamine
DMEM +/+	Dulbecco's Modified Eagle's Medium, high Glucose (4,5 g/l), with stable Glutamine +10% FBS, 1% Penicillin/Streptomycin
Fötales Kälberserum (FCS)	Life Technologies, Darmstadt
Penicilin (6mg/ml)	Genaxxon Bioscience GmbH, Ulm
Streptomycin (10mg/ml)	Genaxxon Bioscience GmbH, Ulm
Trypsin/EDTA	Life Technologies, Darmstadt
TurboFect Transfection Reagent	Thermo Scientific, Waltham, USA

5.9 Geräte

Gerät	Hersteller
ÄKTA™ Start	GE Healthcare, Uppsala, Schweden
Absaugpumpe für die Sterilbank	HLC BioTech, Göttingen
Analysewaage Precisa 100M-300C	Hartenstein GmbH, Würzburg
Autoklav Laboklav 25	SHP Steriltechnik AG, Detzel Schloss/Satuelle
Centrifuge 5417R	Eppendorf GmbH, Hamburg
Centrifuge 5424	Eppendorf GmbH, Hamburg
Centrifuge 5810R	Eppendorf GmbH, Hamburg
CO ₂ -Inkubator 150 (E2)	Binder GmbH, Tuttlingen
ECL ChemoCam Imager	INTAS Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen
Fluorometer Infinite® M200 PRO reader	Tecan GmbH, Maennedorf, Schweiz

Gefrierschrank comfort	Liebherr GmbH, Rostock
Gelelektrophoresekammer	BioRad Laboratories GmbH, München
Heizbad Julabo sw21	Julabo GmbH, Seelbach
Heraeus Function Line T6 Trockenschrank	Thermo Scientific, St. LeonRot
Kühlschrank	Liebherr GmbH, Rostock
Magnetrührer mit Heizung	Heidolph Instruments GmbH, Schwabach
Mikropipetten Research®	Eppendorf GmbH, Hamburg
Mikrowelle Optiquick	Moulinex (Krups), Offenbach
Mini-PROTEAN Tetra System	BioRad Laboratories GmbH, München
Peqstar 2x Twin Block Thermal Cycler	PEQLAB Ltd, Crableck Lane, UK
pH-Meter	Sartorius, Ratingen
Pipetus®-Akku	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Primovert	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Göttingen
Scanlaf Mars Safety Class 2	Weiss Labortechnik GmbH, Heroldsberg
Schüttler	INFORS AG, Schweiz, Bottmingen
Spannungsquelle Power Pac 300	BioRad Laboratories GmbH, Hercules, USA
Spektrophotometer NanoDrop 2000	Thermo Scientific, St. LeonRot
Stuart Roller Mixer SRT 9D	Bibby Scientific, Staffordshire, England
TC10 Automated Cell Counter	BioRad Laboratories GmbH, München
Thermomixer® Komfort	Eppendorf GmbH, Hamburg
Thermal Cycler	Peqlab, VWR, Erlangen
Trans-Blot® Turbo™	BioRad Laboratories GmbH, München
UV-Tisch	Bio-Budget Technologies GmbH
Vortex Mixer	IKA Labortechnik GmbH, Staufen

5.10 Kits

Name	Hersteller
ECL Prime Western Blotting Detection Reagent	Merck KGaA, Darmstadt
NucleoSpin® Gel and PCR Cleanup	Machery-Nagel, Düren
NucleoBond® Xtra Midi/Maxi	Machery-Nagel, Düren
BCA Protein Assay	Thermo Scientific, Waltham, USA
CellTiter-Blue Cell Viability Assay	Promega GmbH, Mannheim
Gene JET Plasmid Miniprep Kit	Thermo Scientific, Waltham, USA

5.11 Größenstandards

GeneRuler Express DNA Ladder, ready-to-use	Thermo Scientific, St. LeonRot
PageRuler™ Prestained Protein Ladder, 10-180 kDa	Thermo Scientific, St. LeonRot

5.12 Puffer und Lösungen

Die verwendeten Puffer und Lösungen wurden, soweit nicht anders angegeben, in destilliertem Wasser angesetzt und gegebenenfalls autoklaviert (120°C, 2 bar, 20 min).

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
Ammoniumperoxidsulfat(APS)-Lösung	10% (m/v) APS
Blocking Puffer für hIL-6R ELISA	5% (m/v) Sucrose 1% ELISA BSA in PBS
Blocking Puffer für Western Blotting	5% (m/v) Magermilchpulver in TBST
Binding Puffer für ÄKTA	PBS (pH 7,2 – 7,4)
Destaining Lösung für Coomassie Gele	10% (v/v) Essigsäure 20% (v/v) Methanol 70% (v/v) dH ₂ O
dNTPs	10 mM dATP

	10 mM dCTP
	10 mM dGTP
	10 mM dTTP
Eluation Puffer 1 für ÄKTA	Citratpuffer 50 mM (pH 3,25)
Eluation Puffer 2 für ÄKTA	Citratpuffer 50 mM (pH 5,5)
FACS Puffer	0,05% BSA
	in PBS
Lämmli-puffer (5x)	10% (m/v) SDS
	50% (v/v) Glycerol
	50 mM Tris-HCl (pH 6,8)
	5% (v/v) β -Mercaptoethanol
	0,5% (m/v) Bromphenolblau
Miled Lysis Buffer (MLB)	50 mM Tris-HCl (pH 7,5)
	150 mM NaCl
	1% (v/v) Triton X-100
	Complete Protease Inhibitor Cocktail Tabletes
	(1 Tablette auf 50 ml Puffer)
Nicht reduzierender Lämmli-puffer (5x)	10% (m/v) SDS
	50% (v/v) Glycerol
	50 mM Tris-HCl (pH 6,8)
	0,5% (m/v) Bromphenolblau
Orange-G-Loading Dye Buffer (6x)	30% (v/v) Glycerol
	50 mM EDTA
PBS-T	0,05% (v/v) Tween-20
	in PBS
PBS	137 mM NaCl
	8,1 mM Na_2HPO_4 (pH 7,4)

	1,5 mM KH_2PO_4 (pH 7,4)
	2,7 mM KCl
SDS PAGE Sammelgelpuffer	250 mM Tris-HCl (pH 6,8)
	0,2% (m/v) SDS
SDS-PAGE Laufpuffer	25 mM Tris-HCl (pH 8,3)
	192 mM Glycin
	1% (m/v) SDS
SDS PAGE Trenngelpuffer	750 mM Tris-HCl (pH 8,8)
	0,2% (m/v) SDS
SDS-PAGE Transferpuffer	25 mM Tris
	192 mM Glycin
	20% (v/v) Methanol
	0,01 % (m/v) SDS
SDS-PAGE Stripping Puffer	62.5 mM Tris-HCl (pH 6,8)
	2% (m/v) SDS
	0,1% (v/v) β -Mercaptoethanol
Solution 1 (S1) für DNA-Minipräparation	50 mM Glucose
	25 mM Tris-HCl (pH 8)
	10 mM EDTA
	0,1% (v/v) RNase
Solution 2 (S2) für DNA-Minipräparation	0,2 M NaOH
	1% SDS
Solution 3 (S3) für DNA-Minipräparation	5 M CH_3COOK
	2 M CH_3COOH
Staining Lösung für Coomassie Gele	20% (v/v) Essigsäure
	80% (v/v) Methanol
	0,2% coomassie brilliant blue R250
Streptavidin-POD-Lösung	0,5% (v/v) Streptavidin

	1% BSA
	in PBS
TBS	10 mM Tris-HCl (pH 8,0)
	150 mM NaCl
TBS-T	0,05% (v/v) Tween-20
	in TBS
Trypsin/EDTA-Lösung	10% (v/v) Trypsin/EDTA (10x)
	in PBS

5.13 Rekombinante Proteine

HIL-6Fc (2 mg/ml)	Hergestellt in AG Scheller
HIL-6Fc S118R/V121D /Y31D (0,5 mg/ml)	Hergestellt von Franziska Rummel
HIL-6/Fc W157R/D160R (0,5 mg/ml)	Hergestellt von Franziska Rummel
Ionomycin (10 µM)	Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen
sgp130 (1,5 mg/ml)	Hergestellt in AG Scheller

5.14 Verbrauchsmaterial

Material	Hersteller
Counting Slides	BioRad Laboratories GmbH, München
Cryogefäße	VWR, Randor, USA
Einmalspritzen	B.Braun, Melsungen
Einmalhandschuhe Nitra Tex	Ansell Healthcare, Brüssel, Belgien
Eppendorf Tubes (1,5 und 2 ml)	Eppendorf AG, Hamburg
Falcons (15 und 50 ml)	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
PCR Reaktionsgefäße	Eppendorf AG, Hamburg
PVDF Membran	Carl Roth GmbH + Co, KG, Karlsruhe
Sterile Stripetten	Corning Incorporated, Coming, USA
Whatman Papier	VWR International GmbH, Darmstadt

Zellkulturschalen	TPP, Trasadingen, Schweiz
Zellkulturplatten (6, 12, 96-Well-Platten)	TPP, Trasadingen, Schweiz
Zellkulturschalen nicht-adherente Zellen	Greiner Bio One, Solingen

5.15 Zelllinien

5.15.1.1 Prokaryotische Zelllinien

XL-1 Blue Competent Cells (#200249, Agilent): *recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F' proAB lacIqZAM15 Tn10 (Tetr)*

5.15.1.2 Eukaryotische Zelllinien

Ba/F3	Murine prä-B-Zelllinie.
Ba/F3-gp130	Murine prä-B-Zelllinie, stabil mit humanem gp130 transduziert.
Ba/F3-mbHIL-11	Murine prä-B-Zelllinie, stabil mit mbHIL-11 in pMOWS-Puro transduziert (Franziska Rummel).
Ba/F3-mbHIL-11 ^{R355E}	Murine prä-B-Zelllinie, stabil mit mbHIL-11 ^{R355E} in pMOWS-Puro transduziert (Franziska Rummel).
Ba/F3-HIL-11Fc	Murine prä-B-Zelllinie, stabil mit HIL-11Fc in pMOWS-Puro transduziert (Franziska Rummel).
Ba/F3-hIL-11R	Murine prä-B-Zelllinie, stabil mit hIL-11R in pMOWS-Puro transduziert (Franziska Rummel).
Ba/F3-gp130-mbHIL-11	Murine prä-B-Zelllinie, stabil mit humanem gp130 und mbHIL-11 in pMOWS-Puro transduziert (Franziska Rummel).
Ba/F3-gp130-mbHIL-11 ^{R355E}	Murine prä-B-Zelllinie, stabil mit humanem gp130 und mbHIL-11 ^{R355E} in pMOWS-Puro transduziert (Franziska Rummel).

Ba/F3-gp130-HIL-11Fc	Murine prä-B-Zelllinie, stabil mit humanem gp130 und sHIL-11Fc in pMOWS-Puro transduziert (Franziska Rummel).
Ba/F3-gp130-hIL-11R	Murine prä-B-Zelllinie, stabil mit humanem gp130 und hIL-11R in pMOWS-Puro transduziert (Franziska Rummel).
CHO K1	<i>Chinese hamster ovary cells</i> (DMSZ Braunschweig)
CHO K1-HIL-6Fc Site III	<i>Chinese hamster ovary cells</i> , stabil mit HIL-6Fc Site III transduziert (Franziska Rummel).
CHO K1-HIL-6Fc Site II	<i>Chinese hamster ovary cells</i> , stabil mit HIL-6Fc Site II transduziert (Franziska Rummel).
HEK293	Immortalisierte humane embryonale Nierenzellen; etablierte Zelllinie für transiente Transfektionen (ATCC-Nummer: CRL-1573; DMSZ Braunschweig).
Phoenix-Eco	Verpackungszelllinie (HEK293T) zur retroviralen Transduktion von Ba/F3-Zellen (Ketteler et al., 2002); zur Verfügung gestellt von Garry P. Nolan, Stanford University, Palo Alto (CA, USA)

Methoden

5.16 Molekularbiologische Methoden

5.16.1 Agarosegelelektrophorese

Die Trennung von DNA-Fragmenten erfolgte mit Hilfe der Gelelektrophorese in Elektrophoresekammern (BioRad Laboratories GmbH, München). Hierfür wurde 1,5%ige Agarose in TAE Puffer aufgekocht und mit 0,001% HD Green versetzt. Die Proben, mit 6x Ladepuffer versetzt, wurden in die Geltaschen aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte bei einer konstanten Spannung von 120 V für 45 min. Das Bandenmuster wurde mit Hilfe des INTAS iX Imager (INTAS Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen) detektiert.

5.16.2 Bestimmung der DNA-Konzentrationen mittels UV-Spektroskopie

Die Konzentration der DNA wurde spektrometrisch durch den NanoDrop 2000 (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen) bestimmt. Dafür wurde 1 µl der in dH₂O gelösten DNA gemessen. Der Reinheitsgrad der DNA wurde durch das Absorptionsverhältnis A₂₆₀/A₂₈₀ ermittelt, welches für reine DNA größer als 1,8 sein sollte.

5.16.3 Dephosphorylierung von DNA

Nach dem Zerschneiden von Plasmid-DNA durch Restriktionsendonukleasen soll vermieden werden, dass es zu einer Religierung des 5'- und 3'-Endes kommt. Dazu wurde 1 U Fast-AP (Thermo Fisch Scientific, St. Leon, Deutschland) zum Restriktionsansatz gegeben und für 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz auf ein Agarosegel geladen, um geschnittene Vektorfragmente aus dem Gel zu isolieren.

5.16.4 Extraktion der DNA aus Agarosegelen

Die Größentrennung von DNA-Fragmenten, die durch Restriktionsendonukleasen erzeugt wurden, erfolgte mittels Agarosegelelektrophorese. Nach der Größentrennung wurden die Fragmente auf einem UV-Tisch (Bio-Budget Technologies GmbH) bei einer Wellenlänge von 365 nm visualisiert und mit einem Skalpell aus dem Gel geschnitten. Die anschließende Isolation der DNA erfolgte nach Herstellerangaben mit dem Kit NucleoSpin® Gel and PCR Cleanup (Machery-Nagel GmbH & Co. KG, Düren).

5.16.5 Ligation von DNA Fragmenten

Für eine Ligation wurde das geschnittene Insert und der geschnittene, dephosphorylierte Vektor in den Verhältnissen 0:1, 3:1 und 5:1 mit 2 U T4 Ligase, 2 µl PEG4000 und 2 µl Ligase-Puffer in einem Gesamtvolumen von 20 µl versetzt. Danach wurde der Ligationsansatz über Nacht bei 4°C inkubiert.

5.16.6 Midi-Präparation der Plasmid-DNA

Zur Isolation von Plasmid-DNA wurden 100 ml LB-Medium, welches zuvor mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzt wurde, mit einer Einzelkolonie einer LB-Platte angeimpft und in einem Schüttler (INFORS AG, Schweiz, Bottmingen) über Nacht bei 37°C und 120 rpm inkubiert. Die angewachsene Bakterienkultur wurde am nächsten Tag pelletiert (4000 g, 4°C, 15 min). Das Plasmid wurde aus dem Zellpellet mit Hilfe des Kits NucleoBond Xtra Midi (Machery-Nagel GmbH & Co. KG, Düren) nach Herstellerangaben isoliert. Die gewonnene DNA wurde in 150 µl dH₂O gelöst und die Konzentration mittels NanoDrop bestimmt. Anschließend wurde die Präparation mittels einer Testrestriktion auf Korrektheit des Plasmids überprüft.

5.16.7 Mini-Präparation von Plasmid-DNA

Für die Isolation von Plasmid-DNA wurden 2 ml LB-Medium, welches zuvor mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzt wurde, mit einem Einzelklon aus einem Ligationsansatz angeimpft und über Nacht bei 37°C und 1400 rpm (Thermomixer® Komfort, Eppendorf, Hamburg) inkubiert. Am folgenden Tag wurden 100 µl von der Bakterienkultur abgenommen und bei 4°C verwahrt. Der Rest wurde zentrifugiert (20.000 g, 5 min, 4°C), in 100 µl kalten S1-Puffer resuspendiert und mit 200 µl S2-Puffer versetzt. Nach fünfmaligem Invertieren für maximal 5 min erfolgte die Zugabe von 150 µl eiskaltem S3-Puffer. Die Suspension wurde für 10 min auf Eis inkubiert und im Anschluss erneut zentrifugiert (20.000 g, 10 min, 4°C). Der Überstand wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 900 µl eiskaltem 100%igen Ethanol versetzt. Anschließend wurde die Reaktion 5 min auf Eis inkubiert, zentrifugiert (20.000 g, 10 min, 4°C) und mit 500 µl 70%igem Ethanol gewaschen. Nach der abschließenden Zentrifugation (20.000 g, 5 min, 4°C) wurde das DNA-Pellet bei Raumtemperatur 20 min getrocknet und in 30 µl dH₂O resuspendiert. Anschließend wurde eine Restriktion zur Testung auf potentiell positive Klone durchgeführt, deren Plasmid-DNA dann aus der verwahrten 100 µl Bakterienkultur als Midi-Präparation angeimpft und anschließend isoliert wurden.

Für die Isolation von Plasmid-DNA zur anschließenden Sequenzierung, nach einer *Site directed mutagenesis* PCR, wurde die Präparation mittels des Gene JET Plasmid Miniprep Kits nach Herstellerangaben durchgeführt.

5.16.8 PCR: *colony*-PCR

Zur Detektion potentiell positiver Klone wurde eine *colony*-PCR durchgeführt. Dazu wurden von einer bewachsenen LB-Agarplatte Einzelklone gepickt und in 25 µl dH₂O resuspendiert. Die Pipettenspitze, mit der die Kolonie überführt wurde, wurde in 2 ml LB-Medium abgeworfen und bei 4°C verwahrt. Zum Reaktionsansatz wurden je 0,25 µl fw und rv Oligonukleotid, 5 µl Taq Puffer, 4 µl MgCl₂, 1 µl dNTPs und 2,5 U Taq Polymerase hinzugefügt. Anschließend wurde das PCR Programm im Thermal Cycler (Peqlab, VWR, Erlangen) folgendermaßen durchgeführt:

Initiale Denaturierung	95°C	10 min	
Denaturierung	95°C	30 sec	
Annealing	50°C	30 sec	35x
Elongation	72°C	1 min/kb	
Finale Elongation	72°C	10 min	
Aufbewahrung	4°C	∞	

Potentiell positive Klone wurden mittels einer Agarosegelelektrophorese detektiert und aus der zuvor verwahrten Pipettenspitze eine Kultur für eine Midi-Präp angeimpft.

5.16.9 PCR: Pfu Polymerase

Zur Amplifikation von spezifischen DNA-Sequenzen wurde die PCR mit einer Pfu Polymerase genutzt. Der Reaktionsansatz, bestehend aus 10 ng Plasmid, je 0,25 µl fw und rv Oligonukleotid, 20 µl HF/GC Puffer, 2 µl dNTPs und 1 U Pfu Polymerase, wurde mit dH₂O auf 100 µl aufgefüllt. Anschließend wurde das PCR Programm im Thermal Cycler (Peqlab, VWR, Erlangen) folgendermaßen durchgeführt:

Initiale Denaturierung	98°C	30 sec
------------------------	------	--------

Denaturierung	98°C	}	30 sec	35x
Annealing	50°C		30 sec	
Elongation	72°C		120 sec/kb	
Finale Elongation	72°C		10 min	
Aufbewahrung	4°C		∞	

5.16.10 PCR: *Site directed mutagenesis*

Zur Generierung von gewollten Punktmutationen wurde eine *site directed mutagenesis* PCR durchgeführt. Dazu wurden zwei Reaktionsansätze mit je 0,4 µl des fw bzw. rv Oligonukleotids (100 pmol) hergestellt. Die beiden Reaktionsansätze, bestehend aus 10 ng Plasmid, 10 µl HFPuffer, 1 µl dNTPs und 1 U Phusion Polymerase wurden mit dH₂O auf 50 µl aufgefüllt. Anschließend wurde das PCR Programm im Thermal Cycler (Peqlab, VWR, Erlangen) folgendermaßen durchgeführt:

Initiale Denaturierung	98°C		4 min	
Denaturierung	98°C	}	1 min	15x
Annealing	55°C		1 min	
Elongation	72°C		10 - 30 sec/kb	
Finale Elongation	72°C		12 min	
Aufbewahrung	4°C		∞	

Danach wurden beide Reaktionsansätze miteinander vereint, auf zwei *Tubes* aufgeteilt und mit je 1 U Phusion Polymerase die PCR Reaktion erneut gestartet. Anschließend wurde die PCR mittels des Kits NucleoSpin® Gel and PCR Cleanup (Machery-Nagel, Düren) gereinigt. Danach wurde eine Testrestriktion mit dem Enzym DpnI über Nacht bei 37°C durchgeführt und am nächsten Tag 20 min bei 80°C hitzeinaktiviert. Anschließend wurde das Produkt für eine Transformation in *Escherichia coli* XL-1 Blue genutzt.

5.16.11 pMOWS Vektor für Retrovirale Transduktion

Damit eine retrovirale Transduktion in Ba/F3-gp130 Zellen erfolgen kann, musste die gewünschte pcDNA in einen pMOWS-Vektor subkloniert werden. Hierfür wurden 20 µg des Plasmids in 5 U BamHI und 5 U EcoNI mit 10 µl BamHI-Puffer in 50 µl Wasser für 3 h bei 37°C inkubiert. Danach wurden die Restriktionsenzyme bei 95°C für 20 min hitzeinaktiviert. Die entstandenen Fragmente wurden in einem 1,5%igen Agarosegel voneinander getrennt und die Bande des Vektors mit einer Größe von 5721 bp isoliert und mittels des Kits NucleoSpin® Gel and PCR Cleanup (Machery-Nagel, Düren) gereinigt. Der Vektor wurde mit 3 µl 10x Klenow-Puffer, 0,5 µl 2 mM dNTP-Mix und 5 U Klenow-Fragment versetzt, um glatte Enden zu erhalten. Die Reaktion wurde 10 min bei 37°C inkubiert und danach bei 95°C für 10 min hitzeinaktiviert. Anschließend wurde der Vektor dephosphoryliert und danach erneut mittels des Kits NucleoSpin® Gel and PCR Cleanup (Machery-Nagel, Düren) gereinigt. Die für die Ligation vorgesehenen Inserts wurden mit PmeI (MssI) enzymatisch gespalten, durch eine Gelelektrophorese voneinander getrennt und gereinigt. Im Anschluss erfolgte die Ligation (siehe Kapitel 5.16.5).

5.16.12 Spaltung von DNA mit Restriktionsenzymen

Die Spaltung von Plasmid-DNA und PCR-Produkten erfolgte mittels Restriktionsenzymen. Für präparative Arbeiten wurden 10 µg Plasmid-DNA mit 10 U des entsprechenden Restriktionsenzyms versetzt und im passenden Puffer in einem Gesamtvolumen von 50 µl über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Fragmente auf einem Agarosegel elektrophoretisch getrennt und das gewünschte Fragment extrahiert. Für analytische Arbeiten wurde 1 µg Plasmid-DNA in einem Gesamtvolumen von 20 µl für mindestens 3 h bei 37°C zerschnitten und anschließend auf einem Agarosegel detektiert. Bei Reaktionen mit zwei verschiedenen Restriktionsenzymen wurde der vom Hersteller empfohlene Puffer verwendet, bei dem beide Restriktionsenzyme die gleiche und höchste Aktivität aufwiesen.

5.16.13 Sequenzierung

Zur Überprüfung der Sequenzabfolge der Plasmide wurden diese von der Firma GATC Biotech, Düsseldorf oder SeqLab-Sequence Laboratories Göttingen GmbH mittels Sanger-Sequenzierung analysiert. Dafür wurden die firmeneigenen Oligonukleotid T7 und BGHrev verwendet. Wenn keine der firmeneigenen Oligonukleotide nutzbar waren, wurde ein Oligonukleotid, das bereits für die Generierung des Plasmids erstellt wurde, verwendet.

5.16.14 Transformation der Plasmid-DNA in chemisch kompetenten *Escherichia coli*

Für die Transformation wurden 30 µl chemisch kompetente *Escherichia coli* XL-1 blue für 5 min auf Eis aufgetaut und mit 10 µg Plasmid-DNA oder 20 µl eines Ligationsansatzes versetzt und anschließend 5 min auf Eis inkubiert. Danach erfolgte die Hitzeschocktransformation für 1 min bei 42°C. Erneut wurden die Bakterien 5 min auf Eis inkubiert. Dann wurden sie in 500 µl 37°C warmem LB-Medium resuspendiert und für 1 h inkubiert (37°C, 1400 rpm) (Thermoblock, Eppendorf, Hamburg). 500 µl der Bakteriensuspension wurden auf einer LB-Platte die mit entsprechendem Antibiotikum versetzt war, ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert.

5.17 Zellkulturmethoden

5.17.1 Concavalin A Fällung von Zellkulturüberständen

Zur Fällung von Zellkulturüberständen wurde Con-A Sepharose (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München) genutzt. Dazu wurden 750 µl Überstand mit 50 µl Con-A über Nacht bei 4°C rollen gelassen. Am nächsten Tag wurden die Proben zentrifugiert (2700 g, 2 min, 4°C) und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde zweimal mit 1 ml PBS gewaschen und anschließend in 50 µl 5x Lämmli-Puffer gelöst und 10 min bei 95°C aufgekocht. Nach der Zentrifugation wurde der Überstand im Western Blot analysiert. Durch Con-A werden glykolisierte Proteine gefällt, da es ein Lektin ist.

