

Aus dem Institut für Biochemie und Molekularbiologie II

der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: Univ.-Prof. Dr. Jürgen Scheller

**Charakterisierung von Einzeldomänenantikörpern und neuen Fusionsproteinen
mit Wirkung auf den Interleukin-6 Signalweg**

Dissertation

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

vorgelegt von

Selina Teresa Hansen

2022

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

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

Zweitgutachter: Prof. Dr. rer. nat. Björn Stork

Meinen Eltern in Liebe und Dankbarkeit gewidmet.

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

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

Heise, D.*, A. D. Soria*, S. Hansen*, C. Dambietz, M. Akbarzadeh, A. F. Berg, G. H. Waetzig, S. Jones, R. Dvorsky, M. R. Ahmadian, J. Scheller, J. M. Moll (2021). "Selective inhibition of IL-6 trans-signaling by a miniaturized, optimized chimeric soluble gp130 inhibits TH17 cell expansion." Sci Signal **14**(696): eabc3480.

* These authors contributed equally.

Zusammenfassung

In dieser Arbeit wurden Einzeldomänenantikörper (sdAb) und neuartige Fusionsproteine entwickelt und charakterisiert, welche auf die Interleukin-6 (IL-6) Signaltransduktion wirken. IL-6 entfaltet seine Effekte über einen spezifischen Rezeptor (IL-6R), sowie das ubiquitär exprimierte Glykoprotein 130 (gp130). Da der IL-6R im Gegensatz zu gp130 nur auf bestimmten Zelltypen exprimiert wird, verleiht er dem IL-6 Signal eine Zelltypspezifität über das *classic-signaling*. Daneben existiert auch das *trans-signaling* über eine lösliche Form, dem *soluble IL-6R* (sIL-6R). Der sIL-6R entsteht dabei durch Ektodomänenshedding oder alternatives *splicing*. Über den sIL-6R kann IL-6 auf jede Zelle wirken, die das gp130 exprimiert. Dieses *trans-signaling* wird hauptsächlich mit chronisch-entzündlichen Prozessen, das *classic-signaling* in erster Linie mit regenerativen Prozessen in Verbindung gebracht. Es ist daher von außerordentlichem Interesse, therapeutisch das IL-6 *trans-signaling* spezifisch inhibieren zu können.

Im Rahmen dieser Arbeit ist insbesondere eine Kombination von sgp130, einem natürlich vorkommenden IL-6 *trans-signaling* Inhibitor und des sdAbs VHH6, der spezifisch den Komplex aus IL-6 und sIL-6R erkennt, von Interesse (Adams *et al.* 2017). Bei dem von Adams *et al.* beschriebenen VHH6 handelt es sich um einen sdAb, der spezifisch ein junktionales Epitop des IL-6/sIL-6R Komplexes bindet, wodurch dieser stabilisiert wird. Durch die Stabilisierung wird ein anhaltendes IL-6 Signal in die Zelle erreicht. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Wirkung des VHH6 auf das IL-6 *trans-* und *classic-signaling* verglichen, wobei gezeigt werden konnte, dass der VHH6 konzentrationsabhängig das IL-6 *trans-signaling* fördert, ohne das IL-6 *classic-signaling* zu beeinflussen.

Diese Erkenntnis konnte genutzt werden, um im kommerziell erhältlichen IL-6/sIL-6R Komplex-ELISA (*Human IL-6/IL-6R α Complex DuoSet ELISA, R&D Systems*) auch bei sehr geringen Mengen IL-6 und sIL-6R den Komplex detektieren zu können.

In einem zweiten Teil dieser Arbeit wurden neuartige Fusionsproteine aus dem VHH6 und Domänen des sgp130Fc generiert und charakterisiert, mit dem Ziel, das IL-6 *trans-signaling* spezifisch zu inhibieren. Das Fusionsprotein cs130Fc zeigte eine vergleichbare inhibitorische Kapazität auf IL-6 *trans-signaling* wie das bereits in klinischen Phase II Studien untersuchte sgp130Fc, bei gleichzeitig geringerer Molekülgröße. Zusätzlich konnten deutlich geringere Auswirkungen auf die Signaltransduktion anderer IL-6 artiger Zytokine wie IL-11 beobachtet werden. Weiterhin konnte in dieser Arbeit erfolgreich eine monomere Form cs130 des Fusionsproteins erstellt werden, die bei deutlich reduziertem Molekulargewicht weiterhin als potenter IL-6 *trans-signaling* Inhibitor agiert.

Summary

In this work, the single domain antibody (sdAb) VHH6, recognizing a junctional epitope formed by the complex of IL-6 and IL-6R, was characterized with regards to its effects on IL-6 signal transduction. IL-6 unfolds its effect via the specific receptor (IL-6R), as well as the ubiquitously expressed glycoprotein 130 (gp130). While gp130 is expressed on all cells, the membranous IL-6R is only found in specific cell types, which causes a cell type specific signaling via this so called classic-signaling. Furthermore, IL-6 can mediate its effect via trans-signaling, which involves a soluble form of the before mentioned IL-6R. This sIL-6R is generated through ectodomainshedding or alternative splicing. The sIL-6R makes it possible for IL-6 to have an effect on all cells expressing gp130. This trans-signaling is mainly associated with chronic inflammatory conditions, while IL-6 classic-signaling takes part in regenerative mechanisms of the human body. Therefore it is of particular interest, to specifically inhibit IL-6 trans-signaling for therapeutic purposes.

The sdAb VHH6, first described by Adams *et al.* in 2017, specifically binds a junctional epitope of the IL-6/sIL-6R complex, which is thereby stabilized. This stabilization leads to a sustained IL-6 signaling. As part of this work, the impact of VHH6 on IL-6 trans- and classic-signaling was compared. It could be shown that VHH6 promotes, depending on its concentration, IL-6 trans-signaling, while at the same time having no impact on IL-6 classic-signaling. This knowledge could then be applied to the commercially obtainable IL-6/sIL-6R complex ELISA (*Human IL-6/IL-6R α Complex DuoSet ELISA, R&D Systems*) to also detect very small amounts of IL-6 and sIL-6R in complex.

Furthermore, fusion proteins of the sdAb VHH6 and miniaturized sgp130 variants were generated and characterized. A dimeric sdAb-sgp130-Fc fusion protein with potent inhibitory activity on IL-6 trans-signaling was identified. This fusion protein cs130Fc demonstrated comparable inhibitory activity to sgp130Fc, while its molecular weight was significantly reduced. A monomeric version of this fusion protein cs130 with less than 20% of the molecular weight of sgp130Fc also showed comparable IL-6 trans-signaling inhibition.

While sgp130Fc also affects signaling of other IL-6 family cytokines relying on gp130 for signal transduction, for example IL-11, the novel fusion proteins show markedly reduced effects on IL-11 signaling. Hence, these inhibitory molecules combine pronounced inhibitory activity with high target selectivity.

Abkürzungsverzeichnis

Begriffe aus Fremdsprachen werden in dieser Arbeit durch Kursivstellung gekennzeichnet.

Chemikalien

DMSO	Dimethylsulfoxid
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
NP-40	Nonident P-40
PEG	Polyethylenglycol
PVDF	Polyvinylidenfluorid
SDS	Natriumdodecylsulfat
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Tween 20	Polyoxyethylen(20)-sorbitanmonolaurat
TX-100	Triton X-100

Einheiten

A	Ampere
Å	Ångström
°C	Grad Celsius
<i>g</i>	Vielfaches der Erdbeschleunigung
h	Stunde(n)
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
mg	Milligramm
min	Minute(n)
mL	Milliliter
mM	Millimolar
ng	Nanogramm

pH	<i>potentia Hydrogenii</i>
sek	Sekunde(n)
U	Unit
V	Volt
µg	Mikrogramm
µL	Mikroliter

Weitere Abkürzungen

Abb.	Abbildung
ADAM	<i>a desintegrin and metalloproteinase</i>
BCA	<i>bicinchoninic acid assay</i>
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
cDNA	<i>complementary DNA</i>
CDR	<i>complementarity determining region</i>
CH	<i>constant heavy chain</i>
CHO	<i>chinese hamster ovary</i>
CL	<i>constant light chain</i>
CLC	<i>cardiotropin-like cytokine</i>
CNTF	<i>ciliary neurotrophic factor</i>
CT-1	<i>cardiotropin-1</i>
D	Domäne
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DSMZ	Deutsche Sammlung für Mikroorganismen und Zellkulturen
EC ₅₀	halbmaximale effektive Konzentration
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ELISA	<i>enzyme linked immunosorbent assay</i>

ELP	<i>elastin-like peptide</i>
Fab	<i>antigen-binding fragment</i>
Fc	<i>fragment crystallizable</i>
FCS	Fetales Kälberserum
Gab1	<i>GRB2 associated binding protein 1</i>
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
gp130	Glykoprotein 130
Grb2	<i>growth factor receptor bound protein 2</i>
H	Hyper
hcAb	<i>heavy chain antibody</i>
HUVEC	<i>human umbilical vein endothelial cell</i>
IC ₅₀	halbmaximale inhibitorische Konzentration
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IZD	intrazelluläre Domäne
JAK	Janus Kinase
LB	Luria-Bertani (<i>lysogeny broth</i>)
LIF	<i>leukemia inhibitory factor</i>
MAPK	<i>mitogen activated protein kinase</i>
MDSC	<i>myeloid-derived suppressor cell</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
n.a.	<i>not available</i>
OSM	<i>oncostatin M</i>
p	phosphoryliert
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDB	Protein Data Bank

PDGF	<i>platelet-derived growth factor</i>
PIAS	<i>protein inhibitor of activated STAT</i>
PI3K	Phosphoinositol-3-Kinase
POD	Peroxidase
R	Rezeptor
RA	Rheumatoide Arthritis
RAS	<i>Rat sarcoma</i>
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>revolutions per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
s	<i>soluble</i> (löslich)
sdAb	<i>single domain antibody</i> (Einzeldomänenantikörper/Nanobody [®])
SH2	<i>Src homology-2</i>
SHP2	<i>Src homology-2 domain-containing phosphatases</i>
SOCS	<i>suppressor of cytokine signaling</i>
SOS	<i>Son of Sevenless</i>
STAT	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA Puffer
TBS	<i>tris-buffered saline</i>
TEV	Tobacco-Etch-Virus
TMD	Transmembrandomäne
TYE	<i>tryptone-yeast extract</i>
VH	<i>variable heavy chain</i>
VHH	<i>variable heavy chain domain</i>
VL	<i>variable light chain</i>
ZBD	Zytokinbindedomäne
ZKÜ	Zellkulturüberstand

Aminosäuren

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

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Das Zytokin Interleukin-6	1
1.1.1	Signaltransduktion von IL-6	1
1.1.2	Wirkungen von IL-6 in Abhängigkeit der Signaltransduktion	5
1.1.3	Inhibierung des IL-6 Signalwegs	6
1.2	Antikörper	8
1.2.1	Einzeldomänenantikörper	8
1.2.2	Der Einzeldomänenantikörper VHH6	11
1.3	Ziele der Arbeit	12
2	Material und Methoden	13
2.1	Material	13
2.1.1	Antibiotika	13
2.1.2	Antikörper	13
2.1.3	Bakterienstämme und Zelllinien	14
2.1.4	Bakterien- und Zellkulturmedien	14
2.1.5	Chemikalien	15
2.1.6	Enzyme	16
2.1.7	Geräte	17
2.1.8	Kits	18
2.1.9	Oligonukleotide	18
2.1.10	Plasmide	18
2.1.11	Programme	19
2.1.12	Puffer und Lösungen	19
2.1.13	Rekombinante Proteine	21
2.1.14	Verbrauchsmaterialien	22
2.2	Molekularbiologische Methoden	23
2.2.1	Konzentrationsbestimmung von Plasmid-DNA und -RNA	23
2.2.2	Agarose Gelelektrophorese	23
2.2.3	Agarosegeleextraktion von Plasmid-DNA	23
2.2.4	Dephosphorylierung von Plasmid-DNA	23
2.2.5	Restriktion mittels Endonukleasen von Plasmid-DNA	24
2.2.6	Ligation von Plasmid-DNA	24
2.2.7	Transformation von Plasmid-DNA in <i>E.coli XL1 blue</i>	24
2.2.8	Mini-Präparation von Plasmid-DNA	24

2.2.9	Midi-Präparation von Plasmid-DNA	25
2.2.10	<i>Colony</i> -Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	25
2.2.11	<i>Site directed mutagenesis</i> -PCR.....	26
2.2.12	Sequenzierung von Plasmid-DNA	26
2.2.13	Kultivierung prokaryotischer Zellen.....	27
2.3	Protein- und Immunbiochemische Methoden	27
2.3.1	Herstellung von Zelllysaten.....	27
2.3.2	Bicinchoninsäure Assay (BCA-Assay).....	27
2.3.3	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	27
2.3.4	Westernblot.....	28
2.3.5	<i>Coomassie Brilliant Blue</i> Färbung	28
2.3.6	Proteinextraktion aus <i>E.coli</i> Periplasma	29
2.3.7	Proteinextraktion aus <i>E.coli</i> Zellkulturüberstand.....	29
2.3.8	Proteinextraktion aus <i>E.coli</i> Zytosol.....	29
2.3.9	Proteinextraktion aus CHO-K1 Zellkulturüberstand.....	30
2.3.10	IL-6/IL-6R Komplex-ELISA	30
2.3.11	Proteolytische Proteinspaltung mittels TEV-Protease	31
2.4	Zellbiologische Methoden	31
2.4.1	Kultivierung von eukaryotischen Suspensions- und adhärennten Zellen	31
2.4.2	Proliferationsassay	32
2.4.3	Stimulationsassay.....	32
2.4.4	Transiente Transfektion von CHO-K1 Zellen	33
2.4.5	Stabile Transfektion von CHO-K1 Zellen.....	33
2.4.6	Kryokonservierung stabil transfizierter CHO-K1 Zellen	33
2.4.7	Expressionsanalyse in CHO-K1 Zellen.....	34
2.4.8	Protein A Präzipitation zur Expressionsanalyse	34
3	Ergebnisse	35
3.1	Der Einzeldomänenantikörper VHH6.....	35
3.1.1	VHH6 kann mittels zytosolischer Extraktion aus <i>E.coli</i> gewonnen werden .	35
3.1.2	VHH6 verstärkt das IL-6 <i>trans-signaling</i>	38
3.1.3	VHH6 hat keinen Einfluss auf das IL-6 <i>classic-signaling</i>	40
3.1.4	Detektion der maximalen Menge an IL-6/sIL-6R Komplex im Komplex-ELISA mithilfe des VHH6	42
3.2	Inhibierung des IL-6 Signalwegs.....	44
3.2.1	Generierung neuartiger sgp130-VHH6 Fusionsproteine	44
3.2.2	Wirkung der sgp130-VHH6 Fusionsproteine auf das IL-6 <i>trans-signaling</i> ...	48

3.2.3	Wirkung der sgp130-VHH6 Fusionsproteine auf das IL-6 <i>classic-signaling</i>	52
3.2.4	Die Spezifität der inhibitorischen Wirkung von cs130Fc	53
3.2.5	Generierung von cs130F _{CD2mut} und c _{GFP} s130Fc	55
3.2.6	Wirkung der Fusionsproteine cs130F _{CD2mut} und c _{GFP} s130Fc auf das IL-6 <i>trans-signaling</i>	58
3.3	Das cs130Fc Fusionsprotein als Monomer cs130	59
3.3.1	Generierung des Monomers cs130	59
3.3.2	Wirkung des Monomers cs130 auf das IL-6 <i>signaling</i>	61
4	Diskussion	63
4.1	Die Stabilisierung des IL-6/sIL-6R Komplexes durch den sdAb VHH6	63
4.2	Cs130Fc inhibiert IL-6 <i>trans-signaling</i> mit hoher Spezifität	65
4.3	Mögliche Anwendungsgebiete von cs130Fc und cs130 in der medizinischen Forschung und Therapie	69
4.4	Schlussfolgerungen	72
5	Literaturverzeichnis	73

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Schematische Darstellung von IL-6R, gp130 und IL-6 im tetrameren Komplex	2
Abb. 2: Schematische Darstellung von IL-6 <i>trans</i> - und <i>classic-signaling</i>	4
Abb. 3: Schematische Darstellung verschiedener Inhibitoren des IL-6 Signalwegs	7
Abb. 4: Schematischer Aufbau verschiedener Antikörper	9
Abb. 5: Schematische Darstellung der IL-6/sIL-6R Komplexstabilisierung durch VHH6... 11	
Abb. 6: VHH6 Aminosäuresequenz und Expressionsplasmid.....	35
Abb. 7: Klonierungsstrategie für pET23a-VHH6.....	36
Abb. 8: Analytische Endonukleasenrestriktion von pET23a-VHH6	37
Abb. 9: SDS-PAGE Analyse mit <i>Coomassie Brilliant Blue</i> Färbung unterschiedlicher Verfahren zur Proteinextraktion des VHH6 aus <i>E.coli</i>	37
Abb. 10: VHH6 verstärkt konzentrationsabhängig die IL-6 <i>trans-signaling</i> abhängige Proliferation	38
Abb. 11: VHH6 verstärkt via IL-6 <i>trans-signaling</i> die Aktivierung des JAK/STAT-Signalwegs	39
Abb. 12: VHH6 hat keinen Einfluss auf die IL-6 <i>classic-signaling</i> abhängige Proliferation von Ba/F3-gp130-IL-6R Zellen.....	41
Abb. 13: Ausschluss einer Kreuzreaktivität von VHH6 mit dem Kit <i>Human IL-6/IL-6Rα Complex DuoSet ELISA</i> (R&D Systems).....	42
Abb. 14: VHH6 erhöht die nachweisbare Menge an IL-6/sIL-6R Komplex im Komplex-ELISA.....	43
Abb. 15: Schematischer Aufbau der drei neuartigen sgp130-VHH6 Fusionsproteine	45
Abb. 16: Klonierungsstrategie für sgp130-VHH6 Fusionsproteine.....	46
Abb. 17: Klonierungsstrategie für sgp130-VHH6 Fusionsproteine.....	47
Abb. 18: Analytische Endonukleasenrestriktion von pcDNA3.1-IL-6-VHH6-Fc und pcDNA3.1-D1-D3/D2-D3/D1-VHH6-Fc	47
Abb. 19: sgp130-VHH6 Fusionsproteine werden in CHO-K1 Zellen exprimiert.....	48
Abb. 20: Inhibitorisches Potential der sgp130-VHH6 Fusionsproteine auf IL-6 <i>trans-signaling</i>	49

Abb. 21: Vergleich des inhibitorischen Potentials von cs130Fc und sgp130Fc bei Zytokinstimulation mit IL-6/sIL-6R	50
Abb. 22: Vergleich des inhibitorischen Potentials von cs130Fc und sgp130Fc bei Zytokinstimulation mit HIL-6	51
Abb. 23: Inhibitorisches Potential der sgp130-VHH6 Fusionsproteine auf IL-6 <i>classic-signaling</i>	52
Abb. 24: Vergleich der biologischen Aktivität der rekombinanten Zytokine HIL-6Fc und HIL-11Fc	53
Abb. 25: Spezifität der inhibitorischen Wirkung von cs130Fc auf IL-6 <i>trans-signaling</i>	54
Abb. 26: Klonierungsstrategie für pcDNA3.1-D1-D3-GFPVHH-Fc.....	56
Abb. 27: c _{GFP} S130Fc und cs130Fc _{D2mut} werden in CHO-K1 Zellen exprimiert	57
Abb. 28: Wirkung von cs130Fc _{D2mut} und c _{GFP} S130Fc auf IL-6 <i>trans-signaling</i>	58
Abb. 29: Schematische Darstellung von cs130Fc und cs130	59
Abb. 30: Generierung des Monomers cs130.....	60
Abb. 31: Spezifität der Wirkung des Monomers cs130 auf IL-6 <i>trans-signaling</i>	61
Abb. 32: Wirkung des Monomers cs130 auf IL-6 <i>trans-signaling</i> im Vergleich zu cs130Fc	62
Abb. 33: Schematische Darstellung von HIL-6.....	63
Abb. 34: Schematische Darstellung der IL-11 Signaltransduktion	66

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Antibiotika	13
Tabelle 2: Primäre Antikörper.....	13
Tabelle 3: Sekundäre Antikörper	13
Tabelle 4: Zelllinien	14
Tabelle 5: Medien für Bakterienkulturen.....	14
Tabelle 6: Zellkulturmedien	15
Tabelle 7: Chemikalien	16
Tabelle 8: Geräte und Hersteller	17
Tabelle 9: Kits.....	18
Tabelle 10: Oligonukleotide	18
Tabelle 11: Plasmide	19
Tabelle 12: Programme	19
Tabelle 13: Puffer und Lösungen	21
Tabelle 14: Rekombinante Proteine	22
Tabelle 15: Verbrauchsmaterialien.....	22
Tabelle 16: Vergleich der Wirkstärke verschiedener Inhibitoren des IL-6 Signalwegs.....	44

1 Einleitung

1.1 Das Zytokin Interleukin-6

Für ein funktionstüchtiges Immunsystem des menschlichen Körpers ist eine spezifische Interaktion zwischen den (Immun-)Zellen von herausragender Bedeutung. Ein wichtiger Bestandteil der Zell-Zellkommunikation in diesem System bilden dabei die Interleukine, die neben den Wachstumsfaktoren und Hämatopoietinen zur Gruppe der Zytokine gezählt werden (Murphy *et al.* 2018). Ihre Wirkung entfalten die Zytokine dabei endokrin, parakrin oder autokrin. Für die vorliegende Arbeit ist das Zytokin Interleukin-6 (IL-6) von besonderem Interesse.

IL-6 wurde erstmals als ein B-Zell Stimulationsfaktor beschrieben (Muraguchi *et al.* 1988; Kawano *et al.* 1988). Es ist das namensgebende Interleukin einer ganzen Interleukin-Familie, zu der neben IL-6 auch das Interleukin-11 (IL-11), der *leukemia inhibitory factor* (LIF), der *ciliary neurotrophic factor* (CNTF), das *oncostatin M* (OSM), das *cardiotropin-like cytokine* (CLC), das *cardiotropin-1* (CT-1), das Interleukin-27 (IL-27), sowie das Interleukin-31 (IL-31) gehören (Malik *et al.* 1989; Bazan 1991; Ip *et al.* 1992; Pennica *et al.* 1995; Kishimoto *et al.* 1995; Taga *et al.* 1997; Pflanz *et al.* 2002; Rose-John 2018).

Die Zytokine der IL-6 Familie besitzen nur eine geringe Gemeinsamkeit bezüglich ihrer Aminosäuresequenz, gleichen sich jedoch in ihrem strukturellen Aufbau (Bazan 1989; Bazan 1991; Spangler *et al.* 2015). Ihr Aufbau folgt dabei dem aller Zytokine, nämlich einer vier-helikalen Struktur mit einer *up-up-down-down* Topologie (Boulton *et al.* 1994). Die Zytokine der IL-6 Familie definieren sich darüber hinaus über eine Glykoprotein 130 kDa (gp130) abhängige Signaltransduktion (Kishimoto *et al.* 1992; Rose-John 2018). IL-6 wirkt insbesondere auf B- und T-Lymphozyten, sowie Hepatozyten und ist damit sowohl in inflammatorische-, als auch regenerative Prozesse eingebunden, auf die in Abschnitt 1.1.2 näher eingegangen wird.

1.1.1 Signaltransduktion von IL-6

Die Signaltransduktion von IL-6 kann über verschiedene Wege erfolgen, wobei hier insbesondere das IL-6 *trans*- und *classic-signaling* von Interesse sind. Grundsätzlich bildet IL-6 zuerst einen Komplex mit seinem α -Rezeptor, dem IL-6 Rezeptor (IL-6R). Nach Bindung an den IL-6R erfolgt eine Konformationsänderung des IL-6, die es ermöglicht, den β -Rezeptor gp130 zu binden, wodurch dieser dimerisiert und eine konsekutive Aktivierung intrazellulärer Tyrosinkinase erfolgen kann (Taga *et al.* 1989; Hibi *et al.* 1990; Murakami *et al.* 1993).

Zum Verständnis der Signaltransduktion ist der Aufbau der einzelnen Komponenten dieses Signalkomplexes sehr wichtig. Zur Bildung des Komplexes besitzt IL-6 drei Bindungsstellen (*sites*) (Simpson *et al.* 1997). *Site* I bindet den α -Rezeptor IL-6R, *site* II die Zytokinbindungsdomänen D2 und D3 des gp130 und *site* III die IgG-ähnliche Domäne D1 des gp130 (Ehlers *et al.* 1994; Hammacher *et al.* 1998; Grötzinger *et al.* 1999).

Der IL-6R ist ein glykosylierter Typ-1 Transmembranrezeptor mit einer Molekülgröße von 80 kDa, der aus drei extrazellulären Domänen, einer *Stalk*-Region, sowie einer Transmembran- und einer intrazellulären Domäne besteht. Die extrazellulären Domänen, die entscheidend sind zur Komplexbildung, sind eine Ig-ähnliche Domäne D1, sowie zwei Fibronectin-III ähnliche Domänen D2 und D3 (Yamasaki *et al.* 1988; Varghese *et al.* 2002). Gp130 besteht aus einer extrazellulären Domäne, mit darauf folgender *Stalk*-Region und Transmembrandomäne, sowie einer intrazellulären Domäne (Hibi *et al.* 1990; Bravo *et al.* 1998). Der extrazelluläre Teil besteht aus den sechs Domänen D1-D6, wobei D1 als Ig-ähnliche Domäne beschrieben ist (Hibi *et al.* 1990). D2-D6 sind als Fibronectin-III ähnliche Domänen beschrieben, mit D2 und D3 als Zytokinbindestellen, die das typische WSXWS Motiv aufweisen (Bazan 1990; Horsten *et al.* 1997). Die intrazelluläre Domäne beinhaltet *box-1* und *box-2* Motive zur Bindung von JAK-Kinasen, sowie vier Tyrosine zur STAT-Aktivierung (Stahl *et al.* 1995; Gerhartz *et al.* 1996).

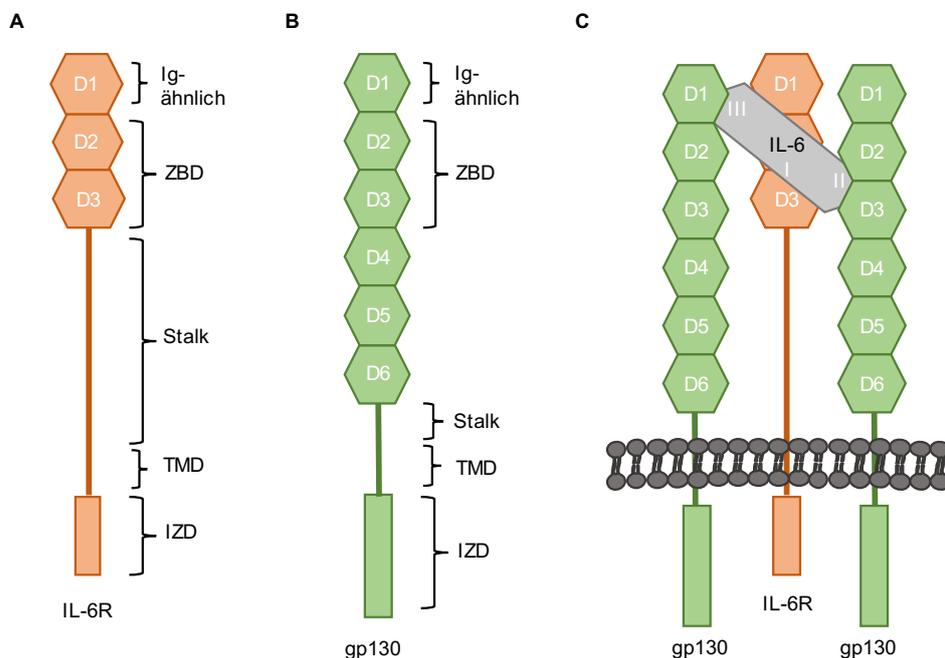


Abb. 1: Schematische Darstellung von IL-6R, gp130 und IL-6 im tetrameren Komplex

(A) Schematische Darstellung des IL-6R mit den extrazellulären Domänen D1-D3, wobei D1 Ig-ähnlich ist und D2-D3 die Zytokinbindedomänen (ZBD) sind. Es folgt eine *Stalk*-Region und Transmembrandomäne (TMD), sowie eine intrazelluläre Domäne (IZD). (B) Schematische Darstellung des gp130 mit den extrazellulären Domänen D1-D6, wobei D1 Ig-ähnlich ist und D2-D6 Fibronectin-III-ähnlich. D2-D3 sind die ZBD. Es folgen ebenfalls die *Stalk*-Region, TMD und IZD. Die IZD beinhaltet dabei die Motive *box-1* und *box-2*, sowie Tyrosine. (C) Schematische Darstellung von IL-6 mit seinen drei *sites* im tetrameren Komplex mit dem IL-6R und zwei gp130 Molekülen. Weitere Erläuterungen dazu finden sich in Abschnitt 1.1.1. Die Darstellung wurde modifiziert nach Kishimoto *et al.* 1995.

Das so genannte *classic-signaling* erfolgt über den zuvor beschriebenen membranständigen IL-6R, womit diese Form der Signaltransduktion nur in Zellen möglich ist, die den IL-6R exprimieren. Dazu gehören B- sowie einige T-Lymphozyten, neutrophile Granulozyten, Makrophagen, Monozyten und Hepatozyten (Hirata *et al.* 1989; Taga 1992; Kishimoto *et al.* 1995; Rose-John *et al.* 2006). Am Anfang der Signaltransduktion steht eine niedrigaffine Bindung zwischen IL-6 und dem IL-6R, die dann zusammen an gp130 Moleküle binden und eine gp130 Homodimerisierung bewirken (Murakami *et al.* 1993). Hier handelt es sich dann um eine hochaffine Bindung (Hibi *et al.* 1990). Die Rekrutierung und Dimerisierung zweier gp130 Moleküle kann dabei abhängig von der IL-6 Konzentration von nur einem IL-6/IL-6R Komplex oder bei hoher IL-6 Konzentration von zwei Komplexen erfolgen (Taga *et al.* 1989; Ward *et al.* 1994, Paonessa *et al.* 1995, Grötzinger *et al.* 1999). Somit entsteht entweder ein tetramerer- oder hexamerer Komplex (Boulanger *et al.* 2003). Im weiteren Verlauf können dadurch verschiedene Signalkaskaden aktiviert werden (Eulenfeld *et al.* 2012).

Die gp130 Homodimerisierung kann einerseits die Initiierung der JAK/STAT Signalkaskade bewirken. Die intrazelluläre gp130 Domäne mit den box-1 und box-2 Motiven bindet JAK-Moleküle (Janus Kinase), welche sich in Folge der gp130 Dimerisierung gegenseitig phosphorylieren (Stahl *et al.* 1994; Narazaki *et al.* 1994). Tyrosine der intrazellulären gp130 Domäne werden ebenfalls phosphoryliert (Boulton *et al.* 1994; Heinrich *et al.* 1998). An diese phosphorylierten Tyrosine werden STAT3 (*signal transducer and activator of transcription*) und in geringerem Umfang auch STAT1 Moleküle über ihre SH2 (*Src homology-2*) Domäne rekrutiert, die dann ebenfalls von den JAK-Molekülen phosphoryliert werden (Gerhartz *et al.* 1996; Fukada *et al.* 1996). Die somit aktivierten STAT-Moleküle bilden dann Homo- oder Heterodimere aus, welche in den Zellkern translozieren (Darnell *et al.* 1994). Hier erfolgt die Bindung an Promotoren der Zielgene, dessen Transkription dadurch initiiert wird (Wegenka *et al.* 1993; Zhong *et al.* 1994).

Dabei existieren Mechanismen zur negativen *Feedback*-Regulation dieses Signals (Heinrich *et al.* 2003). Sie erfolgt einerseits über SHP2 (*Src homology-2 domain-containing phosphatases*) und SOCS-Proteine (*suppressor of cytokine signaling*) (Symes *et al.* 1997; Schaper *et al.* 1998). SOCS-3 bindet an die intrazelluläre gp130 Domäne, wodurch die weitere Phosphorylierung von STAT3 verhindert wird (Nicholson *et al.* 2000). Darüber hinaus ist ein negatives *Feedback* über PIAS-Proteine (*protein inhibitor of activated STAT*) möglich, die an bereits phosphorylierte STAT-Moleküle binden und so dessen Interaktion mit Promotoren verhindern (Chung *et al.* 1997). Neben der Aktivierung der JAK/STAT Kaskade kann die gp130 Dimerisierung auch zu einer Aktivierung des MAPK (*mitogen activated protein kinase*)- und PI3K (Phosphoinositol-3-Kinase)-Signalwegs führen (Boulton *et al.* 1994; Fukada *et al.* 1996; Taga *et al.* 1996; Heinrich *et al.* 1998).

Hier wird die Phosphatase SHP2, ebenfalls über eine SH2 Domäne, an phosphoryliertes Tyrosin der intrazellulären gp130 Domäne rekrutiert (Fukada *et al.* 1996; Schaper *et al.* 1998). SHP2 bindet dann den Grb2 (*growth factor receptor bound protein 2*)-SOS (*Son of Sevenless*) Komplex, der daraufhin Ras (*Rat sarcoma*) aktiviert, das wiederum die MAPK-Signalkaskade induziert (Nakajima *et al.* 1993). Daneben bindet SHP2 das Gab1 (*GRB2 associated binding protein 1*) Protein, welches die PI3-Kinase und somit den PI3K-Signalweg aktiviert (Takahashi-Tezuka *et al.* 1998; Eulenfeld *et al.* 2009).

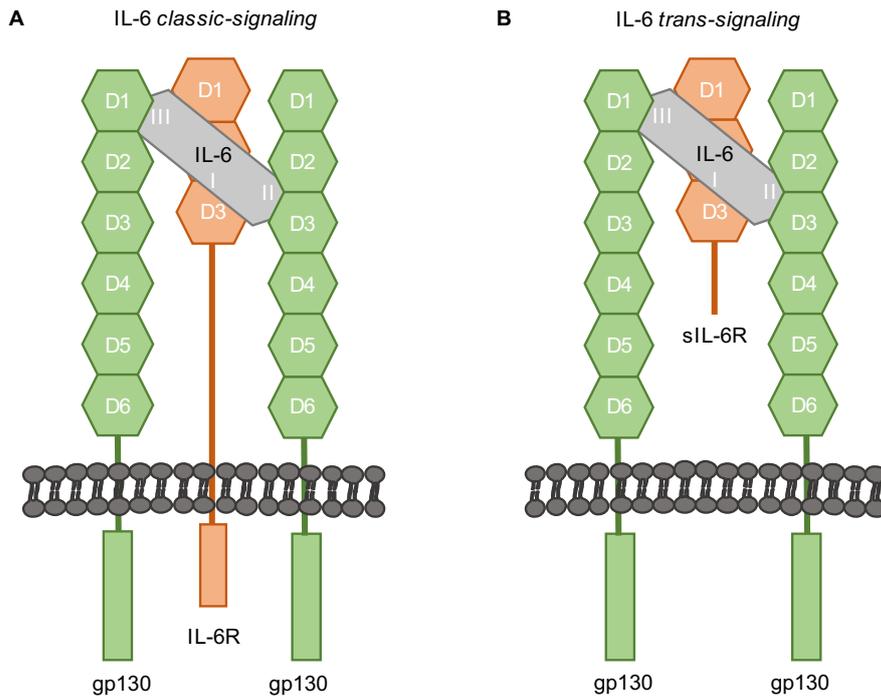


Abb. 2: Schematische Darstellung von IL-6 trans- und classic-signaling

(A) IL-6 *classic-signaling*. Darstellung eines tetrameren Rezeptorkomplexes aus IL-6 (grau), gebunden an den membranständigen IL-6R (orange) mit daraus folgender Bindung und Homodimerisierung von gp130 (grün). Bei hohen Konzentrationen an IL-6 ist ebenfalls ein hexamerer Rezeptorkomplex möglich. **(B)** IL-6 *trans-signaling*. Darstellung eines tetrameren Rezeptorkomplexes aus IL-6, gebunden an den löslichen sIL-6R mit daraus folgender Bindung und Homodimerisierung von gp130. Somit können auch Zellen ohne den membranständigen IL-6R stimuliert werden. Hier ist ebenfalls ein hexamerer Rezeptorkomplex möglich. Die Darstellung wurde modifiziert nach Rose-John 2018.

Im Gegensatz zum *classic-signaling* über den membranständigen IL-6R können mittels *trans-signaling* durch eine lösliche Variante dieses α -Rezeptors prinzipiell alle Zellen durch IL-6 stimuliert werden, da der β -Rezeptor gp130 ubiquitär exprimiert wird (Taga *et al.* 1989; Hibi *et al.* 1990; Rose-John *et al.* 1994). Eine Möglichkeit der Generierung dieser löslichen Variante des IL-6R (sIL-6R) erfolgt mittels posttranslationalem *shedding* (Müllberg *et al.* 1993). Dies geschieht in der *Stalk*-Region durch die ADAM-Proteasen (*A disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein*) ADAM10 oder ADAM17 (Althoff *et al.* 2000; Matthews *et al.* 2003). Ein weiterer Mechanismus besteht in alternativem *splicing* der IL-6R mRNA, wobei das für die Transmembrandomäne kodierende Exon ausgelassen wird (Lust *et al.* 1992, Horiuchi *et al.* 1994; Müller-Newen *et al.* 1996).

Dabei gibt es eine klare Präferenz der Generierung des sIL-6R via *shedding* (90%) über die Generierung durch alternatives *splicing* (Garbers *et al.* 2013). Die weitere Abfolge der Signalkaskade, angefangen bei der gp130 Homodimerisierung, läuft beim IL-6 *trans-signaling* gleich ab wie beim bereits beschriebenen *classic-signaling*. Der sIL-6R wirkt somit als Agonist (Taga *et al.* 1989; Yasukawa *et al.* 1990).

1.1.2 Wirkungen von IL-6 in Abhängigkeit der Signaltransduktion

Die Wirkung von IL-6 im menschlichen Körper hängt entscheidend von der Art der Signaltransduktion ab. Grundsätzlich kann zwischen einer hauptsächlich proinflammatorischen Wirkung über das IL-6 *trans-signaling*, sowie einer antiinflammatorischen und homöostatischen Wirkung über das IL-6 *classic-signaling* unterschieden werden (Chalaris *et al.* 2011; Scheller *et al.* 2014). Über das IL-6 *classic-signaling* werden unter anderem Akute-Phase-Proteine im Rahmen der Infektabwehr aktiviert (Gauldie *et al.* 1987). Für die Leberregeneration nach partieller Hepatektomie ist allerdings das IL-6 *trans-signaling* von Bedeutung (Peters *et al.* 2000; Galun *et al.* 2000; Fazel Modares *et al.* 2019). Bezüglich proinflammatorischer Prozesse ist das *trans-signaling* hingegen in die Aufrechterhaltung der Infiltration von T-Lymphozyten in entzündetem Gewebe involviert (Atreya *et al.* 2000; Jones *et al.* 2010). Über ein Apoptose-induziertes *shedding* des IL-6R ist auch in diesen Zellen das IL-6 *trans-signaling* hochreguliert (Chalaris *et al.* 2007).

Grundsätzlich werden erhöhte Mengen an sIL-6R im Serum mit chronisch-entzündlichen Erkrankungen assoziiert (Robak *et al.* 1998; Scheller *et al.* 2014). Es finden sich erhöhte Mengen an sIL-6R unter anderem bei Morbus Crohn (Atreya *et al.* 2000), rheumatoider Arthritis (Robak *et al.* 1998; Yoshizaki *et al.* 1998; Nowell *et al.* 2003) und Asthma (Yokoyama *et al.* 1997). Darüber hinaus spielt das IL-6 *trans-signaling* auch bei der Entstehung von Adipositas (Esteve *et al.* 2006), Diabetes mellitus Typ II (Wolford *et al.* 2003; Hamid *et al.* 2004) und möglicherweise der Glomerulonephritis (Braun *et al.* 2016) eine Rolle. Des Weiteren ist IL-6 *signaling* in der Karzinogenese einiger Tumorarten involviert (Hodge *et al.* 2005; Rose-John *et al.* 2006). Es konnte unter anderem eine Hochregulation des IL-6 *trans signaling*s in Darm- (Becker *et al.* 2004) und Lungenkrebs (Brooks *et al.* 2016) nachgewiesen werden. IL-6 *trans-signaling* ist darüber hinaus durch die Rekrutierung von MDSCs (*myeloid-derived suppressor cells*) bei der Metastasierung von Brustkrebs involviert (Oh *et al.* 2013).

1.1.3 Inhibierung des IL-6 Signalwegs

Da ein gesteigertes IL-6 *trans-signaling*, wie im vorherigen Abschnitt beschrieben, an zahlreichen Erkrankungen beteiligt ist, besteht ein starkes Interesse an der therapeutischen Blockade dieses Signalwegs. Es wird vermutet, dass der menschliche Körper bereits von Natur aus über ein System zur Regulation des IL-6 *trans-signaling*s verfügt. Dieses System besteht aus einer löslichen Form des gp130, dem *soluble gp130* (sgp130), welches zusammen mit dem sIL-6R ein Puffersystem bildet (Garbers *et al.* 2015; Rose-John 2017). Das körpereigene sgp130 entsteht sowohl durch *shedding*, als auch durch alternatives *splicing* (Diamant *et al.* 1997). Das sgp130 kann nur an den IL-6/sIL-6R Komplex binden und nicht an die einzelnen Komponenten (Jostock *et al.* 2001). Dadurch wird eine Bindung an das membranständige gp130 verhindert und somit das IL-6 *trans-signaling* effektiv blockiert (Narazaki *et al.* 1993; Jostock *et al.* 2001).

Zur Therapie der in Abschnitt 1.1.2 erwähnten Erkrankungen sind bereits medikamentöse Ansätze mit Wirkung auf das IL-6 *signaling* in Verwendung und weiteren Entwicklung. Dabei ist zwischen Inhibitoren, die auf das IL-6 *signaling* insgesamt oder spezifisch auf das IL-6 *trans-signaling* wirken, zu unterscheiden (Rose-John *et al.* 2017). Verschiedene Inhibitoren greifen dabei an unterschiedlichen Stellen in den Signalweg ein. In Anlehnung an das bereits beschriebene körpereigene sgp130 wurde das Fusionsprotein sgp130Fc entwickelt, welches spezifisch das IL-6 *trans-signaling* inhibiert (Jostock *et al.* 2001). Das sgp130Fc dimerisiert über den Fc-Teil (*fragment crystallizable*) und bindet den IL-6/sIL-6R Komplex mit einer deutlich höheren Affinität als das körpereigene sgp130 (Jostock *et al.* 2001). Das Fusionsprotein sgp130Fc wird aktuell unter dem Namen Olamkicept in einer klinischen Phase II-Studie hinsichtlich der Zulassung zur Behandlung der Colitis ulcerosa untersucht (clinicaltrials.gov, ID: NCT03235752). Im Mausmodell konnte unter anderem bereits eine positive Wirkung auf Arteriosklerose (Schuett *et al.* 2012), Lungenkrebs (Brooks *et al.* 2016) und entzündlichen Darmerkrankungen (Atreya *et al.* 2000) gezeigt werden.

Daneben wurden auch gp130 Domänen an eine Hexa-Histidin Sequenz fusioniert, wodurch das Molekül sgp130his als Monomer vorliegt (Jostock *et al.* 2001). Ein weiteres Molekül ist das sgp130-E10Fc, welches aus den gp130 Domänen D1-D4 besteht, die ebenfalls über einen Fc-Teil dimerisieren (Sommer *et al.* 2014). Ein Molekül geringerer Größe ist das mini-gp130-ELP, welches aus den Domänen D1-D3, gebunden an 100 *repeats* von *elastin-like peptides* (ELP), besteht (Lin *et al.* 2006). Das Molekül gp130-RAPS wiederum ist eine natürlich vorkommende gp130 Variante, bestehend aus den Domänen D1-D3, die durch alternatives *splicing* entsteht (Diamant *et al.* 1997; Tanaka *et al.* 2000). Eine schematische Darstellung der Moleküle mit inhibitorischer Wirkung auf den IL-6 Signalweg, die sich vom gp130 ableiten, findet sich in Abbildung 3.

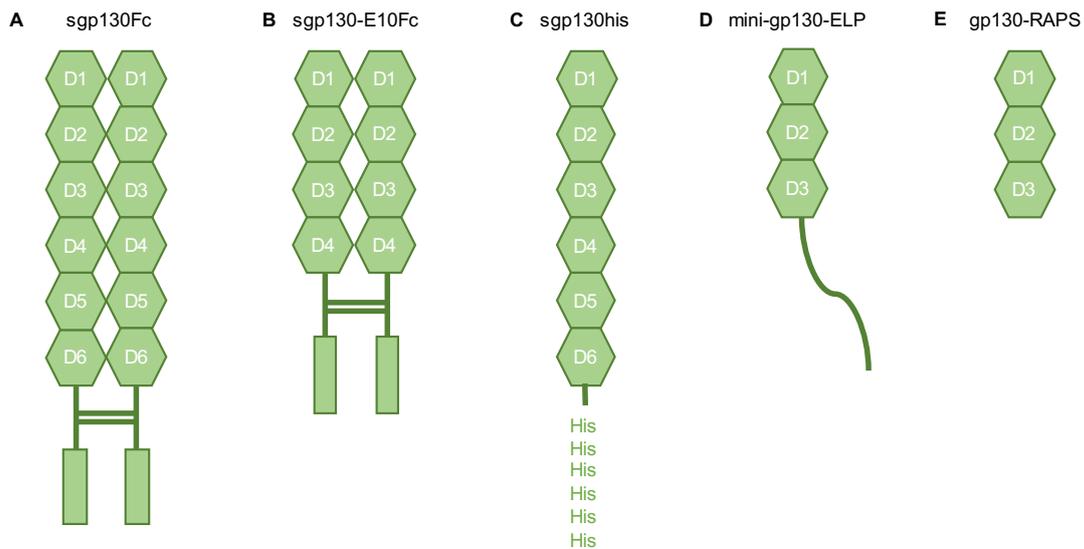


Abb. 3: Schematische Darstellung verschiedener Inhibitoren des IL-6 Signalwegs

(A) Das Molekül sgp130Fc besteht jeweils aus den extrazellulären Domänen D1-D6, die über einen Fc-Teil dimerisieren. (B) Das Molekül sgp130-E10Fc ist vergleichbar aufgebaut wie sgp130Fc, besitzt jedoch nur die Domänen D1-D4. (C) Das Molekül sgp130his besteht aus den Domänen D1-D6 die an ein Hexa-Histidin tag gebunden sind, weshalb es als Monomer vorliegt. (D) Das Molekül mini-gp130-ELP besteht aus den Domänen D1-D3, fusioniert mit 100 *repeats* von *elastin-like peptides* (hier als grüne gewundene Linie dargestellt). (E) Das Molekül gp130-RAPS besteht aus den Domänen D1-D3 und entsteht durch alternatives *splicing*.

Des Weiteren gibt es Inhibitoren, die an IL-6 binden, wie Siltuximab und Olokizumab (Sarosiek *et al.* 2016; Shaw *et al.* 2014). Darüber hinaus wurden Inhibitoren entwickelt, die an den IL-6R binden. Dazu zählt der monoklonale Antikörper Tocilizumab, der bereits zur Behandlung von rheumatoider Arthritis, juveniler idiopathischer Arthritis und der Castleman-Krankheit zum Einsatz kommt, sowie bei weiteren Autoimmunerkrankungen vielversprechende Wirkung zeigt (Tanaka *et al.* 2011). Durch die Bindung von Tocilizumab an die Zytokinbindedomäne für IL-6 sowohl am membranständigen als auch am löslichen IL-6R werden *trans-* und *classic-signaling* gleichermaßen inhibiert (Sato *et al.* 1993; Tanaka *et al.* 2011). Zu den Nebenwirkungen einer immunsuppressiven Therapie mit Tocilizumab zählen unter anderem schwere Infektionen, Malignome, Perforationen des Magen-Darm-Trakts, Leberfunktionsstörungen, sowie schwere kardiale Dysfunktion (Yamamoto *et al.* 2015). Ein weiteres Molekül mit der gleichen Wirkungsweise ist der neutralisierende IL-6R *Nanobody*[®] der Firma Ablynx (Patentnummer: WO 2008/020079 A1). Eine detaillierte Beschreibung von Einzeldomänenantikörpern bzw. *Nanobodies*[®] folgt in Abschnitt 1.2.1. Des Weiteren wurden Antikörper entwickelt, welche durch eine Bindung an gp130 eine Signalinhibition erwirken. Hierzu gehört unter anderem der monoklonale Antikörper B-R3 (Anti-CD130), der über die Bindung an die *domain 2* von gp130 zur Inhibition der Signaltransduktion mehrerer Zytokine der IL-6 Familie führt (Wijdenes *et al.* 1995). Neben der Inhibition über die Bindung an einen der Komponenten des Rezeptorkomplexes aus IL-6 mit seinem α - und β -Rezeptor, existieren auch solche, die die intrazelluläre Signalweiterleitung blockieren.

Dazu gehören die beiden bereits zugelassenen Medikamente Ruxolitinib, welches an JAK1 und JAK2 bindet (Verstovsek *et al.* 2010/2012), sowie Tofacitinib, welches an JAK1 und JAK3 bindet (Ghoreschi *et al.* 2011). Über diese intrazellulären Blockaden des JAK/STAT Signalwegs werden jedoch neben der IL-6 Signalkaskade auch weitere Signalwege beeinflusst.

1.2 Antikörper

Zur Vermittlung der Immunantwort bedarf es eines Zusammenspiels aus angeborenem und adaptivem Immunsystem. Von entscheidender Bedeutung ist hier die T-Lymphozyten abhängige Aktivierung von B-Lymphozyten über eine Antigenpräsentation. Dadurch kann eine Selektion von B-Lymphozytenrezeptoren erfolgen, die in ihrer löslichen Form als Antikörper bekannt sind. Diese Antikörper werden von den so genannten Plasmazellen, einer besonderen Form von B-Lymphozyten, sezerniert, und dienen der andauernden Aktivierung weiterer Immunzellen durch Antigenbindung (Murphy *et al.* 2018). Die hohe Spezifität dieser Antigenbindung ist durch die *complementarity determining region* (CDR) gegeben (Murphy *et al.* 2018). Im menschlichen Organismus sind dabei fünf Isotypen von Antikörpern bekannt (Murphy *et al.* 2018). Der grundsätzliche Aufbau eines menschlichen Antikörpers vom Typ IgG ist in Abschnitt 1.2.1 näher beschrieben. In anderen Organismen finden sich auch Antikörper mit einem anderen strukturellen Aufbau, deren Entdeckung zur Generierung von Einzeldomänenantikörpern geführt hat. Diese sind im Rahmen dieser Arbeit von Interesse und werden im folgenden Abschnitt 1.2.1 näher beschrieben.

1.2.1 Einzeldomänenantikörper

Ein klassischer Antikörper vom Typ IgG besteht aus zwei homologen schweren Ketten und zwei homologen leichten Ketten (Padlan 1994). Die Ketten sind untereinander über Disulfidbrücken verbunden. Eine schwere Kette besteht aus drei konstanten Domänen (CH1-CH3) und einer variablen Domäne (VH). Eine leichte Kette besteht aus einer konstanten (CL) und einer variablen Domäne (VL). Die Domänen CH1 und VH, sowie CL und VL bilden das *antigen-binding fragment* (Fab)-Fragment, die Domänen CH2 und CH3 das *fragment crystallizable* (Fc)-Fragment. Die variablen Domänen enthalten dabei die CDR-Region zur Antigenbindung (Padlan 1994). Antikörper mit einem anderen strukturellen Aufbau sind unter anderem Schwere-Ketten-Antikörper (hcAbs), welche im Serum von Kamelspezies erstmals gefunden wurden (Hamers-Casterman *et al.* 1993). Es handelt sich um Antikörper die lediglich aus zwei homologen Schwereketten bestehen. Eine homologe schwere Kette besteht aus zwei konstanten Domänen, die über eine Gelenkregion mit einer Antigenbindungsdomäne, der *variable heavy chain domain* (VHH), verbunden sind.

Die Sequenz der Domäne CH1 ist noch im Genom vorhanden, wird dann aber mittels *splicing* aus der mRNA entfernt (Nguyen *et al.* 1999; Woolven *et al.* 1999). Einzeldomänenantikörper (sdAbs) wiederum bestehen lediglich aus dieser einen VHH Domäne, wobei die Kapazität der Antigenbindung nicht beeinträchtigt ist (Hamers-Casterman *et al.* 1993).

Die VHH-Domäne der hcAbs weist strukturelle Unterschiede zur Antigenbindungsdomäne menschlicher IgG Antikörper auf. Die VHH-Domäne der hcAbs setzt sich aus neun β -Faltblättern zusammen, die über hypervariable Schleifen miteinander verbunden sind. Davon sind drei der hypervariablen Schleifen als CDRs für die spezifische Antigenbindung verantwortlich (Wang *et al.* 2016). Anders als in anderen Organismen zeigt sich hier einerseits eine Heterogenität in der Länge der CDRs und andererseits insgesamt eine längere CDR3 Schleife (Muyldermans *et al.* 1994). Zur Stabilisierung dieser CDR-Schleife wird eine Disulfidbrücke zwischen CDR1 und CDR3 ausgebildet (Vu *et al.* 1997; Govaert *et al.* 2012). Eine weitere Besonderheit der CDR3 ist, dass die Schleife zum Teil exponiert ist, wobei konventionelle Antigenbindestellen sich eher planar oder als Kavität darstellen (Desmyter *et al.* 1996). Das Repertoire zur Antigenbindung wird in der VHH-Domäne der hcAbs neben dieser Konfiguration durch *interloop* Disulfidbrücken, eine hohe Rate an Nukleotid-Insertionen und -Deletionen, sowie somatische Hyperpunktmutationen ermöglicht (Nguyen *et al.* 2000).

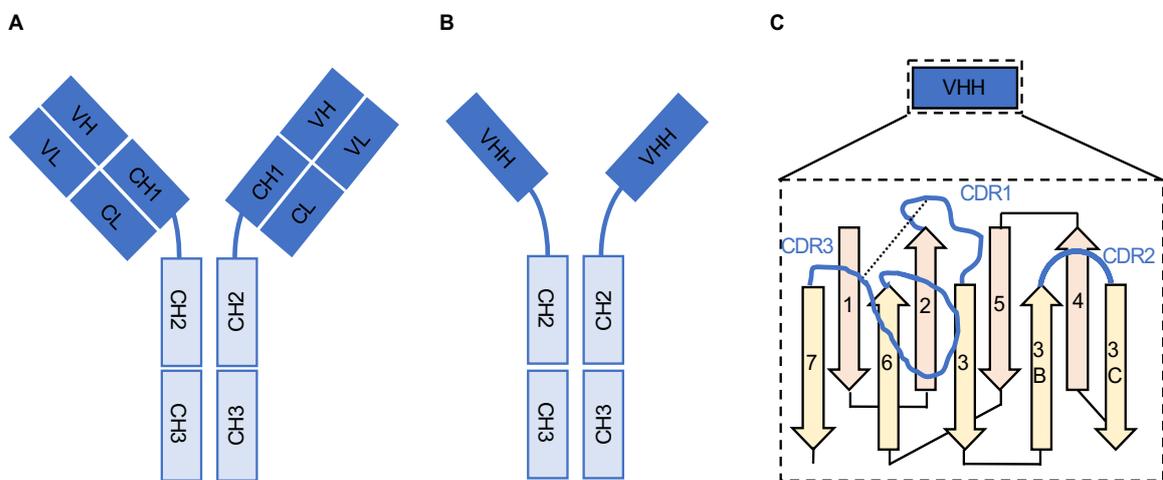


Abb. 4: Schematischer Aufbau verschiedener Antikörper

(A) Humaner IgG Antikörper, bestehend aus zwei homologen schweren Ketten (H=*heavy*) und zwei homologen leichten Ketten (L=*light*). Eine schwere Kette besteht aus drei konstanten Domänen (C=*constant*) und einer variablen Domäne (V=*variable*). Eine leichte Kette besteht aus einer konstanten und einer variablen Domäne. Die variablen Domänen enthalten die CDR Region zur Antigenbindung. (B) Kameloider Schwere-Ketten-Antikörper, bestehend aus zwei homologen schweren Ketten. Eine schwere Kette besteht aus zwei konstanten Domänen, sowie einer variablen Domäne (VHH) zur Antigenbindung. (C) Schematischer Aufbau einer VHH Domäne. Diese besteht aus neun β -Faltblättern, die über hypervariable Schleifen verbunden sind. Blau dargestellt sind dabei die CDR Regionen. Die CDR1 und CDR3 Schleifen sind über eine Disulfidbrücke verbunden (hier als gestrichelte Linie dargestellt). Die Darstellung wurde modifiziert nach Wang *et al.* 2016.

Die längeren CDR Regionen der VHH-Domäne befähigen diese auch effizient an sehr kleine Proteinstrukturen zu binden (Wesolowski *et al.* 2009).

So konnte bereits gezeigt werden, dass eine Bindung und Inhibition aktiver Zentren von Enzymen möglich ist (De Genst *et al.* 2006; Siontorou *et al.* 2013). Zur Generierung von VHHs wird zuerst eine cDNA Bibliothek erstellt, wobei zwischen immunen, naiven und synthetischen Bibliotheken unterschieden werden kann (Wang *et al.* 2016).

Für immune Bibliotheken wird die mRNA aus Lymphozyten eines Kamels im Anschluss an die Immunisierung mit gewünschten Antigenen isoliert und in cDNA transkribiert (Muyldermans *et al.* 2013). Zur Selektion aus naiven Bibliotheken werden viele Lymphozyten von mehreren Kamelen abgenommen, um eine möglichst große Diversität innerhalb der DNA-Bibliothek zu erzielen und somit die Chance zur Identifizierung eines gewünschten sdAbs zu erhöhen (Saerens *et al.* 2012; Muyldermans *et al.* 2013). Um das Problem der Unspezifität naiver DNA-Bibliotheken zu umgehen, gibt es des Weiteren die Möglichkeit synthetische Bibliotheken zu erstellen. Hier werden bereits bestehende DNA Sequenzen von VHHs durch ungeordnete Variationen, insbesondere in der CDR3 Schleife, beispielsweise durch randomisierte CDR3 PCR *primer*, erzeugt (Goldman *et al.* 2006). Mittels *phage display* erfolgt dann ein *screening* hinsichtlich der Bindekapazität an das gewünschte Antigen (Arbabi Ghahroudi *et al.* 1997; Muyldermans *et al.* 2013). Nach Selektion eines vielversprechenden Phagen mittels ELISA kann die DNA hieraus sequenziert werden (Muyldermans *et al.* 2013). Für die Herstellung von sdAbs ist eine Expression in Hefen, Bakterien und Pflanzen möglich (Frenken *et al.* 2000; Pant *et al.* 2006; Ismaili *et al.* 2007).

Aus den Unterschieden im Aufbau und der Sequenz zur Antigenbindung resultieren auch besondere Eigenschaften der sdAbs (Harmsen *et al.* 2007). Dazu gehören neben einer besseren Distribution im Gewebe aufgrund der geringen Molekülgröße von ca. 12 - 15 kDa eine erhöhte Stabilität gegenüber Hitze und Detergenzien, sowie eine bessere Löslichkeit (van der Linden *et al.* 1999; Dumoulin *et al.* 2003). Daraus ergeben sich auch zahlreiche Anwendungsgebiete (Wang *et al.* 2016). So kommen sdAbs als Proteinreinigungsliganden und zur Immunpräzipitation in ELISA-Experimenten zum Einsatz (Klooster *et al.* 2007; Zhu *et al.* 2014). Durch die Möglichkeit der kovalenten Verknüpfung von sdAbs als homo- oder heteromultimere Moleküle ergeben sich weitere Einsatzmöglichkeiten (Steeland *et al.* 2015; Riazi *et al.* 2013). So konnten mithilfe von *green fluorescent protein* (GFP)-sdAbs Untersuchungen zu Protein-Protein-Interaktionen erfolgreich durchgeführt werden (Herce *et al.* 2013). Im Bereich der Onkologie kommen sdAbs besonders in der Diagnostik zum Einsatz, da sie durch eine gute Tumorpenetration sehr sensitiv sind (Vaneycken *et al.* 2011; Huang *et al.* 2008; Hu *et al.* 2017). Darüber hinaus kommen sdAbs in der Therapie immunologischer und infektiologischer Krankheitsbilder zum Einsatz (Wesolowski *et al.* 2009; Steeland *et al.* 2016). Die häufig verwendete Bezeichnung der sdAbs als *Nanobodies*[®] geht auf das Unternehmen Ablynx aus Belgien zurück.

1.2.2 Der Einzeldomänenantikörper VHH6

Der Einzeldomänenantikörper (sdAb) VHH6 wurde im Jahr 2017 von Adams *et al.* beschrieben. Zur Generierung eines Einzeldomänenantikörpers, welcher ein Epitop erkennt das durch die gleichzeitige Bindung von IL-6 an den IL-6R entsteht, wurden Kamele mit einem Fusionsprotein aus sIL-6R und IL-6 immunisiert (Adams *et al.* 2017). Die Grenzfläche beider Moleküle wird durch diesen sdAb gebunden und stabilisiert. Dabei ist in der Kristallstruktur des Komplexes aus VHH6 und IL-6/sIL-6R zu erkennen, dass VHH6 spezifisch an ein Epitop aus der *site* I des IL-6 und der Domäne D1 des sIL-6R bindet. Die *sites* II und III des IL-6 bleiben für die Interaktion mit gp130 frei, wobei der VHH6 deren Bindungsdynamik nicht behindert (Adams *et al.* 2017). Es interagieren alle CDR Regionen des VHH6 mit dem diskontinuierlichen Epitop, das durch die Bildung des IL-6/sIL-6R Komplexes transient besteht. CDR1 und CDR3 interagieren sowohl mit IL-6, als auch dem sIL-6R. Die CDR2 interagiert lediglich mit dem sIL-6R (Adams *et al.* 2017).

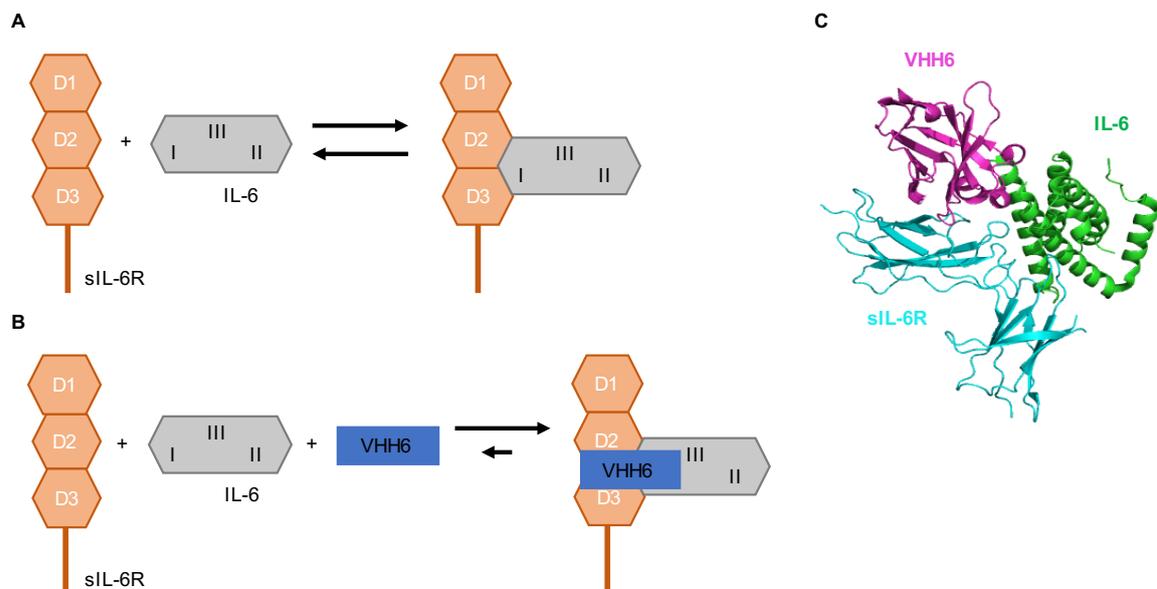


Abb. 5: Schematische Darstellung der IL-6/sIL-6R Komplexstabilisierung durch VHH6

(A) Bei einem 1:1 Konzentrationsverhältnis der Bindungspartner IL-6 und sIL-6R ist das Verhältnis von Assoziation zu Dissoziation ausgeglichen. IL-6 bindet dabei mit der *site* I an die *domains* D2 und D3 des sIL-6R. (B) Durch Zugabe des sdAbs VHH6 zu IL-6 und sIL-6R im Verhältnis 1:1:1 wird die Dissoziation des Komplexes stark verringert. VHH6 behindert dabei nicht die *sites* II und III des IL-6 zur Bindung an gp130. Die Darstellung wurde modifiziert nach Baran *et al.* 2018. (C) Proteinstruktur der VHH6-Bindung an den IL-6/sIL-6R Komplex (PDB 5FUC, erstellt mit PyMOL).