5.17.2 Kultivierung adhärenter Zellen

Die verwendeten adhärenenten Zellen (CHO K1, Phoenix-Eco, HEK293 und alle stabil transduzierten Subtypen) wurden auf 10 cm Schalen mit 10 ml DMEM^{+/+} bei 37°C, 5% CO₂ in einer gesättigten Wasserdampf-atmosphäre kultiviert. Zweimal wöchentlich wurden sie mit 2 ml Trypsin/EDTA (Life Technologies, Darmstadt) gelöst und im Verhältnis 1/10 *gesplitted*.

5.17.3 Kultivierung von Suspensionszellen

Die verwendeten Suspensionszellen (Ba/F3-gp130, Ba/F3 und alle stabil transduzierten Subtypen) wurden auf 10 cm Schalen mit 10 ml DMEM^{+/+} bei 37°C, 5% CO₂ in einer

gesättigten Wasserdampfatosphäre kultiviert. Zweimal wöchentlich wurden sie im Verhältnis 1:10000 *gesplitted*.

5.17.4 Zellviabilitätsassay

Die Ba/F3-gp130 bzw. Ba/F3 Zellen und ihre stabil transduzierten Subtypen wurden dreimal mit PBS gewaschen, in DMEM^{+/+} aufgenommen und gezählt. Anschließend wurden sie so verdünnt, dass pro Well einer 96-Well-Platte 5000 Zellen kultiviert waren. Dabei wurden stets Triplikate erstellt. Die Platte wurde 72 h bei 37°C inkubiert. Die Proliferation der Zellen wurde mit dem CellTiter-Blue Viability Assay (Promega GmbH, Mannheim) am Tecan Infinite M200 PRO Reader (ex-Filter 530/25, em-Filter 590/35, Tecan, Maennedorf, Schweiz) gemessen. Der Zeitpunkt 0 wurde vom Zeitpunkt der höchsten noch messbaren Werte subtrahiert und als „relative light units“ (RLU) angegeben. Alle Messwerte wurden in einer Dreifachbestimmung ermittelt.

5.17.5 Retrovirale Transduktion von Ba/F3 und Ba/F3-gp130 Zellen

Für die retrovirale Transduktion von Ba/F3-gp130-Zellen bzw. Ba/F3-Zellen wurde der Überstand von zuvor transfizierten Phoenix-Eco-Zellen verwendet. Dazu wurden 1x10⁵ Ba/F3-gp130-Zellen in 50 µl DMEM^{-/-} mit 250 µl Phoenixzellüberstand aufgenommen. Nach der Zugabe von 3 µl Polybrene (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Konzentration 8µg/ml) wurden die Zellen 2 h, 300 g bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 5 ml DMEM^{+/+}, mit 10 ng/ml HIL-6 bzw. IL3, in einer 6-Well-Platte für 48 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen durch die Zugabe von Puromycin (1,5 µg/ml) selektiert.

5.17.6 Stimulationsassay des *Cluster-Signalings* und autokrin klassischen *Signalings*

Zur Stimulierung der Ba/F3-gp130 Zellen mit Ba/F3-mbHIL-11 Zellen in *Cluster-Signaling* Analysen oder Experimenten zu autokrinem *Signaling* wurden verwendete Zellen dreimal mit PBS gewaschen und anschließend 3 h bei 37°C in DMEM^{-/-} gestarved. Danach wurden die Zellen erneut mit PBS gewaschen und durch den Zellviabilitätsassay quantifiziert. Wurde eine einzelne Zellreihe verwendet, wurden 1x10⁶ Zellen pro Reaktionsgefäß ausgesäht. Wurden zwei Zellreihen kombiniert wurden je 5x10⁵ Zellen verwendet. Durchgeführte Kombinationen sind:

Ba/F3-gp130

Ba/F3

Ba/F3-gp130 + 10 ng/ml rec. HIL-6

Ba/F3-mbHIL-11

Ba/F3-gp130 + Ba/F3

Ba/F3-gp130 + Ba/F3-mbHIL-11

Ba/F3-gp130 + Ba/F3-mbHIL-11 + 10 µg/ml sgp130

Ba/F3-gp130 + je 1 ml SN einer 0, 30 und 120 min inkubierten *Cluster-Signaling*

Ba/F3-gp130-mbHIL-11

Ba/F3-gp130-mbHIL-11 + 10 µg/ml sgp130

Ba/F3-gp130 + Ba/F3-HIL-11Fc

Ba/F3- mbHIL-11^{R355E}

Ba/F3-gp130 + Ba/F3-mbHIL-11^{R355E}

Ba/F3-gp130 + Ba/F3-mbHIL-11^{R355E} + 10 µg/ml sgp130

Ba/F3-gp130 + je 1 ml SN einer 0, 30 und 120 min inkubierten *Cluster-Signaling*

Ba/F3-gp130-mbHIL-11^{R355E}

Ba/F3-gp130-mbHIL-11^{R355E} + 10 µg/ml sgp130

Je 1×10^6 Zellen wurden in 1 ml DMEM^{-/-} gelöst, in ein Reaktionsgefäß gegeben und 30 min bei 37°C inkubiert. Für Positivkontrollen wurde zuvor 10 ng/ml rekombinantes HIL-6Fc hinzugefügt. Anschließend wurden die Zellen zentrifugiert (1000 g, 5 min, 4°C) und in 100 µl P-STAT Lysepuffer lysiert. Die Überstände wurden bei -20°C aufgehoben.

5.17.7 Transfektion adhärenter Zellen

Für die Transfektion adhärenter Zellen wurden 2×10^6 HEK293 bzw. 5×10^5 CHO-K1 in 10 cm Schalen mit DMEM^{+/+} ausgesät und über Nacht kultiviert. Am folgenden Tag wurde 1 ml DMEM^{-/-} mit 5 µg Plasmid DNA und 10 µl Turbofect (Thermo Fisher Scientific,

St.LeonRot, Deutschland) vermischt und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde die Lösung tropfenweise auf die Zellen gegeben. Nach 6 h erfolgte ein Mediumswechsel mit DMEM^{+/+}. Zur Kontrolle der Transfektionseffizienz wurde je eine Schale der Zellen mit p409-YFP transfiziert. Die höchste Transfektionsrate war 48 h nach der Transfektion erreicht.

Für die Transfektion von Phoenix-Eco Zellen wurden 8×10^5 Zellen/Well in eine 6-Well-Platte mit je 2 ml DMEM^{+/+} ausgesät und über Nacht kultiviert. Am nächsten Tag wurde 1 µg Plasmid-DNA, 2 µl Turbofect in 200 µl DMEM^{+/+} vermischt und tropfenweise über die Zellen gegeben. Nach 6 h wurde das Medium gegen 2 ml DMEM mit 30% FCS und 1% Penicillin/Streptomycin ausgetauscht und über Nacht kultiviert. Am nächsten Tag wurde der Überstand für die retrovirale Transduktion von Ba/F3-gp130 bzw. Ba/F3 Zellen verwendet.

5.17.8 Stabile Transfektion adhärenter Zellen

Zur stabilen Transfektion von CHO Zellen wurde wie bei der normalen Transfektion von adhärenter Zellen verfahren. Nach den 48 h Inkubationszeit wurden die Zellen mit Trypsin gelöst und gewaschen. Danach wurden sie mit neuen 10 ml DMEM^{+/+} und 225 µl G418 resuspendiert und für 72 h inkubiert. Danach erfolgte erneut ein Mediumswechsel mit DMEM^{+/+} und G418. Nach 48 h wurden die Zellen abtrypsiniert, gezählt und so verdünnt, dass in 200 µl im Schnitt nur 0,5 Zellen sind. Dabei wurden 200 µl / Well der Suspensionslösung in eine 96-Well-Platte aufgetragen. 14 Tage lang wurde dann alle 3-4 Tage ein Mediumswechsel mit DMEM^{+/+} und G418 vollzogen. Danach wurden die Überstände der Wells, in denen CHO Zellen angewachsen sind, abgenommen, in Lämmli gekocht und mittels Western Blot detektiert. Die stärksten zwei Klone wurden auf eine 10 cm Schale mit DMEM^{+/+} und G418 gebracht. Man sollte nun eine reine Kolonie haben, die das Plasmid stabil exprimiert.

5.18 Proteinbiochemische Methoden

5.18.1 Bestimmung des Proteingehalts in Zelllysaten mittels Bicinchoninsäure (BCA) Protein Assay

Zur Bestimmung der Konzentration des Gesamtproteingehaltes von Zelllysaten wurde mittels des BCA-Protein-Kits von Thermo Fisher Scientific nach Herstellerangaben

bestimmt. Die Lysate wurden im Verhältnis 1:10 in PBS verdünnt. Je 25 µl des Lysats bzw. der Standardkonzentrationen von BSA wurden pro Well einer 96-Well-Platte in Doppelwerten aufgetragen. Nach Zugabe des Reaktionsgemisches aus dem Kit wurde die Platte 30 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Absorption bei 562 nm am Infinite M200 PRO Microplate Reader von TECAN (Maennedorf, Schweiz) gemessen.

5.18.2 Detektieren von Proteinen im Coomassiegel

Um Proteine nach ihrer Reinigung zu detektieren und ihre Reinheit zu bestimmen, erfolgt eine Anfärbung mittels Coomassie Brilliantblau R350. Dazu wurde eine SDS-PAGE durchgeführt und das Gel im Anschluss mit der Coomassie Staining Lösung bedeckt und in einer Box mit Deckel 15 min bei Raumtemperatur geschwenkt. Anschließend wurde es über Nacht mit Destaining Lösung entfärbt. Am nächsten Tag waren die Proteinbanden sichtbar.

5.18.3 Durchflusszytometrie

Die Expression von Proteinen auf der Zelloberfläche wurde durch die Durchflusszytometrie nachgewiesen. Dafür wurden adhärenente Zellen mit PBS abgelöst und anschließend zentrifugiert (1200 g, Raumtemperatur). Suspensionszellen wurden direkt zentrifugiert. 1×10^6 Zellen wurden gezählt und zweimal in 500 µl FACS Puffer gewaschen (300 g, 4°C, 4 min). Danach wurden die Zellen in 100 µl FACS Puffer aufgenommen, mit dem Primärantikörper vermischt und 1 h auf Eis inkubiert. Anschließend wurden die Zellen dreimal mit 500 µl FACS-Puffer gewaschen, in 100 µl FACS Puffer resuspendiert und mit dem Sekundärantikörper versetzt. Erneut wurde zweimal gewaschen und in 500 µl FACS-Puffer resuspendiert. Die Zellen wurden in FACS Röhrchen (BD Falcon 5 ml Polystyrene Round-Bottom Tube, BD Bioscience Discovery Labware, Bedford, MA, USA) überführt. Danach wurden die Zellen im FACS Canto II (BD Biosciences, Heidelberg) analysiert.

5.18.4 ELISA: hIL-6R

Zur quantitativen Konzentrationsbestimmung des hIL-6R wurde ein Sandwich ELISA verwendet. Dazu wurde eine 96-Well-Mikrotiterplatte (Nunc A/S, Roskilde, Dänemark) mit dem Primärantikörper (IL-6R Ak, 1 µg/ml, je 50 µl pro Well) über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Am nächsten Tag wurde ungebundener Antikörper durch dreimaliges Waschen mit PBS-T entfernt und mit 200 µl Blocking-Puffer pro Well für 2 h bei Raumtemperatur geblockt. Erneut wurde dreimal mit PBS-T gewaschen und anschließend je 50 µl der Proben bzw. des Standards (rekombinantes hIL-6) aufgetragen.

Die Proben wurden zuvor in PBS mit 1% BSA verdünnt und in Dreifachbestimmung aufgetragen. Nach 2 h Inkubationszeit bei Raumtemperatur wurde erneut dreimal mit PBS-T gewaschen. Anschließend wurde der 50 µl des Detektionsantikörpers Baf227 (0,5 µg/ml, 50 µl pro Well) für 2 h inkubiert und danach dreimal gewaschen. Danach wurden 100 µl Streptavidin-POD (verdünnt 1:200 in 1% BSA/PBS) pro Well hinzugegeben und für 30 min bei Raumtemperatur unter Lichtausschluss inkubiert. Nach dreimaligem Waschen erfolgte die Zugabe von 75 µl POD-Substrat für 30 min bei Raumtemperatur. Die Reaktion wurde durch die Zugabe von 75 µl 1,8 M H₂SO₄ gestoppt und an dem Tecan Infinite M200 PRO Reader (Tecan, Maennedorf, Schweiz) bei 450 nm ausgewertet.

5.18.5 SDS-PAGE

Durch eine SDS-PAGE wurden Proteine nach ihrem Molekulargewicht voneinander getrennt. Dafür wurden 50 µg der Zelllysate nach dem BCA Assay, in einem Gesamtvolumen von 2 µl, mit dH₂O und 5 µl 5x Lämmli-puffer gemischt und für 10 min bei 95°C aufgeköcht. Zellkulturüberstände, deren Konzentration nicht bestimmt wurde, wurden 50 µl mit 10 µl Lämmli-puffer aufgeköcht. Von den Lysaten, die direkt in Lämmli-puffer aufgeköcht wurden, wurden direkt 30 µl aufgetragen. Es wurden selbst gegossene Gele mit einer Dicke von 1,5 mm und 10 oder 15 Probentaschen verwendet. Diese bestanden aus einem etwa 1 cm hohem Sammelgel und einem 6 cm hohen Trenngel. Die Größentrennung erfolgte durch das Mini-PROTEAN Tetra System (BioRad Laboratories GmbH, München) bei einer Spannung von 90 V und einer konstanten Amperezahl.

5.18.6 Reinigung von Proteinen aus Zellkulturüberständen

Nachdem CHO Zellen stabil transduziert wurden, begann die Produktionsphase. Dazu wurden die Zellen auf 14 große Schalen mit 15 cm Durchmesser übertragen. Sobald diese voll bewachsen waren, wurden sie mit Trypsin abgelöst und mit 400 ml DMEM^{+/+} mit G418 in eine 1 L Rollerbottle gegeben. Diese wurde 72 h bei 37°C unter ständiger Rotation inkubiert. Danach wurde der Überstand verworfen und durch neuen ersetzt. Dieser besteht aus 342 ml DMEM, 5 ml Pen/Strep, 4,2 ml G418 und 25 ml ultra low IgG FCS. Alle drei Tage wurden die Überstände abgenommen, bis das gewünschte Volumen erreicht war. Anschließend wurde der Überstand 15 min bei 1000 g und danach 15 min bei 10000 g zentrifugiert. Der Überstand wurde nun bei -80°C eingefroren. Für die Proteinreinigung wurden geklärte Zellkulturüberstände mit Hilfe einer ÄKTA™ Start (GE-Lifesciences) auf eine Protein A HiTrap Säule (GE-Lifesciences) geladen. Diese bindet das Protein über

dessen Fc-Tag. Nach Beladung wird die Säule mit mindestens 40 Säulenvolumen (cv) PBS gewaschen und im Anschluss das zu isolierende Protein durch einen pH Wechsel mit 15 cv saurem Elutionspuffer eluiert. Das isolierte Protein wurde anschließend in PBS umgepuffert, auf ca. 1 mg/ml konzentriert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Danach erfolgte eine Lagerung bei -80°C.

5.18.7 Western Blotting

Zur Detektion der zuvor voneinander getrennten Proteine wurde die Methode des Western-Blots verwendet. Dafür wurden die Proteine auf eine PVDF-Membran (Carl Roth GmbH + Co, KG, Karlsruhe) transferiert. Dies erfolgte mit Hilfe des Trans-Blot-Turbo semidry Transfer Systems (BioRad Laboratories GmbH, München). Die Membran wurde zunächst für 1 min in Methanol aktiviert und im Anschluss jeweils einmal in dH₂O und einmal in Transferpuffer für je eine Minute gewaschen. Das Whatman-Papier wurde derzeit in Transferpuffer eingelegt. Nun wurden 3 Whatman-Papiere, PVDF-Membran, SDS-Gel und wieder 3 Whatman-Papiere aufeinandergeschichtet und in das Transfergerät gelegt. Die Proteine wurden elektrophoretisch bei konstanter Spannung (25 V, 1 A, 40 min) auf die Membran transferiert. Danach wurde die Membran in einem 50 ml Falcon mit 5% Milchpulver (zuvor in TBS-T gelöst) bei Raumtemperatur für 1,5 h geblockt. Die Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgte über Nacht bei 4°C. Am nächsten Tag wurde die Membran dreimal für je 5 min mit TBS-T gewaschen und anschließend 1 h bei Raumtemperatur mit dem Sekundärantikörper inkubiert. Erneut wurde zweimal mit TBS-T für je 5 min und einmal 5 min mit TBS gewaschen. Nun wurde die Membran durch das ECL Prime Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare, München) nach Herstellerangaben entwickelt. Die Detektion erfolgte am INTAS Chemo Cam Imager (INTAS Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen) und die Auswertung mit Hilfe der Software ChemoStar Professional (INTAS Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen).

5.18.8 Strippen von Western Blotting-Membranen

Um den vorher verwendeten Antikörper von der Membran zu lösen, wurde der Blot *gestrippt*. Dafür wurde die Membran in einem Falcontube mit 50 ml Stripping Puffer und 50 µl β-Mercaptoethanol für 30 min bei 60°C im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurde dreimal mit TBS-T gewaschen, danach mit Milchpulver geblockt und der neue Antikörper über Nacht bei 4°C inkubiert.

5.18.9 Zelllyse

Zur Zelllyse wurde der P-STAT Lysepuffer verwendet. Dafür wurden 1×10^6 Ba/F3 Zellen nach dem Stimulationsassay bei 1000 g, 4°C zentrifugiert und in 100 µl P-STAT Lysepuffer resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen für 1,5 h bei 4°C gerollt, danach bei 13000 g, 4°C zentrifugiert und der Überstand mit 20 µl 5x Lämmli-Puffer 10 min bei 95°C aufgeköcht und für die Western Blottinganalyse verwendet.

5.19 Statistische Methoden

5.19.1 One way Anova

Zur Signifikanzüberprüfung wurde ein one way Anova mit Dunnett correction ($\pm$ Standardabweichung) durchgeführt. Dazu wurde GraphPad Prism® Version 6.01 genutzt. Dabei gilt: * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,005$, **** $p \leq 0,001$ und ns $p \geq 0,05$.

6 Ergebnisse

6.1 HIL-6Fc Site 2 und Site 3 Mutanten sind Inhibitoren von IL-6

Das Zytokin IL-6 ist, wie in der Einleitung bereits beschrieben, sowohl an der Signaltransduktion durch *Trans-Signaling* als auch *Classic-Signaling* beteiligt. Da *Trans-Signaling* mit entzündlichen Prozessen und Autoimmunerkrankungen in Verbindung gebracht wird, ist es interessant, mögliche Inhibitionswege des *Trans-Signaling* zu erforschen. In dieser Arbeit wird versucht, durch gezielte Punktmutationen einen kompetitiven Inhibitor des IL-6 zu generieren. Es sind sowohl an Site II als auch an Site III des IL-6 Mutationen beschrieben, welche die Aktivität des Zytokins fast vollständig herabsetzen (Paonessa et al., 1995, Savino et al., 1994). Die zwei Sites sind in Abbildung 8 in einer Proteinstruktur dargestellt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden diese Mutationen erstmalig auf die Hyperzytokine HIL-6 und HIL-6Fc übertragen, mit dem Ziel, diese als kompetitive Inhibitoren von IL-6 zu verwenden. Der mögliche Vorteil einer Inkorporation solcher IL-6 Muteine in einem Hyperzytokin wäre eine selektive Blockade des Transsignalweges. Für IL-6 sind bereits einige inhibierende Muteine beschrieben. Diese blockieren allerdings den *Classic*- und *Trans*-Signalweg gleichermaßen. Fusionsproteine, in denen sowohl Site II als auch Site III mutiert sind, können keinerlei Interaktion mit gp130 eingehen. Bei einer isolierten Site II oder Site III Mutation ist es möglich, ein einzelnes gp130 zu binden, allerdings fehlt die Fähigkeit diese zu dimerisieren. In beiden Fällen ist keine Signaltransduktion mehr möglich (Paonessa et al., 1995). An Site II wurden S118R, V121D und Y31D über eine *site directed mutagenesis* PCR mutiert. Damit ist laut (Savino et al., 1994) eine Restaktivität von $< 0,1\%$ im Vergleich zum Wildtyp IL-6 vorhanden. Ebenfalls wurde ein Fusionsprotein erstellt, an dem W157R/D160R und damit die Site III mutiert ist. Das Zytokin hat noch eine Restaktivität von $< 3\%$ im Vergleich zum Wildtyp IL-6 (Paonessa et al., 1995). Aufgrund von Aviditätseffekten haben Inhibitoren als Polymere oftmals eine bessere Inhibitionsfunktion als Monomere. So ist zum Beispiel sgp130Fc ca. 10x potenter als das Monomer sgp130His (Jostock et al., 2001). Aus diesem Grund wurden für diese Arbeit die Punktmutationen sowohl an HIL-6 als auch an HIL-6Fc mutiert, um einen maximal potenten Inhibitor zu generieren.

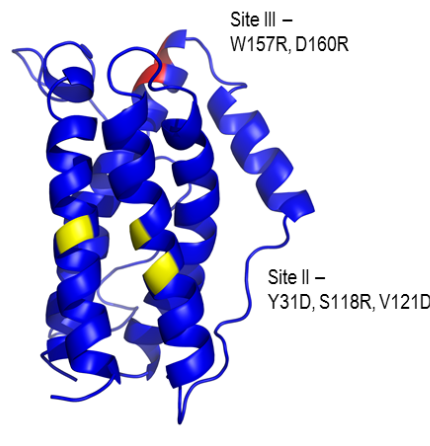


Abbildung 8: **Proteinstruktur des IL-6.**

Lokalisation von Punktmutationen an *Sites* II und III in IL-6. Dargestellt ist die Struktur von IL-6 in Lösung. Rot markiert sind *Site* III und gelb markiert *Site* II Punktmutationen. PDB 1IL6.

6.2 Generierung von HIL-6Fc und HIL-6 mit inaktiver *Site* II oder III

Für die Herstellung der HIL-6Fc und HIL-6 mit inaktiver *Site* II oder III wurde die *site directed mutagenesis* PCR verwendet. Der Austausch an der Aminosäure W157R und D160R an der *Site* III von HIL-6Fc und HIL-6 erfolgte mittels der Oligonukleotide „HIL-6/Fc W157R/D160R fw“ und „HIL-6/Fc W157R/D160R rv“. Dies ist in Abbildung 9 A + B schematisch dargestellt. Für den Austausch der drei Aminosäuren für *Site* II wurden in zwei sequentiellen PCR S118R und V121D und nachfolgend Y31D ausgetauscht. Für die erste PCR wurden die Oligonukleotide „HIL-6/Fc S118R/V121D fw“ und „HIL-6/Fc S118R/V121D rv“ und für die darauffolgende „HIL-6/Fc Y31D fw“ und „HIL-6/Fc Y31D rv“ genutzt (siehe Abbildung 9 C + D). Anschließend wurde die PCR wie in Abschnitt 5.16.10 beschrieben durchgeführt. Nach der jeweiligen PCR erfolgte eine Restriktion mit *DpnI* über Nacht bei 37°C, wodurch das verbleibende *Template* abgebaut wurde. Die Mutationen der vier erstellten Plasmide HIL-6Fc *Site* III, HIL-6 *Site* III, HIL-6Fc *Site* II und HIL-6 *Site* II wurden durch eine Sangersequenzierung bestätigt. Anschließend wurden sie in CHO-K1 Zellen wie in Abschnitt 5.17.7 beschrieben transfiziert.

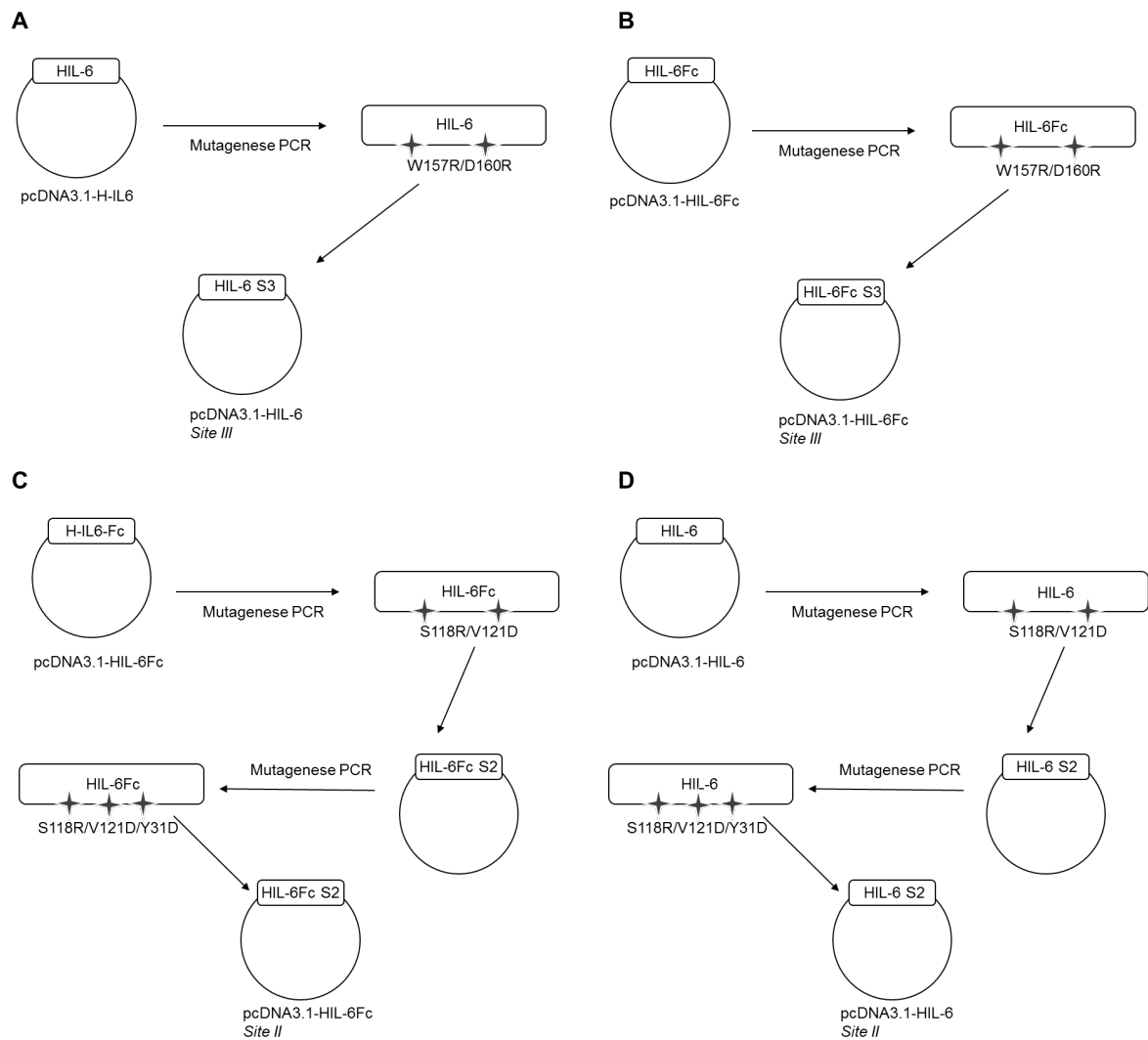


Abbildung 9: **Schematische Übersicht über die Klonierung von HIL-6 / Fc Site II und III.**

A + B) Übersicht über die Klonierung von HIL-6Fc Site III (A) und HIL-6 Site III (B). Dazu wurden mittels einer *Site directed mutagenesis* PCR die Aminosäuren W157R und D160R ausgetauscht. Anschließend erfolgte eine Verifizierung der Mutationen über eine Sequenzierung der Fusionsproteine. **C + D)** Darstellung der Klonierung von HIL-6Fc Site II (C) und HIL-6 Site II (D). Dazu wurden mittels einer *Site directed mutagenesis* PCR die Aminosäuren S118R und V121D ausgetauscht. In einer zweiten *site directed mutagenesis* PCR wurde die dritte Aminosäure Y31D ersetzt. Anschließend erfolgte eine Verifizierung der Mutationen über eine Sangersequenzierung der Fusionsproteine.

6.3 Expression der HIL-6Fc und HIL-6 Site II und III in CHO K1-Zellen

Nach der Klonierung wurden die HIL-6Fc und HIL-6 Site II und III in CHO-K1 Zellen transfiziert (siehe 5.17.7). Zusätzlich wurde zur Transfektions- und Negativkontrolle eine Zellreihe mit YFP (*yellow fluorescent protein*) transfiziert. Für die Transfektion wurde je 5 µg des Plasmids auf die adhärenenten Zellen gegeben und für 48 h inkubiert. Anschließend erfolgte eine Zelllyse mit 50 µl P-STAT Lysepuffer. Mittels eines BCA Assays (siehe 5.18.1) aus je 25 µl Zelllysate wurde die Proteinkonzentration bestimmt. 25 µg des Lysates

wurden für ein SDS-PAGE verwendet und die Proteine mittels eines IL-6R Antikörpers und Sekundärantikörper α -mouse detektiert. Im Western Blot (Abbildung 10 A) zeigte sich eine deutliche Expression aller sechs Fusionsproteine: HIL-6Fc, HIL-6, HIL-6Fc Site III, HIL-6 Site III, HIL-6Fc Site II und HIL-6 Site II. Daraus kann man folgern, dass die durchgeführten Punktmutationen keinen Einfluss auf die Expression haben. Dabei wurden Fusionsproteine mit Fc-Tag bei etwa 100 kD und Fusionsproteine ohne Fc-Tag bei 70 kD detektiert. Als Negativkontrolle wurden Zellen mit YFP transfiziert.

6.4 Überprüfung der Dimerisierung von Fc fusionierten Hyperzytokinvarianten

Neben den Lysaten der transduzierten CHO-K1 Zellen wurden ebenfalls die Überstände (SN) der 48 h lang inkubierten Zellen im Western Blot detektiert. Dazu wurden sie zuvor mit reduzierendem und nicht reduzierendem Lämmli-puffer versetzt. Bei nicht reduzierendem Lämmli-puffer (ohne β -Mercaptoethanol) wurden die Proben nicht aufgekocht und gegebenenfalls entstandene Dimere konnten weiterhin bestehen. Im Western Blot (Abbildung 10 B) waren bei nicht reduzierendem Lämmli-puffer die Proteine der Fc-Tag Fusionsproteine bei etwa 170 kD und in reduzierendem Lämmli-puffer bei etwa 100 kD detektierbar. Fusionsproteine ohne Fc-Tag zeigten sowohl in reduzierbaren als auch im nicht reduzierbaren Lämmli-puffer eine Proteingröße von etwa 70 kD. Die Fusionsproteine mit Fc-Tag konnten ohne β -Mercaptoethanol weiterhin dimerisieren und sind damit schwerer. Aus diesen Ergebnissen lässt sich schließen, dass die Proteine in den Überstand sezerniert wurden. Zudem konnte man sehen, dass die Fusionsproteine mit Fc-Tag über diesen dimerisierten.

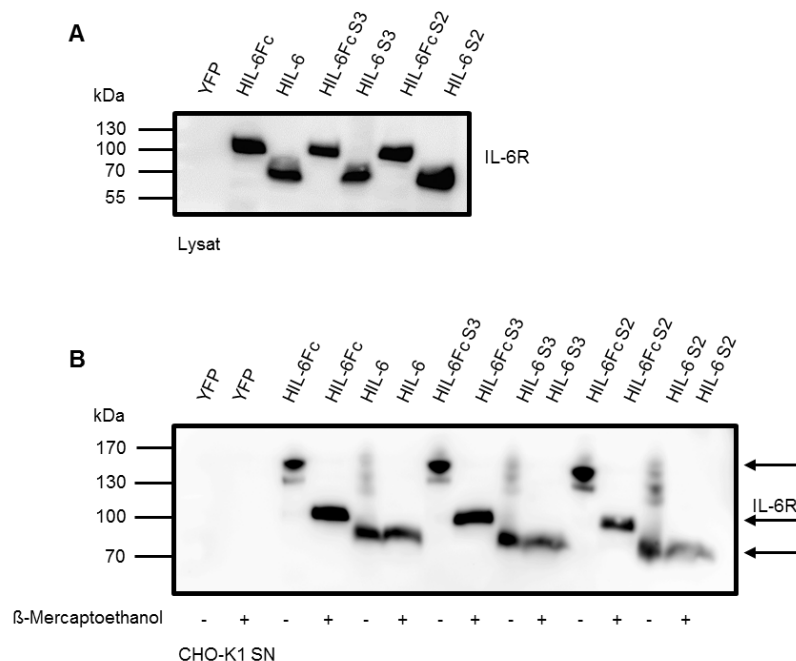


Abbildung 10: HIL-6/Fc Site II und III werden von CHO-K1 Zellen exprimiert, in den Überstand sekretiert und dimerisieren über ihren Fc-Tag.

A) Western Blotanalyse von CHO-K1 Lysaten. CHO-K1 Zellen wurden mit Expressionsplasmiden für die aufgeführten Fusionsproteine transfiziert. 48 h nach Transfektion wurden die Zellen geerntet und Zelllysate sowie Überstände mittels Western Blot analysiert. Zelllysate von transfizierten CHO-K1 Zellen wurden auf Expression der oben genannten Proteine untersucht. Zur Proteindetektion wurde der IL-6R AK verwendet. n=3.

B) Western Blot von Überständen der HIL-6/Fc Mutanten aus CHO-K1 Zellen. Zellkulturüberstände von transfizierten CHO-K1 Zellen wurden auf Expression der oben genannten Proteine untersucht. Um die Fc vermittelte Dimerisierung zu untersuchen, wurden die Proben mit reduzierendem und nicht-reduzierendem Lämmli-puffer versetzt. Zur Proteindetektion wurde der IL-6R Ak verwendet. n=3.

6.5 HIL-6/Fc Site II und III als IL-6 Signaling Inhibitoren

Um die biologische Aktivität der neu generierten HIL-6/Fc Mutanten zu testen, wurde ein Zellviabilitätsassay durchgeführt. Dafür wurden CHO-K1 Zellen mit HIL-6/Fc, HIL-6/Fc S3 und HIL-6/Fc S2 transfiziert. Zur Transfektionsüberprüfung wurde ein Zellansatz mit YFP transfiziert. Nach 48 h wurden die Zellüberstände kollektiviert und bei 13.000 g, 10 min bei 4°C zentrifugiert, um eventuelle Zellbestandteile zu entfernen. Durch einen hIL-6 Rezeptor ELISA (siehe 5.18.4) wurden die Überstände quantifiziert. Für den Zellviabilitätsassay (siehe 5.17.4) wurden Ba/F3-gp130 Zellen für 72 h mit je 1 ng/ml der Hyperzytokine HIL-6/Fc, HIL-6/Fc S3 und HIL-6/Fc S2 inkubiert. Als Positivkontrolle wurden Zellen mit 10 ng/ml rec. HIL-6 stimuliert. Als Negativkontrolle wurden Ba/F3-gp130 Zellen verwendet. Bei der Auswertung des Zellviabilitätsassays (siehe Abbildung 11 A) zeigte sich eine deutliche Proliferation der Ba/F3-gp130 Zellen nach Stimulation mit Wildtyp HIL-6 und HIL-6Fc. Dabei war die HIL-6 Stimulation mit 1 ng/ml vergleichbar stark wie die Positivkontrolle mit 10 ng/ml rec. HIL-6. Die HIL-6Fc Stimulation war sogar

stärker, was durch den verstärkten Effekt der Dimerisierung oder durch unterschiedliche Expressionslevel erklärbar ist. Die mit HIL-6/Fc S3 und HIL-6/Fc S2 inkubierten Zellen zeigten eine deutlich geringere Proliferation als die Positivkontrolle mit 10 ng/ml rec. HIL-6. HIL-6-Fc S3 und HIL-6/Fc S2 zeigten alle drei eine vergleichbar niedrige Proliferation, wie die unstimulierte Negativkontrolle. Im Gegensatz dazu zeigte HIL-6 S3 eine deutliche Restaktivität.

Die geringere biologische Aktivität von HIL-6/Fc *Site* II und III warf die Frage auf, ob sich diese als Inhibitoren von IL-6 eignen. Dazu wurden erneut CHO-K1 Zellen mit den punktmultierten HIL-6/Fc Fusionsproteinen, den Wildtypen und YFP transfiziert. Nach 48 h wurden die Überstände abgenommen und bei 13.000 g, 10 min bei 4°C zentrifugiert um eventuelle Zellbestandteile zu entfernen. Um die Proteinmenge im Überstand zu quantifizieren, wurde ein hIL-6 Rezeptor ELISA (siehe 5.18.4) der Überstände durchgeführt. Demzufolge konnte für den Zellviabilitätsassay die Konzentrationen von 0, 1, 5 und 10 ng/ml eingesetzt werden (siehe Abbildung 11 B). Um die Einflüsse von HIL-6/Fc *Site* II und III auf die Proliferation zu testen, wurde ein Zellviabilitätsassay mit Ba/F3-gp130 Zellen durchgeführt (siehe 5.18.4), die mit 10 ng/ml rekombinantem HIL-6 stimuliert wurden. Zur Kontrolle ab welcher Menge Zellkulturüberstand das Ergebnis eines Proliferationsassays durch Volumenzuwachs beeinflusst werden kann, wurden steigende Volumina von 48 h lang konditioniertem CHO-K1 Überstand verwendet. Im Zellviabilitätsassay (siehe Abbildung 11 B) zeigte sich, dass bei Zugabe von konditioniertem CHO K1 Überstand von 50 µl kein Proliferationsabfall detektierbar war. Bei einer Volumenzugabe von 100 µl war allerdings eine deutliche Proliferationseinschränkung sichtbar. Demzufolge wurden in den folgenden Experimenten nur HIL-6/Fc *Site* II und III Überstände bis zu einem Volumen von maximal 50 µl eingesetzt. Da nur bis 50 µl eine negative Beeinflussung der Proliferation durch das zusätzliche Volumen und die verbrauchten Zellüberstände auszuschließen war, konnten lediglich Inhibitorkonzentrationen bis 10 ng/ml eingesetzt werden. Im Zellviabilitätsassay (Abbildung 11 C) zeigte sich eine Inhibition des rec. HIL-6 durch die vier punktmultierten HIL-6 Fusionsproteine. Als besonders potent erwiesen sich dabei die Fusionsproteine HIL-6Fc S3 und HIL-6Fc S2.

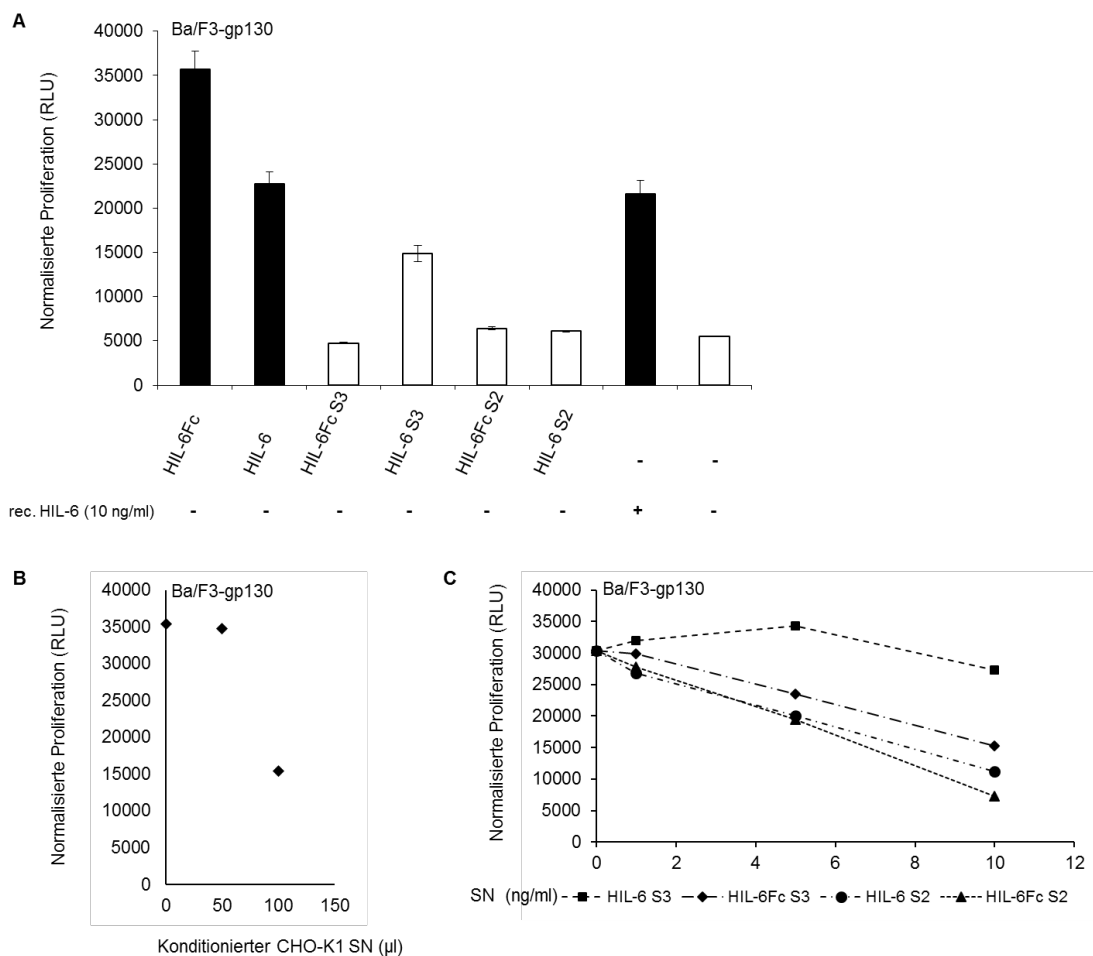


Abbildung 11: **Mutierte Hyperzytokine agieren als *Trans-Signaling* Inhibitoren.**

A) Zellviabilitätsassay von Ba/F3-gp130 Zellen bei Zugabe von 1 ng/ml der HIL-6/Fc *Site* II und III aus CHO-K1 Überstand. Für den Zellviabilitätsassay wurden Ba/F3-gp130 Zellen für 3 Tage mit je 1 ng/ml der HIL-6/Fc Fusionsproteine inkubiert. Proliferation wurde im Anschluss mit CellTiter blue analysiert. n=4. **B)** Zellviabilitätsassay von Ba/F3-gp130 Zellen bei Zugabe von 48 h lang konditioniertem CHO-K1 Überstand untransfizierter Zellen. Zu den Ba/3-gp130 Zellen wurden 0, 50 und 100 µl konditionierter CHO-K1 Überstand gegeben um einen Volumeneffekt bei den folgenden Experimenten auszuschließen. n=3. **C)** Für den Zellviabilitätsassay wurden Ba/F3-gp130 Zellen für 3 Tage mit je 0, 1, 5 oder 10 ng/ml von HIL-6/Fc HIL6/Fc *Site* II und III aus CHO-K1 Überstand inkubiert. Die Zellen wurden zuvor mit 10 ng/ml rec. HIL-6 stimuliert. Um einen Volumeneffekt zu vermeiden, wurden Konzentrationen bis 10 ng/ml eingesetzt. n=4

6.6 Expression der HIL-6Fc Muteine durch stabil transduzierte CHO-K1 Zellen

Um weitere Effekte des 48 h lang inkubierten Mediums auf die Proliferation auszuschließen, wurden HIL-6Fc *Site* III und *Site* II über ihren Fc-Tag gereinigt. Gereinigte Proteine sind für die Aussagekraft des Inhibitors deutlich valider. Dazu wurden die CHO-K1 Zellen mit cDNA stabil transduziert, die die Sequenzen für HIL-6Fc *Site* III und *Site* II enthalten (siehe 5.17.8). Für die Selektion wurde das Antibiotikum G418 verwendet. Um die Einzelklone

nach Stärke der Expression der Fusionsproteine zu selektieren, wurden Western Blots (siehe 5.18.5 und 5.18.7) durchgeführt. Dafür wurde 30 µl des Überstandes mit 5x Lämmli-puffer versetzt, gekocht und per SDS Gel analysiert. Anschließend wurden die Proteine mittels eines IL-6R Antikörpers und α -mouse Sekundärantikörper detektiert. Im Western Blot (siehe Abbildung 11 A+ B) ließen sich die Einzelklone von HIL-6Fc *Site* III und *Site* II mit unterschiedlicher Proteinstärke detektieren. Die optisch zwei stärksten Klone (mit Pfeil markiert) wurden selektiert. Es handelt sich dabei um Klon E11 und D12. Die Einzelklone mit der besten Expressionsstärke wurden nach der Selektion zur Proteinaufreinigung weiterverwendet.

Für HIL-6 *Site* III wurde der Klon E11 und für HIL-6 *Site* II wurde D12 zur Proteinaufreinigung genutzt (siehe 5.17.8). Dazu wurden die Klone auf Rollerbottles überführt und die Überstände gesammelt. Die gesammelten Überstände wurden, wie beschrieben, zentrifugiert und über ein ÄKTA™ Start FPLC System mit einer Protein A HiTrap Säule gereinigt. Diese bindet die Proteine über ihren Fc-Tag. Anschließend erfolgte ein Pufferaustausch zu PBS und eine Konzentrationsbestimmung und Einstellung auf 1,5 mg/ml rek. Protein. Zur Überprüfung der Reinheit des Proteins wurden je 5 µg und 10 µg des HIL-6Fc S3 und S2 auf ein Coomassie Gel (siehe 5.18.2) geladen und detektiert. Als Kontrollen wurden der ungereinigte Überstand, die Ejektionsfraktion 1 und 2 im Citratpuffer und die Waschfraktion aufgetragen. Da kaum andere Proteine außer des Hauptproteins detektierbar waren, schienen die Proteine rein zu sein (siehe 5.18.2) (siehe Abbildung 11 C+ D).

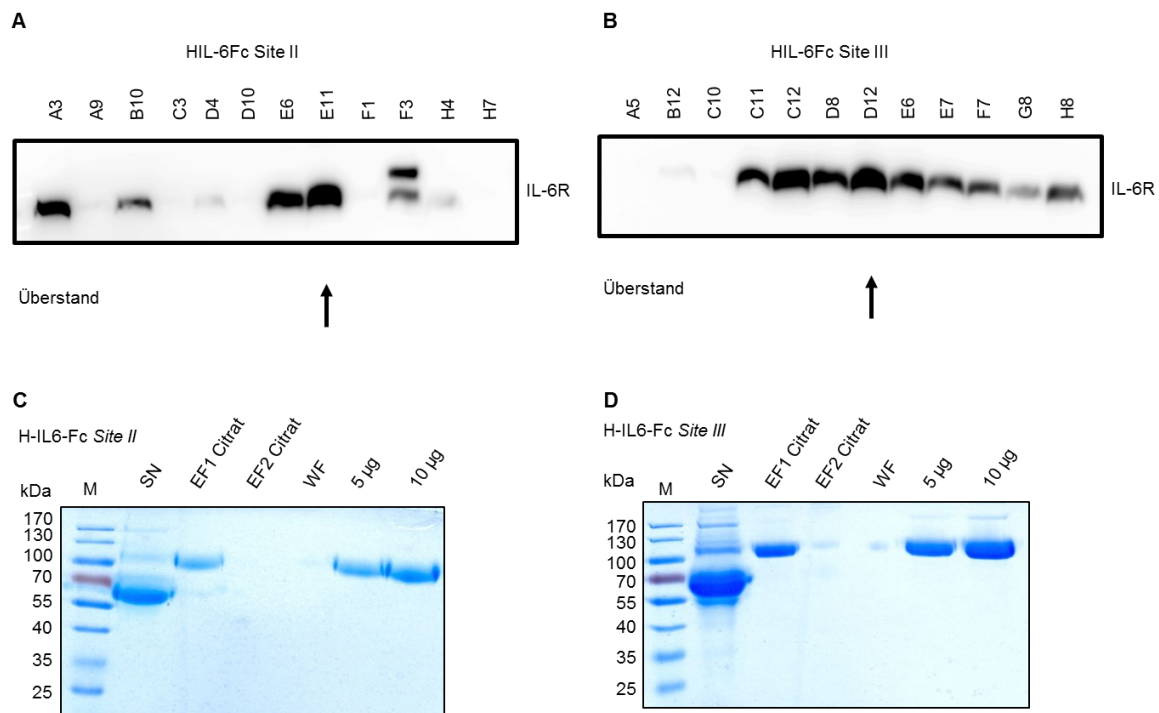


Abbildung 12: **Klonale Selektion und Reinigung von Hyperzytokinvarianten.**

A + B) Western Blotting Analyse der mit HIL-6Fc S2 + S3 transduzierten CHO K1 Klone. Nach erfolgter Transfektion von CHO-K1 Zellen mit Expressionplasmiden für die angezeigten Hyperzytokinvarianten wurden Zellen vereinzelt und die resultierenden Einzelklone auf Hyperzytokinexpression untersucht. Die mit den Pfeilen markierten Klone wurden in Rollerbottles zur Proteinproduktion überführt. n=1. **C + D)** Coomassiefärbung von gereinigten Hyperzytokinen wie oben angegeben. Es wurden je 40 µl der angegebenen Fraktionen aufgetragen, sowie 5 bzw. 10 µg der gereinigten Proteine. Analysiert wurden Fraktionen: Überstand (SN), Elution (EF), Waschfraktion (WF) und 5 bzw. 10 µg HIL-6-Fc Site II oder III. n=2.