Durch diese Bindung wird die Dissoziation beider Bindungspartner stark reduziert und der Komplex stabilisiert. Die Komplexstabilisierung führt in weiterer Folge auch zu einer erhöhten STAT3 Phosphorylierung in einem *in vitro* Modell für IL-6 *trans-signaling* (Adams *et al.* 2017). In *human umbilical vein endothelial cell* (HUVEC) Zellen führt die Zugabe von VHH6 zu IL-6 und sIL-6R zu einer verstärkten Akkumulation von IL-6 in intrazellulären Vesikeln, sowie einer verstärkten inflammatorischen Reaktion (Adams *et al.* 2017).

1.3 Ziele der Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist es, den von Adams *et al.* im Jahr 2017 erstmals beschriebenen Einzeldomänenantikörper VHH6 hinsichtlich seiner Wirkung auf das IL-6 *signaling* genauer zu charakterisieren. Wie bereits in Abschnitt 1.2.2 beschrieben, ist aus der Arbeit von Adams *et al.* bekannt, dass der VHH6 ein spezifisches Epitop des IL-6/sIL-6R Komplexes bindet und somit das IL-6 *trans-signaling* fördert.

Inwieweit diese Wirkung allerdings von der Konzentration oder der Art der Aktivierung des IL-6 *trans-signaling*s abhängt, wurde noch nicht untersucht. Diesen Fragestellungen soll in einem *in vitro* System mit Ba/F3 gp130 Zellen nachgegangen werden. Außerdem soll im Rahmen dieser Arbeit eine mögliche Wirkung auf das IL-6 *classic-signaling* in einem *in vitro* System mit Ba/F3 gp130 IL-6R Zellen untersucht werden. Aus dieser Charakterisierung sollen dann auch mögliche Einsatzgebiete des Einzeldomänenantikörpers VHH6 in einem ELISA zur Quantifizierung von IL-6/sIL-6R Komplexen erschlossen werden.

Im zweiten Teil dieser Arbeit bestand das Ziel in der Generierung eines Fusionsproteins aus VHH6 und Domänen des sgp130Fc, einem bereits bekannten Inhibitor des IL-6 *trans-signaling*s. Dabei war von Interesse, inwieweit ein solches Fusionsprotein biologisch aktiv sein würde. Dazu wurden drei verschiedene Varianten kloniert und exprimiert, sowie deren Extraktion aus eukaryotischen Zellen etabliert. Die Fusionsproteine sollten dann hinsichtlich ihrer inhibitorischen Kapazität und Spezifität für das IL-6 *trans-signaling* näher untersucht werden.

Ein solches Fusionsprotein mit spezifischer inhibitorischer Wirkung auf das IL-6 *trans-signaling* wäre insbesondere im Bereich der Therapie von Autoimmunerkrankungen interessant, bei denen die Überaktivität dieses Signalwegs pathophysiologisch relevant ist. Das einzige zugelassene Medikament mit inhibitorischer Wirkung auf den IL-6 Signalweg, Tocilizumab, hat dabei durch seine Hemmung sowohl des *trans-* als auch *classic-signaling*s Nebenwirkungen, von denen bei einer spezifischen Inhibition des *trans-signaling*s weniger auszugehen ist. Somit könnte dieses Fusionsprotein ein vielversprechender spezifischer Inhibitor des IL-6 *trans-signaling*s sein. Darüber hinaus ist neben der therapeutischen Nutzung auch eine Anwendung in der Forschung in Betracht zu ziehen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Antibiotika

Antibiotika	Konzentration	Hersteller, Ort
Ampicillin	100 µg/mL	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Chloramphenicol	34 µg/mL	Carl Roth GmbH, Karlsruhe

Tabelle 1: Antibiotika

2.1.2 Antikörper

Primärer Antikörper	Beschreibung und Herkunft
α-Phospho-STAT3 (Tyr705) (D3A7) XP [®]	Monoklonaler Antikörper aus dem Kaninchen Stocklösung 0,2 µg/µL; Westernblot 1:1000 (Cell Signaling Technology Europe B.V.)
α-STAT3 (124H6)	Muriner monoklonaler Antikörper Stocklösung 0,2 µg/µL; Westernblot 1:1000 (Cell Signaling Technology Europe B.V.)
α-Myc-Tag (71D10)	Monoklonaler Antikörper aus dem Kaninchen Stocklösung 0,125 µg/µL; Westernblot 1:1000 (Cell Signaling Technology Europe B.V.)
α-CD130 (gp130) (B-R3)	Muriner monoklonaler Antikörper Stocklösung 1 µg/mL; Westernblot 1:1000 (Abcam Cambridge, UK)
α-humaner Fc POD	Polyklonaler Antikörper aus dem Kaninchen, HRP konjugiert Stocklösung 0,8 µg/mL; Westernblot 1:1000 (Thermo Fisher Scientific, Perbio Science, Bonn)

Tabelle 2: Primäre Antikörper

Sekundärer Antikörper	Beschreibung und Herkunft
α-Kaninchen IgG-POD	<i>ImmunoPure Peroxidase Conjugated Goat α-rabbit IgG (H+L)</i> , Stocklösung 0,8 µg/µL; Westernblot 1:5000 (Thermo Fisher Scientific, Perbio Science, Waltham, MA, USA)
α-Maus IgG-POD	<i>ImmunoPure Peroxidase Conjugated Goat α-mouse IgG (H+L)</i> , Stocklösung 0,8 µg/µL; Westernblot 1:5000 (Thermo Fisher Scientific, Perbio Science, Waltham, MA, USA)

Tabelle 3: Sekundäre Antikörper

2.1.3 Bakterienstämme und Zelllinien

In dieser Arbeit wurde der *E. coli* Bakterienstamm *XL1 blue* mit dem Genotyp *recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac [F'proAB lacIQΔM15 Tn10 (TetR)]* verwendet. Die in dieser Arbeit verwendeten eukaryotischen Zelllinien sind in Tabelle 4 aufgelistet.

Zelllinie	Beschreibung und Herkunft
Ba/F3-gp130	murine prä B-Zelllinie, stabil transduziert mit cDNA für humanes gp130. Wachstum in Abhängigkeit von humanem IL-6 und sIL6R bzw. HIL-6. (Fischer <i>et al.</i> 1997)
Ba/F3-gp130-IL-12Rβ1-IL-23R	Ba/F3-gp130 Zellen, stabil transduziert mit cDNA für IL-12Rβ1 und für IL-23R. Wachstum in Abhängigkeit von HIL-6 und IL-23. (Diese Arbeitsgruppe)
Ba/F3-gp130-IL-6R	Ba/F3-gp130 Zellen, stabil transduziert mit cDNA für den humanen IL-6R. Wachstum in Abhängigkeit von humanem IL-6. (Diese Arbeitsgruppe)
CHO-K1	Chinesische Hamster Ovarialzellen (DSMZ, Braunschweig)

Tabelle 4: Zelllinien

2.1.4 Bakterien- und Zellkulturmedien

Zur Selektion der *E. coli* Bakterien wurde den unten genannten Medien im Anschluss an die Autoklavierung ein entsprechendes Antibiotikum hinzugefügt.

Medium	Zusammensetzung
Luria-Bertani (LB) Agar	10 g NaCl 10 g Pepton 5 g Hefeextrakt 20 g Agar ad 1000 mL dH ₂ O
Luria-Bertani (LB) Medium	10 g NaCl 10 g Pepton 5 g Hefeextrakt ad 1000 mL dH ₂ O
<i>Tryptone yeast extract</i> (TYE) Medium	16 g Trypton 10 g Hefeextrakt 5 g NaCl ad 1000 mL dH ₂ O

Tabelle 5: Medien für Bakterienkulturen

Medium	Zusammensetzung	Herkunft
DMEM ^{-/-}	DMEM <i>High Glucose</i> (4,5 g/L), <i>with stabile Glutamine</i>	Life Technologies, Darmstadt
DMEM ^{+/+}	DMEM <i>High Glucose</i> (4,5 g/L), <i>with stabile Glutamine</i>	Life Technologies, Darmstadt
	10% FCS	Life Technologies, Darmstadt
	1% Penicillin/Streptomycin	Genaxxon Bioscience, Ulm
DMEM ^{+/+/low IgG}	DMEM <i>High Glucose</i> (4,5 g/L), <i>with stabile Glutamine</i>	Life Technologies, Darmstadt
	10% <i>ultra-low IgG</i> FCS	Life Technologies, Darmstadt
	1% Penicillin/Streptomycin	Genaxxon Bioscience, Ulm

Tabelle 6: Zellkulturmedien

2.1.5 Chemikalien

Chemikalien	Hersteller, Ort
Acrylamid-Mix 30% (Rotiphorese [®])	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Agar	AppliChem GmbH, Darmstadt
Agarose	Bio-Budget Technologies, Krefeld
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich, München
Bovines Serum Albumin (BSA)	Biomol, Hamburg
Bromphenol-Blau	Roth, Karlsruhe
<i>Complete Protease Inhibitor Cocktail</i>	Roche Diagnostics, Mannheim
<i>Coomassie Brilliant Blue R-250</i>	Life Technologies, Darmstadt
Dinatriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄)	Merck KGaA, Darmstadt
DMEM	Life Technologies, Darmstadt
DMSO	Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA
dNTP Mix (25 mM)	Thermo Scientific, St. Leon-Rot
EDTA	Sigma-Aldrich, Steinheim
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Merck KGaA, Darmstadt
FBS	Gibco, Thermo Scientific, St. Leon-Rot
Glukose	Merck KGaA, Darmstadt
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Glycerol	Carl Roth GmbH, Darmstadt
Hefeextrakt	Roth, Karlsruhe
Imidazol	Sigma-Aldrich, Steinheim
IPTG	Carl Roth GmbH, Darmstadt
Isopropanol	AppliChem GmbH, Darmstadt

Kaliumacetat (C ₂ H ₃ KO ₂)	Merck KGaA, Darmstadt
Kaliumchlorid (KCl)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Kaliumhydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck KgaA, Darmstadt
Magermilchpulver	Roth, Karlsruhe
Methanol	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Natriumfluorid (NaF)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumhydroxid (NaOH)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumorthovanadat (Na ₃ VO ₄)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ni-NTA Agarose	Quiagen, Hilden
NP-40	Sigma-Aldrich, Steinheim
Orange-G	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Pepton	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA
Protein A Agarose	Roche Holding GmbH, Mannheim
Schwefelsäure	AppliChem GmbH, Darmstadt
SDS	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Sucrose	Merck KgaA, Darmstadt
Surfactant P20	GE Healthcare, Freiburg
TEMED	Sigma-Aldrich, Steinheim
TRIS	Bethesda Research Laboratories, Bethesda, USA
Trypanblau	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Trypton	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA
Turbofect	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Tween 20	Sigma-Aldrich, Steinheim
TX-100	Merck KgaA, Darmstadt

Tabelle 7: Chemikalien

2.1.6 Enzyme

Die hier verwendeten Enzyme wie Polymerasen und Restriktionsenzyme wurden von der Firma Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) bezogen.

2.1.7 Geräte

Gerät/Modell	Hersteller, Ort
ÄKTA™ start	GE Healthcare Life Sciences, Chicago, IL, USA
CO ₂ -Inkubator 150 (E2) Brutschrank	Binder GmbH, Tuttlingen
Gelelektrophoresekammer	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Heizblock Stuart Block Heater	Bibby Scientific, Staffordshire, England
Heracell VIOS 250i CO ₂ -Inkubator	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
INTAS Chemo Cam Imager	INTAS Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen
INTAS iX Imager	INTAS Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen
IVIS Lumina-II Imaging System	Perkin Elmer, Waltham, MA, USA
Kühlschrank	Liebherr GmbH, Rostock
Laborfuge 400R	Heraeus GmbH, Hanau
Mini-PROTEAN Tetra System	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
NanoDrop ND-2000	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
PeqStar 2x Twin Block Thermal Cycler	Peqlab, VWR, Erlangen
pH-Meter	WTW, Weilheim
Roller Stuart roller mixer SRT 9D	Bibby Scientific, Staffordshire, England
Schüttler CH-4103	INFORS AG, Bottmingen, Schweiz
TC 10 Automated Cell Counter	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Tecan Infinite M200 PRO Reader	Tecan GmbH, Maennedorf, Schweiz
Thermoblock	Eppendorf GmbH, Hamburg
Trans-Blot Turbo System	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
UV-Tisch	Bio-Budget Technologies GmbH, Krefeld
Vortexer	IKA Labortechnik GmbH, Staufen
Waage Precisa 100M-300C	Hartenstein GmbH, Würzburg
Westernblot Power Pac 300	BioRad Laboratories GmbH, Hercules, USA
Zentrifuge 5417R	Eppendorf AG, Hamburg

Tabelle 8: Geräte und Hersteller

2.1.8 Kits

Falls nicht anders beschrieben, wurden die Experimente mit den Kits entsprechend den Herstellerangaben durchgeführt.

Methoden	Kit (Hersteller)
Agarosegeleextraktion	<i>NucleoSpin[®] Extract II</i> (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren)
Bestimmung Proteinkonzentration	<i>BCA Protein Assay Kit</i> (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)
Detektion Chemilumineszenz	<i>Immobilon[®] Western Chemiluminescent HRP Substrate</i> (Millipore Corporation, Billerica, MA, USA)
IL-6/IL-6R Komplex-ELISA	<i>Human IL-6/IL-6Ra Complex DuoSet[®] ELISA</i> (DY8139, R&D Systems, Abingdon, UK)
96-well Platten und standardisierte Puffer für IL-6/IL-6R Komplex-ELISA	<i>DuoSet[®] ELISA Ancillary Reagent Kit 2</i> (DY008, R&D Systems, Abingdon, UK)
Midi-Präparation von Plasmid DNA	<i>NucleoBond[®] Xtra Midi</i> (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren)
Proliferationsassay	<i>CellTiter-Blue[®] Cell Viability Assay</i> (Promega GmbH, Mannheim)

Tabelle 9: Kits

2.1.9 Oligonukleotide

Alle Oligonukleotide in dieser Arbeit wurden durch Eurofins Genomics MWG Operon GmbH, Ebersberg synthetisiert und sind in der folgenden Tabelle aufgelistet.

Oligonukleotid	Sequenz
D1-D3 fw	5' AAGCTTGCCACCATGCTGACC 3'
D1-D3 rv	5' CTCGAGCTTAGAGGGTCTGTCCTCGTAGG 3'
Fw D2-D3 HindIII	5' AAGCTTCCCCCGAGAAGCCCAAG 3'
Rev D1 XhoI	5' CTCGAGGCCGCTGATGATTGTGATGCC 3'
gp130_Y190K/F191E_f	5' CCGTGGACTACAGCACCGTGAAGGAGGTGAACATCGAAGTGTGGGT 3'
gp130_Y190K/F191E_r	5' ACCCACACTTCGATGTTACCTCCTTCACGGTGTGTAGTCCACGG 3'
T7 fw	5' TAATACGACTCACTATAGGG 3'

Tabelle 10: Oligonukleotide

2.1.10 Plasmide

Plasmid	Herkunft
pcDNA3.1-D1-D3-GFPVHH	Diese Arbeit
pcDNA3.1-D1-D3-GFPVHH-Fc	Diese Arbeit
pcDNA3.1-D1-D3-VHH6-Fc	Diese Arbeit

pcDNA3.1-D2-D3-VHH6-Fc	Diese Arbeit
pcDNA3.1-D1-VHH6-Fc	Diese Arbeit
pcDNA3.1-IL-6-GFPVHH	Diese Arbeit
pcDNA3.1-IL-6-VHH6	Diese Arbeit
pcDNA3.1-IL-6-VHH6-Fc	Diese Arbeit
pET23a-VHH6-Myc-His	Diese Arbeit
pcDNA3.1-HIL-6-Fc	Diese Arbeitsgruppe
pcDNA3.1-nativesHIL-6	Diese Arbeitsgruppe
pET23a-GFPVHH-Myc-His	Diese Arbeitsgruppe
pMAT-VHH6	GeneArt, Thermo Fisher Scientific
pBluescript (Zur Klonierung der gp130 Domänen D1, D2-D3 und D1-D3)	Diese Arbeitsgruppe

Tabelle 11: Plasmide

2.1.11 Programme

Programm	Hersteller, Ort
ChemoStar Professional	INTAS, Göttingen
EndNote™ X7	Thomas Reuter, Carlsbad, CA, USA
ImageJ 1.47V	Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA
Microsoft Office 2017, Version 15.31	Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA
PyMOL	Richardson Lab, Duke University, NC, USA
SnapGene® Viewer, Version 3.3.3	GSL Biotech LLC, Chicago, IL, USA
UNICORN™ start	GE Healthcare Life Sciences, Chicago, IL, USA

Tabelle 12: Programme

2.1.12 Puffer und Lösungen

Puffer/Lösung	Zusammensetzung
1% Agarosegel	3 g Agarosepulver 6 mL 50x TEA Puffer ad 300 mL dH ₂ O
5x Lämmli Puffer	10% SDS 50% Glycerol 125 mM Tris-HCl (pH 6,8) 5% β-Mercaptoethanol 1 Spatelspitze Bromphenolblau
6x DNA Ladepuffer	30% Glycerol in TAE Puffer

	50 mM EDTA
	0,25% Orange-G
<i>Blocking Buffer</i> (BSA)	5% BSA in TBS-T
<i>Blocking Buffer</i> (Milch)	5% Milchpulver in TBS-T
Citratpuffer EB1	50 mM Citrat (pH 5,5)
Citratpuffer EB2	50 mM Citrat (pH 3,5)
<i>Coomassie Brilliant Blue</i>	4% <i>Coomassie Brilliant Blue</i> R250
	80% Methanol
	20% Essigsäure
<i>Destaining Solution</i>	80% Methanol
	20% Essigsäure
Lysepuffer	50 mM Tris HCl
	150 mM NaCl
	2 mM EDTA
	2 mM NaF
	1 mM Na ₃ VO ₄
	1% Nonidet P40
	1% Triton X-100
	1 Tablette Complete Protease Inhibitor
PBS	1,5 mM KH ₂ PO ₄
	2,7 mM KCl
	8,1 mM Na ₂ HPO ₄
	137 mM NaCl (pH 7,4)
PBS-T	0,05% Tween-20 in PBS
pSTAT3 Lysepuffer	50 mM Tris HCl (pH 7,5)
	150 mM NaCl
	2 mM EDTA (pH 8,0)
	2 mM NaF
	1 mM Na ₃ VO ₄
	1% NP-40
	1% Triton-X 100
Sammelgel (2x)	3,44 mL dH ₂ O
	1 mL Acrylamid 30%
	1,5 mL Sammelgelpuffer
	6 µL TEMED
	60 µL APS
Sammelgelpuffer	0,5 M Tris HCl (pH 6,8)
	0,4% SDS
SDS Laufpuffer	25 mM Tris HCl (pH 8,3)
	192 mM Glycerin
	0,1% SDS

<i>Solution 1</i>	50 mM Glukose 25 mM Tris HCl (pH 8,0) 100 mM EDTA (pH 8,0) 100 mM RNase
<i>Solution 2</i>	200 mM NaOH 1% SDS
<i>Solution 3</i>	2,8 mM Kaliumacetat (pH 5,1)
TAE Puffer	40 mM Tris HCl (pH 8,0) 10 mM EDTA 0,1% Essigsäure
TBS	10 mM Tris HCl (pH 8,0) 150 mM NaCl
TBS-T	0,05% Tween-20 in TBS
TES Puffer	124 g Tris 0,2 g EDTA 171 g Sucrose ad 1000 mL dH ₂ O
Transferpuffer	250 mM Tris HCl (pH 8,0) 192 mM Glycerin 0,01% SDS 20% Methanol
Trenngel (12%)	3,3 mL dH ₂ O 4 mL Acrylamid 30% 2,6 mL Trenngelpuffer 4 µL TEMED 100 µL APS
Trenngelpuffer	1,5 M Tris HCl (pH 8,8) 0,4% SDS

Tabelle 13: Puffer und Lösungen

2.1.13 Rekombinante Proteine

Protein	Herkunft
IL-6	Conaris Research Institute AG, Kiel
sIL-6R	Conaris Research Institute AG, Kiel
HIL-6	Diese Arbeitsgruppe
HIL-6Fc	Diese Arbeitsgruppe
HIL-11Fc	Diese Arbeitsgruppe
IL-23	Diese Arbeitsgruppe
sgp130Fc	Diese Arbeitsgruppe

Tocilizumab (RoActemra [®])	Roche, Grenzach-Wyhlen
VHH6	Diese Arbeit
D1-VHH6-Fc	Diese Arbeit
D2-D3-VHH6-Fc	Diese Arbeit
cs130	Diese Arbeit
cs130Fc	Diese Arbeit
CGFPS130Fc	Diese Arbeit
cs130F _{CD2mut}	Diese Arbeit

Tabelle 14: Rekombinante Proteine

2.1.14 Verbrauchsmaterialien

Material	Hersteller, Ort
<i>Bottletop</i> -Filter (0,45 µm)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Einmalspitzen	B. Braun, Melsungen
ELISA Mikrotiterplatte (96-well)	Nunc A/S, Roskilde, Dänemark
Eppendorf Reaktionsgefäß (1,5 mL, 2 mL)	Eppendorf AG, Hamburg
Falcon Reaktionsgefäß (15 mL, 50 mL)	BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA
Handschuhe Nitra-Tex	Ansell Healthcare, Brüssel, Belgien
Kryoröhrchen	VWR, Randor, USA
NAP-25 Säule	GE Healthcare, München
PCR Reaktionsgefäß	Eppendorf AG, Hamburg
PVDF-Membran (Porengröße 0,45 µm)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
TC10 <i>System Counting Slides</i>	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Whatman Papier	VWR International GmbH, Darmstadt
Zellkulturplatten (6-, 12- und 96-well)	TPP, Trasadingen, Schweiz
Zellkulturschalen	TPP, Trasadingen, Schweiz

Tabelle 15: Verbrauchsmaterialien

2.2 Molekularbiologische Methoden

2.2.1 Konzentrationsbestimmung von Plasmid-DNA und -RNA

Zur Konzentrationsbestimmung von Plasmid-DNA und -RNA erfolgte eine spektrometrische Messung mithilfe des *NanoDrop ND-2000*. Zur Reinheitsbestimmung wurde das Absorptionsverhältnis A260/280 herangezogen, wobei ein Wert von 1,8 als ausreichend bewertet wurde.

2.2.2 Agarose Gelelektrophorese

Zur Größentrennung von DNA-Fragmenten nach Restriktion mit Endonukleasen wurde die Agarose Gelelektrophorese genutzt. Das dazu benötigte Agarosegel wurde selber hergestellt, indem 1% oder 2% Agarose in TAE-Puffer aufgekocht und mit 2,5 µL *HD Green* (Intas Science Imaging Instruments, Göttingen) in Schlitten gegossen wurde. Zur späteren Probenladung wurde ein Kamm bis zur Polymerisierung des Gels mit eingesteckt. Die Proben wurden dann mit 6x Ladepuffer versetzt und in die Probentaschen ins Gel gegeben. Die Größentrennung der Fragmente erfolgte dann bei einer Spannung von 100 V, bis die Lauffront das Ende des Gels fast erreicht hat. Als Maßstab wurde der *Gene Ruler Express* bzw. *Gene Ruler 1 kb* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) mit aufgetragen. Die Darstellung erfolgte mithilfe des *INTAS iX Imager*.

2.2.3 Agarosegeleextraktion von Plasmid-DNA

Zur Extraktion von Plasmid-DNA im Anschluss an die Auftrennung nach der Größe mittels Agarose Gelelektrophorese wurde das Kit *NucleoSpin Extract II* nach Herstellerangaben verwendet. Zur Identifizierung der gewünschten Bande wurde das Agarosegel auf einem UV-Tisch mit Licht einer Wellenlänge von 365 nm beleuchtet. Die durch das *HD Green* leuchtenden Banden konnten so mithilfe eines Skalpell aus dem Gel herausgelöst werden.

2.2.4 Dephosphorylierung von Plasmid-DNA

Um eine Ligation des 5' und 3' Endes von zuvor durch Endonukleasen linearisierter Plasmid-DNA (s. Abschnitt 2.2.5) zu vermeiden, wurde eine Dephosphorylierung durchgeführt. Hierzu wurde die DNA mit 1 U Fast-AP (Thermo Fisher Scientific, St. Leon, Deutschland) in entsprechendem Puffer bei 37°C inkubiert und nach 30 min die Reaktion durch Zugabe von 6x DNA Ladepuffer beendet.

2.2.5 Restriktion mittels Endonukleasen von Plasmid-DNA

Zur Fragmentierung von Plasmid-DNA wurde ein präparativer Restriktionsverdau mit Endonukleasen durchgeführt. Für Klonierungen wurden 10 µg der jeweiligen Plasmid-DNA und 10 U des entsprechenden Restriktionsenzym in vorgegebenem Reaktionspuffer mit dH₂O auf ein Gesamtvolumen von 50 µL gebracht und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am Folgetag konnten die Proben einer Gelelektrophorese (s. Abschnitt 2.2.2) und einer Gelextraktion (s. Abschnitt 2.2.3) zugeführt werden. Im Falle einer analytischen Fragestellung wurde das oben beschriebene Verfahren mit nur 1 µg Plasmid-DNA für 2 h durchgeführt. Bei gleichzeitiger Verwendung zweier Restriktionsenzyme wurde ebenfalls der vom Hersteller empfohlene Puffer verwendet.

2.2.6 Ligation von Plasmid-DNA

Zur *sticky end* Klonierung erfolgte eine Ligation des zuvor enzymatisch gespaltenen *inserts* in einen dephosphorylierten Vektor im Verhältnis 3:1. Das *insert* und der Vektor wurden mit 1 U T4 Ligase in entsprechendem Reaktionspuffer auf 20 µL mit dH₂O gegeben und bei 4°C über Nacht inkubiert. Für eine *blunt end* Klonierung wurden *insert* und Vektor ebenfalls im 3:1 Verhältnis mit 2 U T1 Ligase, 2 µL Ligasepuffer und 2 µL 50%iger PEG4000 Lösung über Nacht bei 4°C inkubiert.

2.2.7 Transformation von Plasmid-DNA in *E.coli XL1 blue*

Zur Amplifizierung von Plasmid-DNA erfolgte die Transformation in chemisch kompetente *E.coli XL-1 blue* Zellen. 30 µL dieser Zellen wurden hierzu 15 min auf Eis aufgetaut und dann mit 1 µL Plasmid DNA (Retransformation) bzw. 5 µL (Ligationsansatz) weitere 5 min auf Eis inkubiert. Nach einem einminütigen Hitzeschock bei 42°C wurden die Zellen erneut auf Eis inkubiert. Danach folgte eine erste Kultivierung der Zellen in 500 µL vorgewärmtem LB-Medium ohne Zusatz von Antibiotika für 1 h (Thermoblock 1000 rpm, 37°C). Diese Zellsuspension wurde dann für die weitere Kultivierung auf einer LB-Agar Platte mit entsprechendem Antibiotikum aufgetragen und bei 37°C inkubiert. Am Folgetag konnten die Kolonien auf der Platte im Kühlschrank gelagert oder direkt weiter verwendet werden.

2.2.8 Mini-Präparation von Plasmid-DNA

Zur Präparation kleiner Mengen Plasmid-DNA wurden jeweils 2 mL LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum mit einer Einzelkolonie angeimpft und über Nacht inkubiert (Thermoblock 1000 rpm, 37°C). Die Flüssigkultur wurde dann am Folgetag zentrifugiert (18000 g, 4°C, 5 min) und das *pellet* für die weiteren Arbeitsschritte genutzt.

Das *pellet* wurde in 100 μL kalter *Solution 1* (+ 1:1000 RNase) resuspendiert und anschließend 200 μL *Solution 2* hinzugefügt, bis der Inhalt sich leicht viskös zeigte. Nach 5 min wurde dann 120 μL der *Solution 3* hinzugefügt, um die Lyse zu stoppen. Es folgte eine Inkubation auf Eis für 10 min und danach erneut eine Zentrifugation (18000 g , 4°C, 10 min). Das *pellet* wurde verworfen und der Überstand in ein frisches Eppendorf Reaktionsgefäß überführt. Dieser Überstand wurde dann für 5 min mit 900 μL 100%igem Ethanol auf Eis inkubiert und erneut zentrifugiert (18000 g , 4°C, 15 min). Der Überstand wurde verworfen und das *pellet* in 500 μL 70%igem Ethanol resuspendiert. Nach einer letzten Zentrifugation (18000 g , 4°C, 5 min) wurde der Überstand verworfen und das *pellet* für 15 min an der Luft getrocknet. Das *pellet* mit der isolierten Plasmid-DNA wurde dann in dH_2O gelöst und die Konzentration wie in Abschnitt 2.2.1 beschrieben gemessen. Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

2.2.9 Midi-Präparation von Plasmid-DNA

Zur Präparation größerer Mengen Plasmid-DNA wurden jeweils 100 mL einer Übernachts-Bakterienkultur im Schüttler (120 rpm, 37°C) aus einer Einzelkolonie einer LB-Agar Platte in LB-Medium mit entsprechendem Antibiotikum verwendet. Die Flüssigkultur wurde bei 4000 g und 4°C für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und mit dem Zellpellet weiter gearbeitet. Die Präparation erfolgte gemäß den Herstellerangaben mithilfe des Kits *NucleoBond Xtra Midi*. Die isolierte Plasmid-DNA wurde dann in dH_2O gelöst und die Konzentration wie in Abschnitt 2.2.1 beschrieben gemessen. Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

2.2.10 Colony-Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zur Amplifikation von DNA-Sequenzen, die im Rahmen der Klonierung nötig war, wurde eine *Colony*-Polymerase-Kettenreaktion im *Thermocycler* durchgeführt. Hierbei kam die Taq-Polymerase zur Anwendung. Bakterienkolonien von LB-Agar Platten wurden in PCR Reaktionsgefäßen mit 20 μL dH_2O überführt und anschließend zur initialen Denaturierung für 5 min bei 95°C in den *Thermocycler* gestellt. Jeweils 30 μL des Mastermixes, bestehend aus 5 μL Dream Taq Puffer, 4 μL MgCl_2 (25 mM), 0,25 μL *forward primer*, 0,25 μL *reverse primer*, 1 μL dNTPs (10 mM), 0,2 μL Dream Taq (5 U/ μL) und 19,3 μL dH_2O , wurde dann jeweils in ein Reaktionsgefäß gegeben (Gesamtvolumen 50 μL). Das folgende Programm wurde in Abhängigkeit der Länge des zu amplifizierenden Fragments für die PCR im *Thermocycler* angewandt:

Denaturierung	98°C	5 min	} 35 Zyklen
Denaturierung	98°C	30 sek	
<i>Annealing</i>	60°C	30 sek	
Elongation	72°C	2 min/kb	
Elongation	72°C	10 min	
Lagerung	4°C		

2.2.11 *Site directed mutagenesis*-PCR

Zum gezielten Einbringen von Mutationen in DNA-Sequenzen wurde eine *site directed mutagenesis*-Polymerase-Kettenreaktion im *Thermocycler* durchgeführt. Hierzu wurde die Phusion Polymerase mit *proof-reading* Funktion genutzt. Für jede Probe wurden jeweils zwei verschiedene Reaktionsgefäße, einmal mit *sense primer* und einmal mit *antisense primer* zur PCR vorbereitet. Dazu wurden 1 µL *template-DNA*, 10 µL HF Puffer, 1 µL dNTPs (10 mM), 1 µL Phusion Polymerase (1 U/µL) sowie 0,4 µL *sense-* bzw. *antisense primer* zu 36,6 µL dH₂O hinzugefügt (Gesamtvolumen 50 µL). Nach einem ersten Durchlauf des unten beschriebenen PCR-Programms wurden dann die Ansätze mit dem *sense-* und *antisense primer* vermischt und wieder jeweils zu 50 µL in PCR-Reaktionsgefäße aufgeteilt und 1 µL Phusion Polymerase hinzugefügt. Dann erfolgt ein erneuter Durchlauf des Programms:

Denaturierung	98°C	4 min	} 15 Zyklen
Denaturierung	98°C	1min	
<i>Annealing</i>	55°C	1 min	
Elongation	72°C	30 sek/kb	
Elongation	72°C	12 min	
Lagerung	4°C		

Die PCR-Produkte wurden im Anschluss analog zur Gelextraktion (s. Abschnitt 2.2.3) gereinigt. Dann wurde eine Endonukleasenrestriktion (s. Abschnitt 2.2.5) mit DpnI durchgeführt, die dabei nur das DNA Ausgangsmaterial abbaut und somit die PCR-Produkte selektioniert, bevor eine Transformation mit je 10 µL Plasmid-DNA in *E.coli XL1 blue* erfolgte (s. Abschnitt 2.2.7).

2.2.12 Sequenzierung von Plasmid-DNA

Zur Verifizierung der DNA-Sequenz der in dieser Arbeit klonierten Plasmide im Vergleich zur erwarteten Sequenz erfolgte eine Sanger-Sequenzierung durch die Firma SeqLab Sequence Laboratories Göttingen GmbH.