6.7 Inhibitionsverhalten der HIL-6Fc Mutanten zu IL-6

Nach der Reinigung von HIL-6Fc Site II und III wurde erneut ihre Inhibitionsfähigkeit getestet. Dafür wurde ein Zellviabilitätsassay (siehe 5.17.4) mit 10 ng/ml rec. HIL-6 stimulierten Ba/F3-gp130 Zellen durchgeführt. Zur Überprüfung des generellen Inhibitionsverhaltens der stimulierten Ba/F3-gp130 Zellen wurde eine Konzentrationsreihe mit dem kompetitiven *Trans-Signaling* Inhibitor sgp130 durchgeführt. Nach dem gleichen Prinzip wurden ebenfalls Konzentrationsreihen mit den gereinigten Hyperzytokin Muteinen angewandt. Dafür wurden Konzentrationen von je 0, 0,1, 1, 10, 100, 10^3 , 10^4 und 10^5 ng/ml eingesetzt. Als Negativkontrolle wurden unstimulierte Ba/F3-gp130 Zellen inkubiert. Nach 72 h wurde der Zellviabilitätsassay ausgewertet. Wie in Abbildung 13 zu sehen, zeigte sich eine Inhibition des rec. HIL-6 durch sgp130. Bei 1 ng/ml war schon eine deutliche Inhibition erkennbar und bei 10 ng/ml war die Zellproliferation gleich der unstimulierten Negativkontrolle. Die stimulierten Ba/F3-gp130 Zellen reagierten adäquat auf eine Inhibition durch einen kompetitiven Antagonisten. In Abbildung 13 sieht man, dass die

stimulierten Zellen bei Kokultivierung mit HIL-6Fc *Site* III eine Inhibition ab 100 µg/ml zeigten. Die Reduzierung der Zellproliferation betrug verglichen zwischen 0 und 100 µg/ml HIL-6Fc *Site* III etwa 43%. Bei HIL-6Fc *Site* II betrug die Inhibition etwa 21%, verglichen zwischen 0 und 100 µg/ml. Somit ist die *Site* III Variante stärker inhibitorisch aktiv als *Site* II. Der Einsatz höherer Konzentrationen als 100 µg/ml war aufgrund einer zu starken Verdünnung des Zellansatzes mit PBS nicht durchführbar.

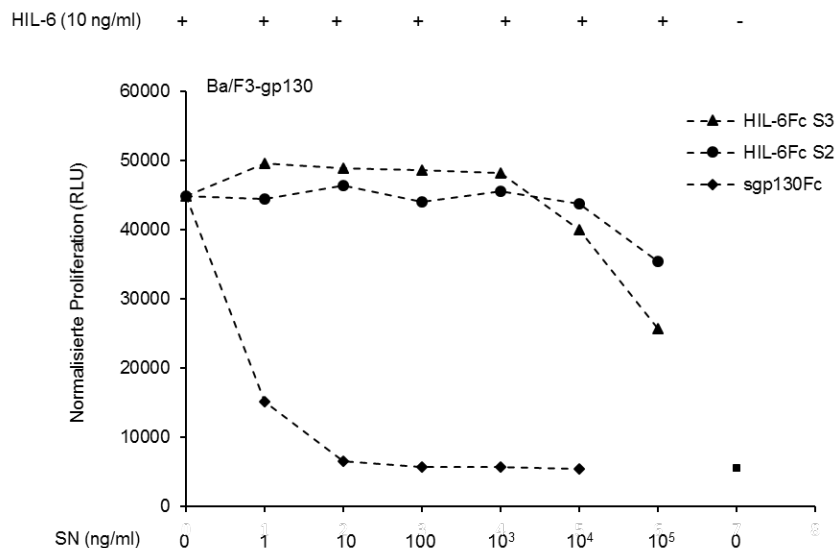


Abbildung 13: Inhibitionsverhalten von mutierten Hyperzytokinen im Vergleich zu sgp130Fc.

Zellviabilitätsassay von Ba/F3-gp130 Zellen bei Zugabe von verschiedenen Konzentrationen der Proteine HIL-6Fc S3 und HIL-6Fc S2. Für den Zellviabilitätsassay wurden Ba/F3-gp130 Zellen für 72 h mit je 0, 0,1, 1, 10, 100, 10³, 10⁴ oder 10⁵ ng/ml HIL-6Fc S3 und HIL-6Fc S2 inkubiert. Die Zellen wurden zuvor mit 10 ng/ml rec. HIL-6 stimuliert. Als Kontrolle der Inhibierbarkeit der Zellen wurde die gleiche Konzentrationsreihe ebenfalls mit dem bekannten Inhibitor sgp130Fc durchgeführt. Als Negativkontrolle wurden unstimulierte Ba/F3-gp130 Zellen verwendet. n=4.

6.8 Ein neuer IL-11 Signalmechanismus: *Cluster-Signaling*

Neben *Classic*- und *Trans-Signaling* wird in dieser Arbeit eine neue Möglichkeit beschrieben, wie IL-11 den STAT3 Signalweg aktivieren kann. Das sogenannte IL-11 *Cluster-Signaling*. Dabei handelt es sich um eine Signaltransduktion, bei der Transmitterzellen, die kein gp130 aber IL-11R exprimieren, IL-11 anderen gp130 tragenden Receiverzellen transpräsentieren (siehe Abbildung 14). Für IL-6 konnte bereits eine Beteiligung des *Cluster-Signaling*s an der Differenzierung von naiven T-Zellen zu TH17 Zellen gezeigt werden (Heink et al., 2017). Für IL-11 ist bislang die Existenz von *Cluster-Signaling* ungeklärt. In dieser Arbeit wird im Folgenden an einem Ba/F3 Modellsystem demonstriert, dass *Cluster-Signaling* auch für IL-11 möglich ist. Dazu wurden Ba/F3 Zellen, die kein endogenes gp130 exprimieren, mit einem Expressionsplasmid transduziert, welches zur Oberflächenexpression von membrangebundenem HIL-11 führt (mbHIL-11). Das membrangebundene H-IL-11 besteht aus den extrazellulären Domänen 1-3 des IL-11R, die über einen flexiblen Linker an IL-11 fusioniert sind. IL-11 wird über die native IL-11R Stalksequenz mit der IL-11R Transmembran und intrazellulären Domäne verbunden. Das resultierende Fusionsprotein stellt damit modellhaft eine *Cluster-Signaling* Situation dar, in der IL-11 an den membranständigen IL-11R einer Transmitterzelle gebunden hat, um eine Receiverzelle zu aktivieren. Im Gegensatz zu einer Transmitterzelle, die statt mbHIL-11 den IL-11R trägt, zu dem man IL-11 titriert, handelt es sich bei dem membrangebundenen Hyperzytokin um ein robusteres und weniger störanfälliges System, um *Cluster-Signaling* zu untersuchen, da aufgrund der kovalenten Verknüpfung des IL-11R mit IL-11 ständig ein *Cluster-Signaling* kompetenter Komplex vorliegt. Würde man stattdessen IL-11R und IL-11 Komplexe ohne kovalente Verknüpfung einsetzen, läge nur ein Bruchteil der eingesetzten Proteinmenge als Komplex vor und damit wäre der Großteil des eingesetzten Proteins inaktiv (Baran et al., 2018, Fischer et al., 1997, Dams-Kozłowska et al., 2012). Als einfaches *Cluster-Signaling Readout* wurde für das gewählte Modellsystem Proliferation und STAT3 Phosphorylierung von Receiverzellen untersucht.

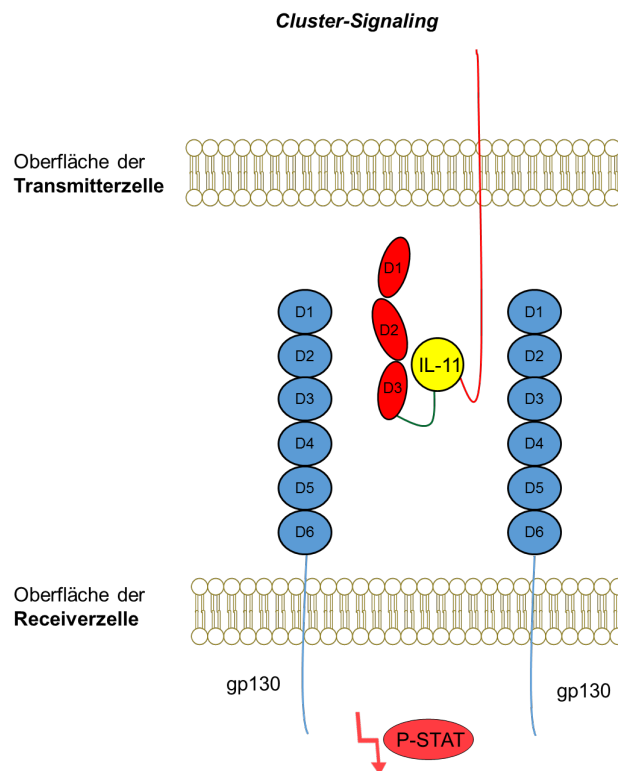


Abbildung 14: **Schematische Darstellung des *Cluster-Signaling*.**

Die Transmitterzelle exprimiert auf der Zelloberfläche membrangebundenes HIL-11. Die Receiverzelle exprimiert gp130. Finden beide Zellen zueinander, kann der Komplex aus Rezeptor und IL-11 des mbHIL-11 an zwei gp130 Moleküle binden und dadurch P-STAT3 aktivieren. Dies regt die Receiverzelle zur Proliferation an.

6.9 Generierung eines membrangebundenen HIL-11

Für den neuen Signalmechanismus IL-11 *Cluster-Signaling* musste ein membrangebundenes Hyperzytokin 11 (mbHIL-11) generiert werden. Erstmals wurde in dieser Arbeit ein mbHIL-11 erstellt. Für die Herstellung des mbHIL-11 wurden die transmembran- und intrazellulären Domäne (T/ICD) des IL-11 Rezeptors aus dem Plasmid pcDNA3.1-IL-11R mittels PCR amplifiziert. Dazu wurden die Oligonukleotide hIL-11R fw und rv genutzt. Die resultierenden PCR-Produkte wurden im Anschluss in pcDNA3.1 kloniert. Es entstand pcDNA3.1-IL-11R-T/ICD. Das pcDNA3.1-HIL-11Fc Plasmid enthält die Sequenz für den sIL-11R und ein IL-11Fc, welche über einen Linker (Sequenz: GGGGSGGGGSGGGGS) miteinander verbunden sind. Die Sequenzen, die für transmembran und intrazelluläre Domänen vom IL-11R kodieren, wurden nun via NotI in pcDNA3.1-HIL-11-Fc subkloniert. Dadurch entstand pcDNA3.1-mbHIL-11. Dieses ist über einen Myc-Tag detektierbar (siehe Abbildung 15 und Abbildung 16 A).

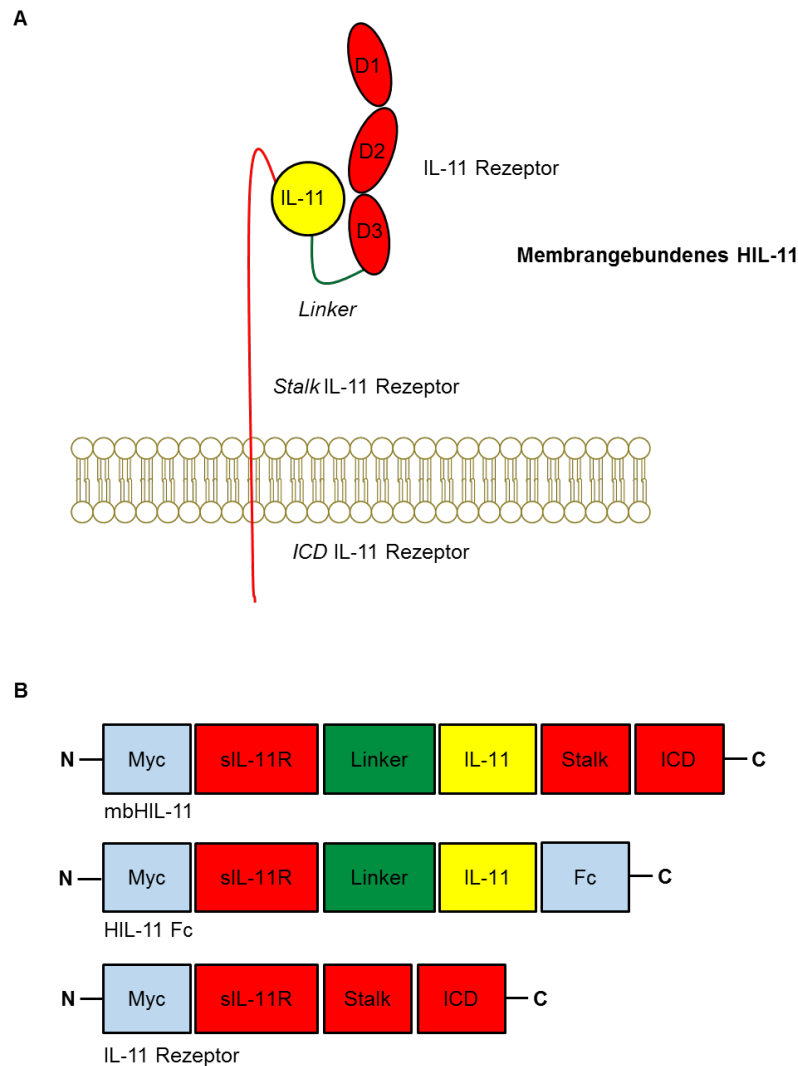


Abbildung 15: **Schematische Darstellung des Aufbaus von membrangebundenen HIL-11, HIL-11 Fc und dem IL-11 Rezeptor.**

A) Der extrazelluläre Teil des IL-11Rs ist mittels eines flexiblen Linkerpeptids mit IL-11 verbunden. IL-11 ist wiederum mit dem nativen Stalk-Bereich des IL-11Rs und der IL-11R ICD fusioniert. Dadurch entsteht ein membranständiges HIL-11 Molekül. Das Fusionsprotein ist über einen Myc-Tag detektierbar. **B)** Schematische Darstellung des Aufbaus von mbHIL-11, HIL-11 Fc und des IL-11 Rezeptors.

Zur Überprüfung der klonierten Sequenz wurde eine Testrestriktion mit BamHI durchgeführt (siehe Abbildung 16 B). Die Schnittstellen des Enzyms sind bei 1474 bp, 2735 bp und 3515 bp. Daraus ergeben sich Fragmentgrößen von 780 bp, 1261 bp und 5944 bp. Anschließend wurde die Sequenz mittels Sangersequenzierung verifiziert. Um das Plasmid stabil in Ba/F3 Zellen zu transduzieren wurde es mittels einer PmeI Restriktion in einen pMOWS Vektor subkloniert. Anschließend erfolgte eine Testrestriktion mit HindIII (siehe Abbildung 16 C). Die Enzymschnittstellen liegen bei 1607 bp und 5130 bp, woraus sich Fragmentgrößen von 3523 bp und 4857 bp ergaben.

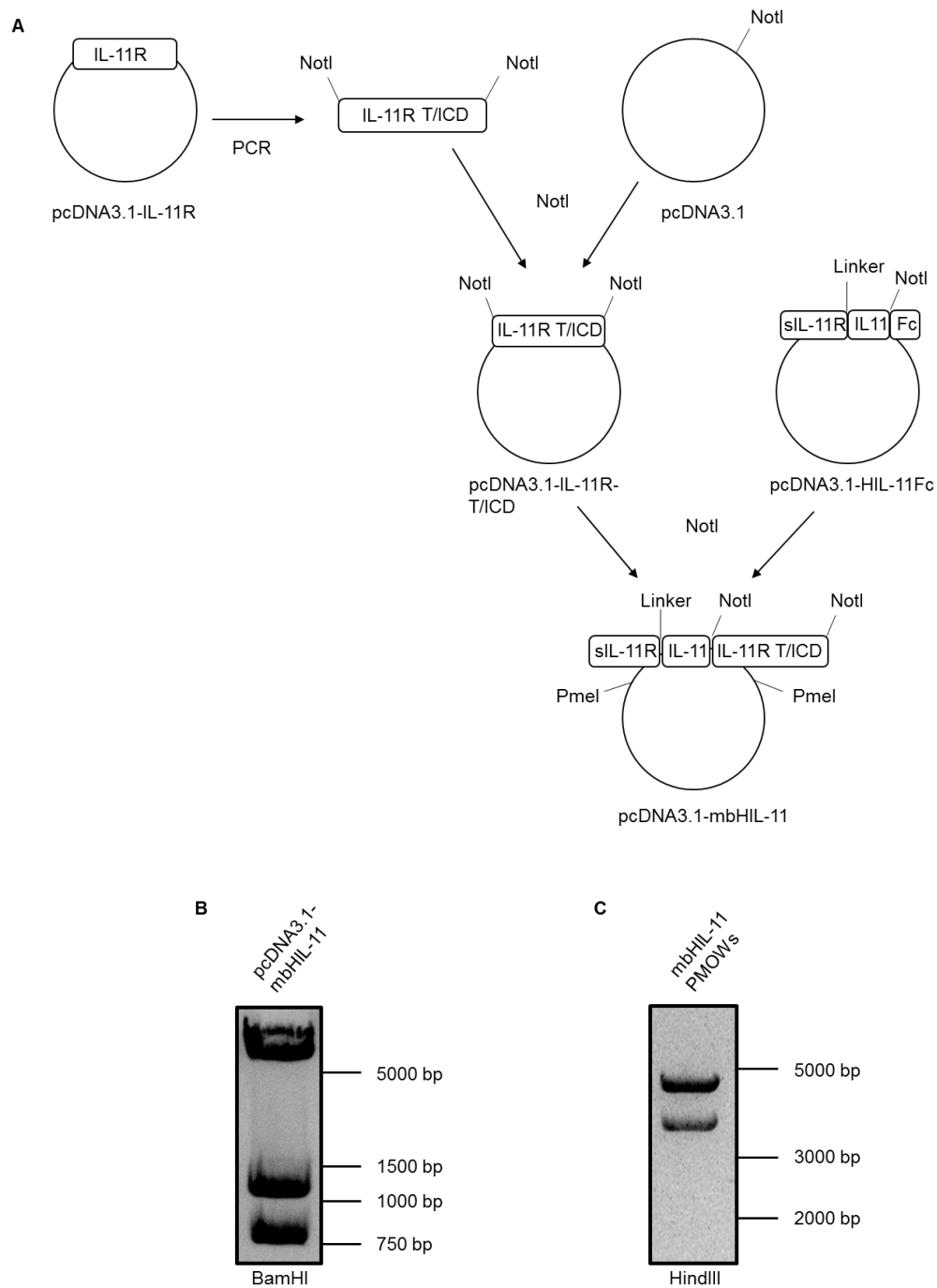


Abbildung 16: **Klonierung von mbHIL-11.**

A) Klonierungsschemata von mbHIL-11. Zur Herstellung eines membranständigen HIL-11 wurde der IL-11 Rezeptor mit seiner Transmembran- und Intrazellulärdomäne mittels PCR amplifiziert. Dazu wurden die Oligonukleotid hIL-11R fw und rv genutzt. Anschließend wurde das DNA Fragment über eine NotI Restriktion in pcDNA3.1 subkloniert. Anschließend wurde das HIL-11-Fc Plasmid mit NotI linearisiert und mit der Sequenz des membranständigen Rezeptors ligiert. Dabei wurde ein neues Stop Codon vor den Fc-Tag hinzugefügt. Es entsteht pcDNA3.1-mbHIL-11. **B)** Testrestriktion von pcDNA3.1-mbHIL-11 mit BamHI. **C)** Testrestriktion von mbHIL-11 in pMOWs mit HindIII.

6.10 Expression von mbHIL-11 in stabil transduzierten Ba/F3 Zellen

Für einen ersten Expressionsnachweis wurde das Fusionsprotein mbHIL-11 in HEK293 Zellen transfiziert (siehe 5.17.7). Als Positivkontrolle und *Trans-Signaling* Modell wurden ebenfalls Hek293 Zellen mit einem Expressionsplasmid für HIL-11Fc (sHIL-11Fc) transfiziert. Nach 48 h wurden die Zellen und deren Überstände gesammelt und zentrifugiert, um sie zu separieren. Das Zellpellet wurde mit *mild lysis buffer* (MLB) lysiert. Die Überstände wurden vorher mittels BCA-Assay quantifiziert (siehe 5.18.1). Für die Analyse mittels Western Blot wurden 50 µg des Überstandes bzw. des Lysats mit 5x Lämmli-puffer versetzt, gekocht und per SDS Gel analysiert (siehe 5.18.7). Anschließend wurden die Proteine mit einem Myc-Antikörper detektiert. Wie in Abbildung 17 A zu sehen, zeigte sich eine deutliche Expression von mbHIL-11 im Zelllysats. Die Positivkontrolle, HIL-11Fc, war Überstand zu detektieren. Im Überstand des membrangebundenen HIL-11 war eine deutlich geringe Proteinmenge detektierbar als beim sHIL-11. Dies deutet darauf hin, dass das mbHIL-11 in einem signifikant geringeren Maße in den Überstand sekretiert und *gshedded* wurde als das sHIL-11. Als Negativkontrolle wurden die untransfizierten Parentalzelllinien verwendet.

Nach der Testexpression in HEK293 Zellen wurden Ba/F3 und Ba/F3-gp130 mit mbHIL-11 und mbHIL-11^{R355E} cDNAs mittels einer retroviralen Transduktion stabil transduziert (siehe 5.17.5). Als *Trans-Signaling* Modell wurden ebenfalls stabile Ba/F3- HIL-11Fc und Ba/F3-gp130- HIL-11Fc Zellen erstellt. Nach der zweiwöchigen Selektion mit Puromycin wurden die Zellen und Überstände gesammelt. Diese wurden daraufhin mittels Western Blot analysiert. Dazu wurden die Überstände und Lysate von je 1×10^6 Zellen mit 5x Lämmli-puffer versetzt und je 30 µl auf ein SDS-Gel aufgetragen (siehe 5.18.7 und 5.18.9). Als Negativkontrolle dienten GFP exprimierende Zellen. Anschließend wurde die Proteindetektion über einen Myc- Antikörper durchgeführt. Dabei zeigte sich, dass sowohl mbHIL-11 als auch die löslichen sHIL-11Fc Varianten in Ba/F3 und Ba/F3-gp130 Zellen exprimiert wurden (siehe Abbildung 17 B). Im Überstand waren die HIL-11Fc Proteine deutlich detektierbar. Allerdings konnten auch geringe Mengen des mbHIL-11 im Überstand von Ba/F3-gp130-mbHIL-11 und Ba/F-mbHIL-11 Zellen detektiert werden. Dies deutet auf ein mögliches Ektodomänen-shedding des membranständigen Hyperzytokins, wie es bereits für den IL-11R beschrieben wurde (Lokau et al., 2016) hin.

Zur weiteren Überprüfung der Expressionsstärke der Zytokine wurde eine durchflusszytometrische Analyse der Zellen durchgeführt (siehe 5.18.3). Da das

Hyperzytokin in der Membran verankert ist, lässt es sich so auf der Zelloberfläche detektieren. Dafür wurden je 1×10^6 Ba/F3, Ba/F3-gp130, Ba/F3-mbHIL-11, Ba/F3-gp130-mbHIL-11, Ba/F3-mbHIL-11^{R355E} und Ba/F3-gp130-mbHIL-11^{R355E} Zellen in FACS-Puffer aufgenommen und mit dem primären Myc-Antikörper 71D10 markiert. Anschließend wurden sie mit dem Sekundärantikörper α -rabbit-Alexa Fluor 488 versetzt. Danach folgte die Analyse der Oberflächenexpression im Durchflusszytometer. Hierbei konnte gezeigt werden, dass die membranständigen Hyperzytokine auf der Oberfläche der vier neu generierten Zelllinien exprimiert wurden (siehe Abbildung 17 C). Die Bedienung des Durchflusszytometers geschah mit freundlicher Unterstützung von Dr. Manuel Franke, Dr. Alexander Lang und Robin Polz.

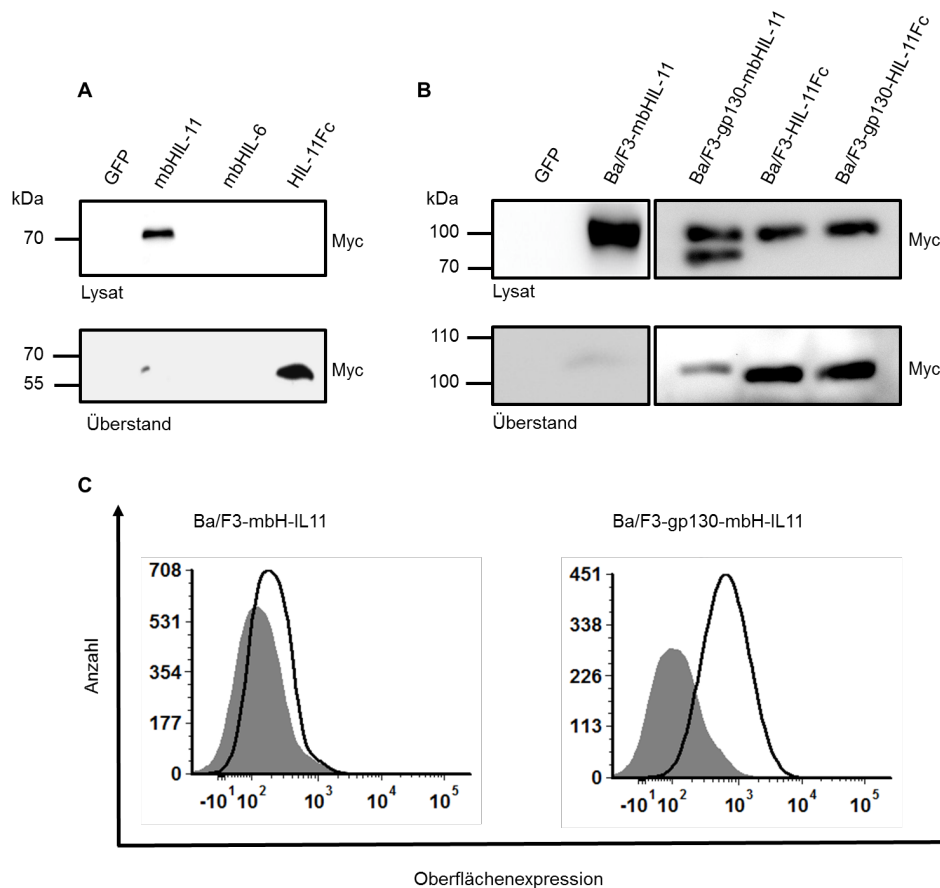


Abbildung 17: mbHIL-11 und HIL-11 wurden exprimiert. MbHIL-11 wurde deutlich weniger in den Überstand sekretiert bzw. geshedded als HIL-11.

A) Für die Analyse mittels Western Blot wurden die Hyperzytokine in HEK293 Zellen transfiziert. Nach 48 h wurden Lysat und Überstand mittels Myc Antikörper für einen Proteinnachweis verwendet. Als Negativkontrolle wurde GFP und mbHIL-6 genutzt. Als Positivkontrolle wurde HIL-11Fc verwendet. n=2. **B)** Western Blot der vier oben genannten stabil transduzierten Zellreihen. Dazu wurde der Überstand und die Lysate von Ba/F3 und Ba/F3-gp130 Zellen, die stabil mit Expressionplasmiden für die oben genannten Proteine transduziert wurden, via Western Blot analysiert und mittels Myc Antikörper detektiert. n=2. **C)** Oberflächenexpression des mbHIL-11 in Ba/F3 und Ba/F3-gp130 Zellen. Die Expression des mbHIL-11 wurde im Durchflusszytometer nachgewiesen (unausgefüllte Histogramme). Als Kontrolle dienen die Parentalzelllinien Ba/F3 bzw. Ba/F3-gp130 (ausgefüllte Histogramme). n=2.

Die für diese Arbeit neu generierten Zellen sind in der Lage, drei verschiedene Signaltransduktionsmechanismen darzustellen: Ba/F3-gp130-mbHIL-11 Zellen induzieren autokrin klassisches IL-11 *Signaling*, Ba/F3-HIL-11Fc Zellen sind ein Modell für das *Trans-Signaling* und Ba/F3-mbHIL-11 Zellen sind die Transmitterzellen des *Cluster-Signaling*. Diese drei Signalmechanismen sind zum besseren Verständnis in Abbildung 18 schematisch dargestellt. Beim autokrinen klassischen *Signaling* werden sowohl das membrangebundene HIL-11 als auch gp130 Moleküle auf der Zelloberfläche exprimiert. Beim *Trans-Signaling* wird lösliches HIL-11Fc als Modell für einen Komplex aus durch *Shedding* generierten sIL-11R und IL-11 verwendet. Es werden dann Zellen aktiviert, die gp130 auf ihrer Oberfläche tragen. Beim *Cluster-Signaling* befinden sich die Transmitter- und Receiverzelle räumlich so nahe, dass eine juxtakrine Aktivierung möglich ist. Dabei exprimiert die Transmitterzelle membrangebundenes HIL-11 und die Receiverzelle gp130 (siehe Abbildung 18).

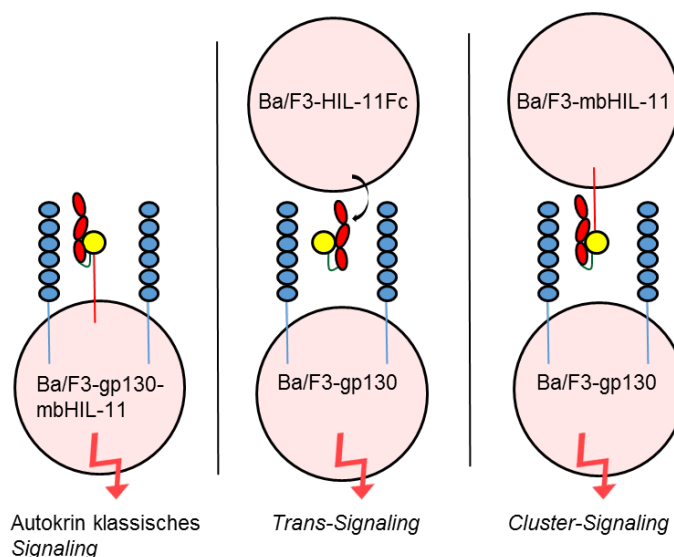


Abbildung 18: **Schematische Abbildung von autokrinen klassischen *Signaling*, *Trans-* und *Cluster-Signaling*.**

Autokrines klassisches *Signaling*: Die Zelle exprimiert sowohl gp130 als auch mbHIL-11 auf der Zelloberfläche. Dadurch kann sich der Komplex zur Aktivierung des STAT3 Signalwegs ohne externe Einflüsse bilden.

***Trans-Signaling*:** Die Transmitterzelle exprimiert HIL-11Fc und die Receiverzelle gp130. Wenn das HIL-11Fc zur Receiverzelle diffundiert, kann in dieser ein Signalweg ausgelöst werden, obwohl sie keinen IL-11 Rezeptor exprimiert.

***Cluster-Signaling*:** Die Transmitterzelle trägt das HIL-11 membrangebunden auf der Zelloberfläche. Für eine Signaltransduktion kommen sich Transmitter- und Receiverzelle so nah, dass sich ein Komplex aus gp130 der Receiverzelle und dem membrangebundenen HIL-11 formiert. Auch hier kann in der Receiverzelle ein Signal ausgelöst werden, obwohl sie keinen IL-11R exprimiert.

6.11 Ba/F3-mbHIL-11 Zellen induzieren *Cluster-Signaling*

Als neuer IL-11 Signalmechanismus wurde bereits das *Cluster-Signaling* vorgestellt. Für den Nachweis dieses Signalmechanismus wurde die *Cluster-Signaling* induzierte

Aktivierung von STAT3 untersucht. Dazu wurden Stimulationsassays (siehe 5.17.6) durchgeführt. Dafür wurden je 5×10^5 Zellen Ba/F3-gp130, Ba/F3-mbHIL-11 und 1×10^6 Ba/F3-gp130-mbHIL-11 Zellen nach dreimaligem Waschen mit PBS, 3 h in 1 ml DMEM^{-/-} inkubiert. Danach wurden sie erneut dreimal gewaschen. Anschließend wurden je 5×10^5 Ba/F3-gp130 (Receiverzelle) mit Ba/F3-mbHIL-11 (Transmitterzelle) Zellen gemeinsam 30 min inkubiert. In dieser Zeit geschieht das *Cluster-Signaling*. Danach wurden die Zellen erneut dreimal gewaschen. Als Positivkontrolle wurden 1×10^6 Ba/F3-gp130 Zellen mit 10 µg/ml rec. HIL-6Fc stimuliert. Als Negativkontrollen wurden 1×10^6 aller verwendeten Zellen unstimuliert verwendet. Die Kontrollen wurden, wie der *Cluster-Signaling* Ansatz, dreimal gewaschen. Darauf folgte die Zentrifugation (1000 g, 5 min, 4°C) und Lyse (siehe 5.18.9). Die Proben wurden mit 5x Lämmli-puffer aufgekocht, auf ein SDS-Gel geladen und mittels Western Blot (siehe 5.18.7) mit P-STAT3 und STAT3 Antikörpern untersucht. Hierbei zeigte sich, dass in Ba/F3-gp130 Zellen, die mit Ba/F3-mbHIL-11 Zellen inkubiert wurden, STAT3 phosphoryliert wurde (siehe Abbildung 19). Die zwei Zelllinien alleine wiesen kein P-STAT3 Signal auf. Das zeigte, dass die zwei Zellreihen ausschließlich gemeinsam durch *Cluster-Signaling* den P-STAT3 Signalweg induzieren können.

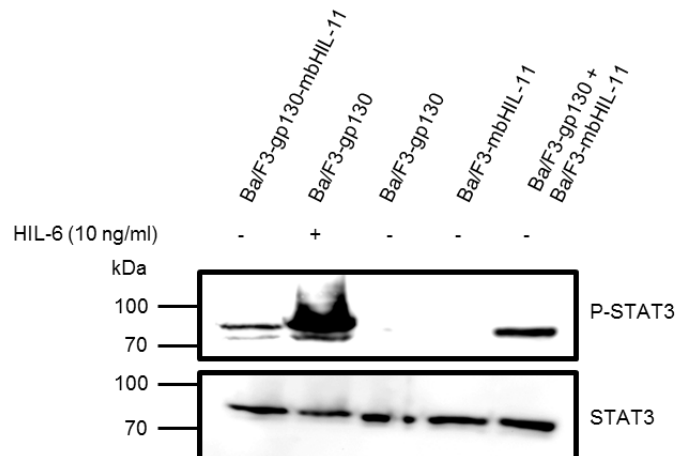


Abbildung 19: **Membranständiges HIL-11 induziert *Cluster-Signaling* und autokrines klassisches *Signaling*.**

5×10^5 Ba/F3-gp130 Zellen wurden mit 5×10^5 Ba/F3-mbHIL-11 Zellen für 30 min gemeinsam inkubiert. Ebenfalls wurden beide Zelllinien separat inkubiert und Ba/F3-gp130-mbHIL-11 Zellen separat inkubiert. Als Positivkontrolle wurden Ba/F3-gp130 Zellen mit 10 ng/ml HIL-6 stimuliert. Die Analyse der STAT3 Phosphorylierung erfolgte mittels Western Blot mit Antikörpern gegen STAT3 und P-STAT3. n=4.

6.12 Ba/F3-gp130-mbHIL-11 Zellen proliferieren autonom durch autokrine Stimulation und sind nicht durch sgp130Fc inhibierbar

Zellen, die sowohl gp130 als auch das membrangebundene HIL-11 exprimieren, sind ein Modell, um autokrines *Classic-Signaling* zu zeigen. Die Zellen sind in der Lage, ohne Zugabe von HIL-6 oder IL-11 zu proliferieren. Damit sind sie autokrin proliferativ. Dies ist sowohl anhand einer STAT3 Aktivierung als auch durch Induktion von Proliferation nachweisbar. Die Western Blotanalyse in Abbildung 19 zeigt autokrines klassisches *Signaling* in Ba/F3gp130-mbHIL-11 Zellen. Die Probenvorbereitung erfolgte wie in Kapitel 6.11 beschrieben. Das autokrine klassische *Signaling* der Ba/F3gp130-mbHIL-11 Zellen zeigte sich ebenfalls auf Proliferationsebene im Zellviabilitätsassay. Dazu wurden die Zellen 72 h, wie in 5.17.4 beschrieben, auf einer 96-Well Platte inkubiert. Je ein Triplikat wurde mit 100, 10, 1, 10^{-1} , 10^{-2} und 0 $\mu\text{g/ml}$ sgp130Fc behandelt. Als Negativkontrolle wurden 5000 unstimulierte Ba/F3-gp130 Zellen verwendet. Als Positivkontrolle wurden 5000 Ba/F3-gp130 Zellen mit 1 ng/ml rec. HIL-6 inkubiert. Im Zellviabilitätsassay in Abbildung 20 zeigte sich, dass die Ba/F3gp130-mbHIL-11 und Ba/F3gp130-mbHIL-11^{R355E} Zellen autokrin proliferierten. Eine Inhibierung des autokrinen klassischen *Signalings* mit sgp130Fc konnte durch eine *Dose-Response-Curve* von 0 – 10 $\mu\text{g/ml}$ nicht erzielt werden. Erst ab 100 $\mu\text{g/ml}$ war eine beginnende Inhibition detektierbar. Diese schwere Inhibierbarkeit des autokrinen klassischen *Signaling* deutet darauf hin, dass es sich um intrazelluläre Signaltransduktion handeln könnte, auf die sgp130Fc keinen bzw. einen geringen Einfluss hat. Möglicherweise bilden sich bereits intrazellulär vorgefertigte Komplexe aus mbHIL-11 und gp130. Diese wären dann schon aktiv und induzieren Signalwege, bevor sgp130Fc sie als kompetitiver Antagonist extrazellulär inhibieren kann. Die Effekte hoher sgp130Fc Konzentrationen ließen sich ebenfalls durch intrazelluläre Komplexbildung erklären. Solche präformierten Komplexe könnten auf die Zelloberfläche gelangen. Durch die Membranlokalisation und die bereits erfolgte Komplexierung von IL-11 und IL-11R und gp130 käme es dann zu einer gp130 Dimerisierung, die eine Signalkaskade einleitet. Bei niedrigen sgp130 Konzentrationen wäre die Zelloberfläche höchstwahrscheinlich nicht mit sgp130Fc gesättigt, wodurch es zur Signaltransduktion käme. Konzentrationen ab 100 $\mu\text{g/ml}$ sgp130Fc führen eventuell zu so hohen lokalen sgp130Fc Konzentrationen, dass schon beim Einbau der präformierten Komplexe in die Membran eine Hemmung durch sgp130Fc erfolgen würde.

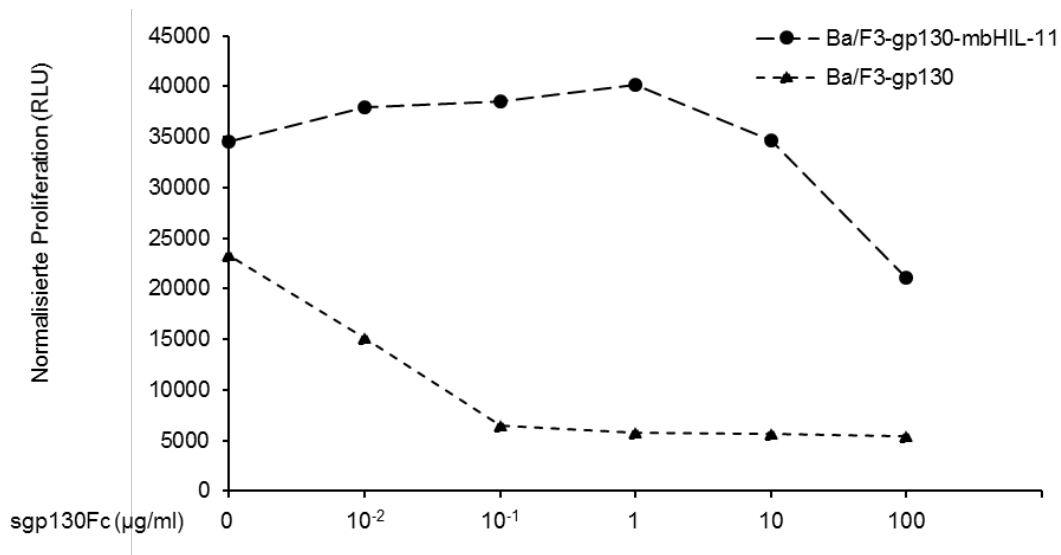


Abbildung 20: **Ba/F3-gp130-mbHIL-11 Zellen sind autokrin proliferativ und nicht durch sgp130Fc inhibierbar.**

Zur Überprüfung, ob die autokrin proliferativ wachsenden Ba/F3-gp130-mbHIL-11 Zellen durch sgp130Fc inhibierbar sind, wurde eine *Dose-Response* mit Konzentrationen von 0, 10⁻², 10⁻¹, 1, 10 und 100 µg/ml sgp130Fc erstellt. Dafür wurden Ba/F3-gp130-mbHIL-11 Zellen 72 h lang mit den unterschiedlichen sgp130Fc Konzentrationen inkubiert. Ebenfalls wurden Ba/F3-gp130 Zellen mit 10 ng/ml rec. HIL-6 stimuliert. Diese wurden ebenfalls mit den unterschiedlichen sgp130Fc Konzentrationen kokultiviert. n=3.

6.13 Differenzierung zwischen *Trans-Signaling* und *Cluster-Signaling*

Um *Trans-Signaling* von *Cluster-Signaling* zu differenzieren, ist es wichtig, Effekte durch *Shedding* des IL-11 Rezeptors auszuschließen. Während *Trans-Signaling* auf dem löslichen IL-11:IL-11R Komplex beruht, ist *Cluster-Signaling* eine membrangebundene Signaltransduktion. Die Mutation von Arginin 355 im *Stalk* des IL-11R führt zu einer 70% Reduktion des IL-11R *Sheddings* (Lokau et al., 2016). Damit ist R355 eine kritische Schnittstelle für die Proteolyse des IL-11R von ADAM10. Es ist zu verhindern, dass das mbHIL-11 *geshedded* wird und dadurch HIL-11Fc in den Überstand sekretiert wird. Denn dann könne man nicht sicher davon ausgehen, dass die Signalinduktion in Ba/F3-gp130 Zellen durch *Cluster-Signaling* induziert wird. Wenn sHIL-11 im Überstand ist, kann dieses via *Trans-Signaling* STAT3 aktivieren. Aus diesem Grund wurde Arginin 355 zu Glutaminsäure mutiert. Dadurch wird damit das *Shedding* auf 30% verglichen mit dem *wild-type* Rezeptor reduziert (Lokau et al., 2016). Diese kaum *sheddbare* Rezeptorvariante „R355E“ wurde in das mbHIL-11 kloniert. Eine schematische Darstellung des Fusionsproteins befindet sich in Abbildung 21 A. Der IL-11R *Stalk*, bestehend aus IL-11R^{R355E} und der T/ICD, wurde von GeneArt (Thermo Fisher) synthetisiert und in pcDNA3.1-mbHIL11 subkloniert. Die mutierte Stalkvariante ist von NotI-Sites flankiert.

Der native *Stalk* wurde mittels NotI aus dem mbHIL-11 entfernt und durch die mutierte Rezeptorvariante ersetzt. Es entsteht pcDNA3.1-mbHIL-11^{R355E} (siehe Abbildung 21 B). Zur Überprüfung des klonierten Fusionsproteins wurde eine Testrestriktion mit BamHI durchgeführt. Dabei liegen die Enzymschnittstellen bei 1474 bp, 2735 bp und 3515 bp, woraus sich Fragmentgrößen von 5944 bp, 1260 bp und 780 bp ergeben (siehe Abbildung 21 C). Anschließend wurde eine Sangersequenzierung durchgeführt. Um das Plasmid stabil in Ba/F3 Zellen zu transduzieren, wurde es mittels einer PmeI-Restriktion in einen pMOWS Vektor subkloniert. Anschließend erfolgte eine Testrestriktion mit BamHI, dessen Schnittstellen bei 2062 bp, 3323 bp und 4103 bp liegen. Die Fragmente waren demnach 6339 bp, 1261 bp und 780 bp groß (siehe Abbildung 21 D).

Auch mbHIL-11^{R355E} wurde stabil in Ba/F3 und Ba/F3-gp-130 Zellen transduziert (5.17.5). Anschließend erfolgte eine durchflusszytometrische Analyse der Oberflächenexpression des mbHIL-11^{R355E} in Ba/F3 und Ba/F3-gp130 Zellen (siehe Abbildung 21 E).

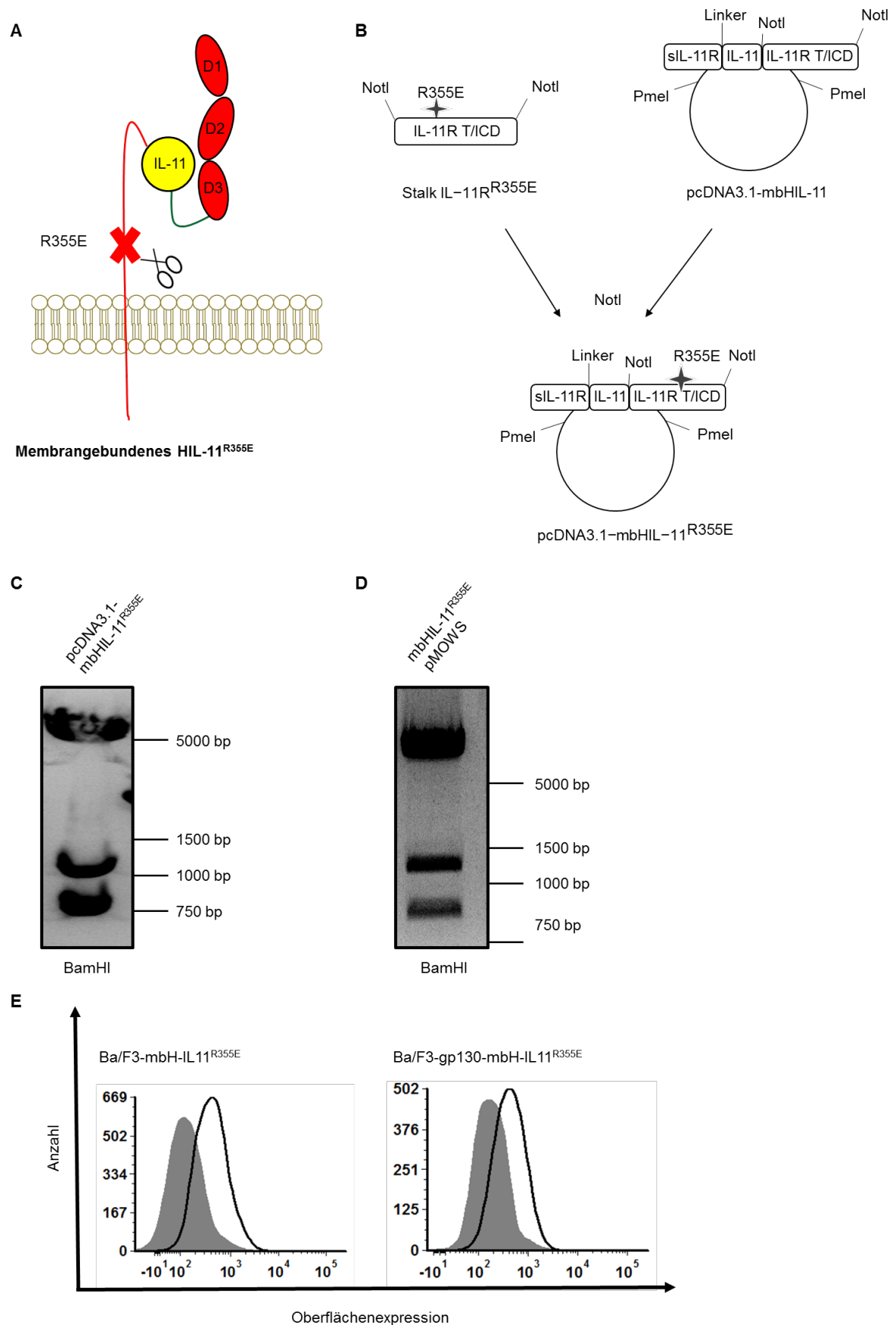


Abbildung 21: **Aufbau, Klonierung und Expression des mbHIL-11^{R355E}.**

A) Die Abbildung zeigt den schematischen Aufbau des mbHIL-11^{R355E}. Dabei wurde an eine Punktmutation (R355E) in die Stalkregion eingefügt, die das *Shedding* durch ADAM Proteasen verhindert (Lokau et al., 2016).

Ansonsten ist der Aufbau wie gehabt: IL-11R ist über einen *Linker* mit IL-11 an den *Stalk*, transmembran und intrazelluläre Domäne verbunden. **B)** Klonierung des mbHIL-11^{R355E}. Der *Stalk*, bestehend aus IL-11R^{R355E} und der T/ICD, wurde mit NotI aus der von GeneArt synthetisierten cDNA geschnitten. Das zuvor generierte Plasmid mbHIL-11 wurde mit NotI geöffnet und als Vektor genutzt. Anschließend wurden die Sequenzen ligiert und es entstand die Mutationsvariante pcDNA3.1-mbHIL-11^{R355E}. **C + D)** Restriktion von mb-HIL-11^{R355E} in pcDNA3.1 mit BamHI (C) und in pMOWS mit BamHI (D). **E)** Oberflächenexpression des mbHIL-11^{R355E} in Ba/F3 und Ba/F3-gp130 Zellen. Die Expression des mbHIL-11^{R355E}-Variante wurde im Durchflusszytometer nachgewiesen (unausgefüllte Histogramme). Als Kontrolle dienen die Parentalzelllinien Ba/F3 bzw. Ba/F3-gp130 (ausgefüllte Histogramme). n=2.

6.14 IL-11 Cluster-Signaling ist durch sgp130Fc inhibierbar

Der neue Signalweg IL-11 *Cluster-Signaling* ist durch sgp130Fc inhibierbar. Um den Effekt von sgp130Fc auf IL-11 *Cluster-Signaling* zu untersuchen, wurde die *Cluster-Signaling* vermittelte Induktion von Proliferation und STAT3 Aktivierung untersucht. Für die Western Blotanalyse wurde der zuvor beschriebene Stimulationsassay des *Cluster-Signaling* durchgeführt (siehe 5.17.6). Hierbei wurden für das *Cluster-Signaling* die nicht *sheddbaren* Ba/F3-mbHIL-11^{R355E} Zellen verwendet. Dadurch sollten *sheddinginduzierte Trans-Signaling* Effekte auf STAT3 Aktivierung und Proliferation minimiert werden. Zusätzlich wurde getestet, ob *Cluster-Signaling* durch sgp130Fc inhibierbar ist. Dazu wurden Ba/F3-gp130 für 30 min mit Ba/F3-mbHIL-11^{R355E} Zellen koinkubiert, um *Cluster-Signaling* zu induzieren. Dies geschah in An- oder Abwesenheit von 10 µg/ml sgp130Fc. Als Negativkontrollen dienten die unstimulierten Parentalzelllinien, als Positivkontrolle mit 10 ng/ml HIL-6 stimulierte Ba/F3-gp130 Zellen. In der folgenden Analyse (5.18.7) konnte gezeigt werden, dass *Cluster-Signaling* sowohl durch mbHIL-11 als auch durch die punktmutierte mbHIL-11^{R355E} Variante induziert wird. Interessanterweise ist *Cluster-Signaling*, im Gegensatz zum autokrinen klassischen *Signaling*, durch sgp130Fc deutlich inhibierbar (siehe Abbildung 22 A).