2.2.13 Kultivierung prokaryotischer Zellen

Die Kultivierung prokaryotischer Zellen erfolgte in LB-Medium oder auf LB-Agar Platten, jeweils mit 100 µg/mL Ampicillin. Flüssigkulturen wurden im Schüttler kultiviert (900 rpm, 37°C). Bakterienkulturen auf LB-Agar Platten wurden ebenfalls bei 37°C inkubiert.

2.3 Protein- und Immunbiochemische Methoden

2.3.1 Herstellung von Zelllysaten

Zur Analyse des Proteingehalts nach Transfektion oder nach Stimulationsassays wurden jeweils Zelllysate hergestellt. Dafür wurden die Zellen des jeweiligen Experiments zentrifugiert und das Zellpellet in normalem Lysepuffer oder pSTAT3 Lysepuffer resuspendiert. Nach einer Inkubation mit kontinuierlicher Durchmischung (3 h, 4°C) wurde die Zellsuspension erneut zentrifugiert (15 min, 4°C, 20000 g). Der Überstand wurde verworfen und das *pellet* mit den jetzt darin enthaltenen, aus den Zellen gelösten Proteinen, zur Bestimmung der Proteinkonzentration (s. Abschnitt 2.3.2) verwendet.

2.3.2 Bicinchoninsäure Assay (BCA-Assay)

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration in Zelllysaten wurde der *bicinchoninic acid assay* (BCA-Assay) mit dem *BCA Protein Assay Kit* durchgeführt. Dazu wurde gemäß den Herstellerangaben *working reagent*, bestehend aus Reagenz A und B im Verhältnis 50:1, hergestellt. Die Zelllysate (s. Abschnitt 2.3.1) wurden 1:10 mit dH₂O verdünnt und davon 25 µL mit jeweils 200 µL des *working reagent* vermischt. Für die Standardgerade wurde 25 µL BSA in bereits definierten Konzentrationen ebenfalls mit 200 µL des *working reagent* versetzt. Die Ansätze wurden jeweils für 30 min bei 37°C inkubiert und im Anschluss auf eine *96-well* Platte pipettiert, wobei eine Doppelbestimmung durchgeführt wurde. Die Absorption wurde dann bei 562 nm mit dem *Tecan Infinite M200 Pro Reader* bestimmt und die Proteinkonzentration anhand der Standardgeraden bestimmt.

2.3.3 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Trennung von Proteinen gemäß ihres Molekulargewichts wurde das SDS-PAGE Verfahren angewandt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Gele, bestehend aus 4/5 Trenngel (12%) und 1/5 Sammelgel (2x), mit einer Dicke von 1,5 mm und mit 10 oder 15 Probenkammern, verwendet. Als Größenmarker diente der kommerziell erhältliche *PageRuler Prestained Protein Ladder* (Thermo Fisher Scientific). Zur Analyse wurden jeweils 50 µg der zu untersuchenden Proteine mit 5x Lämmli auf ein Endvolumen von

25 μ L verdünnt und zur Proteindenaturierung bei 95°C für 10 min inkubiert. Nach entsprechender Beladung der Probenkammern erfolgte die Größentrennung der Proteine mithilfe des *Mini-PROTEAN Tetra Systems* bei einer Spannung von ca. 100 V, bis die Lauffront das untere Ende des Trenngels erreicht hat.

2.3.4 Westernblot

Zum Nachweis der Proteine nach erfolgter Größenauftrennung mittels SDS-PAGE wurden diese im Westernblot Verfahren vom SDS-Gel auf eine PVDF-Membran übertragen. Hierzu wurde die Membran nacheinander mit Methanol, dH₂O und Transferpuffer befeuchtet und zusammen mit dem SDS-Gel zwischen drei Lagen *Whatman Paper* in die *blotting* Kammer gelegt. Um Artefakte zu vermeiden, wurde das *Whatman Paper* ebenfalls in Transferpuffer äquilibriert und Luftblasen ausgestrichen. Der elektrophoretische Proteintransfer erfolgte mithilfe des *Trans-Blot Turbo semidry Transfer System* bei einer Spannung von 25 V und Stärke von 1 A für 60-90 min. Nach erfolgtem Transfer wurde die PVDF-Membran im 50 mL Falcon Reaktionsgefäß dreifach mit TBS-T für jeweils 10 min gewaschen und im Anschluss alle unspezifischen, freien Antikörper-Bindungsstellen mit *Blocking Buffer* (5% Milchpulver in TBS-T) für 2 h bei RT gesättigt. Die Inkubation der PVDF-Membran mit dem entsprechenden Primärantikörper erfolgte über Nacht bei 4°C. Am Folgetag wurde die Membran dreifach jeweils 10 min mit TBS-T gewaschen, um freie Primärantikörper zu entfernen, bevor die Membran für 1 h bei RT mit dem Sekundärantikörper inkubiert wurde. Danach wurde die Membran erneut dreifach jeweils 10 min mit TBS-T gewaschen. Die Proteindetektion erfolgte dann gemäß den Herstellerangaben mithilfe des *Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate* am *INTAS Chemo Cam Imager*. Die Detektion von STAT3 erfolgte über den Primär-AK α -STAT3 (124H6) und den Sekundär-AK α -Maus IgG-POD. Die Detektion von pSTAT3 erfolgte über den Primär-AK α -Phospho-STAT3 (Tyr705) (D3A7) XP und den Sekundär-AK α -Kaninchen IgG-POD. Bei Detektion anderer Proteine mit anderen Antikörpern sind diese in der Abbildungsbeschriftung genannt.

2.3.5 Coomassie Brilliant Blue Färbung

Zur unselektiven Darstellung aller der Größe nach voneinander getrennten Proteine auf einem SDS-Gel wurden diese mit *Coomassie Brilliant Blue* angefärbt, wobei der Farbstoff unabhängig von der Proteinsequenz an die basischen Aminosäureseitenketten bindet. Das SDS-Gel wurde für 10 min mit *Coomassie Brilliant Blue* inkubiert und um die Banden sichtbar zu machen im Anschluss für 2 h mit *SDS Destaining Solution* und dann über Nacht in dH₂O entfärbt. Am Folgetag konnte das Gel mithilfe eines herkömmlichen Scanners eingescannt werden.

2.3.6 Proteinextraktion aus *E.coli* Periplasma

Zur Proteinextraktion aus Periplasma wurden 2 L *E.coli* Hauptkultur in LB-Medium mit Ampicillin (1:1000) und Chloramphenicol (1:1000) mit 10 mM IPTG über Nacht bei 28°C inkubiert. Nach Zentrifugation (3000 g, 15 min, RT) wurde das Zellpellet in 30 mL TES resuspendiert und für 1 h bei 4°C inkubiert. Danach wurde 60 mL ¼ TES hinzugefügt und die Suspension für weitere 45 min bei 4°C inkubiert. Dann erfolgte eine weitere Zentrifugation (10000 g, 30 min, 4°C), wobei mit dem gewonnenen Überstand als Periplasmaextrakt weitergearbeitet wurde. 45 mL Periplasmaextrakt wurde via Ni-NTA Affinitätschromatographie mit 500 mM Imidazol in PBS extrahiert. Der Pufferaustausch von Imidazol gegen PBS erfolgte über eine NAP-25 Säule.

2.3.7 Proteinextraktion aus *E.coli* Zellkulturüberstand

Zur Proteinextraktion aus Zellkulturüberstand wurden 1 L *E.coli* Hauptkultur in TYE-Medium mit Ampicillin (1:1000) und Chloramphenicol (1:000), sowie 0,1% Glukose, die über Nacht mit 1 mM IPTG stimuliert und bei 28°C inkubiert wurde, abzentrifugiert (5000 g, 15 min, 4°C) und der Überstand erneut zentrifugiert (10000 g, 20 min, 4°C). Dieser Überstand wurde durch einen *Bottletop*-Filter (0,45 µm) filtriert und dann für 2 h mit 1 mL Ni-NTA Agarose inkubiert. Dann erfolgte die Extraktion durch Elution mit 500 mM Imidazol in PBS. Der Pufferaustausch erfolgte wie in Abschnitt 2.3.6 beschrieben.

2.3.8 Proteinextraktion aus *E.coli* Zytosol

Zur Proteinextraktion aus dem Zytoplasma wurden 2 L *E.coli* Hauptkultur in TYE-Medium mit Ampicillin (1:1000) und Chloramphenicol (1:1000) und 0,1% Glukose, die über Nacht mit 1mM IPTG stimuliert und bei 28°C inkubiert wurde, abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das *pellet* wurde in 150 mL PBS resuspendiert und eine Tablette *complete protease inhibitor cocktail* hinzugefügt. Die Resuspensionslösung wurde anschließend im *Fluidizer* lysiert und erneut abzentrifugiert (20000 g, 20 min, 4°C). Der Überstand dieses Lysats wurde durch einen *Bottletop*-Filter (0,45 µm) filtriert und anschließend mit Ni-NTA Agarose für 3 h bei 4°C inkubiert. Die Proteinextraktion aus diesem Lysat erfolgte dann mittels Affinitätschromatographie durch Elution mit 500 mM Imidazol in PBS. Der Pufferaustausch erfolgte wie in Abschnitt 2.3.6 bereits beschrieben.

2.3.9 Proteinextraktion aus CHO-K1 Zellkulturüberstand

Die Proteinextraktion aus CHO-K1 Zellkulturüberstand (ZKÜ) erfolgte mithilfe des Protein-aufreinigungssystems *ÄKTA™ start*. Dazu wurde ZKÜ, der zuvor über einen *Bottletop*-Filter (0,45 µm) filtriert und bei -80°C gelagert war, aufgetaut und abzentrifugiert (4°C, 4000 g, 30 min). Das *ÄKTA™ start* System wurde dann zur Vorbereitung mit dH₂O gespült, bis die *baseline* stabil und die *conductivity* nahe null angezeigt wurden. Dann wurde eine Protein A Säule unter Fluss (1 mL/min) angeschlossen und das dH₂O im System gegen PBS ausgetauscht. Somit wurde auch die Säule mit PBS äquilibriert bis die *baseline* stabil war. Dann wurde der ZKÜ durch die Säule geleitet und diese im Anschluss wieder mit PBS gewaschen. Währenddessen wurden 15 mL Falcon Reaktionsgefäße zur Elution vorbereitet, indem jeweils 1 mL 1 M Tris (pH 10) vorgelegt wurde. Die Elution erfolgte dann mit einer Mischung aus den Citratpuffern EB1 (pH 3,5) und EB2 (pH 5,5) im Verhältnis 70:30 in die vorbereiteten Reaktionsgefäße. Im Anschluss an die Elution wurden die Proben konzentriert und der Tris-Puffer über eine NAP-25 Säule gegen PBS getauscht. Das gereinigte Protein wurde dann in flüssigem Stickstoff gefroren und bei -80°C gelagert.

2.3.10 IL-6/IL-6R Komplex-ELISA

Zur Anwendung kam das ELISA Kit *Human IL-6/IL-6Rα Complex DuoSet* zusammen mit dem *DuoSet ELISA Ancillary Reagent Kit 2*. Die Durchführung des ELISA erfolgte mit im Kit enthaltenen *96-well* Platten und standardisierten Puffern nach Herstellerangaben. Die Platte wurde über Nacht mit *capture antibody* in *coating buffer* inkubiert und am Folgetag dreifach mit *wash buffer* gewaschen. Die Platte wurde dann für 2 bis 3 h mit *reagent diluent* inkubiert. Danach wurden die Proben in entsprechender Konzentration in 1% BSA in PBS verdünnt und für 1 bis 2 h bei RT auf der Platte inkubiert. Ebenso wurde eine Standardreihe in *reagent diluent* auf der Platte inkubiert. Nach dieser Inkubation wurde die Platte erneut dreifach gewaschen, dann für 1 bis 2 h mit dem *detection antibody* inkubiert und wieder dreifach gewaschen. Zur Detektion wurde die Platte für 30 min bei RT mit Streptavidin-HRP in *reagent diluent* inkubiert und im Anschluss dreifach gewaschen. Das POD-Substrat wurde für 10 min hinzugefügt und die Reaktion dann mit 1,8 M Schwefelsäure gestoppt. Die Messung der optischen Dichte erfolgte im Anschluss bei 450 nm am *Infinite M200 PRO Reader*.

2.3.11 Proteolytische Proteinspaltung mittels TEV-Protease

Zur spezifischen Proteolyse eines Proteins wurde die Tobacco-Etch-Virus (TEV) Protease eingesetzt, welche an einer spezifischen Sequenz (TEV *site*) eine hydrolytische Spaltung bewirkt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde diese Methode vornehmlich zur Abspaltung von Fc-Fragmenten genutzt. Diese Fc-Fragmentabspaltung konnte einerseits mit Protein in ZKÜ oder extrahiertem, gereinigtem Protein erfolgen. Für Ersteres wurde 1 mL ZKÜ mit enthaltenem Protein über Nacht bei 4°C mit entsprechender Menge TEV-Protease inkubiert. Zur Überprüfung der Spaltung an der gewünschten Stelle wurde eine SDS-PAGE (s. Abschnitt 2.3.3) mit anschließendem Westernblot (s. Abschnitt 2.3.4) durchgeführt. Zur Spaltung von extrahiertem und gereinigtem Protein wurden ca. 10 µg Protein mit 20 µL TEV-Protease über Nacht bei 4°C inkubiert. Zur Entfernung des somit abgespaltenen Fc-Fragments und der TEV-Protease (besitzt Myc-Fragment) erfolgte am Folgetag eine Inkubation mit 30 µL Protein A Agarose und 30 µL Ni-NTA Agarose für 2 h bei 4°C. Die Agarose wurde vorher jeweils dreifach mit PBS äquilibriert. Nach der zweistündigen Inkubation konnte der Überstand entnommen werden, der jetzt nur das gereinigte und abgespaltene Protein enthalten sollte. Zur Überprüfung wurde mit den einzelnen Fraktionen ebenfalls eine SDS-PAGE mit Westernblotanalyse im Anschluss durchgeführt.

2.4 Zellbiologische Methoden

2.4.1 Kultivierung von eukaryotischen Suspensions- und adhärennten Zellen

Alle Zelllinien, die in Experimenten dieser Arbeit zur Anwendung kamen, sind in Abschnitt 2.1.3 beschrieben. Die Kultivierung erfolgte dabei in 10 cm Kulturschalen mit 10 mL DMEM^{+/+} (DMEM *High Glucose* 4,5 g/mL + 10% FCS + 1% Penicillin/Streptomycin) in einem CO₂ Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ in gesättigter Wasserdampf-atmosphäre. Zur Subkultivierung der Suspensionszellen Ba/F3-gp130, Ba/F3-gp130-IL6R, sowie Ba/F3-gp130-IL-12Rβ1-IL-23R wurden alle 3-4 Tage 1 µL einer Kulturschale in eine neue Schale mit frischem DMEM^{+/+} und 10 µL HIL-6 überführt. Die adhärennten CHO-K1 Zellen wurden zur Subkultivierung alle 3-4 Tage in einem Verhältnis von 1:100 auf eine neue Kulturschale überführt. Dafür wurde zunächst das Medium entfernt und die Zellen dreifach mit PBS gewaschen, um jegliche Reste des verbrauchten Mediums zu entfernen. Die Ablösung von der Kulturschale erfolgte durch Zugabe von 2 mL Trypsin/EDTA für 5 min bei 37°C. Die Zellen wurden dann in 2 mL DMEM^{+/+} aufgenommen und bei 1200 g für 5 min bei RT pelletiert. Nach Resuspension des Zellpellets in 1 mL DMEM^{+/+} wurden die Zellen auf eine neue 10 cm Kulturschale mit 10 mL DMEM^{+/+} überführt und im CO₂ Inkubator kultiviert.

2.4.2 Proliferationsassay

Alle Proliferationsassays in dieser Arbeit wurden mit Suspensionszellen durchgeführt und mithilfe des *Tecan Infinite M200 Pro Reader* ausgewertet. Zur Vorbereitung wurden die Zellen dreifach jeweils pelletiert (5 min, RT, 450 g) und anschließend mit 10 mL PBS gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Pellet in 5 mL DMEM^{+/+} Medium resuspendiert und die Zellzahl bestimmt. Dafür wurden 6 µL der Suspension mit 6 µL *Trypan Blue Dye* vermischt und davon 10 µL auf ein *TC10 System Counting Slides Dual Chamber* geladen, um die Zellzahl vom *TC10 Automated Cell Counter* bestimmen zu lassen. Die Zellzahl wurde dann auf $5 \times 10^3 / 100 \mu\text{L}$ eingestellt. Jeweils 100 µL dieser Zellsuspension wurden pro well einer 96-well Platte eingesetzt und je nach Experiment mit entsprechenden Zytokinen versetzt. Um eine Verunreinigung des Mediums und dadurch unspezifisch ausgelöste Proliferation auszuschließen wurde auch jeweils eine Negativkontrolle ohne Zytokinzugabe angesetzt. Für alle Experimente wurden von einer Kondition jeweils Triplikate angesetzt. Nach einer Inkubation von 72 h bei 37°C im Brutschrank wurde die Proliferation mithilfe des *CellTiter-Blue Cell Viability Assay Kit* bestimmt. Hierbei wird der Farbstoff Resazurin von metabolisch aktiven Zellen zum fluoreszierenden Resorufin umgesetzt. Zum Nachweis der metabolischen Aktivität wurde jedem well 20 µL des *CellTiter-Blue* hinzugefügt und die Fluoreszenz am *Tecan Infinite M200 Pro Reader* (Exzitation bei 560 nm, Emission bei 590 nm) gemessen. Zur Angabe der Proliferation wurden die Werte der Fluoreszenzmessung zum Zeitpunkt null von den höchsten noch messbaren Werten subtrahiert.

2.4.3 Stimulationsassay

Zur Untersuchung der Aktivierung von Signalwegen in verschiedenen Ba/F3-Zelllinien wurden Stimulationsassays durchgeführt. Um einen möglichen Einfluss von bereits im Medium enthaltenen Zytokinen auszuschließen, wurden die Zellen dreifach mit PBS gewaschen (5 min, RT, 450 g) und für 3 h in DMEM^{-/-} Medium gehalten. Da jegliche Signalwege in Abwesenheit von FCS nicht aktiviert werden können, wurden die Zellen somit vor der Stimulation in einen inaktiven Zustand überführt. Dann wurden die Zellen je nach Experiment mit entsprechenden Zytokinen für 15 min stimuliert. Um eine unspezifische Stimulation durch das Medium auszuschließen, wurde bei jedem Experiment auch eine Negativkontrolle ohne Zytokinstimulation angesetzt. Nach der Stimulation wurde die Zellsuspensionen zentrifugiert (5 min, RT, 1000 g), der Überstand verworfen und aus dem Pellet Zelllysate (s. Abschnitt 2.3.1) hergestellt. Diese Zelllysate wurden dann für die weiteren Analysen eingesetzt.

2.4.4 Transiente Transfektion von CHO-K1 Zellen

In Vorbereitung auf die transiente Transfektion wurden CHO-K1 Zellen mit einer Zellzahl von 2×10^6 in 10 mL DMEM^{+/+} auf eine 10 cm Kulturschale gegeben und wie in Abschnitt 2.4.1 beschrieben im Inkubator kultiviert. Zur Transfektion wurden dann am Folgetag jeweils 5 µg des gewünschten Plasmids in 1 mL DMEM^{-/-} und 10 µL *Turbofect* gegeben, kurz invertiert, und für 15 min im CO₂ Inkubator bei 37°C gehalten. Aus diesem Transfektionsgemisch wurden dann jeweils 1 mL auf die am Vortag präparierten Zellkulturschalen mit CHO-K1 Zellen gegeben. Nach 5 h wurden die Zellen in frisches DMEM^{+/+} Medium überführt, um toxische Effekte durch das *Turbofect* zu minimieren. Jeweils 24 h und 48 h nach Transfektion wurde Zellkulturüberstand für die nachfolgenden Experimente abgenommen, steril filtriert und anschließend in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

2.4.5 Stabile Transfektion von CHO-K1 Zellen

Zur stabilen Transfektion von CHO-K1 Zellen wurde diese wie in Abschnitt 2.4.4 beschrieben durchgeführt, jedoch erfolgte der Mediumswechsel nach 5 h mit DMEM^{+/+/low} IgG (DMEM *High Glucose* 4,5 g/mL + 10% *ultra-low* IgG FCS + 1% Penicillin/Streptomycin). Zur Selektion geeigneter Einzelklone wurden die Zellen 48 h nach Transfektion in einer Anzahl von 0,5 Zellen pro *well* in 100 µL DMEM^{+/+} + G-418 auf eine 96-*well* Platte ausgesät. Im Verlauf wurde beobachtet, in welchem *well* ein Einzelklon heranwächst. Sechs davon wurden nach weiteren 48 h bis 72 h ausgewählt und in 2 mL DMEM^{+/+} + G-418 auf eine 6-*well* Platte überführt. Es wurde erneut das Wachstum beobachtet und im Verlauf gut anwachsende Klone auf eine 10 cm Schale überführt. Außerdem wurden 500 µL Zellkulturüberstand zur Expressionsanalyse abgenommen (s. Abschnitt 2.4.7). Im Anschluss konnten geeignete Klone zur Kryokonservierung ausgewählt werden.

2.4.6 Kryokonservierung stabil transfizierter CHO-K1 Zellen

Zur Kryokonservierung stabil transfizierter CHO-K1 Zellen wurden diese von einer 10 cm Schale durch Zugabe von 2 mL Trypsin/EDTA abgelöst und diese Reaktion durch Zugabe von 2 mL DMEM^{+/+} wieder gestoppt. Es folgte eine Zentrifugation der nun abgelösten CHO-K1 Zellen (1500 g, 5 min, RT) und der Überstand wurde verworfen. Das Zellpellet wurde in 2 mL FCS + 10% DMSO resuspendiert und davon jeweils 1 mL in ein Kryoröhrchen überführt. Danach erfolgte eine Abkühlung dieser Kryoröhrchen bei -80°C in Isopropanol. Die Lagerung erfolgte ebenfalls bei -80°C.

2.4.7 Expressionsanalyse in CHO-K1 Zellen

Zur Expressionsanalyse der Proteine aus transient transfizierten CHO-K1 Zellen wurden sowohl Zellkulturüberstände (ZKÜ) als auch Zelllysate verwendet. Der ZKÜ wurde dafür wie in Abschnitt 2.4.4 beschrieben gewonnen und jeweils 80 µL davon wurden mit 20 µL 5x Lämmli Puffer kurz aufgeköcht. Zur Herstellung der Zelllysate wurden die CHO-K1 Zellen 48 h nach der transienten Transfektion (s. Abschnitt 2.4.4) von der Zellkulturschale in 1 mL PBS mit einem Zellschaber abgelöst und anschließend zentrifugiert (1000 g, 5 min, RT). Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 150 µL 5x Lämmli Puffer resuspendiert und kurz aufgeköcht. Die so präparierten ZKÜ und Zelllysate wurden dann mittels SDS-PAGE Analyse (s. Abschnitt 2.3.3) und anschließendem Westernblot (s. Abschnitt 2.3.4) auf ihren Proteingehalt hin untersucht.

2.4.8 Protein A Präzipitation zur Expressionsanalyse

Um in der Expressionsanalyse wie in Abschnitt 2.4.7 beschrieben auch eine Detektion kleiner Mengen an Protein zu ermöglichen, wurde eine Protein A Präzipitation durchgeführt. Hierzu wurden 50 µL Protein A Agarose dreifach mit 1 mL PBS gewaschen und im Anschluss mit 1 mL Zellkulturüberstand von transient transfizierten CHO-K1 Zellen über Nacht bei 4°C inkubiert. Am Folgetag wurde die Probe zentrifugiert (2000 g, 4°C, 3 min) und die Protein A *beads* im Sediment erneut dreifach mit PBS gewaschen. Dann wurden die *beads* für 10 min mit 100 µL 2,5x Lämmli Puffer kurz aufgeköcht. Im Anschluss erfolgte eine SDS-PAGE Analyse (s. Abschnitt 2.3.3) und ein Westernblot (s. Abschnitt 2.3.4).

3 Ergebnisse

3.1 Der Einzeldomänenantikörper VHH6

Der grundsätzliche Aufbau und die Eigenschaften von Einzeldomänenantikörpern (sdAb), wie dem VHH6, wurden bereits in Abschnitt 1.2.1 und 1.2.2 beschrieben. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die IL-6 abhängige Proliferation über eine STAT3 Phosphorylierung sowohl in einem *in vitro* System für IL-6 *trans-signaling* mit Ba/F3-gp130 Zellen, als auch IL-6 *classic-signaling* mit Ba/F3-gp130-IL6R Zellen, untersucht. Hierdurch sollte der Einfluss von VHH6 auf das IL-6 *trans-signaling* im Vergleich zum IL-6 *classic-signaling* untersucht werden. Die spezifische Bindung des VHH6 an ein junktionales Epitop legt dabei die Vermutung nahe, dass nur eine Wirkung auf das IL-6 *trans-signaling* ausgeübt wird.

3.1.1 VHH6 kann mittels zytosolischer Extraktion aus *E.coli* gewonnen werden

Zur Durchführung der oben genannten Experimente wurde zuerst eine Methode zur Gewinnung des sdAbs VHH6 aus *E.coli* etabliert. Hierzu wurde der VHH6 in den pET23a Vektor kloniert und erfolgreich in *E.coli* exprimiert. Die Aminosäuresequenz wurde aus der PDB (Protein Data Bank) Datei extrahiert (s. Abb. 6 A).

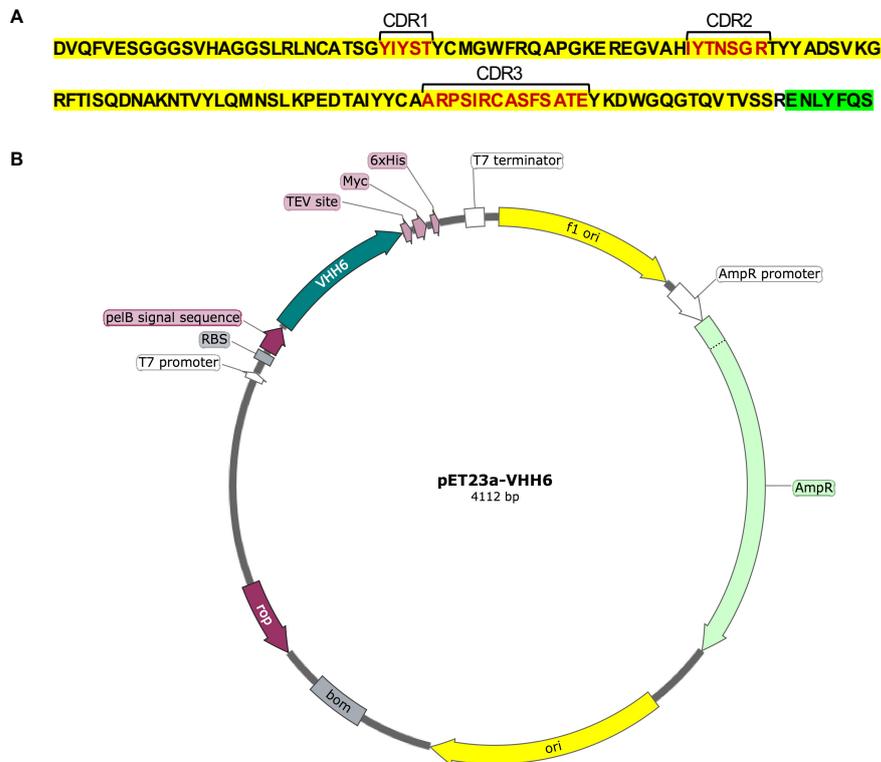


Abb. 6: VHH6 Aminosäuresequenz und Expressionsplasmid

(A) Aminosäuresequenz aus PDB Datei extrahiert. Sequenz des VHH6 gelb hinterlegt, Erkennungssequenz für TEV-Protease grün hinterlegt. CDR-Regionen entsprechend gekennzeichnet. (B) Schematischer Aufbau des Expressionsplasmids pET23a-VHH6, erstellt mit SnapGene Viewer.

Aus dieser Aminosäuresequenz konnte die DNA Sequenz generiert werden, welche bei GeneArt (Thermo Fisher Scientific) bestellt wurde (s. Abb. 6 A). Zur Klonierung wurde die cDNA des VHH6 in das Plasmid pET23a ligiert. Details zur Klonierungsstrategie sind in Abbildung 7 dargestellt.

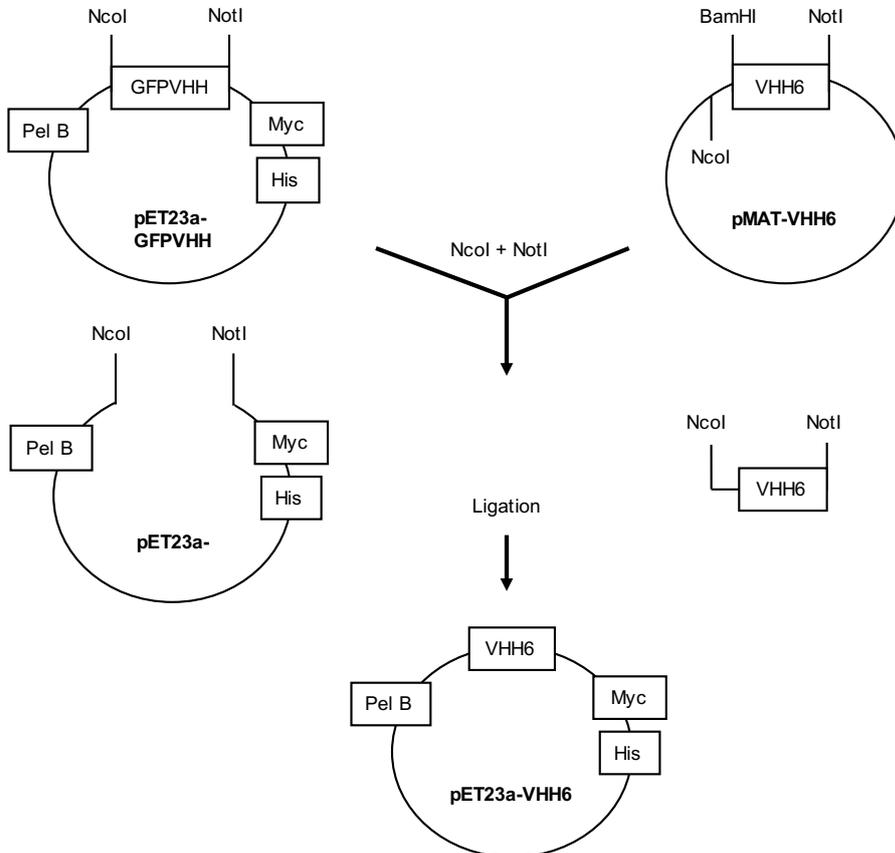


Abb. 7: Klonierungsstrategie für pET23a-VHH6

Es erfolgte ein präparativer Restriktionsverdau (s. Abschnitt 2.2.5) des Plasmids pET23a-GFPVHH-Myc-His und der cDNA, kodierend für den VHH6 mit der Erkennungssequenz für die TEV-Protease (pMAT-VHH6), mit den Endonukleasen NcoI und NotI. Die cDNA für den VHH6 wurde dann in das Plasmid pET23a zwischen die Pel B- und die Myc-Sequenz ligiert (s. Abschnitt 2.2.6).

Im Anschluss an die Klonierung erfolgte die Transformation des neuen Plasmids pET23a-VHH6 in chemisch kompetente *E.coli* Zellen (s. Abschnitt 2.2.7). Zur Auswahl eines erfolgreich transformierten *E.coli* Klon erfolgte ein *screening* mittels DNA Mini-Präparation (s. Abschnitt 2.2.8) und anschließender analytischer Endonukleasenrestriktion (s. Abschnitt 2.2.5). Von allen Proben mit Fragmenten in erwarteter Größe in der Gelelektrophorese, wurden drei zur DNA Midi-Präparation ausgewählt (s. Abschnitt 2.2.9). Zur Überprüfung der Klonierung wurde dann eine analytische Restriktion der Plasmid-DNA nach Midi-Präparation mit den Endonukleasen NotI und BglII durchgeführt (s. Abschnitt 2.2.5), dessen Ergebnis in Abbildung 8 dargestellt ist. Wie erwartet wurden Fragmente in einer Größe von 3537 bp und 575 bp in der Gelelektrophorese nachgewiesen, weshalb von einer erfolgreichen Klonierung aller drei Klone ausgegangen werden kann.

Zur Verifizierung der gewünschten Sequenz erfolgte eine Sanger-Sequenzierung des Plasmids mit dem *primer* T7 (s. Abschnitt 2.2.12).