Zusätzlich zur Analyse der Effekte von sgp130Fc auf IL-11 *Cluster-Signaling* induzierte STAT3 Phosphorylierung wurden auch die Effekte von sgp130Fc auf die *Cluster-Signaling* vermittelte Proliferation untersucht. Dafür wurden 2500 Ba/F3-gp130 Zellen mit 2500 Ba/F3-mbHIL-11 bzw. Ba/F3-mbHIL-11^{R355E} Zellen für 72 h inkubiert. In je ein Triplikat wurden 10 µg/ml sgp130Fc hinzugefügt. Als Positivkontrolle wurden Ba/F3-gp130 Zellen mit 10 ng/ml rekombinantem HIL-6Fc verwendet. Als Negativkontrollen je 5000 unstimulierte Ba/F3-gp130 und Ba/F3-mbHIL-11 Zellen. Nach 72 h wurde der Zellviabilitätsassay, wie in Kapitel 5.17.4 beschrieben, ausgewertet. Hierbei zeigte sich eine signifikant stärkere Proliferation von Ba/F3-gp130 Zellen nach Transaktivierung durch Ba/F3-mbHIL-11 Zellen gegenüber den unstimulierten Negativkontrollen. Wie bereits

anhand der STAT3 Aktivierung gezeigt (Abbildung 22 A), ist auch im Zellviabilitätsassay eine Inhibition des *Cluster-Signalings* durch 10 µg/ml sgp130Fc nachweisbar (Abbildung 22 B + C). Die Inhibition des *Cluster-Signalings* durch sgp130Fc lässt die Proliferationsrate wieder auf den Ausgangswert der unstimulierten Ba/F3-mbHIL-11 bzw. Ba/F3-mbHIL-11^{R355E} Zellen abfallen. Anschließend wurde eine Signifikanzprüfung durchgeführt (siehe 5.19.1). Dabei zeigte sich, dass *Cluster-Signaling* gegenüber den unstimulierten Ba/F3-gp130 Zellen signifikant war (** $p \leq 0.01$). Mit Zugabe von 10 µg/ml sgp130Fc war kein Unterschied zwischen den unstimulierten Ba/F3-gp130 Zellen detektierbar (ns $p \geq 0,05$). Das bedeutet, dass *Cluster-Signaling* durch sgp130Fc inhibierbar ist.

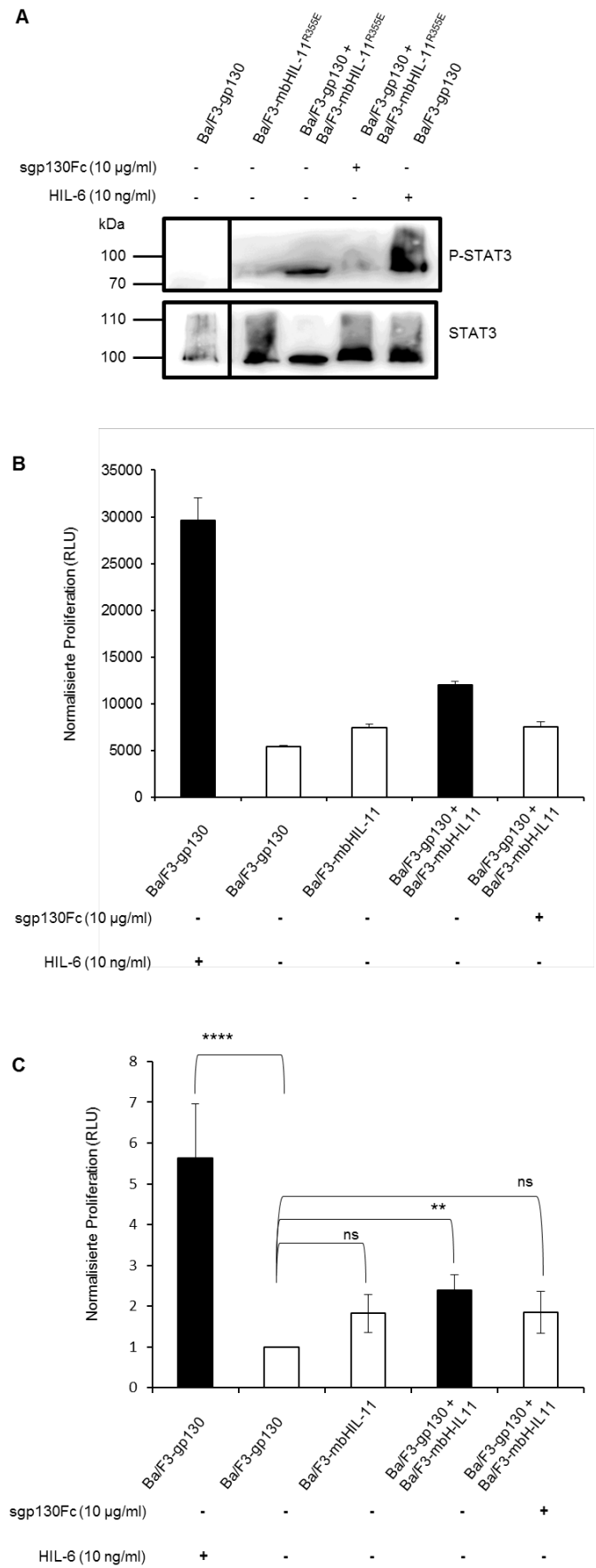


Abbildung 22: **Cluster-Signaling** ist mit mbHIL-11^{R355E} im P-STAT3 Western Blot und Zellviabilitätsassay detektierbar und durch sgp130Fc inhibierbar.

A) Zur Western Blotanalyse des *Cluster-Signalings* wurden 5×10^5 Ba/F3-gp130 + Ba/F3-mbHIL-11^{R355E} Zellen 30 min kokultiviert und anschließend lysiert. Ebenfalls wurde die Inhibition des *Cluster-Signalings* durch sgp130Fc getestet. Dazu wurden 5×10^5 Ba/F3-gp130 + Ba/F3-mbHIL-11^{R355E} Zellen mit 10 µg/ml sgp130Fc in der 30-minütigen Inkubationszeit kokultiviert. Als Negativkontrolle dienten die einzelnen, unstimulierten Zellen. Als Positivkontrolle wurden mit 10 ng/ml rec. HIL-6 stimulierte Ba/F3-gp130 Zellen verwendet. **n=3.** **B) + C)** CellTiter-Blue Analyse der Proliferation von Ba/F3-gp130 und Ba/F3-mbHIL-11 Zellen und Kokulturen, die mit den angegebenen Zytokinen inkubiert wurden. Als Negativkontrollen dienten jeweils 5000 der unstimulierten Zellreihen. Als Positivkontrolle dienten Ba/F3-gp130 Zellen, die vorher mit 10 ng/ml rec. HIL-6 stimuliert wurden. Danach wurden sie 72 h lang kultiviert. **B)** Ein repräsentativer Zellviabilitätsassay wird gezeigt. **C)** RLU Werte wurden auf die Ba/F3-gp130 Kontrolle normiert. Bei den dargestellten Daten handelt es sich um Mittelwerte $\pm$ Standardabweichungen von 3 unabhängigen Experimenten. Es wurde ein one way Anova mit Dunnett correction durchgeführt. ** $p \leq 0,01$, **** $p \leq 0,001$ und ns $p > 0,05$. **n=3.**

6.15 IL-11 Cluster-Signaling lässt sich von Trans-Signaling abgrenzen

Um erneut das *Cluster-Signaling* von *Trans-Signaling* zu differenzieren, wurden Zellkulturüberstände von Kokulturen aus Ba/F3-gp130 und Ba/F3-mbHIL-11 bzw. Ba/F3-mbHIL-11^{R355E} Zellen auf eventuelle Spuren von *sheddetem*, und damit löslichen, HIL-11, welches *Trans-Signaling* induzieren könnte, getestet. Um die *Cluster-Signaling* Überstände zu generieren, wurden 5×10^5 Ba/F3-gp130 + Ba/F3-mbHIL-11^{R355E} Zellen für 30 min gemeinsam inkubiert und anschließend dreimal gewaschen. Danach wurden 1×10^6 Ba/F3-gp130 Zellen für 0, 30 oder 120 min in 900 µl DMEM^{+/+} mit 100 µl des konditionierten Zellkulturüberstands aus Kokultivierungsexperimenten inkubiert. Anschließend wurden die Zellen lysiert und für die Western Blotanalyse verwendet (5.18.7). Für den proteinbiochemischen Nachweis der autokrinen Signaltransduktion wurden 1×10^6 Ba/F3-gp130-mbHIL-11 Zellen in An- oder Abwesenheit von 10 µg/ml sgp130Fc in DMEM^{-/-} für 3 h inkubiert. Um eine autokrine Signaltransduktion von *Trans-Signaling* zu unterscheiden, wurde das Experiment mit der kaum *sheddbaren* mbHIL-11^{R355E} Variante wiederholt. Als Positivkontrolle wurden 1×10^6 Ba/F3-gp130 Zellen mit 10 ng/ml rekombinantem HIL-6 verwendet. Als Negativkontrolle wurden von allen verwendeten Zellreihen 1×10^6 Zellen unstimuliert eingesetzt. Zelllysate wurden im Anschluss mittels Western Blot auf STAT3 Phosphorylierung untersucht. Dabei zeigte sich, dass sowohl Ba/F3gp130-mbHIL-11 als auch Ba/F3-gp130-mbHIL-11^{R355E} Zellen STAT3 autokrin aktivieren (siehe Abbildung 23 A). Dies war durch die Zugabe von 10 µg/ml sgp130Fc nicht inhibierbar. Es konnte ebenfalls eine durch *Cluster-Signaling* induzierte STAT3 Phosphorylierung gezeigt werden, die durch sgp130Fc inhibierbar war. Weiterhin konnte keine STAT3 Aktivierung in Ba/F3-gp130 Zellen nachgewiesen werden, die mit konditioniertem Zellkulturüberstand aus Kokultivierungsexperimenten stimuliert wurden. Das zeigt, dass Zellkulturüberstände aus Kokultivierungsexperimenten keine Konzentrationen von HIL-11 enthalten, die eine STAT3 Aktivierung durch *Trans-Signaling*

ermöglichten. Demzufolge muss es sich bei den detektierten Signalen um *Cluster-Signaling* und nicht um *Trans-Signaling* gehandelt haben.

Ein weiteres Experiment um *Cluster-Signaling* klar vom *Trans-Signaling* abzugrenzen und zu beweisen, dass das mbHIL-11 und mbHIL-11^{R355E} in keinem relevanten Maße *gshedded* und damit löslich wird, wird im Folgenden beschrieben. Während im letzten Experiment (Abbildung 23 A) die *Cluster-Signaling* Überstände auf sHIL-11 getestet wurden, wurde in diesem Experiment durch Gabe von Ionomycin ADAM10 induziertes *Shedding* verstärkt. Dafür wurden je 1×10^6 Ba/F3-gp130, Ba/F3-mbHIL-11, Ba/F3-gp130-mbHIL-11, Ba/F3-gp130-mbHIL-11^{R355E} und Ba/F3-hIL-11R Zellen gewaschen, *gestarved* und in 1 ml DMEM^{+/+} für 1 h mit 10 μ M Ionomycin inkubiert. Nach Ionomycinvorbehandlung wurden konditionierte Zellkulturüberstände verwendet, um Ba/F3-gp130 Zellen zu stimulieren (siehe Abbildung 23 B). Erneut wurde ebenfalls der Überstand des *Cluster-Signalings* auf sHIL-11 getestet. Dafür wurden je 5×10^5 Zellen Ba/F3-gp130 mit Ba/F3-mbHIL-11 bzw. Ba/F3-mbHIL-11^{R355E} gewaschen, *gestarved* und anschließend 24 h gemeinsam inkubiert. Anschließend wurden alle Zellen bei 1000 g, RT für 5 min zentrifugiert und die Überstände für den Zellviabilitätsassay verwendet. Dafür wurden statt 100 μ l DMEM^{+/+} nur 90 μ l und 10 μ l des *Cluster-Signaling* Überstands verwendet. Anschließend wurde der Zellviabilitätsassay nach 72 h wie in 5.17.4 beschrieben inkubiert und ausgewertet. Im Zellviabilitätsassay (Abbildung 23 B) zeigte sich, dass konditionierter Überstand von Ionomycin behandelten Ba/F3-mbHIL-11, Ba/F3-gp130-mbHIL-11 und Ba/F3-gp130-mbHIL-11^{R355E} Zellen dann Ba/F3-gp130 Zellen zur Proliferation anregte. Im direkten Vergleich war der proliferative Effekt von konditionierten Überständen aus Ba/F3-gp130-mbHIL-11^{R355E} geringer als der von Überständen von Ba/F3-gp130-mbHIL-11. Dies könnte ein Indikator dafür sein, dass die punktmutierte mbHIL-11^{R355E} Variante weniger *gshedded* wird und damit weniger sHIL-11 in den Überstand gelangt und proliferativ wirken kann. Der Überstand von Ba/F3-gp130-hIL-11R Zellen konnte keine Proliferation induzieren. Die Negativkontrolle mit Ba/F3-gp130 Zellüberstand wies ebenfalls keine Proliferation auf. Zudem konnte erneut mit den Überständen des *Cluster-Signalings* keine Proliferation induziert werden.

Die Experimente dieses Kapitels zeigen, dass *Cluster-Signaling* klar von *Trans-Signaling* abgegrenzt wurde. Konditionierte Überstände von Kokultivierungsexperimenten zeigen keine signifikante HIL-11 Aktivität. Die Kokultivierung von Ba/F3-gp130 Zellen mit Ba/F3-mbHIL-11 und Ba/F3-mbHIL-11^{R355E} Zellen führte jedoch zur Signaltransduktion. Im

Gegensatz dazu zeigten konditionierte Überstände von Ba/F3-gp130-mbHIL-11 und Ba/F3-gp130-mbHIL-11^{R355E} Zellen HIL-11-Aktivität, die in der Lage war, *Trans-Signaling* zu induzieren, wenn ADAM10 zuvor mit Ionomycin aktiviert wurde. Demnach ließ sich eine *Trans-Signaling* vermittelte Induktion von Proliferation und STAT3 Phosphorylierung in Kokultivierungsexperimenten ausschließen. Es musste sich also um *Cluster-Signaling* handeln. Folglich konnte in dieser Arbeit erstmalig *Cluster-Signaling* für IL-11 gezeigt werden.

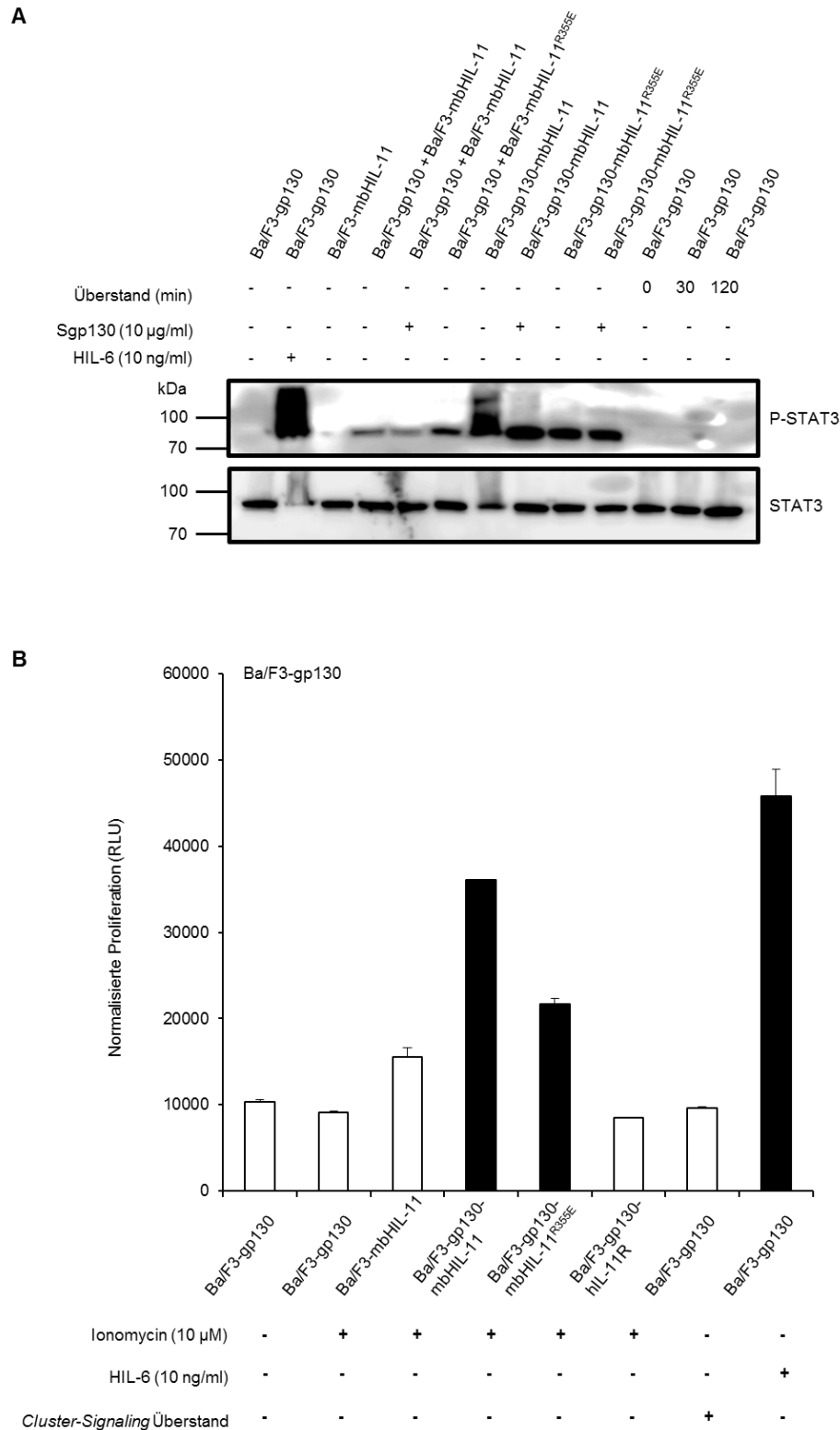


Abbildung 23: **Cluster-Signaling** ist im Western Blot und Zellviabilitätsassay von **Trans-Signaling** differenzierbar.

A) Für dieses Experiment wurden 5×10^5 Ba/F3-gp130 + Ba/F3-mbHIL-11^{R355E} Zellen für 30 min gemeinsam inkubiert. Nach dreimaligem Waschen wurden 1×10^6 Ba/F3-gp130 Zellen für 0, 30 oder 120 min in 900 µl DMEM^{+/+} und 100 µl des *Cluster-Signaling* Überstands inkubiert. Zusätzlich wurden erneut 5×10^5 Ba/F3-gp130 + Ba/F3-mbHIL-11^{R355E} Zellen für 30 min gemeinsam inkubiert. Dabei wurde die Inhibierbarkeit durch sgp130Fc getestet, indem 10 µg/ml sgp130Fc zu dem Zellansatz gegeben wurde. Ebenfalls wurden 1×10^6 der Ba/F3-gp130-mbHIL-11^{R355E} Zellen unstimuliert und mit 10 µg/ml sgp130Fc inkubiert. Als Negativkontrollen wurden 1×10^6 der einzelnen unstimulierten Zellreihen verwendet. n=3. **B)** Im Zellviabilitätsassay wurden in den

verschiedenen Zellen *Shedding* durch 10 mM Ionomycin induziert. Dazu wurden je 1×10^6 Ba/F3-gp130, Ba/F3-mbHIL-11, Ba/F3-gp130-mbHIL-11, Ba/F3-gp130-mbHIL-11^{R355E} und Ba/F3hIL-11R Zellen gewaschen, *gestarved* und in 1 ml DMEM^{+/+} für 1 h mit 10 μ M Ionomycin inkubiert. Danach wurden die jeweiligen Überstände mit Ba/F3-gp130 Zellen für 72 h kultiviert. Als Positivkontrolle wurden mit 10 ng/ml rec. HIL-6 stimulierte Ba/F3-gp130 Zellen verwendet. Als Negativkontrolle dienten unstimulierte Ba/F3-gp130 Zellen. Ionomycin Versuch n=2, *Cluster-Signaling* Überstand Versuch n=3.

6.16 Ba/F3-hIL-11R Zellen als Modell des *Cluster-Signalings*

Da es *in vivo* keine membrangebundenen Hyperzytokine gibt und diese nur als artifizielle Fusionsproteine *in vitro* verwendet werden, wurde zusätzlich versucht, eine *in vivo* nahe *Cluster-Signaling* Situation nachzustellen. Dafür wurden Ba/F3 und Ba/F3-gp130 Zellen mit humanem (h)IL-11 Rezeptor erstellt (siehe 5.17.5). Anschließend erfolgte eine Analyse der Oberflächenexpression im Durchflusszytometer (siehe Abbildung 24 A). Die Bedienung des Durchflusszytometers geschah mit freundlicher Unterstützung von Dr. Manuel Franke und Larissa Lamertz. Diese Ba/F3-gp130-hIL11-R und Ba/F3-hIL-11R Zellen wurden in der Arbeitsgruppe Scheller als *in vivo* Modell des *Cluster-Signalings* genutzt. Dazu wurden Ba/F3-gp130 Zellen mit Ba/F3-hIL-11R Zellen und IL-11 gemeinsam inkubiert. Dies regte die Ba/F3-gp130 Zellen zur Proliferation an (Lamertz, **Rummel** et al., 2018), denn IL-11 kann an den hIL-11R der Ba/F3 Zellen binden. Kommt die Ba/F3-gp130 Zelle diesem Komplex nun sterisch nah, kann *Cluster-Signaling* erfolgen (siehe Abbildung 24 B).

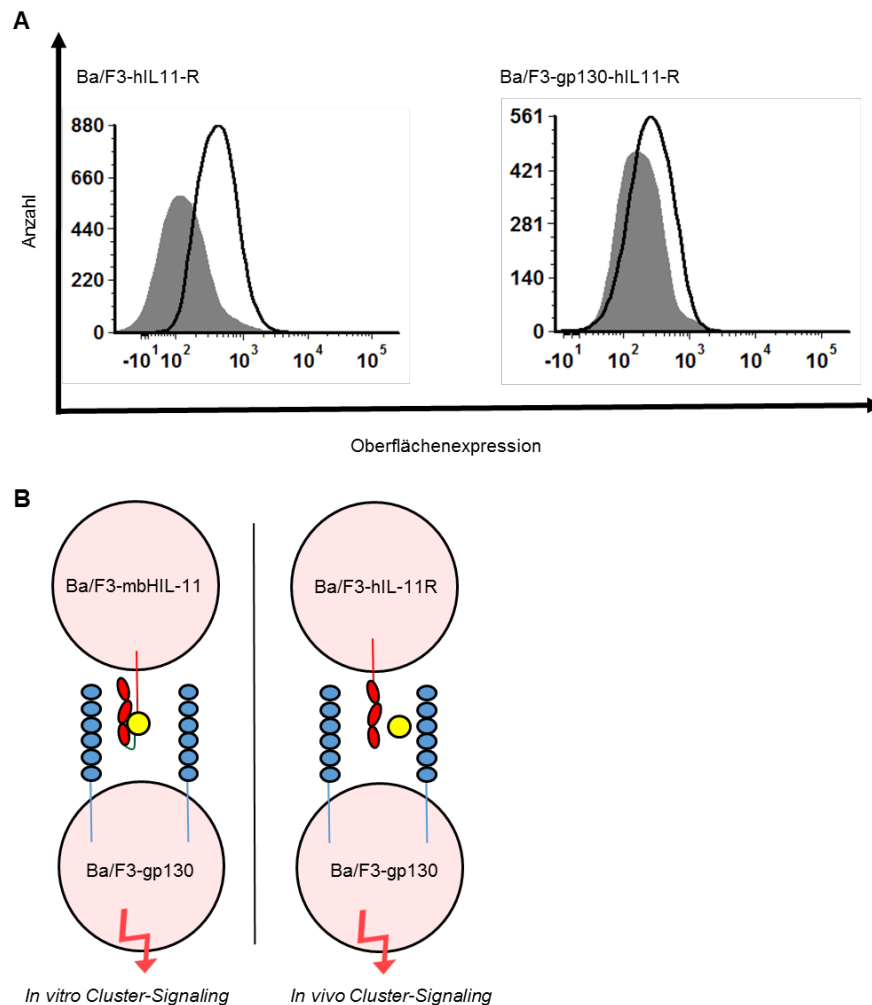


Abbildung 24: hIL-11R Zellen als *in vivo* Modell des *Cluster-Signalings*.