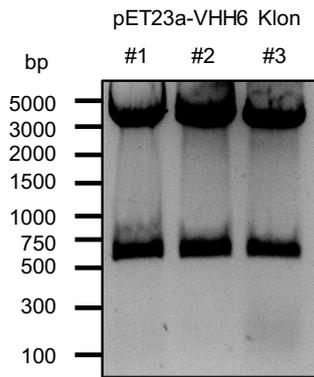


Abb. 8: Analytische Endonukleasenrestriktion von pET23a-VHH6

Die Restriktionsanalyse erfolgte wie in Abschnitt 2.2.5 beschrieben mit den Endonukleasen NotI und BglII nach einer DNA Midi-Präparation. Fragmente in einer Größe von 3537 bp und 575 bp erwartet.

Danach erfolgte die Transformation in *E.coli* Zellen (s. Abschnitt 2.2.7). Die Extraktion des Proteins aus *E.coli* Periplasma, - Zellkulturüberstand und - Zytosol wurden miteinander verglichen. Zur Durchführung s. Abschnitte 2.3.6, 2.3.7 und 2.3.8. Als Methode mit der höchsten Proteinextraktion erwies sich die Extraktion aus dem Zytosol mittels kommerziell erhältlicher Ni-NTA Agarose. Hier konnte aus einer 2 L *E.coli* Kultur 5 mg VHH6 gewonnen werden. Zum Nachweis des VHH6 wurde mit den Proben aus verschiedenen Schritten der Proteinextraktion eine SDS-PAGE (s. Abschnitt 2.3.3) mit anschließendem Westernblot (s. Abschnitt 2.3.4) durchgeführt. Mittels anschließender *Coomassie Brilliant Blue* Färbung (s. Abschnitt 2.3.5) wurden alle vorhandenen Proteine in den Proben nachgewiesen. Somit konnte die Reinheit, insbesondere der Elutionsfraktion, beurteilt werden (s. Abb. 9). Für alle folgenden Experimente wurde der VHH6 mittels Proteinextraktion aus dem Zytosol von *E.coli* gewonnen.

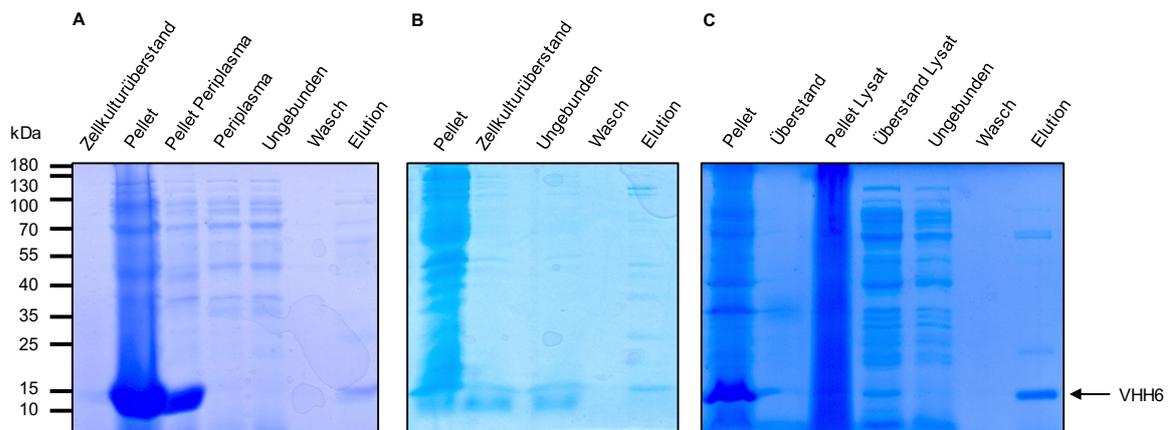


Abb. 9: SDS-PAGE Analyse mit *Coomassie Brilliant Blue* Färbung unterschiedlicher Verfahren zur Proteinextraktion des VHH6 aus *E.coli*

(A) Extraktion aus Periplasma, Ertrag: 315 µg aus 2 L *E.coli* Kultur in LB-Medium (s. Abschnitt 2.3.6).

(B) Extraktion aus Zellkulturüberstand, Ertrag: 320 µg aus 1 L *E.coli* Kultur in TYE-Medium (s. Abschnitt 2.3.7).

(C) Extraktion aus dem Zytosol, Ertrag: 5 mg aus 2 L *E.coli* Kultur in TYE-Medium (s. Abschnitt 2.3.8).

3.1.2 VHH6 verstärkt das IL-6 *trans-signaling*

In *in vitro* Experimenten mit *human umbilical vein endothelial cell* (HUVEC) Zellen wurde bereits gezeigt, dass der sdAb VHH6 den IL-6/sIL-6R Komplex stabilisiert und somit zu einer erhöhten STAT3 Phosphorylierung und vermehrter Expression proinflammatorischer Gene führt (Adams *et al.* 2017). Der Einfluss des VHH6 auf IL-6 *trans-signaling* wurde auch im Rahmen dieser Arbeit im Sinne eines Bestätigungsexperiments untersucht, wobei die Ergebnisse von Adams *et al.* reproduziert werden konnten. Zur Analyse der Dosis-Wirkungs-Beziehung auf die IL-6 *trans-signaling* induzierte Zellproliferation unter Zugabe von VHH6 wurden hier Proliferationsassays mit Ba/F3-gp130 Zellen durchgeführt (s. Abschnitte 3.1.1 und 2.4.2). Die Ba/F3-gp130 Zellen wurden hierzu mit 10 ng/mL IL-6, 10 ng/mL sIL-6R, sowie ansteigenden Konzentrationen an VHH6 (0,01 - 30 µg/mL) für 72 h bei 37°C inkubiert. Als Positivkontrolle wurde die Zellproliferation mit 10 ng/mL HIL-6 über das IL-6 *trans-signaling* induziert. Im Anschluss wurde die Zellproliferation mit dem Kit *CellTiter-Blue Cell Viability Assay* gemessen (s. Abschnitt 2.4.2).

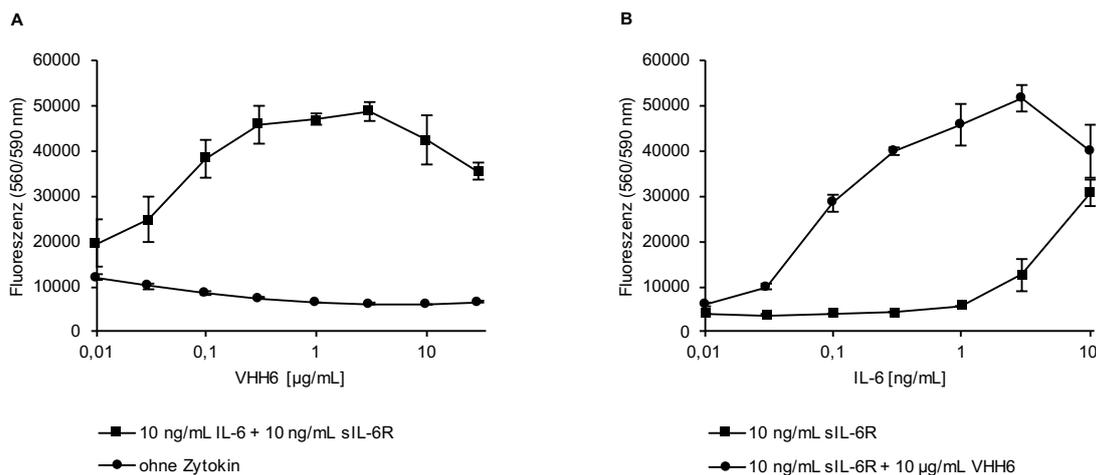


Abb. 10: VHH6 verstärkt konzentrationsabhängig die IL-6 *trans-signaling* abhängige Proliferation
(A) Proliferationsmessung von Ba/F3-gp130 Zellen (5×10^4 Zellen/mL), stimuliert mit 10 ng/mL IL-6 und 10 ng/mL sIL-6R, sowie ansteigender Konzentration an VHH6 (0,01 - 30 µg/mL). Um eine Kreuzreaktivität auszuschließen wurde auch Zellen ohne Zytokinstimulation die gleiche Menge an VHH6 zugesetzt. Auslesung nach 72 h mit dem *CellTiter-Blue Cell Viability Assay*. **(B)** Proliferationsmessung von Ba/F3-gp130 Zellen (5×10^4 Zellen/mL), stimuliert mit 10 ng/mL sIL-6R, sowie einer steigenden Konzentration an IL-6 (0,01 - 10 ng/mL), jeweils ohne und mit 10 µg/mL VHH6. Auslesung nach 72 h mit dem *CellTiter-Blue Cell Viability Assay*. Die Experimente A-B wurden jeweils n=3 mal durchgeführt, wobei hier ein repräsentatives Ergebnis gezeigt ist.

Es zeigte sich, dass mit steigender Konzentration an VHH6 die Proliferation über den IL-6/sIL-6R Komplex signifikant erhöht wurde. Bereits 300 ng/mL VHH6 waren ausreichend, um den IL-6/sIL-6R Komplex soweit zu stabilisieren, dass eine maximale Zellproliferation erreicht wurde (Baran *et al.* 2018). Die halbmaximale effektive Konzentration (EC_{50}) des VHH6 zur Proliferation der Ba/F3-gp130 Zellen konnte hier mit 50 ng/mL geschätzt werden (s. Abb. 10 A). Um eine unspezifische, durch VHH6 induzierte Proliferation auszuschließen, wurden auch Ba/F3-gp130 Zellen nur mit VHH6 (0,01 - 30 µg/ml) für 72 h bei 37°C inkubiert. Es zeigte sich, dass VHH6 allein keine Zellproliferation induziert (s. Abb. 10 A).

In einem weiteren Versuch wurden Ba/F3-gp130 Zellen mit 10 ng/mL sIL-6R und ansteigenden Konzentrationen an IL-6 (0,01 - 10 ng/mL) für 72 h bei 37°C inkubiert. Zusätzlich wurde einer Messreihe 10 µg/mL VHH6 beigefügt. Über VHH6 wurde die minimale Konzentration von IL-6, die nötig ist, um mit dem sIL-6R eine Proliferation zu induzieren, von 1 ng/mL auf 0,03 ng/mL IL-6 reduziert (Baran *et al.* 2018). Aus diesen Daten konnte die halbmaximale effektive Konzentration (EC₅₀) von IL-6 bei einer Konzentration von 10 ng/mL sIL-6R in Abhängigkeit von VHH6 errechnet werden. Die EC₅₀ ohne VHH6 lag bei 3 ng/mL IL-6 und verringerte sich durch Zugabe von 10 µg/mL VHH6 auf 0,1 ng/mL IL-6 (s. Abb. 10 B). Zur näheren molekularen Analyse der Wirkung des VHH6 auf die IL-6 *trans-signaling* abhängige Proliferation, wurde die Aktivierung des JAK/STAT-Signalwegs untersucht. Wie bereits in Abschnitt 1.1.1 beschrieben, induziert IL-6 sowohl über *classic*-, als auch *trans-signaling* die Aktivierung der Janus Kinase 1 (JAK 1), welche den Transkriptionsfaktor STAT3 phosphoryliert und somit aktiviert. Zum Nachweis der STAT3 Phosphorylierung (pSTAT3) wurden Stimulationsassays mit Ba/F3-gp130 Zellen durchgeführt (s. Abschnitt 2.4.3). Die Zellen wurden mit 10 ng/mL IL-6, verschiedenen Konzentrationen an sIL-6R (50, 100 oder 200 ng/mL) und in Abwesenheit oder mit 10 µg/mL VHH6 für 10 min stimuliert. Als Positivkontrolle für die Phosphorylierung von STAT3 über das IL-6 *trans-signaling* wurden die Zellen mit 10 ng/mL HIL-6 stimuliert. Unstimulierte Ba/F3-gp130 Zellen wurden als Negativkontrolle verwendet. Zelllysate wurden erstellt (s. Abschnitt 2.3.1) und jeweils 50 µg Gesamtprotein mittels SDS-PAGE und anschließendem Westernblot auf die Menge an pSTAT3 analysiert (s. Abschnitte 2.3.3 und 2.3.4). Zur Ladekontrolle wurde in der SDS-PAGE Analyse zusätzlich zum pSTAT3 auch das STAT3 Signal gemessen.

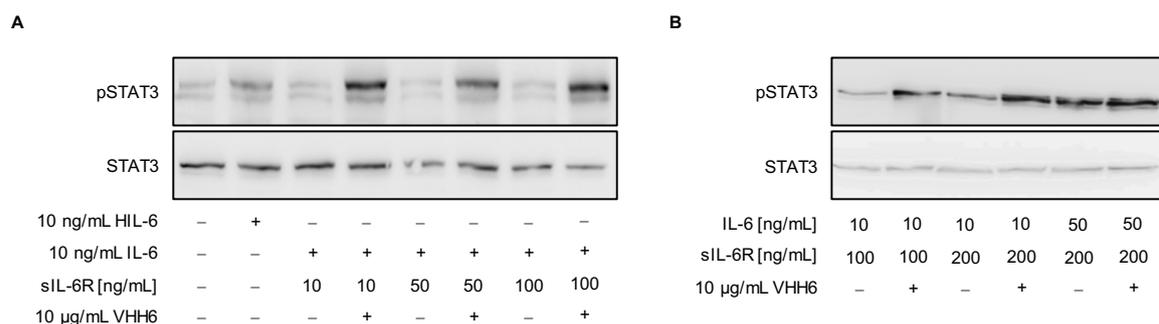


Abb. 11: VHH6 verstärkt via IL-6 *trans-signaling* die Aktivierung des JAK/STAT-Signalwegs

(A) 5x10⁵ Ba/F3-gp130 Zellen wurden mit 10 ng/mL IL-6 und steigenden Konzentrationen an sIL-6R kultiviert, jeweils ohne und mit 10 µg/mL VHH6. SDS-PAGE und Westernblot. Detektion von STAT3 mit Primär-AK α-STAT3 (124H6) und Sekundär-AK α-Maus IgG-POD; Detektion von pSTAT3 mit Primär-AK α-Phospho-STAT3 (Tyr705) (D3A7) XP und Sekundär-AK α-Kaninchen IgG-POD. (B) 5x10⁵ Ba/F3-gp130 Zellen wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen an IL-6 und sIL-6R kultiviert, jeweils ohne und mit 10 µg/mL VHH6. SDS-PAGE und Westernblot. Detektion von STAT3 mit Primär-AK α-STAT3 (124H6) und Sekundär-AK α-Maus IgG-POD; Detektion von pSTAT3 mit Primär-AK α-Phospho-STAT3 (Tyr705) (D3A7) XP und Sekundär-AK α-Kaninchen IgG-POD.

Die Experimente A-B wurden jeweils n=3 mal durchgeführt, wobei hier ein repräsentatives Ergebnis gezeigt ist.

In der Negativkontrolle wurde kein pSTAT3 Signal detektiert, wohingegen in der Positivkontrolle mit 10 ng/mL IL-6 Stimulation eine erhöhte Menge an pSTAT3 detektiert wurde. Bei der Zellstimulation mit 10 ng/mL IL-6 und 10 ng/mL sIL-6R, sowie höheren Konzentrationen an sIL-6R, wurde keine Phosphorylierung von STAT3 beobachtet. Diese wurde erst durch Zugabe von 10 µg/mL VHH6 ab einer Konzentration von 10 ng/mL IL-6 und 10 ng/mL sIL-6R festgestellt (s. Abb. 11 A). Erst ab einer Konzentration von 50 ng/mL IL-6 und 200 ng/mL sIL-6R zeigte sich auch ohne den stabilisierenden Effekt des VHH6 die Phosphorylierung von STAT3 durch Bindung des IL-6/sIL-6R Komplexes an gp130 (s. Abb. 11 B) (Baran *et al.* 2018). Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die VHH6 vermittelte Stabilisierung des IL-6/sIL-6R Komplexes zu einer stärkeren Aktivierung des JAK/STAT-Signalwegs führt. Dies konnte sowohl über eine erhöhte IL-6 *trans-signaling* abhängige Zellproliferation, als auch einer vermehrten Phosphorylierung von STAT3 gezeigt werden (Baran *et al.* 2018).

3.1.3 VHH6 hat keinen Einfluss auf das IL-6 *classic-signaling*

Da der sdAb VHH6 an ein diskontinuierliches Epitop bindet, welches erst durch die Bindung von IL-6 an den sIL-6R entsteht, liegt die Vermutung nahe, dass dieser sdAb keine Wirkung auf das IL-6 *classic-signaling* haben würde. Um dies zu untersuchen, wurde die Proliferationsdynamik von Ba/F3-gp130-IL-6R Zellen beobachtet, die hier ein *in vitro* System zur Modellierung des IL-6 *classic-signaling*s darstellen. Die Proliferation wird durch Zugabe von IL-6 erreicht, das nach Bindung an den membranständigen IL-6R im Sinne des *classic-signaling*s zu einer Rekrutierung von gp130 Molekülen führt, die dann über den JAK/STAT-Weg Zielgene induzieren, welche die Proliferation steuern (s. Abschnitt 1.1.1). Um einen möglichen Effekt des VHH6 auf das IL-6 *classic-signaling* zu untersuchen, wurden Proliferationsassays mit Ba/F3-gp130-IL-6R Zellen durchgeführt die mit steigenden Konzentrationen an IL-6 (0,005 - 10 ng/mL) stimuliert wurden, sowohl mit 10 µg/mL VHH6, als auch ohne VHH6. Als Negativkontrolle wurde den Zellen nur VHH6 ohne IL-6 zugegeben, was keine Proliferation bewirkte. Die Proliferation nahm dabei mit steigender IL-6 Konzentration in gleichem Ausmaß zu, wohl mit 10 µg/mL VHH6, als auch ohne VHH6 (s. Abb. 12 A) (Baran *et al.* 2018). Um auch auf molekularer Ebene die Ergebnisse der Wirkung des VHH6 auf das IL-6 *trans-* mit dem *classic-signaling* vergleichen zu können, wurde hier ebenfalls das Ausmaß der Phosphorylierung von STAT3 in Ba/F3-gp130-IL-6R Zellen über *classic-signaling* bestimmt. Dazu wurden Stimulationsassays durchgeführt (s. Abschnitt 2.4.3), wobei die Ba/F3-gp130-IL-6R Zellen für 10 min mit verschiedenen Konzentrationen an IL-6 (0,1, 1, 10, 50 oder 200 ng/mL) stimuliert wurden. Ein Teil der Zellen erhielt zusätzlich zum IL-6 10 µg/mL VHH6.

Ba/F3-gp130-IL-6R Zellen ohne Zytokinstimulation wurden als Negativkontrolle verwendet. Zelllysate wurden erstellt und jeweils 50 µg Protein mittels SDS-PAGE und Westernblot auf die Menge an pSTAT3 analysiert (s. Abschnitte 2.3.1, 2.3.3 und 2.3.4). Der Nachweis von STAT3 wurde als Ladekontrolle verwendet. Das Ausmaß der Phosphorylierung war dabei direkt abhängig von der Menge an zugegebenem IL-6. Ab 10 ng/mL IL-6 wurde eine maximale Phosphorylierung detektiert. Ob dem Ansatz zusätzlich VHH6 zugegeben wurde oder nicht hatte dabei keinen Einfluss (s. Abb. 12 B) (Baran *et al.* 2018).

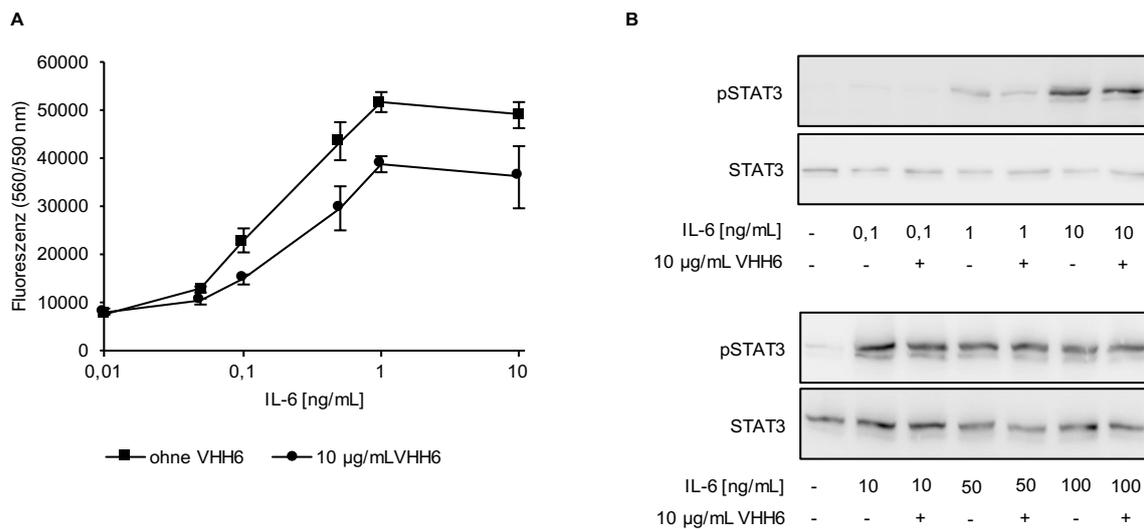


Abb. 12: VHH6 hat keinen Einfluss auf die IL-6 *classic-signaling* abhängige Proliferation von Ba/F3-gp130-IL-6R Zellen.

(A) Proliferationsmessung von Ba/F3-gp130-IL-6R Zellen (5×10^4 Zellen/mL), stimuliert mit einer steigender Konzentration an IL-6 (0,01-10 ng/mL), jeweils ohne und mit 10 µg/mL VHH6. Auslesung nach 72 h mit dem *CellTiter-Blue Cell Viability Assay*. (B) 5×10^5 Ba/F3-gp130-IL-6R Zellen wurden mit steigenden Konzentrationen an IL-6 kultiviert, jeweils ohne und mit 10 µg/mL VHH6 dazu. Als Negativkontrolle diente ein Ansatz ohne Zytokinstimulation. SDS-PAGE und Westernblot. Detektion STAT3 mit Primär-AK α -STAT3 (124H6) und Sekundär-AK α -Maus IgG-POD; Detektion pSTAT3 mit Primär-AK α -Phospho-STAT3 (Tyr705) (D3A7) XP und Sekundär-AK α -Kaninchen IgG-POD.

Die Experimente A-B wurden jeweils n=3 mal durchgeführt, wobei hier ein repräsentatives Ergebnis gezeigt ist.

Durch diese Experimente konnte ein Einfluss des sdAbs VHH6 auf das IL-6 *classic-signaling* ausgeschlossen werden. Die Phosphorylierung von STAT3 und die damit verbundene Zellproliferation über IL-6 *classic-signaling* wurden durch den VHH6 weder gefördert noch behindert (Baran *et al.* 2018). Dies lässt darauf schließen, dass der VHH6 aufgrund seiner Spezifität für ein junktionales, transientes Epitop des IL-6/sIL-6R Komplexes nicht an den Komplex aus IL-6 und membranständigem IL-6R bindet oder dass die Aktivierung des membranständigen Rezeptors sich nicht beeinflussen lässt, da sich auf der Membran gp130 in räumlicher Nähe zum IL-6R befindet und es dadurch nach Bindung von IL-6 an den IL-6R zu einer sofortigen Rekrutierung von gp130 kommt. Die räumliche Nähe des IL-6R und gp130 führt möglicherweise zu einer sehr effizienten und vor allem schnellen Aktivierung der Signaltransduktion, die eine Stabilisierung des Gleichgewichts von IL-6/IL-6R erschwert. Die Spezifität für das IL-6 *trans-signaling* macht den sdAb VHH6 allerdings zu einem sehr interessanten Modulator des IL-6 *trans-signaling*s.

3.1.4 Detektion der maximalen Menge an IL-6/sIL-6R Komplex im Komplex-ELISA mithilfe des VHH6

Die stabilisierende Wirkung des VHH6 auf den IL-6/sIL-6R Komplex konnte genutzt werden, um die Sensitivität eines kommerziell erhältlichen Komplex-ELISA (*Human IL-6/IL-6Ra Complex DuoSet ELISA*, R&D Systems) zu erhöhen. Es konnte in der Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass der Komplex aus IL-6 und sIL-6R nicht sehr stabil ist und dementsprechend unter Gleichgewichtsbedingungen nur geringe Mengen Komplex aber große Anteile freier Komponenten vorliegen (Baran *et al.* 2018). Um die maximal mögliche Menge des IL-6/sIL-6R Komplexes im ELISA zu bestimmen wurde VHH6 als stabilisierendes Protein eingesetzt. Die folgenden Experimente wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Paul Baran aus dem Institut für Biochemie und Molekularbiologie II an der Heinrich-Heine-Universität durchgeführt, der sich im Rahmen seiner Dissertation unter anderem mit der exakten Quantifizierung von IL-6/sIL-6R Komplexen auseinandergesetzt hat.

Im Rahmen dieser Arbeit stellte sich die Frage nach der Detektion der maximal möglichen Menge an IL-6/sIL-6R Komplex. Die Durchführung der folgenden ELISA Experimente erfolgte wie in Abschnitt 2.3.10 beschrieben. Zuerst wurde eine Kreuzreaktivität des VHH6 mit dem Komplex ELISA Kit ausgeschlossen, indem der VHH6 (1 µg/mL oder 10 µg/mL) sowohl alleine, als auch in Kombination mit nur IL-6 (50 ng/mL) oder nur sIL-6R (50 ng/mL) aufgetragen wurde. Unter keiner dieser Bedingungen wurde ein Signal detektiert. Im Vergleich dazu wurde ein deutlicher Signalanstieg jeweils unter Zugabe des VHH6 detektiert (s. Abb. 13).

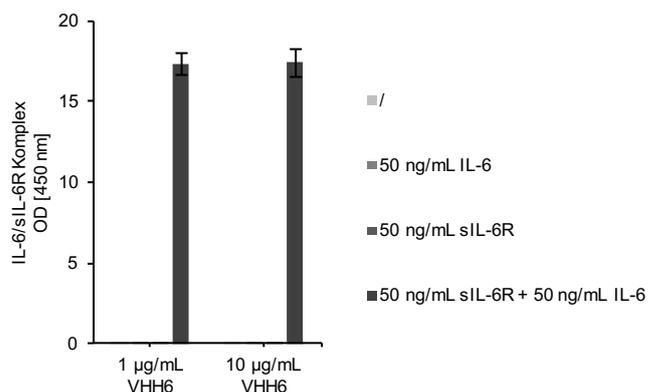


Abb. 13: Ausschluss einer Kreuzreaktivität von VHH6 mit dem Kit *Human IL-6/IL-6Ra Complex DuoSet ELISA* (R&D Systems)

Analyse der Menge an detektierbarem IL-6/sIL-6R Komplex mittels ELISA bei Inkubation (1 h bei RT) ausschließlich mit VHH6 (1 µg/mL oder 10 µg/mL), sowie VHH6 und 50 ng/mL IL-6 oder VHH6 und 50 ng/mL sIL-6R. Nur bei der Inkubation von VHH6 (1 µg/mL oder 10 µg/mL) zusammen mit IL-6 und sIL-6R wurde ein Signal detektiert.

Das Experiment wurde n=3 mal durchgeführt, wobei hier ein repräsentatives Ergebnis gezeigt ist.

In einem weiteren Experiment wurde untersucht, ob der VHH6 die Menge an detektierbarem IL-6/sIL-6R Komplex erhöht, sowie die optimale VHH6 Konzentration zur Stabilisierung und Detektion des IL-6/sIL-6R Komplexes im ELISA bestimmt.

Dazu wurden im ELISA 50 ng/mL sIL-6R mit verschiedenen Konzentrationen an IL-6 (5 - 50 ng/mL) und VHH6 (0,1 - 10 µg/mL) für 1 h bei RT inkubiert und im Anschluss analysiert. Zur Kontrolle wurde eine Reihe ohne Zugabe des VHH6 angesetzt. Unabhängig von der Konzentration an VHH6 wurde hier immer eine höhere Menge an IL-6/sIL-6R Komplex detektiert als in der Kontrolle ohne VHH6. Eine maximale Stabilisierung erfolgte dabei ab einer VHH6 Konzentration von 0,5 µg/mL. Dies entspricht einem 30fachen Überschuss an VHH6 (s. Abb. 14 A). Außerdem wurde untersucht, inwieweit VHH6 die nötige Menge an IL-6 zur Detektion von IL-6/sIL-6R Komplex im ELISA verringern kann. Dazu wurden 50 ng/mL sIL-6R mit verschiedenen Mengen IL-6 (0,1 - 1 ng/mL) für 1 h bei RT inkubiert, jeweils ohne oder mit VHH6 (0,1 oder 0,5 µg/mL). Anschließend wurde die Menge an Komplex mittels ELISA quantifiziert, wobei in den Ansätzen ohne VHH6 bei solchen niedrigen IL-6 Konzentrationen kein Signal gemessen werden konnte. Durch Zugabe von VHH6 hingegen war eine Detektion bei allen IL-6 Konzentrationen möglich. Die Detektion der IL-6/sIL-6R Komplexe erfolgte dabei deutlich stärker wenn 0,5 µg/mL VHH6 anstatt 0,1 µg/mL hinzugegeben wurden (s. Abb. 14 B) (Baran *et al.* 2018).

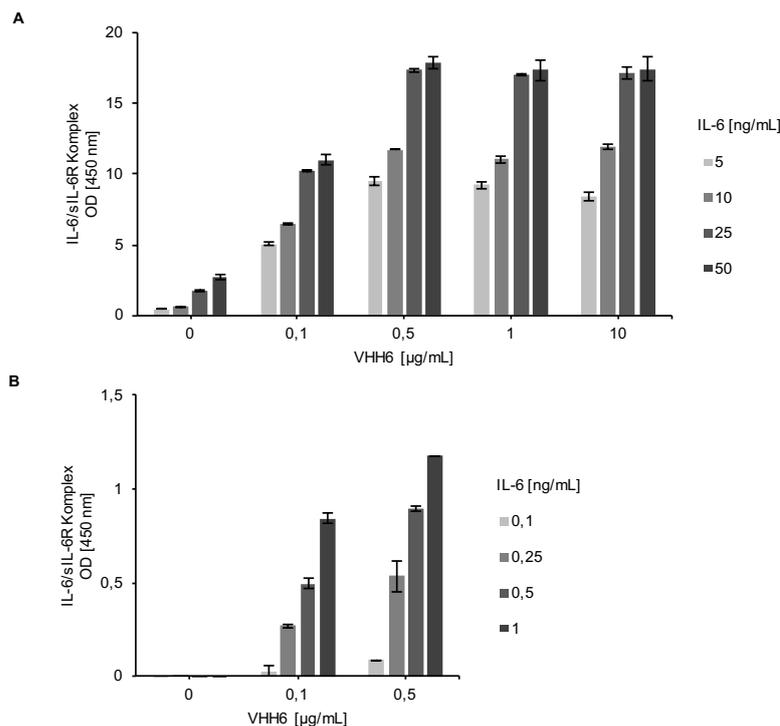


Abb. 14: VHH6 erhöht die nachweisbare Menge an IL-6/sIL-6R Komplex im Komplex-ELISA.

(A) Analyse der Menge an IL-6/sIL-6R Komplex mittels ELISA bei unterschiedlichen Konditionen von IL-6 (5 - 50 ng/mL) mit 50 ng/mL sIL-6R, bei ansteigenden Konzentrationen an VHH6 (0 - 10 µg/mL). Die Inkubation erfolgte für 1 h bei RT. (B) Analyse der Menge an IL-6/sIL-6R Komplex mittels ELISA bei unterschiedlichen Konditionen von IL-6 (0,1 - 1 ng/mL) mit 50 ng/mL sIL-6R, bei ansteigenden Konzentrationen an VHH6 (0 - 0,5 µg/mL). Die Inkubation erfolgte für 1 h bei RT. Zur Durchführung von (A) und (B) s. Abschnitt 2.3.10. Die Experimente A-B wurden jeweils n=3 mal durchgeführt, wobei hier ein repräsentatives Ergebnis gezeigt ist.

Der sdAb VHH6 erhöht also deutlich die Sensitivität und verbessert somit die Nachweisgrenze der Menge an detektierbarem IL-6/sIL-6R Komplex im ELISA Kit *Human IL-6/IL-6Rα Complex DuoSet* von R&D Systems (Baran *et al.* 2018).

3.2 Inhibierung des IL-6 Signalwegs

Sowohl zur generellen Inhibierung der IL-6 Signalwege, als auch der selektiven Inhibierung des IL-6 *trans-signaling*, wurden bereits verschiedene Moleküle beschrieben, welche sich hinsichtlich ihres Aufbaus und ihrer genauen Wirkung unterscheiden.

Diese Moleküle wurden bereits in Abschnitt 1.1.3 beschrieben. Moleküle, die auf der Struktur des gp130 aufbauen, unterscheiden sich dabei je nach Aufbau stark in ihrer Größe, inhibitorischen Kapazität, sowie der Spezifität für das IL-6 *signaling* (s. Tabelle 16). Eine schematische Darstellung dieser Moleküle ist in Abbildung 3 (Abschnitt 1.1.3) zu sehen.