A) Oberflächenexpression des hIL-11R in Ba/F3 und Ba/F3-gp130 Zellen. Die Expression des hIL-11R wurde im Durchflusszytometer nachgewiesen (unausgefüllte Histogramme). Als Kontrolle dienten die Parentalzelllinien Ba/F3 bzw. Ba/F3-gp130 (ausgefüllte Histogramme). **B)** Schematische Abbildung von *Cluster-Signaling* durch membrangebundene Hyperzytokine und *in vivo*. Beim *Cluster-Signaling in vitro* können Transmitterzellen mit einem mbHIL-11 in Ba/F3-gp130 Receiverzellen ein Signal induzieren (links). In einem *in vivo* Modell können Ba/F3-hIL-11R Zellen mit IL-11 einen Komplex bilden. Kommt die Ba/F3-gp130 Receiverzelle diesem hIL-11R:IL-11 Komplex sterisch nahe genug, kann *Cluster-Signaling* erfolgen (rechts).

7 Diskussion und Ausblick

7.1 Nutzen von HIL-6Fc Site II und III als kompetitive Inhibitoren

HIL-6Fc Site II und III sind selektive Inhibitoren für das IL-6 *Signaling*. In dieser Arbeit war es das Ziel, herauszufinden, inwieweit HIL-6Fc Site II und III, neben sgp130, als IL-6 *Signaling* Inhibitoren eingesetzt werden können. Während es in ersten Experimenten mit Zellkulturüberständen so aussah, als dass die Inhibition bereits mit Konzentrationen von 10 ng/ml möglich wäre, konnte mit den gereinigten Proteinen erst eine Inhibition mit 100 µg/ml erreicht werden. Wirkkonzentrationen von Inhibitoren ab 100 µg/ml sind nicht ungewöhnlich. Der monoklonale IL-6R Antikörper Tocilizumab erzielt in vergleichbaren Experimenten ab 10 - 100 µg/ml eine inhibitorische Wirkung (Moll et al., 2017, Sato et al., 1993). Da sgp130Fc als etablierter *Trans-Signaling* Inhibitor schon mit 10 ng/ml fungiert (Jostock et al., 2001, Moll et al., 2017), können die HIL-6Fc Site II und III Fusionsproteine aus dieser Arbeit vermutlich keine Alternative dazu bieten. Weiterhin ist unklar, ob hyperzytokinbasierte Inhibitoren einen Einfluss auf IL-6 *Classic-Signaling* haben, da eine Blockade von membrangebundenem gp130 beide Signalwege beeinflusst. Dies müsste in weiterführenden Experimenten geklärt werden.

7.2 Etablierung eines robusten *Cluster-Signaling* Modells basierend auf membranständigen Hyperzytokinen für IL-11

Für IL-6 sind verschiedene Signaltransduktionsmechanismen bekannt. Diese sind die gut beschriebenen *Classic-Signaling* und *Trans-Signaling* Wege (Scheller et al., 2011). Kürzlich wurde erstmals IL-6 *Cluster-Signaling* beschrieben. Außerdem konnte kürzlich ein erster Nachweis von löslichem IL-11R *in vivo* erbracht werden (Lokau et al., 2016). Da sowohl IL-6 als auch IL-11 Signaltransduktion über gp130 Dimerisierung induzieren und die α -Rezeptoren beider Zytokine nur auf bestimmten Zellpopulationen zu finden sind, ist es naheliegend, dass es analog zu IL-6 auch für IL-11 einen *Cluster-Signaling* Weg gibt. In dieser Arbeit konnte mittels membrangebundener Hyperzytokine ein IL-11 *Cluster-Signaling* Weg dargestellt werden. Dazu wurden membranständige HIL-11 Varianten erstellt. Für die erfolgreiche Einleitung von *Cluster-Signaling* muss sich ein Komplex aus IL-11 und dem IL-11R bilden. Dieser Komplex unterliegt konzentrationsabhängigen Dissoziations- und Assoziationsvorgängen. Je höher die Zytokin- und α -Rezeptorkonzentration sind, desto mehr Komplex liegt vor und damit steigt das Potential für

Cluster-Signaling. Um ein möglichst robustes und wenig störungsanfälliges Modellsystem für *Cluster-Signaling* zu generieren, wurden membranständige Hyperzytokine entwickelt, die auf der Oberfläche von Transmitterzellen exprimiert werden können. Ein solches Hyperzytokin-basiertes System hat mehrere Vorteile gegenüber Transmitterzellen, die den IL-11R exprimieren und mit IL-11 beladen werden. Zum einen liegen durch die kovalente Verknüpfung von Zytokin und Rezeptor alle Moleküle als Komplex vor, während für die Interaktion von IL-6 und IL-6R bekannt ist, dass sich bei Inkubation von IL-6 mit IL-6R ein Gleichgewicht mit geringen Anteilen IL-6/IL-6R Komplex einstellt (Baran et al., 2018). Weiterhin haben Hyperzytokine bedingt durch die beschriebenen Vorteile bezüglich der Komplexbildung, eine ca. 100-1000-fach höhere biologische Aktivität (Fischer et al., 1997). Zusätzlich besteht bei IL-11-beladenen IL-11R Transmitterzellen die Komplikation, dass freies IL-11 *Classic-Signaling* induzieren kann, welches von *Cluster-Signaling* Effekten abgegrenzt werden muss. HIL-11 induziert kein *Classic-Signaling*, da IL-11 kovalent mit dem sIL-11R verknüpft ist. Folglich wurde ein membranständiges mbHIL-11 für diese Arbeit generiert. Es besteht aus dem sIL-11R, der über einen *Linker* an ein IL-11 gebunden ist. Dieses Hyper-IL-11 wurde dann über einen *Stalk*, transmembran- und intrazelluläre Domäne des IL-11R, fest in die Zelloberfläche verankert. Das membranständige Hyperzytokin wurde erfolgreich exprimiert. Western Blotanalysen zeigten jedoch ein geringes Ausmaß von löslichem mbHIL-11 in Zellkulturüberständen. Deshalb wurde eine sheddingresistente Variante mbHIL-11^{R355E} erstellt. Die Mutation von Arginin 355 zu Glutaminsäure reduziert die Effizienz des ADAM10 vermittelten *Sheddings* um ca. 70% (Lokau et al., 2016). Im Folgenden konnte für beide mbHIL-11 Varianten eine Membranlokalisation nachgewiesen werden. Kokultivierungsexperimente mit Ba/F3-gp130 Receiverzellen und Ba/F3-mbHIL-11 Transmitterzellen zeigten außerdem, dass die beiden mbHIL-11 Varianten in der Lage sind, *Cluster-Signaling* zu induzieren. Diese Experimente stimmen in Ihren Aussagen mit Ergebnissen von Heink et al. überein, die erstmals IL-6 *Cluster-Signaling* mit einem Ba/F3-gp130 und Ba/F3-IL-6R Modellsystem zeigen konnten. Eine Schwierigkeit in der Interpretation dieser Analysen ist die Differenzierung von *Classic*-, *Trans*- und *Cluster-Signaling*. Das von Heink et al. gewählte Modellsystem lässt Einflüsse von allen drei Signalmechanismen zu, da freies IL-6 sowohl *Cluster*- als auch *Classic-Signaling* induzieren kann. Zusätzlich werden durch ADAM10 und 17 sowohl der IL-6R als auch der IL-11R konstitutiv *geshedded* (Müllberg et al., 1993, Matthews et al., 2003). Dadurch kann es außerdem zur Induktion von *Trans-Signaling* kommen. Das in dieser Arbeit verwendete Hyperzytokin-basierte Modellsystem induziert kein *Classic-Signaling*, da

Hyperzytokine durch ihren Aufbau bedingt ausschließlich *Trans-Signaling* induzieren. Um weiterhin *Trans-Signaling* Effekte zu vermeiden, wurde eine proteolyseresistente Variante des mbHIL-11 generiert.

7.3 IL-11 Cluster-Signaling ist durch sgp130Fc inhibierbar

Der neu entdeckte Signalmechanismus *Cluster-Signaling* wurde nun auf Möglichkeiten zur Inhibition untersucht. Da sgp130 ein IL-11 *Trans-Signaling* Inhibitor ist (Moll et al., 2017, Lokau et al., 2016), wurde dieser auch für die IL-11 *Cluster-Signaling* Inhibition eingesetzt. Interessanterweise konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass IL-11 *Cluster-Signaling* durch sgp130Fc inhibierbar ist. Sowohl die STAT3 Phosphorylierung, als auch Proliferation von *Cluster-Signaling* stimulierten Ba/F3-gp130 Zellen konnten durch sgp130Fc blockiert werden. Vermutlich konkurriert das sgp130Fc, ähnlich wie beim *Trans-Signaling*, mit den membrangebundenen gp130 Molekülen der Receiverzelle um die Bindungsstellen des mbHIL-11. Zusätzlich dazu konnte in der Arbeitsgruppe Scheller das Bindungsverhalten von sgp130Fc an mbHIL-11 in der Durchflusszytometrie untersucht werden. Auch dabei ließ sich eindeutig erkennen, dass sgp130Fc an das membrangebundene HIL-11 Fusionsprotein bindet (Lamertz, **Rummel** et al., 2018).

7.4 Differenzierung von mbHIL-11 induziertem Cluster-Signaling und IL-11 Trans-Signaling

Ein weiterer wichtiger Teil dieser Arbeit war es, den Nachweis zu erbringen, dass *Cluster-Signaling* ein eigenständiger Signalmechanismus ist und es sich nicht um ein durch *Shedding* des mbHIL-11 induziertes *Trans-Signaling* Artefakt handelt. Dazu war sicherzustellen, dass das mbHIL-11 nicht von der Zelloberfläche *geshedded* werden kann. Es konnte gezeigt werden, dass mbHIL-11 nur in geringem Umfang in den Überstand freigesetzt wurde (Abbildung 17 A). Um mbHIL-11 *Shedding* weiter zu verringern, wurde eine Punktmutation in den *Stalk* eingefügt. Durch den Austausch von Arginin355 durch Glutaminsäure ist ein *Shedding* des *Stalks* kaum mehr möglich (Lokau et al., 2016). Da auch hier *Cluster-Signaling* weiterhin möglich war, kann man davon ausgehen, dass kein *Trans-Signaling* vorliegt. Ebenfalls wurde in dieser Arbeit der Überstand der gemeinsam inkubierten *Cluster-Signaling* Zellen (Ba/F3-mbHIL-11 und Ba/F3-gp130) auf potentielle Spuren von löslichem HIL-11 getestet. Dazu wurde dieser Überstand mit Ba/F3-gp130 Zellen kokultiviert. Dieser konnte weder in P-STAT3 Western Blots noch in 72 h lang inkubierten Zellviabilitätsassays ein Zellsignal in den Ba/F3-Zellen induzieren. Wären relevante Mengen sHIL-11 im

Überstand gewesen, hätten die Zellen ein Signal erhalten. Dadurch wurde gezeigt, dass, im Gegensatz zum *Trans-Signaling*, beim *Cluster-Signaling* kein sIL-11 vorhanden ist, sondern es sich um einen sterischen Signalmechanismus von zwei Zellen handelt, bei dem der IL-11R fest auf der Oberfläche bleibt. Damit wurde *Cluster-Signaling* in dieser Arbeit eindeutig als neuer, dritter IL-11 Signalmechanismus vorgestellt.

7.5 Kann es ein *in vivo* Cluster-Signaling geben?

Nachdem in dieser Arbeit gezeigt wurde, dass IL-11 *Cluster-Signaling* auf Zellkulturebene generell möglich ist, stellt sich die Frage der *in vivo* Relevanz und Bedeutung. Erst kürzlich wurde ein IL-11 *Trans-Signaling in vivo* beschrieben, wobei die Auswirkungen dessen noch unerforscht sind (Lokau et al., 2016). Bis vor kurzem war man noch der Auffassung, dass gp130 ubiquitär auf allen humanen Zellen zu finden ist. Kürzlich wurden allerdings Zelltypen beschrieben, die kein gp130 auf ihrer Zelloberfläche exprimieren. Darunter waren z.B. einige dendritische Zellen und Granulozyten (Heink et al., 2017, Wilkinson et al., 2018a). Möglicherweise ist das ein Hinweis auf eine *in vivo* Relevanz von *Cluster-Signaling*. IL-6 *Cluster-Signaling* konnte letztes Jahr erstmalig *in vivo* beschrieben werden (Heink et al., 2017). Dabei sind dendritische Zellen die Transmitterzellen. Sie exprimieren kein gp130 auf ihrer Zelloberfläche, tragen allerdings einen den IL-6R. Wenn dendritische Zellen IL-6 ausschütten, verändert es T-Zellen auf molekularer Ebene so, dass sie zu pathologischen TH₁₇ Zellen werden und besonders gewebsschädigende Eigenschaften erlangen. Dies war allerdings nicht immer der Fall. Heink et al. konnten zeigen, dass bei *Classic-* und *Trans-Signaling* dieser Prozess nicht eintritt, sondern lediglich beim *Cluster-Signaling*. Dabei transpräsentieren dendritische Zellen direkt an ihrer Zelloberfläche IL-6 an die T-Zellen. Diese werden daraufhin zu pathologischen TH₁₇ Zellen. Heink et al. vermuten, dass die hohe Pathogenität und Aggressivität der TH₁₇ Zellen gegen körpereigenes Gewebe daher kommt, dass die TH₁₇ Zellen in kurzer Zeit verschiedene Signale der dendritischen Zellen erhalten. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass *Cluster-Signaling* für *Graft vs. Host Diseases* mitverantwortlich ist und bietet damit einen weiteren interessanten therapeutischen Ansatz (Wilkinson et al., 2018b). Interessant wäre es nun zu wissen, ob es auch IL-11 *Cluster-Signaling in vivo* gibt. Dafür wurden in dieser Arbeit Ba/F3 Zellen mit hIL-11R erstellt. Damit konnte in der Arbeitsgruppe Scheller gezeigt werden, dass Ba/F3-hIL-11R Zellen mit sIL-11 in Ba/F3-gp130 Zellen ein Signal induzieren konnten (Lamertz, **Rummel** et. al., 2018). Prinzipiell wäre es also möglich, dass es, wie bei IL-6, ein IL-11 *Cluster-Signaling*

in vivo geben kann. Dies müsste durch Zellen erfolgen, die IL-11R, aber kein gp130 exprimieren.

7.6 Warum ist autokrines klassisches *Signaling* nicht durch sgp130Fc inhibierbar?

Eine weitere interessante Beobachtung in dieser Arbeit war, dass Zellen, die sowohl gp130 als auch mbHIL-11 exprimieren, autokrin proliferativ sind. Diese Ba/F3-gp130-mbHIL-11 und auch Ba/F3-gp130-mbHIL-11^{R355E} Zellen sind in der Lage, autokrines klassisches *Signaling* zu induzieren. Dabei bilden das mbHIL-11 und der gp130 Rezeptor einen Komplex auf der Zelloberfläche und induzieren ein Signal in der Zelle. Ähnlich wie beim *Classic-Signaling* sind der IL-11R und das gp130 auf einer Zelloberfläche lokalisiert. Der Unterschied ist, dass beim *Classic-Signaling* das IL-11 an den IL-11R bindet, während dies beim autokrin klassischen *Signaling* schon als membrangebundener IL-11:IL-11R Komplex vorliegt. Dieses autokrine klassische IL-11 *Signaling* konnte erstmalig in dieser Arbeit beschrieben werden. Interessant war nun zu testen, ob sgp130 das autokrine klassische *Signaling* inhibieren kann. Während das IL-6 *Trans-Signaling* ab Konzentrationen von 10 ng/ml sgp130Fc inhibierbar ist (Moll et al., 2017, Jostock et al., 2001), konnte erst mit 100 µg/ml sgp130Fc eine beginnende Inhibition des IL-11 autokrinen klassischen *Signalings* dokumentiert werden. Erst mit 10⁴-facher Konzentration von sgp130, verglichen zum *Trans-Signaling*, konnte ein Teil des autokrinen klassischen *Signalings* gehemmt werden. Neben den Zellviabilitätsdaten war das autokrine klassische *Signaling* das P-STAT3 Signal ebenfalls nicht durch sgp130Fc inhibierbar. Dieses führt zu der Annahme, dass sich möglicherweise intrazellulär gp130:mbHIL-11 Komplexe bilden und schon bei der Bildung intrazellulär Signaltransduktion aktivieren. Damit kann sgp130Fc, welches sich ausschließlich extrazellulär befindet, nicht in Kontakt mit dem mbHIL-11 kommen und dadurch keine Inhibition bewirken. Dabei ist noch unklar, wo genau diese präformierten gp130:mbHIL-11 Komplexe in der Zelle gebildet werden. *In vivo* wurde ein ähnlicher Signaltransduktionsmechanismus bereits gezeigt. So kann virales IL-6 aus dem humanen Herpes Virus 8 intrazellulär Signal induzieren (Meads and Medveczky, 2004, Kovaleva et al., 2006). Auch im Falle von konstitutiv aktiven gp130 findet intrazelluläres *Signaling* statt (Rinis et al., 2014, Schmidt-Arras et al., 2014). Es ist zum aktuellen Zeitpunkt allerdings unklar, ob eine solche intrazelluläre Komplexbildung *in vivo* relevant ist.

8 Danksagung

An erster Stelle danke ich Herrn Prof. Dr. Jürgen Scheller, der es mir möglich machte an seinem Institut einen Einblick in das biochemische und wissenschaftliche Arbeiten zu erhalten und dessen Tür, im wahrsten Sinne des Wortes, immer offenstand.

Großer Dank gilt Dr. Jens Moll, dem ich für seine engagierte Betreuung, grenzenlose Unterstützung und seine beruhigenden und humorvollen Worte danke.

Ramona Clemen danke ich für ihre Hilfe im Labor, ihre Freundschaft und die aufmunternden Kaffeepausen, wenn ich sie so dringend benötigte.

Dank gilt ebenfalls allen Mitarbeitern des Instituts für Biochemie und Molekularbiologie II, die meine Fragen beantworteten und mir weiterhalfen. Insbesondere bedanke ich mich für die Zusammenarbeit mit Robin Polz, Erika Engelowski, Alexander Lang, Manuel Franke und Petra Oprée, die gute Seele des Labors.

Ebenfalls danke ich allen Korrekturlesern, die sich die Mühe machten, Wort für Wort dieser Arbeit zu lesen und mir mit ihrer Freundschaft und offenen Ohren immer zur Seite standen.

9 Literaturverzeichnis

- ATREYA, R., MUDTER, J., FINOTTO, S., MÜLLBERG, J. & JOSTOCK, T. 2000. Blockade of interleukin 6 trans signaling suppresses T-cell resistance against apoptosis in chronic intestinal inflammation: Evidence in Crohn disease and experimental colitis in vivo. *Nature medicine*, 583–588 (2000).
- BABON, J. J., VARGHESE, L. N. & NICOLA, N. A. 2014. Inhibition of IL-6 family cytokines by SOCS3. *Seminars in Immunology*, 26, 13-9.
- BARAN, P., HANSEN, S., WAETZIG, G. H., AKBARZADEH, M., LAMERTZ, L., HUBER, H. J., AHMADIAN, M. R., MOLL, J. M. & 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.
- BARKHAUSEN, T., TSCHERNIG, T., ROSENSTIEL, P., VAN GRIENSVEN, M., VONBERG, R. P., DORSCH, M., MUELLER-HEINE, A., CHALARIS, A., SCHELLER, J., ROSE-JOHN, S., SEEGER, D., KRETTEK, C. & WAETZIG, G. H. 2011. Selective blockade of interleukin-6 trans-signaling improves survival in a murine polymicrobial sepsis model. *Critical Care Medicine*, 39, 1407-13.
- BARTON, V. A., HALL, M. A., HUDSON, K. R. & HEATH, J. K. 2000. Interleukin-11 signals through the formation of a hexameric receptor complex. *Journal of Biological Chemistry*, 275, 36197-203.
- BAZAN, J. F. 1990. Structural design and molecular evolution of a cytokine receptor superfamily. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87, 6934-8.
- BECKER, C., FANTINI, M. C., WIRTZ, S., NIKOLAEV, A., LEHR, H. A., GALLE, P. R., ROSE-JOHN, S. & NEURATH, M. F. 2005. IL-6 signaling promotes tumor growth in colorectal cancer. *Cell Cycle*, 4, 217-20.
- DAMS-KOZŁOWSKA, H. 2013. Designer Cytokine Hyper Interleukin 11 (H11) is a Megakaryopoietic Factor. *International Journal of Medical Sciences*, 10(9), 1157-1165.
- DAMS-KOZŁOWSKA, H., GRYSKA, K., KWIATKOWSKA-BOROWCZYK, E., IZYCKI, D., ROSE-JOHN, S. & MACKIEWICZ, A. 2012. A designer hyper interleukin 11 (H11) is a biologically active cytokine. *BMC biotechnology*, 12, 8.
- DOGANCI, A., EIGENBROD, T., KRUG, N., DE SANCTIS, G. T., HAUSDING, M., ERPENBECK, V. J., HADDAD EL, B., LEHR, H. A., SCHMITT, E., BOPP, T., KALLEN, K. J., HERZ, U., SCHMITT, S., LUFT, C., HECHT, O., HOHLFELD, J. M., ITO, H., NISHIMOTO, N., YOSHIZAKI, K., KISHIMOTO, T., ROSE-JOHN, S., RENZ, H., NEURATH, M. F., GALLE, P. R. & FINOTTO, S. 2005. The IL-6R

- alpha chain controls lung CD4+CD25+ Treg development and function during allergic airway inflammation in vivo. *Journal of Clinical Investigation*, 115, 313-25.
- DRUCKER, C., GEWIESE, J., MALCHOW, S., SCHELLER, J. & ROSE-JOHN, S. 2010. Impact of interleukin-6 classic- and trans-signaling on liver damage and regeneration. *Journal of Autoimmunity*, 34, 29-37.
- ELLINGSGAARD, H., EHSES, J. A., HAMMAR, E. B., VAN LOMMEL, L., QUINTENS, R., MARTENS, G., KERR-CONTE, J., PATTOU, F., BERNEY, T., PIPELEERS, D., HALBAN, P. A., SCHUIT, F. C. & DONATH, M. Y. 2008. Interleukin-6 regulates pancreatic alpha-cell mass expansion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105, 13163-8.
- FISCHER, M., GOLDSCHMITT, J., PESCHEL, C., BRAKENHOFF, J. P., KALLEN, K. J., WOLLMER, A., GRÖTZINGER, J. & ROSE-JOHN, S. 1997. I. A bioactive designer cytokine for human hematopoietic progenitor cell expansion. *Nature biotechnology*, 15, 142-145.
- GAILLARD, J. P., BATAILLE, R., BRAILLY, H., ZUBER, C., YASUKAWA, K., ATTAL, M., MARUO, N., TAGA, T., KISHIMOTO, T. & KLEIN, B. 1993. Increased and highly stable levels of functional soluble interleukin-6 receptor in sera of patients with monoclonal gammopathy. *European Journal of Immunology*, 23, 820-4.
- GARBERS, C., APARICIO-SIEGMUND, S. & ROSE-JOHN, S. 2015. The IL-6/gp130/STAT3 signaling axis: recent advances towards specific inhibition. *Current Opinion in Immunology*, 34, 75-82.
- GARBERS, C., JÄNNER, N., CHALARIS, A., MOSS, M. L., FLOSS, D. M., MEYER, D., KOCH-NOLTE, F., ROSE-JOHN, S. & SCHELLER, J. 2011a. 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. *Journal of Biological Chemistry*.
- GARBERS, C. & SCHELLER, J. 2013. Interleukin-6 and interleukin-11: same same but different. *Biological chemistry*, 394, 1145-1161.
- GARBERS, C., THAISS, W., JONES, G. W., WAETZIG, G. H., LORENZEN, I., GUILHOT, F., LISSILAA, R., FERLIN, W. G., GROTZINGER, J., JONES, S. A., ROSE-JOHN, S. & SCHELLER, J. 2011b. Inhibition of classic signaling is a novel function of soluble glycoprotein 130 (sgp130), which is controlled by the ratio of interleukin 6 and soluble interleukin 6 receptor. *Journal of Biological Chemistry*, 286, 42959-70.
- GIESE, B., RODERBURG, C., SOMMERAUER, M., WORTMANN, S. B., METZ, S., HEINRICH, P. C. & MULLER-NEWEN, G. 2005. Dimerization of the cytokine receptors gp130 and LIFR analysed in single cells. *Journal of Cell Science*, 118, 5129-40.

- GREENHILL, C. J., ROSE-JOHN, S., LISSILAA, R., FERLIN, W., ERNST, M., HERTZOG, P. J., MANSELL, A. & JENKINS, B. J. 2011. IL-6 trans-signaling modulates TLR4-dependent inflammatory responses via STAT3. *Journal of Immunology*, 186, 1199-208.
- HARKER, J. A., LEWIS, G. M., MACK, L. & ZUNIGA, E. I. 2011. Late interleukin-6 escalates T follicular helper cell responses and controls a chronic viral infection. *Science*, 334, 825-9.
- 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. & KORN, T. 2017. Trans-presentation of IL-6 by dendritic cells is required for the priming of pathogenic TH17 cells. *Nature Immunology*, 18, 74-85.
- HEINRICH, P. C., BEHRMANN, I., MÜLLER-NEWEN, G., SCHAPER, F. & GRAEVE, L. 1998. Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway. *The Biochemical journal*, 334 (Pt 2), 297-314.
- HILTON, D. J., HILTON, A. A., RAICEVIC, A., RAKAR, S., HARRISON-SMITH, M., GOUGH, N. M., BEGLEY, C. G., METCALF, D., NICOLA, N. A. & WILLSON, T. A. 1994. Cloning of a murine IL-11 receptor alpha-chain; requirement for gp130 for high affinity binding and signal transduction. *The EMBO Journal*, 13, 4765-75.
- ILLEI, G. G., SHIROTA, Y., YARBORO, C. H., DARUWALLA, J., TACKEY, E., TAKADA, K., FLEISHER, T., BALOW, J. E. & LIPSKY, P. E. 2010. Tocilizumab in systemic lupus erythematosus: data on safety, preliminary efficacy, and impact on circulating plasma cells from an open-label phase I dosage-escalation study. *Arthritis and Rheumatism*, 62, 542-52.
- JOHNSTONE, C. N., CHAND, A., PUTOCZKI, T. L. & ERNST, M. 2015. Emerging roles for IL-11 signaling in cancer development and progression: Focus on breast cancer. *Cytokine Growth Factor Review*, 26, 489-98.
- JONES, S. A., RICHARDS, P. J., SCHELLER, J. & ROSE-JOHN, S. 2005. IL-6 transsignaling: the in vivo consequences. *Journal of Interferon and Cytokine Research*, 25, 241-53.
- JONES, S. A., SCHELLER, J. & ROSE-JOHN, S. 2011. Therapeutic strategies for the clinical blockade of IL-6/gp130 signaling. *Journal of Clinical Investigation*, 121, 3375-3383.
- JOSTOCK, T., MULLBERG, J., OZBEK, S., ATREYA, R., BLINN, G., VOLTZ, N., FISCHER, M., NEURATH, M. F. & ROSE-JOHN, S. 2001. Soluble gp130 is the natural inhibitor of soluble interleukin-6 receptor transsignaling responses. *European Journal of Biochemistry*, 268, 160-7.

- KAMIMURA, D., ISHIHARA, K. & HIRANO, T. 2003. IL-6 signal transduction and its physiological roles: the signal orchestration model. *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology* 149, 1-38.
- KISHIMOTO, T., AKIRA, S., NARAZAKI, M. & TAGA, T. 1995. Interleukin-6 family of cytokines and gp130. *Blood*, 86, 1243-54.
- KOBAYASHI, S., TERAMURA, M., OSHIMI, K. & MIZOGUCHI, H. 1994. Interleukin-11. *Leukemia & Lymphoma*, 15, 45-9.
- KOVALEVA, M., BUSSMEYER, I., RABE, B., GROTZINGER, J., SUDARMAN, E., EICHLER, J., CONRAD, U., ROSE-JOHN, S. & 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, 8510-20.
- LAMERTZ, L., RUMMEL, F., POLZ, R., BARAN, P., HANSEN, S., WAETZIG, G. H., MOLL, J. M., FLOSS, D. M. & SCHELLER, J. 2018. Soluble gp130 prevents interleukin-6 and interleukin-11 cluster signaling but not intracellular autocrine responses. *Science Signaling*, 11.
- LISSILAA, R., BUATOIS, V., MAGISTRELLI, G., WILLIAMS, A. S., JONES, G. W., HERREN, S., SHANG, L., MALINGE, P., GUILHOT, F., CHATEL, L., HATTERER, E., JONES, S. A., KOSCO-VILBOIS, M. H. & FERLIN, W. G. 2010. Although IL-6 trans-signaling is sufficient to drive local immune responses, classical IL-6 signaling is obligate for the induction of T cell-mediated autoimmunity. *Journal of Immunology*, 185, 5512-21.
- LOKAU, J., NITZ, R., AGTHE, M., MONHASERY, N., APARICIO-SIEGMUND, S., SCHUMACHER, N., WOLF, J., MOLLER-HACKBARTH, K., WAETZIG, G. H., GROTZINGER, J., MULLER-NEUEN, G., ROSE-JOHN, S., SCHELLER, J. & GARBERS, C. 2016. Proteolytic Cleavage Governs Interleukin-11 Trans-signaling. *Cell Reports*, 14, 1761-73.
- LUPARDUS, P. J., SKINIOTIS, G., RICE, A. J., THOMAS, C., FISCHER, S., WALZ, T. & GARCIA, K. C. 2011. Structural snapshots of full-length Jak1, a transmembrane gp130/IL-6/IL-6Ralpha cytokine receptor complex, and the receptor-Jak1 holocomplex. *Structure*, 19, 45-55.
- MACKIEWICZ, A., SCHOOLTINK, H., HEINRICH, P. C. & ROSE-JOHN, S. 1992. Complex of soluble human IL-6-receptor/IL-6 up-regulates expression of acute-phase proteins. *Journal of Immunology*, 149, 2021-7.
- MARIE, C., LOSSER, M. R., FITTING, C., KERMARREC, N., PAYEN, D. & 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, 1515-22.

- MATTHEWS, V., SCHUSTER, B., SCHUTZE, S., BUSSMEYER, I., LUDWIG, A., HUNDHAUSEN, C., SADOWSKI, T., SAFTIG, P., HARTMANN, D., KALLEN, K. J. & ROSE-JOHN, S. 2003. Cellular cholesterol depletion triggers shedding of the human interleukin-6 receptor by ADAM10 and ADAM17 (TACE). *Journal of Biological Chemistry*, 278, 38829-39.
- MEADS, M. B. & 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, 51793-803.
- MEASE, P. J., GOTTLIEB, A. B., BERMAN, A., DRESCHER, E., XING, J., WONG, R. & BANERJEE, S. 2016. The Efficacy and Safety of Clazakizumab, an Anti-Interleukin-6 Monoclonal Antibody, in a Phase IIb Study of Adults With Active Psoriatic Arthritis. *Arthritis Rheumatology*, 68, 2163-73.
- MIR, S. A., CHATTERJEE, A., MITRA, A., PATHAK, K., MAHATA, S. K. & SARKAR, S. 2012. Inhibition of signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) attenuates interleukin-6 (IL-6)-induced collagen synthesis and resultant hypertrophy in rat heart. *Journal of Biological Chemistry*, 287, 2666-77.
- MOLL, J. M., WEHMOLLER, M., FRANK, N. C., HOMEY, L., BARAN, P., GARBERS, C., LAMERTZ, L., AXELROD, J. H., GALUN, E., MOOTZ, H. D. & SCHELLER, J. 2017. Split(2) Protein-Ligation Generates Active IL-6-Type Hyper-Cytokines from Inactive Precursors. *ACS Synthetic Biology*, 6, 2260-2272.
- MÜLLBERG, J., SCHOOLTINK, H., STOYAN, T., GUNTHER, M., GRAEVE, L., BUSE, G., MACKIEWICZ, A., HEINRICH, P. C. & ROSE-JOHN, S. 1993. The soluble interleukin-6 receptor is generated by shedding. *European Journal of Immunology*, 23, 473-80.
- NANDURKAR, H. H., HILTON, D. J., NATHAN, P., WILLSON, T., NICOLA, N. & BEGLEY, C. G. 1996. The human IL-11 receptor requires gp130 for signalling: demonstration by molecular cloning of the receptor. *Oncogene*, 12, 585-93.
- NARAZAKI, M., YASUKAWA, K., SAITO, T., OHSUGI, Y., FUKUI, H., KOISHIHARA, Y., YANCOPOULOS, G. D., TAGA, T. & 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, 1120-6.
- NOWELL, M. A., RICHARDS, P. J., HORIUCHI, S., YAMAMOTO, N., ROSE-JOHN, S., TOPLEY, N., WILLIAMS, A. S. & JONES, S. A. 2003. Soluble IL-6 receptor governs IL-6 activity in experimental arthritis: blockade of arthritis severity by soluble glycoprotein 130. *Journal of Immunology*, 171, 3202-9.
- OBANA, M., MAEDA, M., TAKEDA, K., HAYAMA, A., MOHRI, T., YAMASHITA, T., NAKAOKA, Y., KOMURO, I., TAKEDA, K., MATSUMIYA, G., AZUMA, J. &

- FUJIO, Y. 2010. Therapeutic activation of signal transducer and activator of transcription 3 by interleukin-11 ameliorates cardiac fibrosis after myocardial infarction. *Circulation*, 121, 684-91.
- PAIVA, P., MENKHORST, E., SALAMONSEN, L. & DIMITRIADIS, E. 2009. Leukemia inhibitory factor and interleukin-11: critical regulators in the establishment of pregnancy. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 20, 319-28.
- PAONESSA, G., GRAZIANI, R., DE SERIO, A., SAVINO, R., CIAPPONI, L., LAHM, A., SALVATI, A. L., TONIATTI, C. & CILIBERTO, G. 1995. Two distinct and independent sites on IL-6 trigger gp 130 dimer formation and signalling. *The EMBO Journal*, 14, 1942-51.
- POLI, V., BALENA, R., FATTORI, E., MARKATOS, A., YAMAMOTO, M., TANAKA, H., CILIBERTO, G., RODAN, G. A. & COSTANTINI, F. 1994. Interleukin-6 deficient mice are protected from bone loss caused by estrogen depletion. *The EMBO Journal*, 13, 1189-96.
- PUTOCZKI, T. & ERNST, M. 2010. More than a sidekick: the IL-6 family cytokine IL-11 links inflammation to cancer. *Journal of Leukocyte Biology*, 88, 1109-1117.
- PUTOCZKI, T. L. & ERNST, M. 2015. IL-11 signaling as a therapeutic target for cancer. *Immunotherapy*, 7, 441-53.
- QUINTANA, F. J. 2016. Old dog, new tricks: IL-6 cluster signaling promotes pathogenic TH17 cell differentiation. *Nature Immunology*, 18, 8-10.
- RINIS, N., KUSTER, A., SCHMITZ-VAN DE LEUR, H., MOHR, A. & MULLER-NEWEN, G. 2014. Intracellular signaling prevents effective blockade of oncogenic gp130 mutants by neutralizing antibodies. *Cell Communication and Signaling*, 12, 14.
- ROBAK, T., GLADALSKA, A., STEPIEN, H. & ROBAK, E. 1998. Serum levels of interleukin-6 type cytokines and soluble interleukin-6 receptor in patients with rheumatoid arthritis. *Mediators of Inflammation*, 7, 347-53.
- ROBB, L., HILTON, D. J., WILLSON, T. A. & BEGLEY, C. G. 1996. Structural analysis of the gene encoding the murine interleukin-11 receptor α -chain and a related locus. *Journal of Biological Chemistry*.
- ROSE-JOHN, S. 2012. IL-6 trans-signaling via the soluble IL-6 receptor: importance for the pro-inflammatory activities of IL-6. *International Journal of Biological Sciences*, 8, 1237-47.
- ROSE-JOHN, S. 2018. Interleukin-6 Family Cytokines. *Cold Spring Harb Perspectives in Biology*, 10.
- ROSE-JOHN, S. & HEINRICH, P. C. 1994. Soluble receptors for cytokines and growth factors: generation and biological function. *Biochemical Journal*, 300, 281-90.

- ROSE-JOHN, S., SCHELLER, J., ELSON, G. & JONES, S. A. 2006. Interleukin-6 biology is coordinated by membrane-bound and soluble receptors: role in inflammation and cancer. *Journal of Leukocyte Biology*, 80, 227-36.
- ROSE-JOHN, S., WAETZIG, G. H., SCHELLER, J., GROTZINGER, J. & SEEGER, D. 2007. The IL-6/sIL-6R complex as a novel target for therapeutic approaches. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 11, 613-24.
- SATO, K., TSUCHIYA, M., SALDANHA, J., KOISHIHARA, Y., OHSUGI, Y., KISHIMOTO, T. & BENDIG, M. M. 1993. Reshaping a human antibody to inhibit the interleukin 6-dependent tumor cell growth. *Cancer Research*, 53, 851-6.
- SAVINO, R., LAHM, A., SALVATI, A. L., CIAPPONI, L., SPORENO, E., ALTAMURA, S., PAONESSA, G., TONIATTI, C. & CILIBERTO, G. 1994. Generation of interleukin-6 receptor antagonists by molecular-modeling guided mutagenesis of residues important for gp130 activation. *The EMBO Journal*, 13, 1357-67.
- SCHELLER, J., CHALARIS, A., SCHMIDT-ARRAS, D. & ROSE-JOHN, S. 2011. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1813, 878-88.
- SCHELLER, J., GARBERS, C. & ROSE-JOHN, S. 2014. Interleukin-6: from basic biology to selective blockade of pro-inflammatory activities. *Seminars in immunology*, 26, 2-12.
- SCHMIDT-ARRAS, D., MULLER, M., STEVANOVIC, M., HORN, S., SCHUTT, A., BERGMANN, J., WILKENS, R., LICKERT, A. & ROSE-JOHN, S. 2014. Oncogenic deletion mutants of gp130 signal from intracellular compartments. *Journal of Cell Science*, 127, 341-53.
- SPRECHER, C. A., GRANT, F. J., BAUMGARTNER, J. W., PRESNELL, S. R., SCHRADER, S. K., YAMAGIWA, T., WHITMORE, T. E., O'HARA, P. J. & FOSTER, D. F. 1998. Cloning and characterization of a novel class I cytokine receptor. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 246, 82-90.
- TAKEUCHI, Y., WATANABE, S., ISHII, G., TAKEDA, S., NAKAYAMA, K., FUKUMOTO, S., KANETA, Y., INOUE, D., MATSUMOTO, T., HARIGAYA, K. & FUJITA, T. 2002. Interleukin-11 as a stimulatory factor for bone formation prevents bone loss with advancing age in mice. *Journal of Biological Chemistry*, 277, 49011-8.
- TANAKA, T. & KISHIMOTO, T. 2014. The biology and medical implications of interleukin-6. *Cancer Immunology Research*, 2, 288-94.
- TANAKA, T., NARAZAKI, M. & KISHIMOTO, T. 2012. Therapeutic targeting of the interleukin-6 receptor. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 52, 199-219.
- TANAKA, T., NARAZAKI, M. & KISHIMOTO, T. 2014. IL-6 in inflammation, immunity, and disease. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 6, a016295.

- TENHUMBERG, S., SCHUSTER, B., ZHU, L., KOVALEVA, M., SCHELLER, J., KALLEN, K. J. & ROSE-JOHN, S. 2006. gp130 dimerization in the absence of ligand: preformed cytokine receptor complexes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 346, 649-57.
- WANG, J., HOMER, R. J., HONG, L., COHN, L., LEE, C. G., JUNG, S. & ELIAS, J. A. 2000. IL-11 selectively inhibits aeroallergen-induced pulmonary eosinophilia and Th2 cytokine production. *Journal of Immunology*, 165, 2222-31.
- WILKINSON, A. N., GARTLAN, K. H., KELLY, G., SAMSON, L. D., OLVER, S. D., AVERY, J., ZOMERDIJK, N., TEY, S. K., LEE, J. S., VUCKOVIC, S. & HILL, G. R. 2018a. Granulocytes Are Unresponsive to IL-6 Due to an Absence of gp130. *Journal of Immunology*, 200, 3547-3555.
- WILKINSON, A. N., KUNS, R. D., VARELIAS, A., VUCKOVIC, S., ROSE-JOHN, S., GARTLAN, K. H. & HILL, G. R. 2018b. Distinct IL-6 signaling pathways drive alternate pathogenic T cell differentiation and GVHD after transplant in vivo *The Journal of Immunology*, 200, 55.2-55.2.
- XING, Z., CARDONA, C. J., ADAMS, S., YANG, Z., LI, J., PEREZ, D. & 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, 1109-18.

10 Plasmidkarten

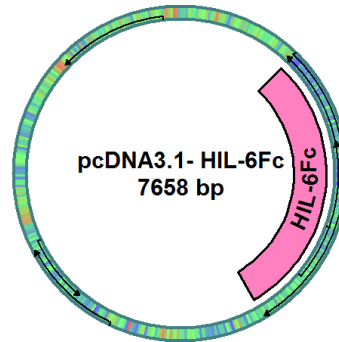


Abbildung 25: Plasmidkarte des pcDNA3.1-HIL-6Fc.

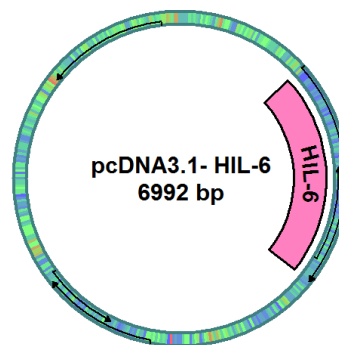


Abbildung 26: Plasmidkarte des pcDNA3.1-HIL-6.

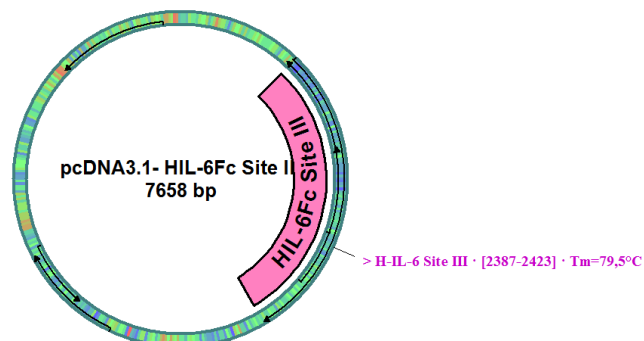


Abbildung 27: Plasmidkarte des pcDNA3.1-HIL-6Fc Site III.

Mit dem zur Generierung verwendeten Oligonukleotid.

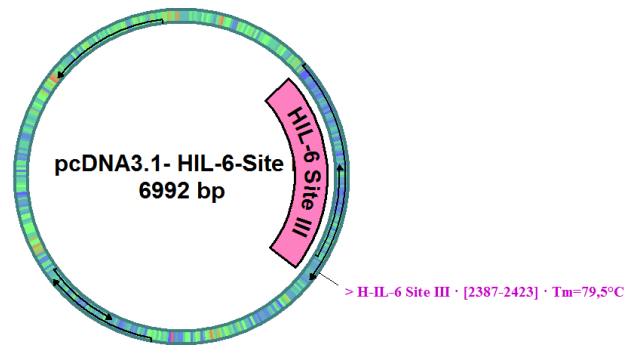


Abbildung 28: **Plasmidkarte des pcDNA3.1-HIL-6 Site III.**

Mit dem zur Generierung verwendeten Oligonukleotid.

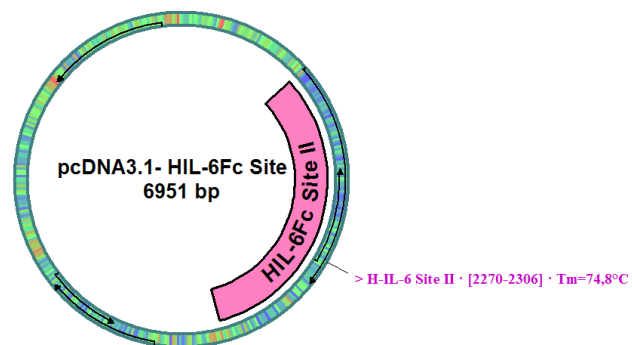


Abbildung 29: **Plasmidkarte des pcDNA3.1-HIL-6Fc Site II.**

Mit dem zur Generierung verwendeten Oligonukleotid.

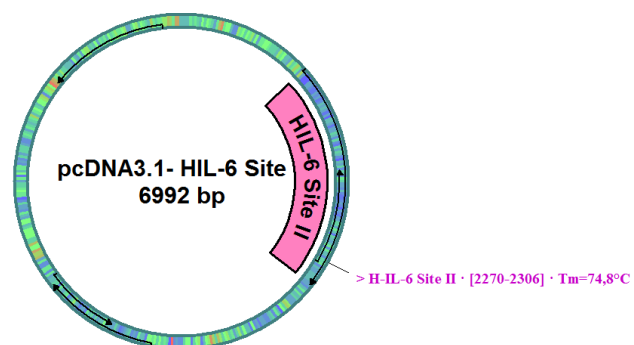


Abbildung 30: **Plasmidkarte des pcDNA3.1-HIL-6 Site II.**

Mit dem zur Generierung verwendeten Oligonukleotid.

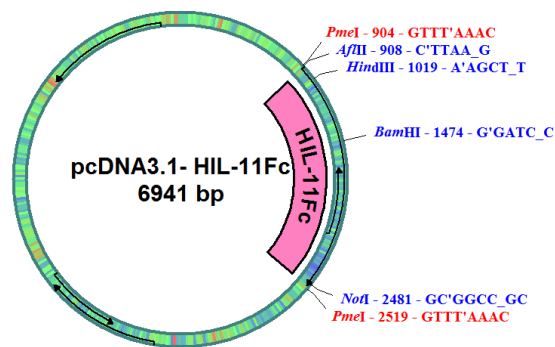


Abbildung 31: Plasmidkarte des pcDNA3.1-HIL-11Fc.

Mit den relevanten Enzymschnittstellen.

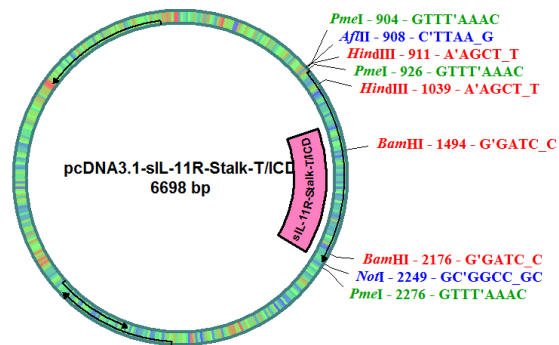


Abbildung 32: Plasmidkarte des pcDNA3.1-sIL-11R-Stalk-T/ICD.

Mit den relevanten Enzymschnittstellen.

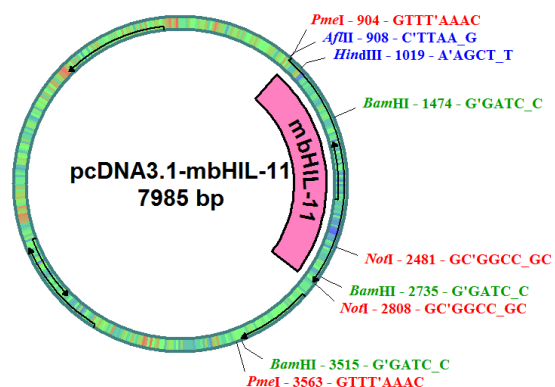


Abbildung 33: Plasmidkarte des pcDNA3.1-mbHIL-11.

Mit den relevanten Enzymschnittstellen.

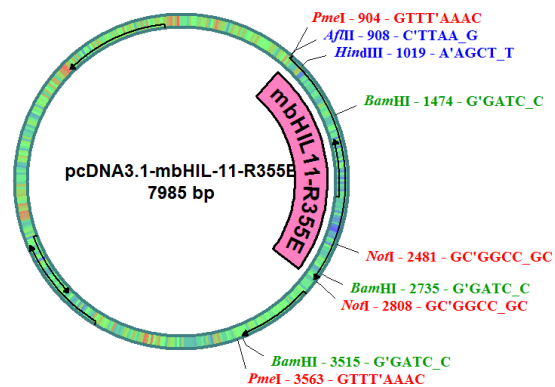


Abbildung 34: Plasmidkarte des pcDNA3.1-mbHIL-11^{R355E}.

Mit den relevanten Enzymschnittstellen.

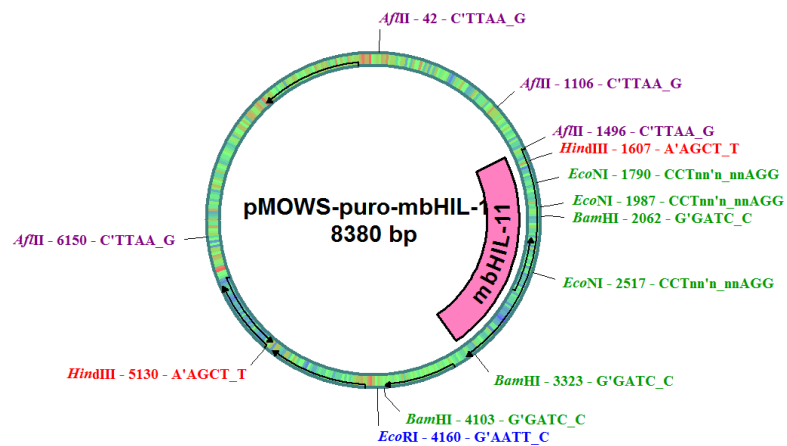


Abbildung 35: Plasmidkarte des pMOWS- mbHIL-11.

Mit den relevanten Enzymschnittstellen.

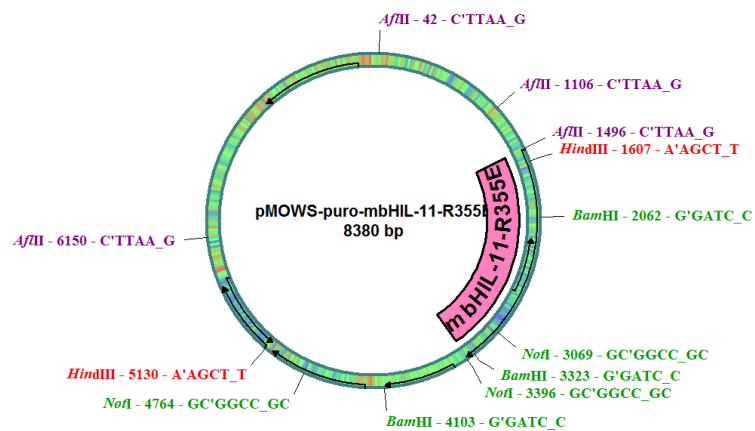


Abbildung 36: Plasmidkarte des pMOWS- mbHIL-11^{R355E}.

Mit den relevanten Enzymschnittstellen.