Variante	sgp130Fc	sgp130-E10Fc	sgp130his	mini-gp130-ELP	gp130-RAPS
Molekulargewicht [kDa]	186	140	67	75	35
IC ₅₀ [ng/mL]	20	n.a.	200	n.a.	n.a.
IC ₅₀ [nM]	0,067	67	0,4	n.a.	n.a.
Inhibitorische Wirkungsbreite [ng/mL]	20-500	1000	200-500	10000	500-1000
Quelle	Jostock <i>et al.</i> 2001; Garbers <i>et al.</i> 2011; Wolf <i>et al.</i> 2016	Sommer <i>et al.</i> 2014	Jostock <i>et al.</i> 2001	Lin <i>et al.</i> 2006	Tanaka <i>et al.</i> 2000; Richards <i>et al.</i> 2006

Tabelle 16: Vergleich der Wirkstärke verschiedener Inhibitoren des IL-6 Signalwegs

Aus den zuvor gezeigten Ergebnissen bezüglich der Spezifität des sdAbs VHH6 entwickelte sich die Idee, diese Eigenschaft zur spezifischen Inhibierung des IL-6 *trans-signaling* zu nutzen. Der sdAb VHH6, der eigentlich über die Bindung an ein junktionales Epitop des IL-6/sIL-6R Komplexes das IL-6 *trans-signaling* fördert, wurde hier an Domänen des sgp130Fc Moleküls gekoppelt, um so möglicherweise durch Vermittlung von Aviditätseffekten das inhibitorische Potential von sgp130 zu verbessern und eine IL-6 *trans-signaling* Spezifität zu erzeugen.

3.2.1 Generierung neuartiger sgp130-VHH6 Fusionsproteine

Im Rahmen dieser Arbeit wurden drei verschiedene Varianten eines sgp130-VHH6 Fusionsproteins generiert und hinsichtlich ihrer Wirkung auf den IL-6 Signalweg untersucht. Alle drei Varianten bestehen dabei aus VHH6, der einerseits über einen flexiblen Peptidlinker (100 Å) mit Domänen des sgp130 und andererseits über einen *linker* mit integrierter Erkennungssequenz für die TEV-Protease an ein Fc-Fragment verbunden ist. Die Varianten unterscheiden sich dabei in der Anzahl der sgp130 Domänen (s. Abb. 15).

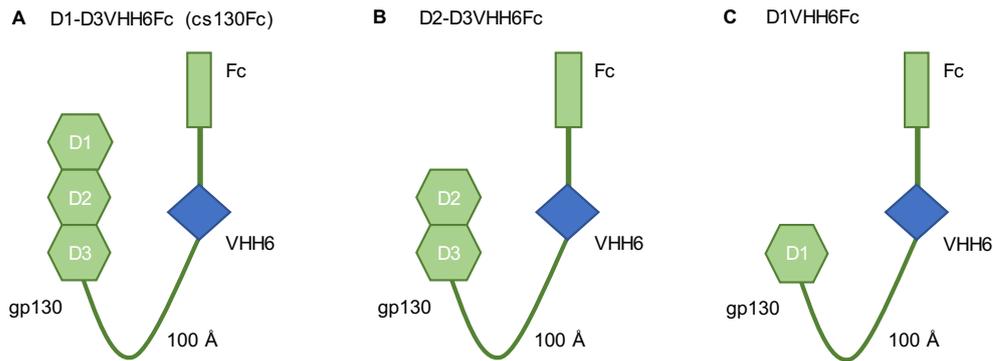


Abb. 15: Schematischer Aufbau der drei neuartigen sgp130-VHH6 Fusionsproteine

(A) Das Molekül D1-D3VHH6Fc (cs130Fc) besteht aus den extrazellulären gp130 Domänen D1-D3, die über einen 100 Å Peptidlinker mit dem VHH6 verbunden sind, der wiederum über einen *linker* mit der Erkennungssequenz für die TEV Protease an ein Fc-Teil gebunden ist. Über das Fc-Teil erfolgt eine Dimerisierung. Das Dimer hat eine Molekülgröße von 157 kDa. (B) Das Molekül D2-D3VHH6Fc ist analog zum D1-D3VHH6Fc (cs130Fc) aufgebaut und hat als Dimer eine Molekülgröße von 128 kDa. (C) Das Molekül D1VHH6Fc ist analog zum D1-D3VHH6Fc (cs130Fc) aufgebaut und hat als Dimer eine Größe von 108 kDa.

Eine detaillierte Darstellung der Klonierungsstrategie ist in Abbildung 16 und 17 zu finden. In einem ersten Schritt wurde das Plasmid pMAT-IL-6-VHH6 kloniert. Dazu wurde aus dem Ausgangsplasmid pMAT-nativesHIL-6 mittels präparativer Endonukleasenrestriktion mit BamHI und PmlI die Sequenz für den IL-6R abgespalten (s. Abschnitt 2.2.5). Die VHH6 cDNA Sequenz wurde durch Restriktion mit BamHI und EcoRV aus dem Plasmid pMAT-VHH6, welches bei GeneArt (Thermo Fisher Scientific) bestellt wurde, gewonnen. Dann erfolgte eine Ligation der VHH6 cDNA hinter die IL-6 Sequenz in das pMAT-IL-6 Plasmid (s. Abschnitt 2.2.6). Durch eine präparative Endonukleasenrestriktion dieses Plasmids mit HindIII und NotI konnte die Sequenz IL-6-VHH6 gewonnen werden. Das Plasmid pcDNA3.1-HIL-6-Fc wurde ebenfalls mit den Restriktionsenzymen HindIII und NotI hydrolysiert. Im Anschluss wurde dann die IL-6-VHH6 Sequenz in dieses Plasmid vor die Fc-Sequenz ligiert. Das Ergebnis der analytischen Endonukleasenrestriktion des klonierten Plasmids pcDNA3.1-IL-6-VHH6-Fc mit BamHI ist in Abbildung 18 A dargestellt.

Zur weiteren Klonierung wurden jeweils die gp130 Domänen D1-D3, D2-D3 und D1 mittels PCR amplifiziert und in den Vektor pBluescript ligiert (s. Abschnitt 2.2.6). Im Anschluss an diese Ligation erfolgte jeweils eine präparative Endonukleasenrestriktion mit HindIII und XhoI, sowohl der gp130 Domänen im pBluescript, als auch dem zuvor klonierten Plasmid pcDNA3.1-IL-6-VHH6-Fc (s. Abb. 17). Nach der jeweiligen Ligation von D1-D3, D2-D3 oder D1 vor die VHH6 Sequenz in das Plasmid pcDNA3.1-VHH6-Fc, erfolgte die Transformation in *E. coli XL1 blue* mit anschließender DNA Mini- und Midi-Präparation (s. Abschnitte 2.2.7, 2.2.8 und 2.2.9). Das Ergebnis der im Anschluss durchgeführten analytischen Endonukleasenrestriktion ist in Abbildung 18 B-D dargestellt.

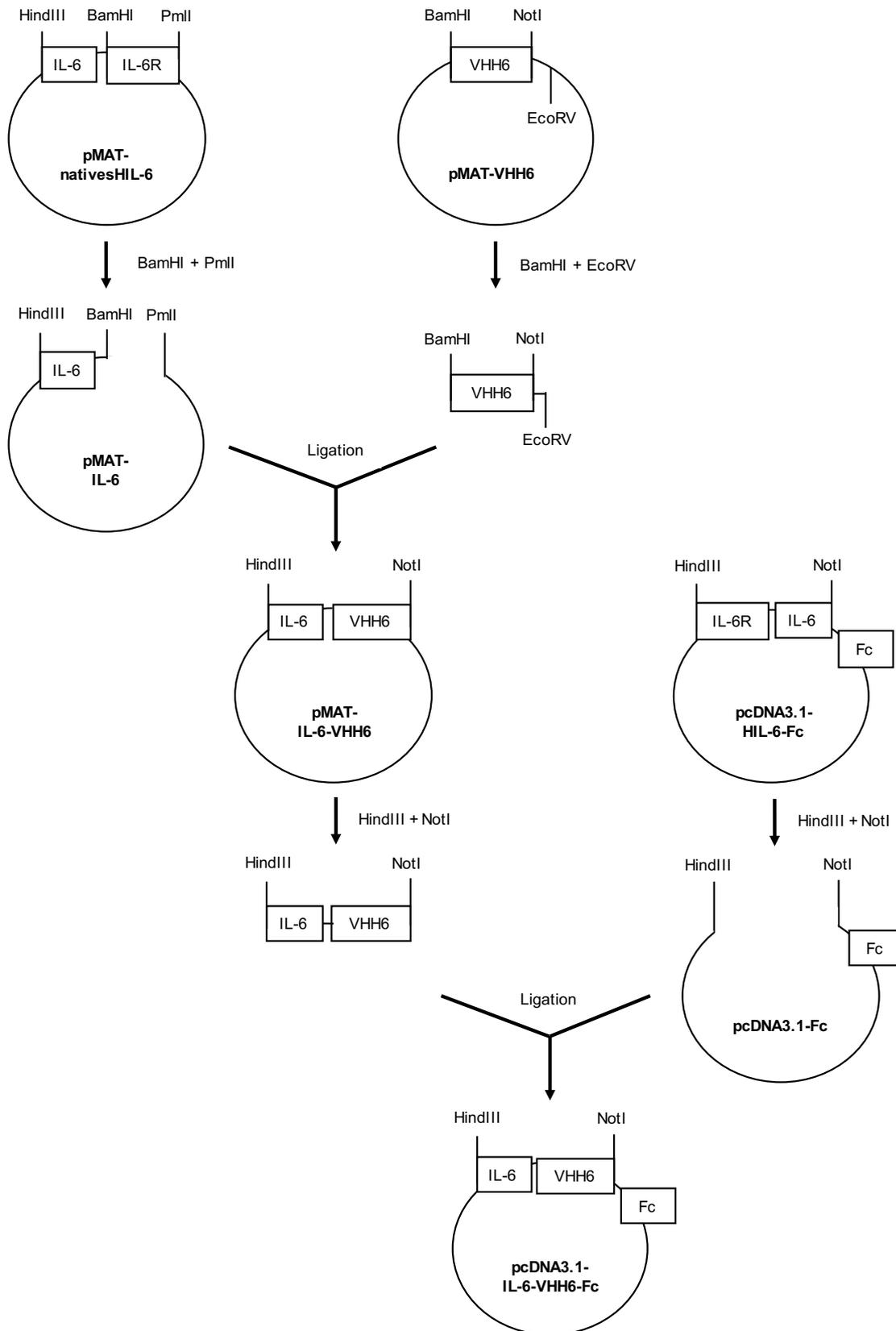


Abb. 16: Klonierungsstrategie für sgp130-VHH6 Fusionsproteine

Es erfolgte ein präparativer Restriktionsverdau (s. Abschnitt 2.2.5) der Plasmide pMAT-nativesHIL-6 und pMAT-VHH6 mit den Endonukleasen BamHI und PmlI. Die cDNA für den VHH6 wurde dann in das Plasmid pMAT-nativesHIL-6 hinter die IL-6 Sequenz ligiert (s. Abschnitt 2.2.6). Dieses Plasmid pMAT-IL-6-VHH6 und das Plasmid pcDNA3.1-HIL-6-Fc wurden dann mit den Restriktionsenzymen HindIII und NotI präparativ hydrolysiert. IL-6-VHH6 wurde dann in das Plasmid pcDNA3.1 vor die Fc-Sequenz ligiert.

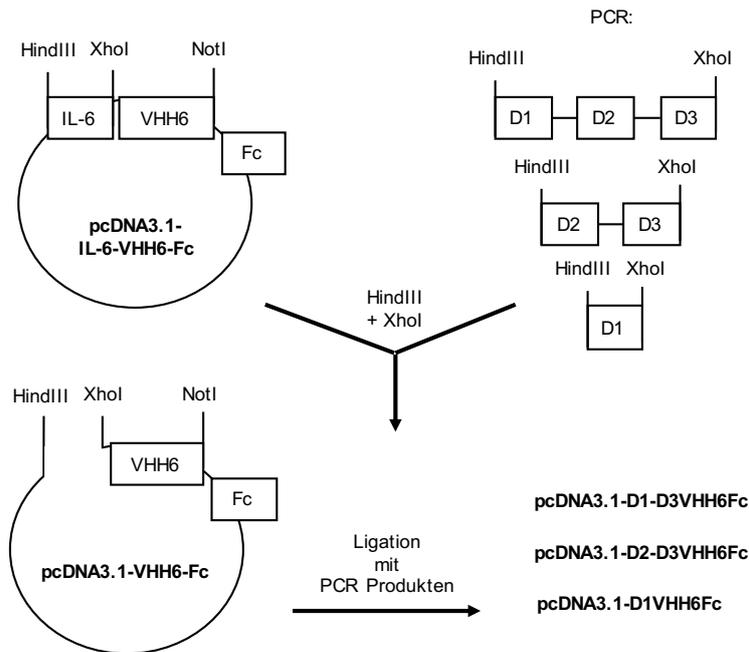


Abb. 17: Klonierungsstrategie für sgp130-VHH6 Fusionsproteine

Es erfolgte ein präparativer Restriktionsverdau (s. Abschnitt 2.2.5) des Plasmids pcDNA3.1-IL-6-VHH6-Fc und den PCR-Produkten D1-D3, D2-D3 und D1 in pBluescript mit den Endonukleasen HindIII und XhoI. Die sgp130 Domänen D1-D3, D2-D3 und D1 wurden dann jeweils in das Plasmid pcDNA3.1-VHH6-Fc vor die VHH6 Sequenz ligiert (s. Abschnitt 2.2.6).

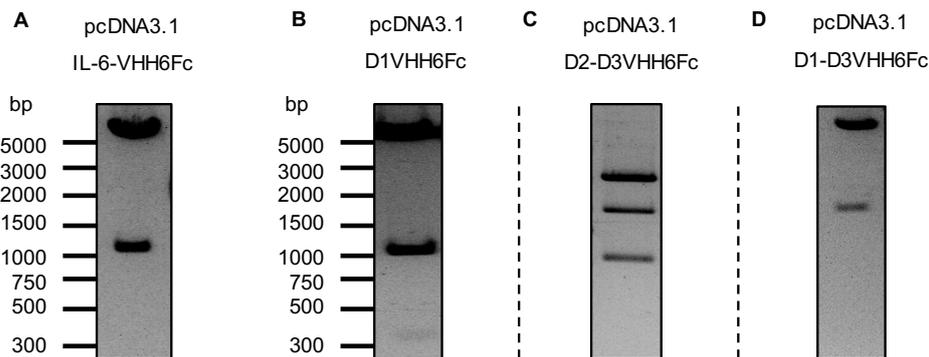


Abb. 18: Analytische Endonukleasenrestriktion von pcDNA3.1-IL-6-VHH6-Fc und pcDNA3.1-D1-D3/D2-D3/D1-VHH6-Fc

(A) Die analytische Restriktionsanalyse erfolgte wie in Abschnitt 2.2.5 beschrieben mit der Endonuklease BamHI, Fragmente in einer Größe von 1113 und 6110 bp erwartet. (B) Analytischer Restriktionsverdau von pcDNA3.1-D1-VHH6-Fc mit BamHI, Fragmente in einer Größe von 376, 1113 und 5467 bp erwartet. (C) Analytischer Restriktionsverdau von pcDNA3.1-D2-D3-VHH6-Fc mit PvuII, Fragmente in einer Größe von 1953, 1096, 1069 und 3075 bp erwartet. (D) Analytischer Restriktionsverdau von pcDNA3.1-D1-D3-VHH6-Fc mit EcoRV, Fragmente in einer Größe von 1680 und 5888 bp erwartet.

Die Plasmide wurden dann in CHO-K1 Zellen transient transfiziert. Die Transfektion erfolgte wie in Abschnitt 2.4.4 beschrieben. Zum Nachweis einer erfolgreichen Transfektion wurden Zellkulturüberstand (ZKÜ) und Zelllysate (s. Abschnitt 2.3.1) auf die gewünschten Proteine hin untersucht. Es erfolgte eine SDS-PAGE Analyse (s. Abschnitt 2.3.3) mit anschließendem Westernblot (s. Abschnitt 2.3.4). Hier zeigte sich, dass alle drei Varianten sowohl in das Zellkulturmedium sezerniert wurden, als auch im Zelllysate vorhanden waren, wobei die Expression von D1VHH6Fc und D1-D3VHH6Fc (cs130Fc) stärker ausfielen.

Zur besseren Darstellung wurde mit den ZKÜ eine Protein A Präzipitation (s. Abschnitt 2.4.8) mit anschließender SDS-PAGE Analyse und einem Westernblot durchgeführt. Hier zeigte sich, dass das Fusionsprotein D1-D3VHH6Fc (cs130Fc) in deutlich höherer Menge im ZKÜ vorhanden war als die anderen beiden Varianten (s. Abb. 19).

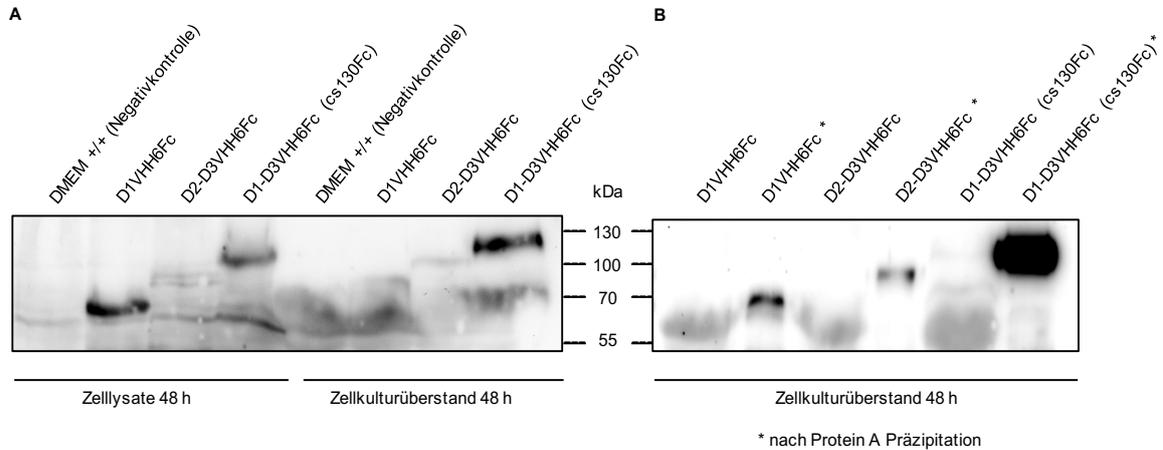


Abb. 19: sgp130-VHH6 Fusionsproteine werden in CHO-K1 Zellen exprimiert

(A) Die Proteine aus ZKÜ oder Zelllysate transient transfizierter CHO-K1 Zellen jeweils mit den Plasmiden der sgp130-VHH6 Fusionsproteine wurden mittels SDS-PAGE und Westernblotanalyse nachgewiesen. Detektion der Proteine mit Antikörper α -humaner Fc POD. Die Proteine konnten sowohl in den Zelllysaten als auch im ZKÜ nachgewiesen werden. (B) Mittels Protein A Präzipitation von 1 mL ZKÜ mit 50 μ g Protein A Agarose aus transient transfizierten CHO-K1 Zellen mit den Plasmiden der sgp130-VHH6 Fusionsproteine konnten diese für den Nachweis mittels SDS-PAGE und Westernblot angereichert werden. Detektion der Proteine mit Antikörper α -humaner Fc POD. Es zeigte sich, dass das Protein D1-D3VHH6Fc (cs130Fc) in größerer Menge als die anderen beiden Fusionsproteine im ZKÜ vorhanden ist.

Zur Durchführung von Experimenten mit definierten Mengen des Moleküls D1-D3VHH6Fc (cs130Fc) wurde das Protein aus dem Zellkulturüberstand extrahiert. Die Proteinextraktion erfolgte mittels Affinitätschromatographie (s. Abschnitt 2.3.9).

3.2.2 Wirkung der sgp130-VHH6 Fusionsproteine auf das IL-6 *trans-signaling*

Nach erfolgreicher Expression in CHO-K1 Zellen und Proteinextraktion aus transient transfizierten CHO-K1 Zellen wurden die drei neuen Fusionsproteine bezüglich ihrer Wirkung auf den IL-6 Signalweg hin untersucht. Die Kombination aus einer VHH6 Komponente, die spezifisch den IL-6/sIL-6R Komplex bindet, als auch einer sgp130 Komponente, die diesen Komplex hemmen kann, wurde vermutet, dass das IL-6 *trans-signaling* gehemmt werden kann. Zur ersten Einschätzung der Wirkung auf das IL-6 *trans-signaling* wurde untersucht, inwieweit die IL-6 abhängige Proliferation von Ba/F3-gp130 Zellen beeinflusst wird. Hierzu wurden Proliferationsassays mit Ba/F3-gp130 Zellen durchgeführt, die zusätzlich zur Stimulation mit 10 ng/mL IL-6 + 70 ng/mL sIL-6R mit Zellkulturüberstand (ZKÜ) aus transient transfizierten CHO-K1 Zellen inkubiert wurden. Wie in Abschnitt 3.2.1 beschrieben, werden die Fusionsproteine in den ZKÜ sezerniert und können somit ihre Wirkung auf die Ba/F3-gp130 Zellen entfalten.

Um eine unspezifische Wirkung der Fusionsproteine auf die Zellen auszuschließen wurden diese auch nur mit ZKÜ, ohne Zytokine, unter gleichen Bedingungen inkubiert. Die Zellproliferation wurde dann mit dem *CellTiter-Blue Cell Viability Assay* gemessen (s. Abschnitt 2.4.2). Es war keine unspezifische Wirkung auf Zellen ohne Zytokinstimulation zu verzeichnen (s. Abb. 20 A). Die Fusionsproteine D1VHH6Fc und D2-D3VHH6Fc verstärkten die Zellproliferation im Gegensatz zur alleinigen Zytokinstimulation. Von den Fusionsproteinen war nur die Variante D1-D3VHH6Fc (cs130Fc) in der Lage, die IL-6 *trans-signaling* abhängige Proliferation zu unterdrücken. Zur Bestätigung dieser Ergebnisse wurden mit den gleichen ZKÜ und den darin enthaltenen Fusionsproteinen Stimulationsassays (s. Abschnitt 2.4.3) durchgeführt. Die Ba/F3-gp130 Zellen wurden mit 10 ng/mL HIL-6, sowie den ZKÜ (100 µl oder 1 mL), stimuliert. Als Positivkontrolle für die Phosphorylierung von STAT3 über das IL-6 *trans-signaling* wurden die Zellen nur mit 10 ng/mL HIL-6 stimuliert. Unstimulierte Ba/F3-gp130 Zellen wurden als Negativkontrolle verwendet. Nach der Stimulation wurden Zelllysate erstellt (s. Abschnitt 2.3.1). Jeweils 50 µg Gesamtprotein wurden mittels SDS-PAGE (s. Abschnitt 2.3.3) und anschließendem Westernblot (s. Abschnitt 2.3.4) auf die Menge an pSTAT3 analysiert. Als Ladekontrolle wurde in der SDS-PAGE Analyse zusätzlich zum pSTAT3 auch das STAT3 Signal gemessen. Hier zeigte sich erneut, dass nur D1-D3VHH6Fc (cs130Fc) eindeutig ein inhibitorisches Potential auf das IL-6 *trans-signaling* entfalten kann. Das pSTAT3 Signal bei Inkubation mit D1VHH6Fc und D2-D3VHH6Fc war vergleichbar mit der alleinigen Stimulation durch den IL-6/sIL-6R Komplex. Diese Ergebnisse zeigten sich sowohl bei Inkubation mit 100 µL, als auch mit 1 mL ZKÜ (s. Abb. 20 B).

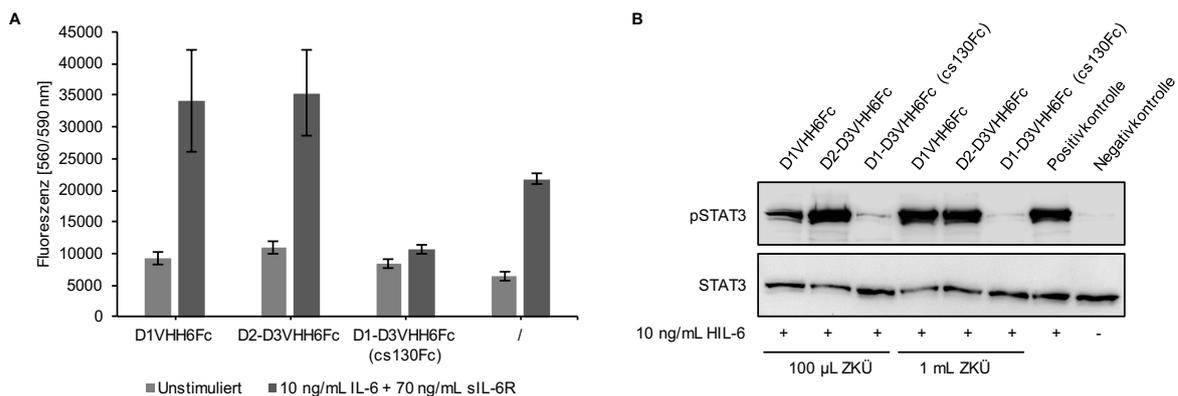


Abb. 20: Inhibitorisches Potential der sgp130-VHH6 Fusionsproteine auf IL-6 *trans-signaling*
(A) Proliferationsmessung von Ba/F3-gp130 Zellen (5×10^5 Zellen/mL) stimuliert mit 10 ng/mL IL-6 + 70 ng/mL sIL-6R, jeweils mit 100 µL ZKÜ von transient transfizierten CHO-K1 Zellen, die die Fusionsproteine sezernieren. Auslesung nach 72 h mit dem *CellTiter-Blue Cell Viability Assay*. **(B)** 5×10^5 Ba/F3-gp130 Zellen wurden mit 10 ng/mL HIL-6 kultiviert, jeweils mit 100 µL oder 1 mL ZKÜ von transient transfizierten CHO-K1 Zellen. Als Kontrollen dienten ein Ansatz nur mit Zytokinstimulation (Positivkontrolle) und ein Ansatz ganz ohne Zytokinstimulation oder ZKÜ (Negativkontrolle). SDS-PAGE und Westernblot. Detektion STAT3 mit Primär-AK α -STAT3 (124H6) und Sekundär-AK α -Maus IgG-POD; Detektion pSTAT3 mit Primär-AK α -Phospho-STAT3 (Tyr705) (D3A7) XP und Sekundär-AK α -Kaninchen IgG-POD. Die Experimente A-B wurden jeweils n=3 mal durchgeführt, wobei hier ein repräsentatives Ergebnis gezeigt ist.

In einem weiteren Schritt war nun von Interesse, wie das inhibitorische Potential des cs130Fc im Vergleich zum sgp130Fc zu beurteilen ist. Um einen quantitativen Vergleich anzustellen wurden diese Experimente mit gereinigtem Protein aus transient transfizierten CHO-K1 Zellen durchgeführt. Die Proteinextraktion wurde in Abschnitt 2.3.9 beschrieben. Diesmal wurde die IL-6 abhängige Proliferation von Ba/F3-gp130-IL-12R β 1- IL-23R Zellen untersucht. Die Ba/F3-gp130-IL-12R β 1-IL-23R Zellen wurden dazu mit 10 ng/mL IL-6 + 70 ng/mL sIL-6R stimuliert. Dazu wurden die inhibitorischen Proteine cs130Fc und sgp130Fc in steigender Dosierung (0,0001 - 1 μ g/mL) zugegeben.

Nach einer Inkubationszeit von 72 h bei 37°C wurde die Zellproliferation wie in Abschnitt 2.4.2 beschrieben gemessen. Bei der Stimulation mit 10 ng/mL IL-6 + 70 ng/mL sIL-6R zeigte sich, dass sgp130Fc in niedrigen Konzentrationen (0,0001 - 0,01 μ g/mL) die Proliferation etwas stärker inhibiert als cs130Fc. Ab einer Konzentration von 0,03 μ g/mL zeigten cs130Fc und sgp130Fc eine vergleichbare inhibitorische Wirkung. Dies lässt sich auch anhand der berechneten IC₅₀ Werte feststellen, wobei der IC₅₀ Wert für cs130Fc 37 ng/mL und für sgp130Fc 25 ng/mL beträgt (s. Abb. 21 A).

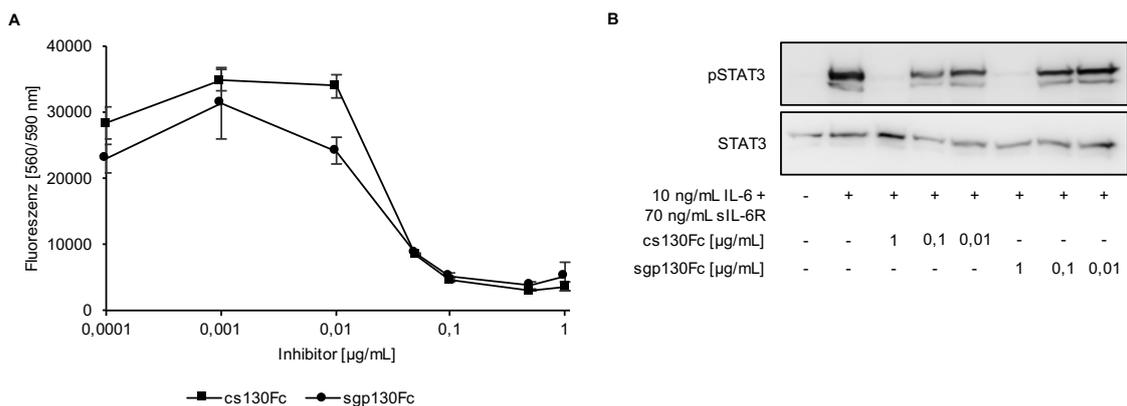


Abb. 21: Vergleich des inhibitorischen Potentials von cs130Fc und sgp130Fc bei Zytokinstimulation mit IL-6/sIL-6R

(A) Proliferationsmessung von Ba/F3-gp130-IL-12R β 1-IL-23R Zellen (5×10^4 Zellen/mL), stimuliert mit 10 ng/ml IL-6 + 70 ng/ml sIL-6R. Dazu wurde den Zellen zur Proliferationshemmung steigende Konzentrationen (0,0001 – 1 μ g/mL) an cs130Fc oder sgp130Fc hinzugegeben. Auslesung nach 72 h mit dem *CellTiter-Blue Cell Viability Assay*. **(B)** 5×10^5 Ba/F3-gp130-IL-12R β 1-IL-23R Zellen wurden mit 10 ng/mL IL-6 + 70 ng/mL sIL-6R kultiviert, jeweils mit 1 μ g/mL, 0,1 μ g/mL oder 0,01 μ g/mL an cs130Fc oder sgp130Fc. Als Referenz für die Proliferation diente ein Ansatz nur mit Zytokinstimulation und zur Kontrolle wurde ein Ansatz nicht stimuliert. SDS-PAGE und Westernblot. Detektion STAT3 mit Primär-AK α -STAT3 (124H6) und Sekundär-AK α -Maus IgG-POD; Detektion pSTAT3 mit Primär-AK α -Phospho-STAT3 (Tyr705) (D3A7) XP und Sekundär-AK α -Kaninchen IgG-POD. Die Experimente A-B wurden jeweils n=3 mal durchgeführt, wobei hier ein repräsentatives Ergebnis gezeigt ist.

Zur Bestätigung wurde ebenfalls die Auswirkung der Inhibitoren auf den JAK/STAT-Signalweg in Ba/F3-gp130-IL-12R β 1-IL-23R Zellen durch Stimmulationsassays (s. Abschnitt 2.4.3) untersucht. Dazu wurden die Zellen mit 10 ng/mL IL-6 + 70 ng/mL sIL-6R, sowie den Inhibitoren cs130Fc und sgp130Fc in den Konzentrationen 1 μ g/mL, 0,1 μ g/mL oder 0,01 μ g/mL für 10 min stimuliert. Als Positivkontrolle für die STAT3 Phosphorylierung über IL-6 *trans-signaling* wurden die Zellen mit 10 ng/mL IL-6 + 70 ng/mL sIL-6R stimuliert. Unstimulierte Ba/F3-gp130-IL-12R β 1-IL-23R Zellen dienten als Negativkontrolle.

Nach der Stimulation wurden Zelllysate erstellt (s. Abschnitt 2.3.1) und jeweils 50 µg Gesamtprotein mittels SDS-PAGE und Westernblot auf die Menge an pSTAT3 analysiert (s. Abschnitte 2.3.3 und 2.3.4). Die Positivkontrolle zeigte einen pSTAT3 Nachweis. In der Negativkontrolle wurde kein pSTAT3 Signal nachgewiesen. Durch Zugabe von 1 µg/mL cs130Fc oder sgp130Fc wurde das pSTAT3 Signal vollständig unterdrückt. In geringerer Konzentration konnte keine inhibitorische Wirkung auf die Phosphorylierung von STAT3 nachgewiesen werden (s. Abb. 21 B).

In einem weiteren Proliferationsassay wurden die Ba/F3-gp130-IL-12Rβ1-IL-23R Zellen mit 10 ng/mL HIL-6 stimuliert. Hier zeigte sich ebenfalls eine vergleichbare inhibitorische Wirkung von cs130Fc und sgp130Fc. Die IC₅₀ wurde für cs130Fc mit 20,3 ng/mL und für sgp130Fc mit 8,5 ng/mL berechnet (s. Abb. 22 A). Zusätzlich wurde ein Stimulationsassay mit 10 ng/mL HIL-6 durchgeführt. Es zeigte sich in der Negativkontrolle keine unspezifische Stimulation und in der Positivkontrolle ein pSTAT3 Nachweis. Die STAT3 Phosphorylierung wurde durch 1 µg/mL cs130Fc bzw. 0,1 µg/mL sgp130Fc abgeschwächt (s. Abb. 22 B).

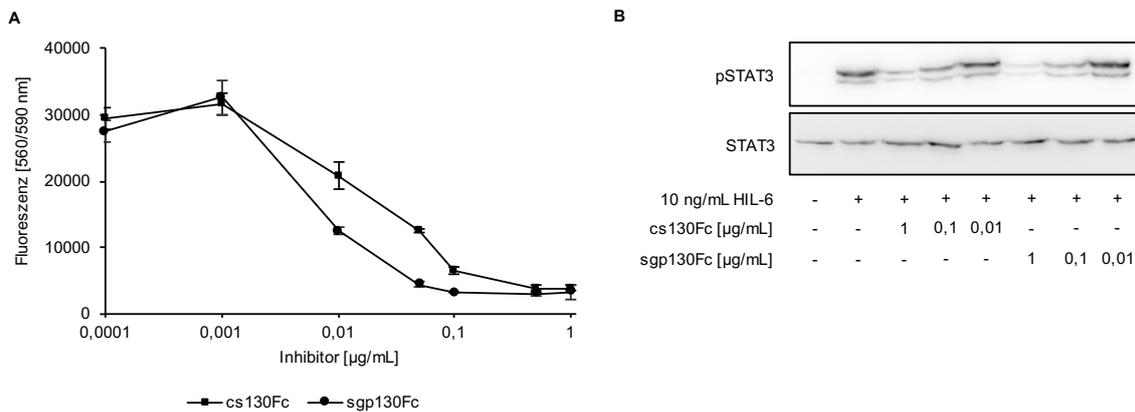


Abb. 22: Vergleich des inhibitorischen Potentials von cs130Fc und sgp130Fc bei Zytokinstimulation mit HIL-6

(A) Proliferationsmessung von Ba/F3-gp130-IL-12Rβ1-IL-23R Zellen (5×10^4 Zellen/mL), stimuliert mit 10 ng/ml HIL-6. Dazu wurde den Zellen zur Proliferationshemmung steigende Konzentrationen (0,0001 – 1 µg/mL) an cs130Fc oder sgp130Fc hinzugegeben. Auslesung nach 72 h mit dem *CellTiter-Blue Cell Viability Assay*.

(B) 5×10^5 Ba/F3-gp130-IL-12Rβ1-IL-23R Zellen wurden mit 10 ng/mL HIL-6 kultiviert, jeweils mit 1 µg/mL, 0,1 µg/mL oder 0,01 µg/mL an cs130Fc oder sgp130Fc. Als Referenz für die Proliferation diente ein Ansatz nur mit Zytokinstimulation und zur Kontrolle wurde ein Ansatz nicht stimuliert. SDS-PAGE und Westernblot. Detektion STAT3 mit Primär-AK α-STAT3 (124H6) und Sekundär-AK α-Maus IgG-POD; Detektion pSTAT3 mit Primär-AK α-Phospho-STAT3 (Tyr705) (D3A7) XP und Sekundär-AK α-Kaninchen IgG-POD.

Die Experimente A-B wurden jeweils n=3 mal durchgeführt, wobei hier ein repräsentatives Ergebnis gezeigt ist.

Von den drei neuartigen sgp130-VHH6 Fusionsproteinen zeigte lediglich D1-D3VHH6Fc, im Nachfolgenden cs130Fc genannt, eine inhibitorische Wirkung auf das IL-6 *trans-signaling*. Aus den zuvor dargestellten Ergebnissen lässt sich zudem schließen, dass cs130Fc ein vergleichbares Inhibitorisches Potential auf das IL-6 *trans-signaling* besitzt wie sgp130Fc. Dabei ist besonders hervorzuheben, dass cs130Fc eine minimierte sgp130Fc Variante ist, die der natürlich vorkommenden sgp130RAPS Variante entspricht. Während sgp130RAPS eine deutlich reduzierte inhibitorische Wirkung im Vergleich zu sgp130Fc aufweist, zeigte sich für cs130Fc eine zu sgp130Fc vergleichbare inhibitorische Wirkung.

3.2.3 Wirkung der sgp130-VHH6 Fusionsproteine auf das IL-6 *classic-signaling*

Neben der Untersuchung der Wirkung der neu generierten sdAb-Fusionsproteine auf das IL-6 *trans-signaling* war auch eine mögliche Beeinflussung des IL-6 *classic-signaling* von Interesse. Dadurch dass der sdAb VHH6 spezifisch nur das IL-6 *trans-signaling* beeinflusst (s. Abschnitte 3.1.2 und 3.1.3) lag auch hier die Vermutung nahe, dass die neuen Fusionsproteine das IL-6 *classic-signaling* nicht beeinflussen würden.

Zur Beantwortung dieser Fragestellung wurde die Wirkung der Fusionsproteine auf die IL-6 abhängige Proliferation von Ba/F3-gp130-IL6R Zellen als *in vitro* System für IL-6 *classic-signaling* untersucht. Diese Zellen proliferieren in Anwesenheit von IL-6, welches dann über eine Bindung an den membranständigen IL-6R eine Dimerisierung von gp130 und Aktivierung des JAK/STAT Signalwegs bewirken kann. Die Ba/F3-gp130-IL6R Zellen wurden mit 10 ng/mL IL-6 und ZKÜ aus transient transfizierten CHO-K1 Zellen für 72 h bei 37°C inkubiert. Wie in Abschnitt 3.2.1 beschrieben, werden die Fusionsproteine in den ZKÜ sezerniert und können somit ihre Wirkung auf die Ba/F3-gp130-IL6R Zellen entfalten. Um eine unspezifische Wirkung der Fusionsproteine auf die Zellen auszuschließen, wurden diese auch nur mit ZKÜ, ohne IL-6, unter gleichen Bedingungen inkubiert. Nach 72 h wurde dann die Zellproliferation wie in Abschnitt 2.4.2 beschrieben mit dem Kit *CellTiter-Blue Cell Viability Assay* gemessen. Dabei war keine unspezifische Wirkung auf die Zellen zu verzeichnen. Weiterhin zeigte keines der Fusionsproteine ein inhibitorisches Potential auf die IL-6 *classic-signaling* abhängige Proliferation dieser Zellen. Eine entscheidende Steigerung der Proliferation war ebenfalls nicht zu erkennen (s. Abb. 23 A).

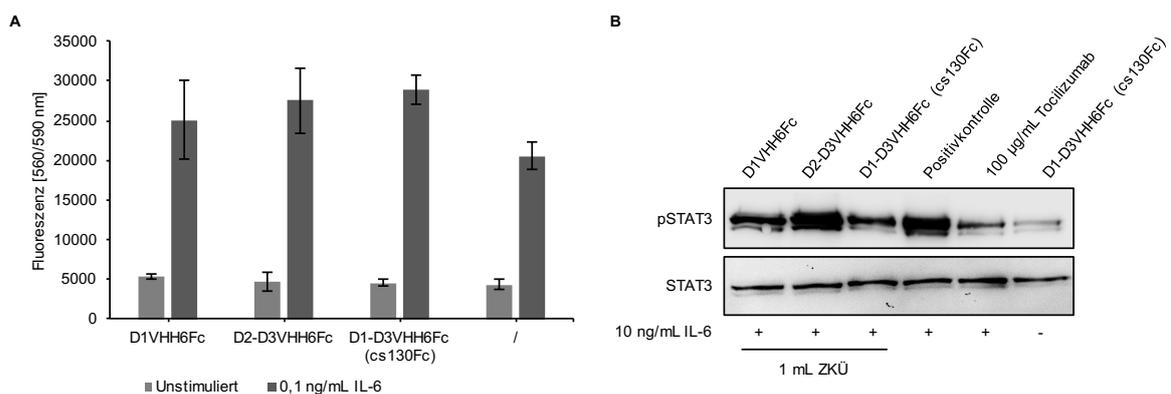


Abb. 23: Inhibitorisches Potential der sgp130-VHH6 Fusionsproteine auf IL-6 *classic-signaling*

(A) Proliferationsmessung von Ba/F3-gp130-IL6R Zellen (5×10^4 Zellen/mL), stimuliert mit 10 ng/mL IL-6, sowie jeweils 100 µL ZKÜ transient transfizierter CHO-K1 Zellen, die die Fusionsproteine sezernieren. Auslesung nach 72 h mit dem *CellTiter-Blue Cell Viability Assay*. **(B)** 5×10^5 Ba/F3-gp130-IL6R Zellen wurden mit 10 ng/mL IL-6 kultiviert, sowie jeweils 1 mL ZKÜ transient transfizierter CHO-K1 Zellen. Zum Nachweis der möglichen Inhibition wurde einem Ansatz 100 µg/mL Tocilizumab zugegeben. Zur Kontrolle wurden die Zellen einmal nur mit IL-6 stimuliert und einmal unstimuliert belassen. SDS-PAGE und Westernblot. Detektion STAT3 mit Primär-AK α -STAT3 (124H6) und Sekundär-AK α -Maus IgG-POD; Detektion pSTAT3 mit Primär-AK α -Phospho-STAT3 (Tyr705) (D3A7) XP und Sekundär-AK α -Kaninchen IgG-POD.

Die Experimente A-B wurden jeweils n=3 mal durchgeführt, wobei hier ein repräsentatives Ergebnis gezeigt ist.

Zusätzlich zur Proliferationsmessung wurde auch die IL-6 *classic-signaling* abhängige Phosphorylierung von STAT3 über den JAK/STAT-Signalweg in Ba/F3-gp130-IL6R Zellen in einem Stimulationsassay (s. Abschnitt 2.4.3) untersucht. Nach 3 h Inkubation in DMEM^{-/-} Medium wurden die Zellen mit 10 ng/mL IL-6 in Anwesenheit der inhibitorischen Fusionsproteine, oder dem klinisch zugelassenen IL-6R neutralisierenden, rekombinanten Antikörper Tocilizumab stimuliert. Unstimulierte Ba/F3-gp130-IL6R Zellen wurden als Negativkontrolle verwendet. Dabei wurde keine Wirkung der Fusionsproteine auf IL-6 *classic-signaling* detektiert, während Tocilizumab eine deutliche Abschwächung der STAT3 Phosphorylierung bewirkte (s. Abb. 23 B).

Betrachtet man die Ergebnisse aus Abschnitt 3.2.2 und 3.2.3 ist festzustellen, dass von den drei sgp130-VHH6 Fusionsproteinen cs130Fc spezifisch IL-6 *trans-signaling* inhibieren kann und bei deutlich geringerem Molekulargewicht eine vergleichbare Wirkstärke zum sgp130Fc aufweist. Eine Auswirkung auf IL-6 *classic-signaling* zeigte sich hingegen nicht.

3.2.4 Die Spezifität der inhibitorischen Wirkung von cs130Fc

Nachdem der cs130Fc als neues sgp130-VHH6 Fusionsprotein mit inhibitorischer Wirkung auf das IL-6 *trans-signaling*, ohne Beeinflussung des IL-6 *classic-signaling*s, identifiziert werden konnte, wurde eine weitere Charakterisierung hinsichtlich der Spezifität für das IL-6 *trans-signaling* durchgeführt. Diese Charakterisierung erfolgte stets im Vergleich zum sgp130Fc, wobei bereits in Abschnitt 3.2.2 gezeigt werden konnte, dass die inhibitorische Wirkung auf das IL-6 *trans-signaling* vergleichbar stark ausgeprägt ist.

Als *in vitro* System für IL-6 *trans-signaling* wurden diesmal Ba/F3-gp130-IL-12R β 1-IL-23R Zellen genutzt, die in Abhängigkeit von HIL-6, HIL-11 und IL-23, proliferieren können. Zur Vorbereitung wurde die biologische Aktivität der rekombinanten Zytokine HIL-6Fc und HIL-11Fc verglichen, um die notwendige Menge zur maximalen Proliferation zu ermitteln.

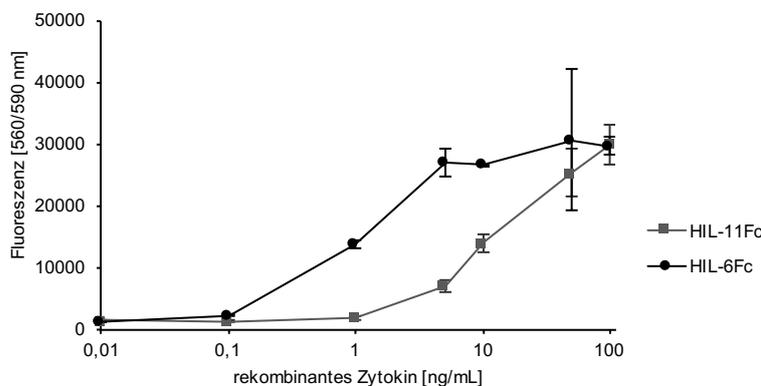


Abb. 24: Vergleich der biologischen Aktivität der rekombinanten Zytokine HIL-6Fc und HIL-11Fc
Proliferationsmessung von Ba/F3-gp130-IL-12R β 1-IL-23R Zellen (5×10^4 Zellen/mL), stimuliert mit steigenden Konzentrationen (0,01 - 100 ng/mL) an HIL-11Fc und HIL-6Fc zum Vergleich der Stimulationsstärke. Auslesung nach 72 h mit dem *CellTiter-Blue Cell Viability Assay*.
Dieses Experiment wurde n=3 mal durchgeführt, wobei hier ein repräsentatives Ergebnis gezeigt ist.

Es wurden Proliferationsassays mit Ba/F3-gp130-IL-12R β 1-IL-23R Zellen durchgeführt, die mit steigenden Konzentrationen (0,01 - 100 ng/mL) an HIL-11Fc und HIL-6Fc stimuliert wurden. Nach 72 h wurde die Zellproliferation mit dem Kit *CellTiter-Blue Cell Viability Assay* gemessen (s. Abschnitt 2.4.2). Es zeigte sich, dass die maximale Proliferation bereits ab einer HIL-6Fc Konzentration von 5 ng/mL erreicht wurde, im Vergleich zu einer Konzentration von 100 ng/mL des Zytokins HIL-11Fc (s. Abb. 24).

Um mögliche unspezifische Effekte auf die zelluläre Signaltransduktion auszuschließen wurde der Effekt auf die IL-23 induzierte Signaltransduktion untersucht. Dazu wurden Ba/F3-gp130-IL-12R β 1-IL-23R Zellen mit 10 ng/mL IL-23, sowie ansteigenden Konzentrationen (0,0001 - 1 μ g/mL) an cs130Fc oder sgp130Fc inkubiert. Dabei zeigten die Proteine unabhängig von der eingesetzten Konzentration keine Wirkung auf die IL-23 *signaling* abhängige Proliferation (s. Abb. 25 A).

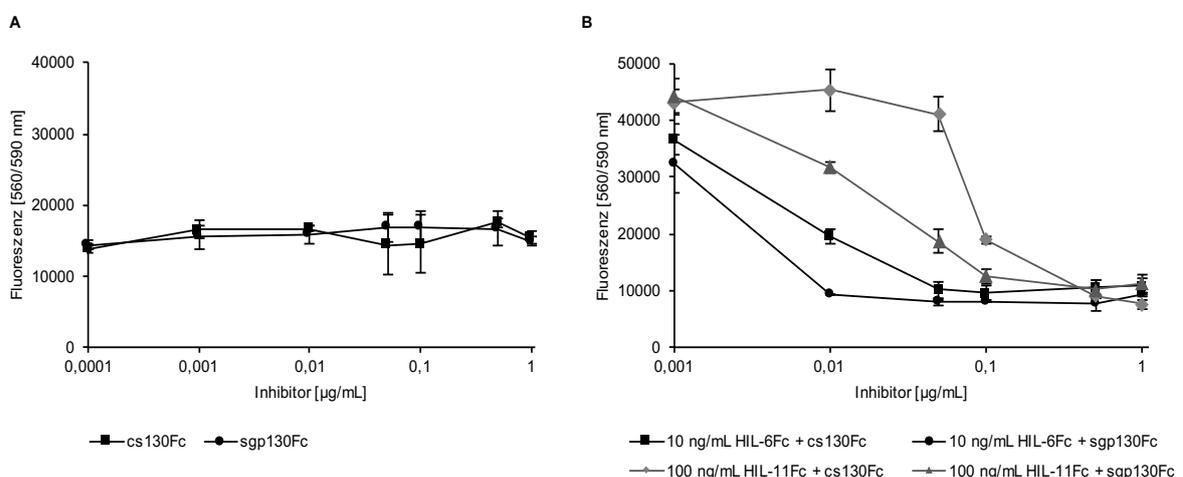


Abb. 25: Spezifität der inhibitorischen Wirkung von cs130Fc auf IL-6 *trans-signaling*

(A) Proliferationsmessung von Ba/F3-gp130-IL-12R β 1-IL-23R Zellen (5×10^4 Zellen/mL), stimuliert mit 10 ng/mL IL-23, sowie ansteigenden Konzentrationen (0,0001 - 1 μ g/mL) an cs130Fc oder sgp130Fc. Auslesung nach 72 h mit dem *CellTiter-Blue Cell Viability Assay*. (B) Proliferationsmessung von Ba/F3-gp130-IL-12R β 1-IL-23R Zellen (5×10^4 Zellen/mL), stimuliert mit 10 ng/mL HIL-6Fc bzw. HIL-11Fc, mit ansteigenden Konzentrationen an cs130Fc oder sgp130Fc. Auslesung nach 72 h mit dem *CellTiter-Blue Cell Viability Assay*. Die Experimente A-B wurden jeweils n=3 mal durchgeführt, wobei hier ein repräsentatives Ergebnis gezeigt ist.

In nachfolgenden Proliferationsassays wurden nun Ba/F3-gp130-IL-12R β 1-IL-23R Zellen mit 10 ng/mL HIL-6Fc oder 100 ng/mL HIL-11Fc, sowie steigenden Konzentrationen (0,001 - 1 μ g/mL) an cs130Fc oder sgp130Fc inkubiert, um die inhibitorische Wirkung zu vergleichen. Die Zellproliferation wurde wie in Abschnitt 2.4.2 beschrieben bestimmt. Bei der Stimulation mit HIL-6Fc konnte das IL-6 *trans-signaling* abhängige Zellwachstum sowohl durch cs130Fc als auch sgp130Fc gehemmt werden. Eine vollständige Hemmung der Proliferation konnte mit 0,05 μ g/mL cs130Fc oder 0,01 μ g/mL sgp130Fc erreicht werden. Hier erwies sich die Proliferationshemmung durch sgp130Fc also etwas effektiver. Ab einer Konzentration von 0,05 μ g/mL cs130Fc oder sgp130Fc war die inhibitorische Stärke vergleichbar ausgeprägt (s. Abb. 25 B).

Bei der Stimulation mit HIL-11Fc waren dagegen andere Ergebnisse zu erfassen. Hier wurde die HIL-11Fc abhängige Zellproliferation zunehmend bei ansteigender Konzentration an sgp130Fc gehemmt. Eine vollständige Unterdrückung der Proliferation erfolgte ab einer Konzentration von 0,1 µg/mL sgp130Fc. Im Gegensatz dazu zeigte cs130Fc erst bei der fünffachen Konzentration eine vollständige Inhibition der HIL-11Fc induzierten Proliferation. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass cs130Fc spezifischer auf IL-6 *trans-signaling* wirkt als sgp130Fc. Bei einer Konzentration von 0,05 µg/mL cs130Fc oder sgp130Fc wurde die IL-6 *trans-signaling* abhängige Proliferation vollständig inhibiert, wobei sgp130Fc in dieser Konzentration auch die IL-11 abhängige Proliferation inhibiert. Der cs130Fc zeigte in dieser Konzentration noch keine Wirkung auf das IL-11 *signaling* und ist somit spezifischer für IL-6 *trans-signaling* (s. Abb. 25 B).

Dies ist auch mit den berechneten Werten zur halbmaximalen inhibitorischen Konzentration (IC_{50}) nachzuvollziehen. Die IC_{50} von cs130Fc zur Inhibition der IL-11 abhängigen Proliferation betrug 83 ng/mL im Gegensatz zur deutlich niedrigeren IC_{50} von 15 ng/mL bei Inkubation mit sgp130Fc. Für die IL-6 *trans-signaling* abhängige Proliferation mit HIL-6 Stimulation lag die IC_{50} von cs130Fc mit 8,1 ng/mL etwas höher als die IC_{50} von 1,9 ng/mL bei Inkubation mit sgp130Fc.

Zusammenfassend weisen diese Ergebnisse auf eine inhibitorische Wirkung des cs130Fc hin, die spezifisch für IL-6 *trans-signaling* ist. Zur Durchführung weiterer Experimente mit dem im Rahmen dieser Arbeit klonierten Fusionsprotein cs130Fc am Institut für Biochemie und Molekularbiologie II erfolgte eine stabile Transfektion des Plasmids in CHO-K1 Zellen (s. Abschnitt 2.4.5), sowie die Kryokonservierung dieser Zellen (s. Abschnitt 2.4.6).

3.2.5 Generierung von cs130Fc_{D2mut} und c_{GFP}s130Fc

Zum besseren Verständnis über die molekulare Wirkungsweise des neuen Fusionsproteins cs130Fc sollte untersucht werden, inwieweit die inhibitorische Wirkung von den jeweiligen Komponenten (gp130 Domänen D1-D3 und VHH6) abhängig ist (s. Abschnitt 3.2.6). Zur Durchführung der entsprechenden Proliferationsassays wurden die zwei Moleküle c_{GFP}s130Fc und cs130Fc_{D2mut} kloniert, wobei jeweils einer der Komponenten in seiner Funktion beeinträchtigt wurde. Der Austausch des VHH6 sdAb gegen einen GFPVHH sdAb im Molekül c_{GFP}s130Fc beeinträchtigt die Bindung an den IL-6/sIL-6R Komplex und die Mutation in der Domäne D2 im Molekül cs130Fc_{D2mut} führt zum Funktionsverlust des gp130 Anteils, wodurch die Bindung an *site II* von IL-6 beeinträchtigt ist. In Abbildung 26 ist eine detaillierte Darstellung der Klonierungsstrategie für das Plasmid pcDNA3.1-D1-D3 GFPVHH-Fc (c_{GFP}s130Fc) gezeigt. Es erfolgte eine präparative Endonukleasenrestriktion der Plasmide pcDNA3.1-GFPVHH und pcDNA3.1-IL-6-VHH6 mit BamHI und NotI.

Im Anschluss erfolgte eine Ligation des GFPVHH in das Plasmid pcDNA3.1-IL-6 und eine präparative Endonukleasenrestriktion der Plasmide pcDNA3.1-IL-6-GFPVHH und pcDNA3.1-D1-D3-VHH6-Fc mit HindIII und XhoI. Es erfolgte die Ligation des D1-D3 in das Plasmid pcDNA3.1-GFPVHH anstelle von IL-6 und im Anschluss die Transformation des fertigen Plasmids pcDNA3.1-D1-D3-GFPVHH in *E.coli XL1 blue* (s. Abschnitte 2.2.5, 2.2.6 und 2.2.7).

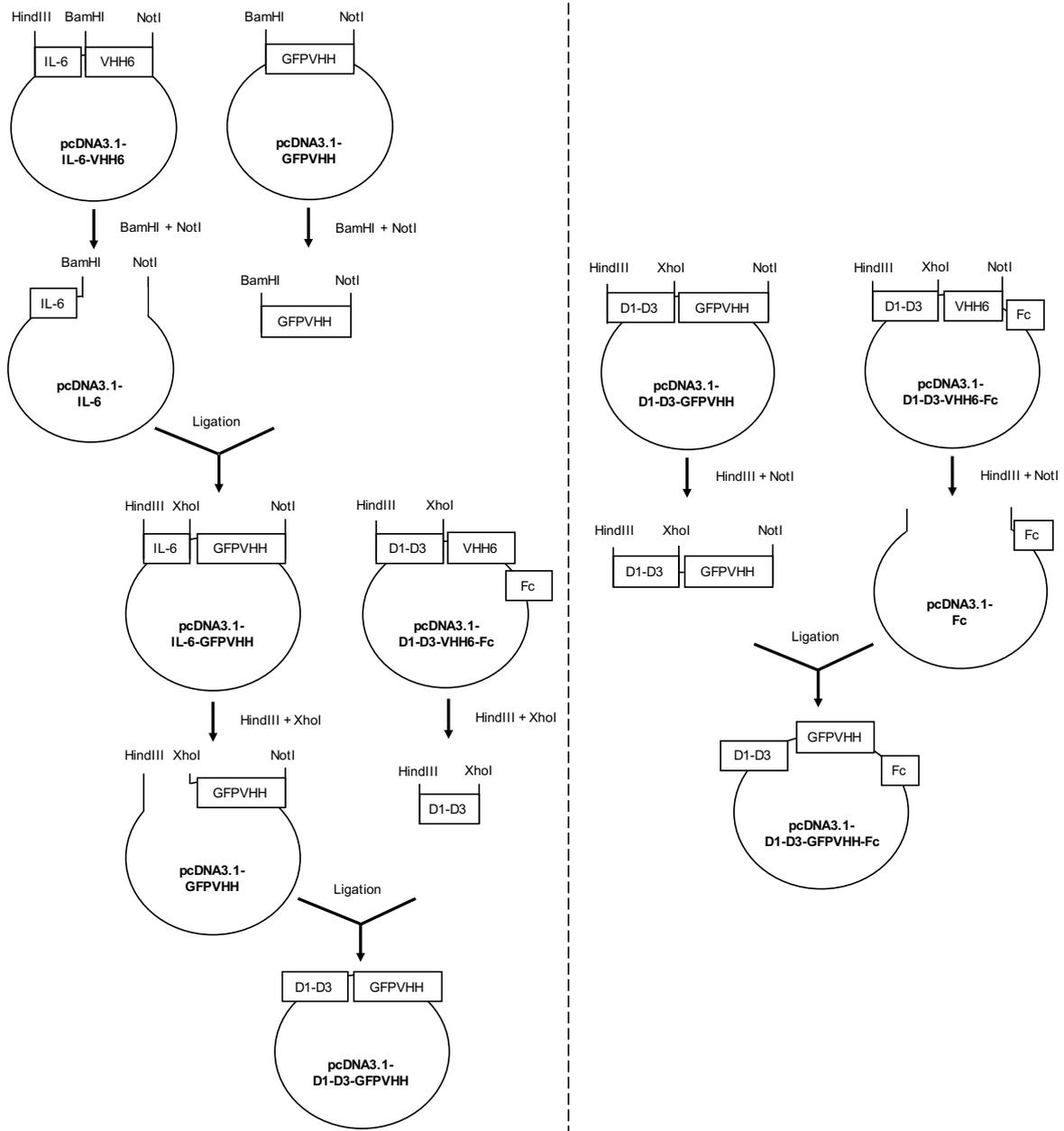


Abb. 26: Klonierungsstrategie für pcDNA3.1-D1-D3-GFPVHH-Fc

Es erfolgte ein präparativer Restriktionsverdau (s. Abschnitt 2.2.5) der Plasmide pcDNA3.1-IL-6-VHH6 und pcDNA3.1-GFPVHH mit den Endonukleasen BamHI und NotI. Die cDNA des GFPVHH wurde in das Plasmid pcDNA3.1-IL-6 hinter die IL-6 Sequenz ligiert (s. Abschnitt 2.2.6). In einem weiteren Schritt erfolgte ein Restriktionsverdau von pcDNA3.1-IL-6-GFPVHH und pcDNA3.1-D1-D3 mit HindIII und XhoI. Anschließend wurde die D1-D3 Sequenz vor den GFPVHH zum Plasmid pcDNA3.1-D1-D3-GFPVHH ligiert. Im letzten Schritt (Abbildung rechte Seite) wurden die Plasmide pcDNA3.1-D1-D3-GFPVHH und pcDNA3.1-D1-D3-VHH6-Fc mit den Restriktionsenzymen HindIII und NotI präparativ hydrolysiert. Die Sequenz D1-D3-GFPVHH wurde dann in das Plasmid pcDNA3.1 vor die Fc-Sequenz ligiert.

Im Anschluss folgten eine DNA Mini- und Midi-Präparation, sowie eine analytische Endonukleasenrestriktion (s. Abschnitte 2.2.8 und 2.2.9). Dann wurde eine präparative Endonukleasenrestriktion des Plasmids pcDNA3.1-D1-D3-GFPVHH und des Plasmids pcDNA3.1-D1-D3-VHH6-Fc mit HindIII und NotI durchgeführt und im nächsten Schritt die Sequenz des D1-D3-GFPVHH in den Vektor pcDNA3.1-Fc ligiert. Im Anschluss wurde die Klonierung des Plasmids pcDNA3.1-D1-D3-VHH6-Fc (c_{GFP}S130Fc) mittels analytischer Endonukleasenrestriktion mit BamHI und HindIII, sowie einer Sanger-Sequenzierung überprüft (s. Abschnitte 2.2.5 und 2.2.12).

Die Generierung der Mutation in D2 des Plasmids pcDNA3.1-D1-D3-VHH6-Fc_D2mut wurde mithilfe einer *site directed mutagenesis*-PCR durchgeführt (s. Abschnitt 2.2.11). Als Ausgangsplasmid diente dabei das pcDNA3.1-D1-D3-VHH6-Fc. Im Anschluss an die PCR folgte eine DNA Mini-Präparation mit Transformation in *E.coli XL1 blue*, sowie eine analytische Endonukleasenrestriktion mit EcoRV. Mit ausgewählten Klonen wurde dann eine DNA Midi-Präparation durchgeführt, wobei zuletzt via Sanger-Sequenzierung mit dem *primer* T7 der Nachweis der gewünschten Sequenz des Plasmids pcDNA3.1-D1-D3-VHH6-Fc_D2mut (cs130Fc_{D2mut}) erfolgte (s. Abschnitte 2.2.7, 2.2.8, 2.2.9 und 2.2.12).

Im Anschluss erfolgte eine transiente Transfektion der Plasmide in CHO-K1 Zellen (s. Abschnitt 2.4.4). Zur Bestätigung einer erfolgreichen Transfektion und Proteinsynthese wurden Zellkulturüberstände (ZKÜ) und Zelllysate jeweils nach 48 h abgenommen und mittels SDS-PAGE Analyse und anschließendem Westernblot auf das Vorhandensein der Proteine hin überprüft (s. Abschnitte 2.3.3 und 2.3.4). Die Proteine konnten jeweils im ZKÜ nachgewiesen werden (s. Abb. 27).

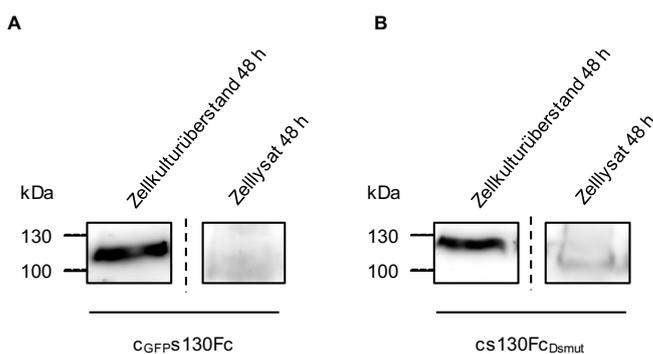


Abb. 27: c_{GFP}S130Fc und cs130Fc_{D2mut} werden in CHO-K1 Zellen exprimiert

(A) Das Protein c_{GFP}S130Fc aus ZKÜ oder Zelllysat transient transfizierter CHO-K1 Zellen mit dem Plasmid pcDNA3.1-D1-D3-GFPVHH-Fc wurde mittels SDS-PAGE und Westernblotanalyse nachgewiesen (s. Abschnitte 2.3.3 und 2.3.4). Detektion des Proteins mit Antikörper α -humaner Fc POD. Das Protein konnte im ZKÜ der 48 h nach Transfektion abgenommen wurde nachgewiesen werden. Kein Nachweis im Zelllysat. (B) Analog zu (A) Nachweis des Proteins cs130Fc_{D2mut} im ZKÜ transient transfizierter CHO-K1 Zellen 48 h nach Transfektion. Kein Nachweis im Zelllysat. Detektion im Westernblot mit Antikörper α -humaner Fc POD.

Somit eignet sich der ZKÜ 48 h nach Transfektion zur Durchführung der im folgenden Abschnitt 3.2.6 beschriebenen Proliferationsassays.

3.2.6 Wirkung der Fusionsproteine cs130Fc_{D2mut} und c_{GFP}s130Fc auf das IL-6 *trans-signaling*

Zur Untersuchung der Wirkung von cs130Fc, cs130Fc_{D2mut} und c_{GFP}s130Fc auf das IL-6 *trans-signaling* wurden Proliferationsassays mit Ba/F3-gp130-IL-12R β 1-IL-23R Zellen durchgeführt. Die Zellproliferation erfolgte mit unterschiedlicher Zytokinstimulation. Zur Untersuchung der Wirkung auf IL-6 *trans-signaling* wurde mit 10 ng/mL HIL-6 oder 10 ng/mL IL-6 + 70 ng/mL sIL-6R stimuliert, sowie zur Untersuchung des IL-11 *trans-signaling*s mit 10 ng/mL HIL-11Fc. Die Ba/F3-gp130-IL-12R β 1-IL-23R Zellen wurden jeweils mit den genannten Zytokinen und Fusionsproteinen für 72 h inkubiert.

Die Durchführung und Auswertung des Experiments erfolgte wie in Abschnitt 2.4.2 beschrieben. Die Auswertung ergab in der Positivkontrolle hinsichtlich der verschiedenen Zytokine ein ähnliches Proliferationsausmaß, weshalb hier ein Vergleich der Konditionen möglich war. Ebenso konnte im Sinne einer Negativkontrolle keine Proliferation unstimulierter Zellen gemessen werden (s. Abb. 28).

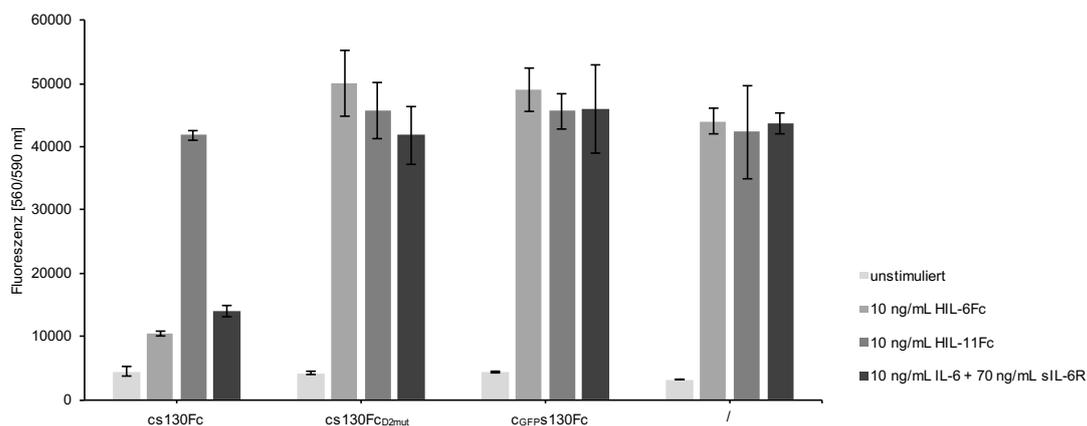


Abb. 28: Wirkung von cs130Fc_{D2mut} und c_{GFP}s130Fc auf IL-6 *trans-signaling*

Proliferationsmessung von Ba/F3-gp130-IL-12R β 1-IL-23R Zellen (5×10^4 Zellen/mL), stimuliert entweder mit 10 ng/mL HIL-6Fc, 10 ng/mL HIL-11Fc oder 10 ng/mL IL-6 + 70 ng/mL sIL-6R, jeweils mit 100 μ L ZKÜ von transient transfizierten CHO-K1 Zellen mit den Plasmiden für cs130Fc_{D2mut} und c_{GFP}s130Fc, sowie cs130Fc. Auslesung nach 72 h mit dem *CellTiter-Blue Cell Viability Assay*.

Das Experiment wurde n=3 mal durchgeführt, wobei hier ein repräsentatives Ergebnis gezeigt ist.

Die Zugabe der Fusionsproteine cs130Fc_{D2mut} und c_{GFP}s130Fc hatte keinen Einfluss auf die Proliferation, sowohl via IL-6 *trans-signaling* als auch IL-11 *trans-signaling*. Durch Zugabe des cs130Fc hingegen wurde die Proliferation über das IL-6 *trans-signaling* deutlich abgeschwächt. Hier zeigte sich kaum Unterschied in der Stimulation mit HIL-6 oder IL-6 und sIL-6R. Die IL-11 abhängige Proliferation hingegen wurde nicht beeinflusst, was erneut die Spezifität dieses Fusionsproteins für das IL-6 *trans-signaling* zeigt (s. Abb. 28). Insgesamt legen die Ergebnisse dieses Versuchs nahe, dass die inhibitorische Wirkung des cs130Fc auf dem Zusammenspiel der sgp130Fc Domänen D1, D2 und D3, sowie dem Einzeldomänenantikörper (sdAb) VHH6 beruht, da sowohl der Austausch des sdAbs, als auch eine Mutation in D1-D3 an der D2-Domäne zum Funktionsverlust geführt haben.

3.3 Das cs130Fc Fusionsprotein als Monomer cs130

Die Bioverfügbarkeit von Medikamenten und insbesondere Biologika ist abhängig von deren Molekulargewicht, wobei ein geringes Molekulargewicht zu einer besseren Verfügbarkeit führt (Li *et al.* 2016). Nachdem die Funktionsweise des cs130Fc Fusionsproteins in seiner dimeren Form charakterisiert worden ist, wurde in dieser Arbeit untersucht, ob das Protein auch als Monomer funktionstüchtig ist. Die bisher bekannten sgp130Fc Varianten mit geringem Molekulargewicht, darunter sgp130his, mini-gp130-ELP und gp130-RAPS, weisen ein deutlich geringeres inhibitorisches Potential im Vergleich zu sgp130Fc auf (Jostock *et al.* 2001; Lin *et al.* 2006; Richards *et al.* 2006).

Um bei geringerem Molekulargewicht trotzdem eine inhibitorische Wirkung vergleichbar mit der von sgp130Fc zu erreichen, wurden hier die sgp130 Domänen D1-D3 mit dem VHH6 fusioniert. Zur Generierung des Monomers cs130 erfolgte eine posttranslationale proteolytische Abspaltung des Fc-Fragments, die im folgenden Abschnitt beschrieben wird. Im Anschluss wurde das Monomer hinsichtlich seiner Wirkung auf das IL-6 *trans-signaling* untersucht und die Wirkstärke mit der von sgp130Fc verglichen.

3.3.1 Generierung des Monomers cs130

Die Sequenz des cs130Fc beinhaltet zwischen dem VHH6 und dem Fc-Fragment eine spezifische Sequenz zur Proteolyse mittels der TEV-Protease. Im Rahmen dieser Arbeit erfolgte die Generierung des Monomers cs130 also posttranslational. Ziel war es hier, die Größe des Proteins von seiner dimeren Form (157 kDa) durch Überführung in eine monomere Form (52 kDa) stark zu reduzieren (s. Abb. 29).

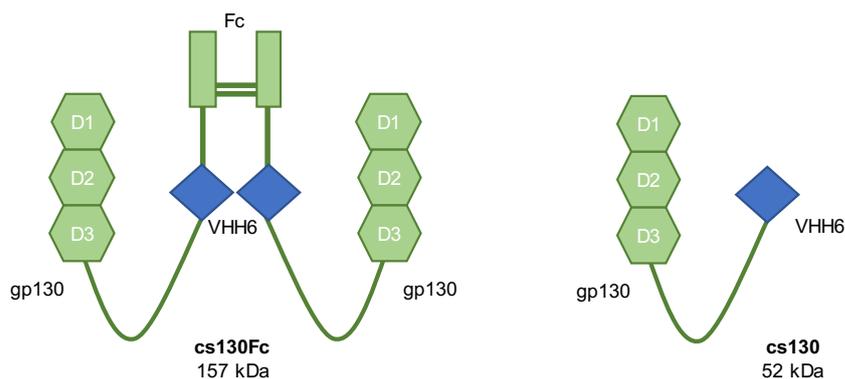


Abb. 29: Schematische Darstellung von cs130Fc und cs130

Schematischer Vergleich zwischen cs130Fc mit einem Molekulargewicht von 157 kDa und cs130 Monomer mit einem Molekulargewicht von 52 kDa.

Um die Möglichkeit der Proteolyse mittels der TEV-Protease zu überprüfen wurde cs130Fc im ZKÜ transient transfizierter Zellen mit unterschiedlichen Mengen TEV-Protease und unter verschiedenen Konditionen für 14 h über Nacht inkubiert (s. Abschnitt 2.3.11).

Zur Analyse erfolgte eine SDS-PAGE (s. Abschnitt 2.3.3) und ein Westernblot (s. Abschnitt 2.3.4). Für den Westernblot wurden die Primärantikörper α -humaner Fc und α -CD130 (gp130) (B-R3) und der Sekundärantikörper α -Maus POD verwendet. Dadurch konnte sowohl das Fc-Fragment, als auch das Protein cs130Fc nachgewiesen werden. Hierbei zeigte sich, dass bei einer Inkubation mit 5 μ g TEV-Protease bei 4°C über Nacht die gewünschte proteolytische Spaltung effizient erfolgte. In den Konditionen ohne Zugabe der TEV-Protease erfolgte kein Nachweis des Fc-Fragments, weshalb eine unspezifische Spaltung durch Verunreinigungen ausgeschlossen werden konnte (s. Abb. 30 A).

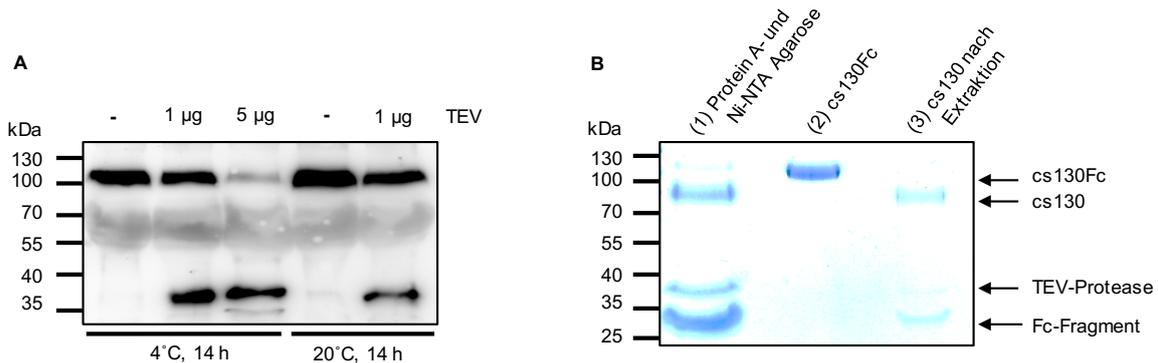


Abb. 30: Generierung des Monomers cs130

(A) SDS-PAGE und Westernblot (Primär-AK: α -humaner Fc POD und α -CD130, Sekundär-AK: α -Maus POD) nach proteolytischer Spaltung von cs130Fc in Zellkulturüberstand durch die TEV-Protease unter verschiedenen Konditionen. **(B)** Inkubation von 10 μ g cs130Fc mit 5 μ g TEV-Protease bei 4°C über Nacht und anschließender Inkubation mit Protein A- und Ni-NTA Agarose zur Extraktion des Monomers cs130. SDS-PAGE mit anschließender *Coomassie Brilliant Blue* Färbung nach Extraktion mit Auftragung von (1) Protein A- und Ni-NTA Agarose (2) gereinigtem, unbehandeltem cs130Fc Protein (3) Überstand nach Inkubation mit Protein A- und Ni-NTA Agarose der extrahiertes, monomeres cs130 enthält.

In einem weiteren Experiment zur Generierung des Monomers wurde gereinigtes cs130Fc Protein genutzt. Dabei erfolgte die Inkubation von 10 μ g Protein mit 5 μ g TEV-Protease bei 4°C über Nacht. Am Folgetag erfolgte dann die Trennung des monomeren cs130 sowie der TEV-Protease und des Fc-Fragments über eine Inkubation mit Protein A- und Ni-NTA Agarose (s. Abschnitt 2.3.11). Dabei findet eine Bindung der Fc-Fragmente an Protein A und der TEV-Protease über die His₆-Sequenz an Ni-NTA statt. Zur Darstellung der einzelnen Fraktionen nach Extraktion erfolgte eine SDS-PAGE (s. Abschnitt 2.3.3) mit anschließender *Coomassie Brilliant Blue* Färbung (s. Abschnitt 2.3.5). Dabei konnte gezeigt werden, dass eine posttranslationale proteolytische Abspaltung des Fc-Fragments vom cs130Fc erfolgreich möglich ist. Mittels *Coomassie Brilliant Blue* Färbung lässt sich erkennen, dass der Großteil an TEV-Protease und Fc-Fragment mittels der Inkubation mit Protein A- und Ni-NTA Agarose entfernt werden kann. Im Überstand wurde nach Inkubation mit der TEV-Protease und der Agarose nur monomeres cs130, sowie noch geringe Mengen des Fc-Fragments nachgewiesen. Das Protein in seiner Fc fusionierten Form wurde nicht nachgewiesen, weshalb von einer vollständigen Proteolyse der gesamten Proteinmenge ausgegangen werden kann (s. Abb. 30 B).

3.3.2 Wirkung des Monomers cs130 auf das IL-6 signaling

Um die Wirkung des Inhibitors cs130 in seiner monomeren Form zu untersuchen wurden verschiedene Proliferationsassays durchgeführt. Für ein erstes, orientierendes Experiment wurde ein Proliferationsassay mit Ba/F3-gp130-IL-12R β 1-IL-23R Zellen und dem Monomer cs130 nach proteolytischer Spaltung durch die TEV-Protease aus dem ZKÜ transient transfizierter CHO-K1 Zellen (s. Abschnitt 3.3.1) durchgeführt. Hiermit sollte die Wirkung sowohl auf das IL-6 *trans-signaling*, als auch auf das IL-11 und IL-23 *signaling* untersucht werden. Die Wirkung wurde dabei mit der des Fusionsproteins cs130Fc verglichen.

Zur *in vitro* Darstellung des IL-6 *trans-signaling*s wurden die Zellen mit 10 ng/mL HIL-6Fc oder 10 ng/mL IL-6 + 70 ng/mL sIL-6R stimuliert, sowie zur *in vitro* Darstellung der anderen Signalwege jeweils mit 10 ng/mL HIL-11Fc bzw. 10 ng/mL IL-23. Die Zellen wurden dann nur mit den Zytokinen inkubiert oder mit cs130 in 100 μ L ZKÜ oder cs130Fc in 100 μ L ZKÜ. Zum Ausschluss eines unspezifischen Wachstums der Zellen, sowie einer unspezifischen Wirkung der Inhibitoren, wurden im gleichen Experiment auch Konditionen ohne Zytokinstimulation angelegt. Die Durchführung und Auswertung des Proliferationsassays erfolgte wie in Abschnitt 2.4.2 beschrieben. Dabei zeigte sich, dass das Wachstum der Zellen am stärksten mit HIL-6Fc induziert werden konnte. Hier wurde das Wachstum durch Zugabe der Inhibitoren deutlich reduziert, wobei der Effekt von dimerem cs130Fc etwas stärker war als der von monomerem cs130. Dies könnte durch dimerisierungsbedingte Aviditätseffekte begründet sein. Die durch den IL-6/sIL-6R Komplex induzierte IL-6 *trans-signaling* abhängige Proliferation konnte hingegen sowohl von cs130Fc, als auch cs130 als Monomer, vollständig unterdrückt werden. Weiterhin war keine signifikante Inhibierung des IL-23 oder IL-11 *signalings* zu verzeichnen, weshalb hier eine unspezifische Wirkung ausgeschlossen werden konnte (s. Abb. 31).

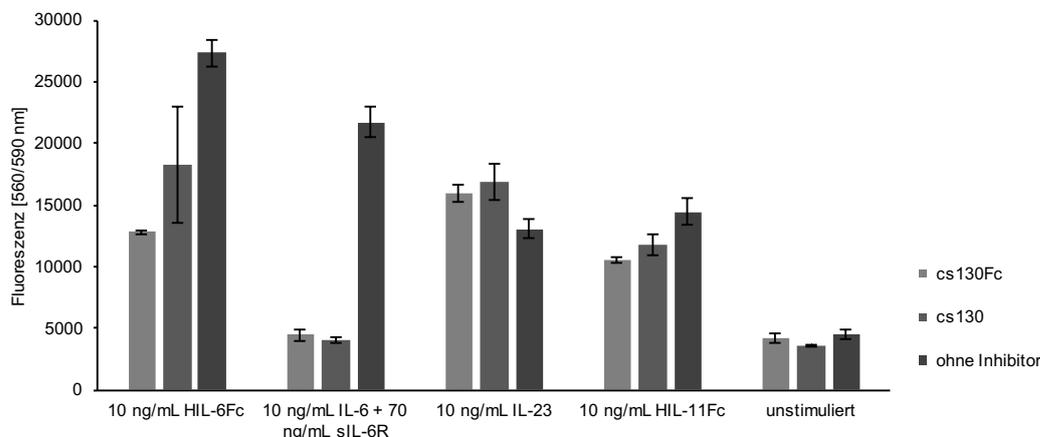


Abb. 31: Spezifität der Wirkung des Monomers cs130 auf IL-6 *trans-signaling*

Proliferationsmessung von Ba/F3-gp130-IL-12R β 1-IL-23R Zellen (5×10^4 Zellen/mL), stimuliert mit 10 ng/mL HIL-6Fc, 10 ng/mL IL-6 + 70 ng/mL sIL-6R, 10 ng/mL IL-23 oder 10 ng/mL HIL-11Fc. Dabei wurden jeweils Konditionen ohne Inhibitor oder mit cs130Fc (aus ZKÜ transient transfizierter Zellen) bzw. cs130 (nach Proteolyse mittels TEV-Protease) untersucht. Auslesung nach 72 h mit dem *CellTiter-Blue Cell Viability Assay*. Dieses Experiment wurde nur einmalig durchgeführt.

Zur Verifizierung und exakteren Untersuchung dieser Ergebnisse hinsichtlich der Wirkung der Inhibitoren auf das IL-6 *trans-signaling* wurde ein weiterer Proliferationsassay mit den Fusionsproteinen cs130Fc und cs130 durchgeführt, welche aus transient transfizierten CHO-K1 Zellen extrahiert wurden. In diesem Proliferationsassay erfolgte die Stimulation der Ba/F3-gp130-IL-12R β 1-IL-23R Zellen über IL-6 *trans-signaling* erneut mit 10 ng/mL HIL-6 oder 10 ng/mL IL-6 + 70 ng/mL sIL-6R. Den somit stimulierten Zellen wurden die Inhibitoren in ansteigender Konzentration (0,01 - 10 mM) zugegeben und die Proliferation analysiert (s. Abschnitt 2.4.2).

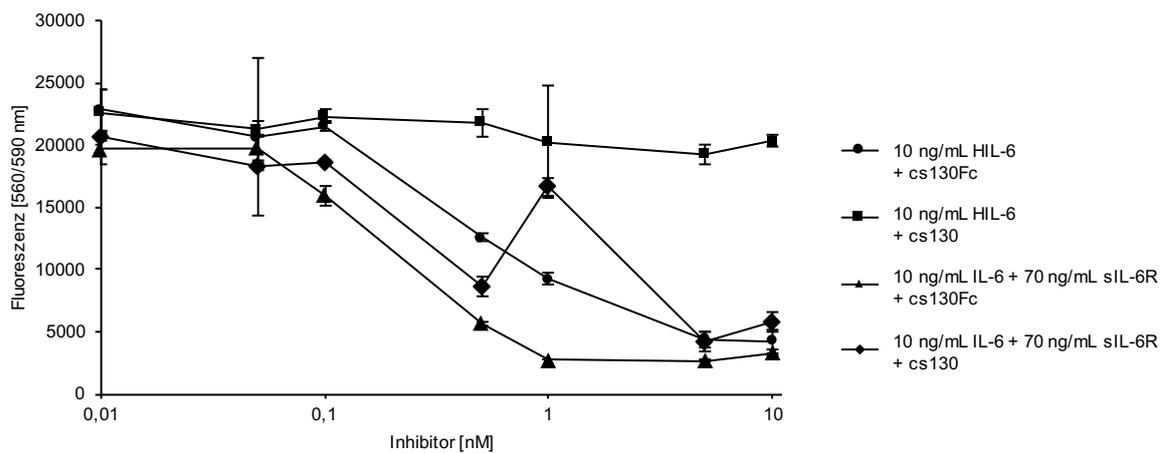


Abb. 32: Wirkung des Monomers cs130 auf IL-6 *trans-signaling* im Vergleich zu cs130Fc

Proliferationsmessung von Ba/F3-gp130-IL-12R β 1-IL-23R Zellen (5×10^4 Zellen/mL), stimuliert mit 10 ng/mL HIL-6 oder 10 ng/mL IL-6 + 70 ng/mL sIL-6R, jeweils unter Zugabe des Inhibitors cs130Fc oder cs130 nach Proteinextraktion aus dem Zytosol von CHO-K1 Zellen. Auslesung nach 72 h mit dem *CellTiter-Blue Cell Viability Assay*.

Dieses Experiment wurde nur einmalig durchgeführt.

Die Zugabe des cs130 bei einer Stimulation mit 10 ng/mL HIL-6 hatte keinen Einfluss auf die Zellproliferation. Bei einer Stimulation mit 10 ng/mL IL-6 + 70 ng/mL sIL-6R hingegen konnte die Proliferation durch cs130 in ähnlichem Ausmaß wie durch cs130Fc inhibiert werden. Die inhibitorische Wirkung von cs130Fc ist ebenfalls etwas stärker ausgeprägt bei der Stimulation mit IL-6/sIL-6R anstatt HIL-6 (s. Abb. 32).

4 Diskussion

4.1 Die Stabilisierung des IL-6/sIL-6R Komplexes durch den sdAb VHH6

Der Einzeldomänenantikörper (sdAb) VHH6 bindet spezifisch ein funktionales Epitop des IL-6/sIL-6R Komplexes und führt durch diese Stabilisierung des Komplexes zu einer Förderung des IL-6 *trans-signaling* (Adams *et al.* 2017). Inwieweit der sdAb VHH6 auch eine Wirkung auf IL-6 *classic-signaling* haben würde, war bisher unklar.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde erstmals die konzentrationsabhängige Wirkung des VHH6 auf die IL-6 *trans-* und *classic-signaling* induzierte Proliferation von Ba/F3-gp130 Zellen und Ba/F3-gp130-IL-6R Zellen untersucht. Hier zeigte sich, dass der sdAb VHH6 konzentrationsabhängig IL-6 *trans-signaling* fördert und zu einer stärkeren Zellproliferation von Ba/F3-gp130 Zellen führt ohne IL-6 *classic-signaling* zu beeinflussen (s. Abschnitte 3.1.2 und 3.1.3). In diesen Experimenten konnte die von Adams *et al.* bereits beobachtete Zunahme an intrazellulärer STAT3 Phosphorylierung über IL-6 *trans-signaling* bestätigt werden (Adams *et al.* 2017). In einem *in vitro* Modell für IL-6 *classic-signaling* mit Ba/F3-gp130-IL-6R Zellen konnte weder eine vermehrte STAT3 Phosphorylierung noch eine Wirkung auf die Zellproliferation nachgewiesen werden (s. Abschnitt 3.1.3).

An dieser Stelle ist auch der Vergleich des VHH6 mit HIL-6 interessant. Hierbei handelt es sich um ein *Designer-Zytokin*, welches 1997 erstmals beschrieben wurde und ebenfalls zu einer verstärkten Aktivierung des IL-6 *trans-signaling* führt (Fischer *et al.* 1997).

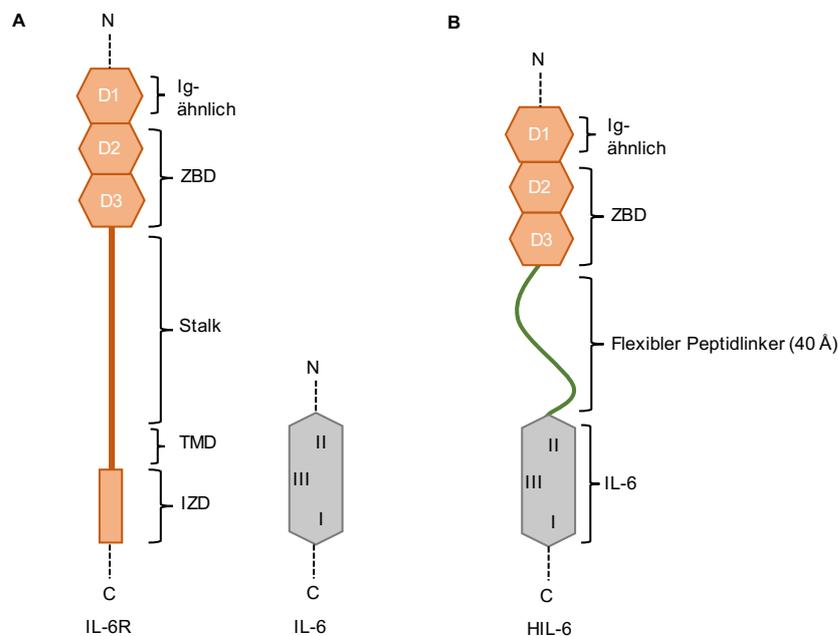


Abb. 33: Schematische Darstellung von HIL-6

(A) Schematische Darstellung von IL-6R und IL-6 mit Kennzeichnung von N- und C-Terminus. Darstellung modifiziert nach Kishimoto *et al.* 1995. (B) Schematische Darstellung von HIL-6, bestehend aus den Domänen D1, D2 und D3 des IL-6R (N-terminal), welche über einen flexiblen Peptidlinker mit dem IL-6 (C-terminal) verbunden sind (Fischer *et al.* 1997).

Anders als beim sdAb VHH6, der durch die Bindung des IL-6/sIL-6R zu einer geringeren Dissoziation dieses Komplexes führt, handelt es sich bei HIL-6 um ein Protein, bei dem IL-6 über einen flexiblen Peptidlinker mit dem sIL-6R fusioniert ist (s. Abb. 33). Das HIL-6 zeigt dabei eine 100-1000fach erhöhte Affinität gegenüber Zellen, die gp130 exprimieren, als dies bei Inkubation mit IL-6 und sIL-6R allein der Fall ist (Fischer *et al.* 1997; Rakemann *et al.* 1999). HIL-6 wurde in der *in vitro* und *in vivo* Forschung zum IL-6 *trans-signaling* vielfach genutzt (Rakemann *et al.* 1999).

Der entscheidende Unterschied in der Förderung des IL-6 *trans-signaling*s durch den sdAb VHH6 und das Fusionsprotein HIL-6 besteht darin, dass die Wirkung von VHH6 abhängig von der Menge an bereits vorhandenem IL-6 und sIL-6R ist, wohingegen das HIL-6 davon unabhängig auf Zellen wirkt, die gp130 exprimieren. Zur quantitativen Analyse des IL-6/sIL-6R Komplexes ist HIL-6 somit nicht geeignet. Der Nachweis der IL-6 Aktivität ist unter anderem bei entzündlichen Prozessen relevant (Rose-John 2012). Ein Puffersystem für IL-6 *trans-signaling* besteht aus endogenem sgp130 und sIL-6R (Jostock *et al.* 2001; Garbers *et al.* 2015; Rose-John 2017). Unter physiologischen Bedingungen finden sich im Serum deutlich höhere Konzentrationen an sIL-6R und sgp130, wobei IL-6 an den sIL-6R bindet und von sgp130 abgepuffert werden kann (Garbers *et al.* 2015; Rose-John 2017). Im Rahmen inflammatorischer Prozesse sind sowohl das Zytokin IL-6 als auch der sIL-6R hochreguliert und in erhöhten Mengen im Serum nachweisbar (Mitsuyama *et al.* 1995; Robak *et al.* 1998; Scheller *et al.* 2014). Dies wiederum bedingt eine verstärkte Aktivierung des IL-6 *trans-signaling*s. Grundsätzlich könnte es zur Erforschung verschiedener, mit IL-6 *signaling* assoziierter Erkrankungen hilfreich sein, neben der Menge an IL-6 auch die Menge an IL-6/sIL-6R Komplex exakt bestimmen zu können. So könnte der Einfluss eines Überschusses an IL-6 über IL-6/sIL-6R Komplex oder *vice versa* möglicherweise besser untersucht werden. Berücksichtigt werden muss dabei auch eine mögliche lokale Anreicherung der Komponenten im Gewebe, die einer Blutuntersuchung nicht direkt zugänglich sind (Jones *et al.* 2011). Zur Präzisierung der quantitativen Analyse von IL-6/sIL-6R Komplex im Serum könnte der Einsatz des VHH6 nützlich sein.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, ob der VHH6 die Detektion auch sehr geringer Mengen an IL-6/sIL-6R Komplex im kommerziell erhältlichen IL-6/sIL-6R Komplex-ELISA (*Human IL-6/IL-6R α Complex DuoSet ELISA* von R&D Systems) erhöhen würde. Nach Ausschluss einer Kreuzreaktivität des VHH6 mit dem ELISA Kit konnte gezeigt werden, dass sich durch Zugabe des VHH6 der IL-6/sIL-6R Komplex auch bei IL-6 Konzentrationen im Bereich von 0,1 - 1 ng/mL nachweisen lässt (Baran *et al.* 2018). Zum Vergleich wurde gezeigt, dass sich der IL-6/sIL-6R Komplex unter Gleichgewichtsbedingungen nicht sehr stabil zeigt und ein großer Anteil an freien Komponenten vorliegt.

Ebenfalls wurde gezeigt, dass in Anwesenheit des VHH6 alle vorhandenen IL-6 Moleküle eine Bindung mit dem sIL-6R eingehen und somit kein inaktives IL-6 oder sIL-6R vorliegen (Baran *et al.* 2018). Neben dem möglichen Einsatz des VHH6 in der Diagnostik ist auch ein therapeutischer Nutzen zu erwägen. Grundsätzlich wird das IL-6 *trans-signaling* mit Entzündungsprozessen in Verbindung gebracht, weshalb eine Förderung dieses Signalwegs zunächst nicht sinnvoll erscheint (s. Abschnitt 1.1.2). Mittlerweile ist jedoch erforscht, dass bestimmte Heilungsprozesse über IL-6 *trans-signaling* vermittelt werden. Hier ist vor allem die Leberregeneration nach partieller Hepatektomie zu nennen (Peters *et al.* 2000; Galun *et al.* 2000; Fazel Modares *et al.* 2019).

Dahingehend wurde auch bereits der therapeutische Einsatz von HIL-6 diskutiert (Fischer *et al.* 1997). Eine Applikation von VHH6 alleine würde aufgrund der in Abschnitt 1.1.2 bereits beschriebenen Wirkungen des IL-6 *trans-signaling*s voraussichtlich zu schweren Nebenwirkungen führen. Hier könnte eine mögliche Optimierung im Sinne einer Reduktion von Nebenwirkungen in der Kopplung des VHH6 an ein Molekül, welches spezifisch an Zellen in der Leber bindet, bestehen. Für die Leberregeneration nach Hepatektomie ist insbesondere die IL-6 Ausschüttung aus Kupffer-Zellen entscheidend (Taub 2004). Eine gezielte Aufnahme des VHH6 in die Leber könnte durch eine Fusion mit dem Zuckermolekül Mannose erreicht werden, wobei die Mannosylierung eine Bindung an Rezeptoren der Kupffer-Zellen ermöglicht (Minayoshi *et al.* 2018). Ebenso denkbar wäre die Fusion an ein Galaktose oder Glukose Molekül um eine Aufnahme in Hepatozyten über den Asialoglykoprotein-Rezeptor (ASGPR) zu erreichen (D'Souza, Devarajan 2015). Neben der Generierung eines solchen Fusionsproteins ist auch seine Funktionsweise im Hinblick auf eine mögliche Beeinträchtigung der VHH6 Wirkung durch sterische Effekte zu bedenken.

4.2 Cs130Fc inhibiert IL-6 *trans-signaling* mit hoher Spezifität

Es sind bereits verschiedene (Fusions-)Proteine mit inhibitorischer Wirkung auf das IL-6 *trans-signaling* bekannt, die sich unter anderem in ihrem molekularen Aufbau und Gewicht, sowie der inhibitorischen Wirkstärke, stark unterscheiden (s. Tabelle 16).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein neues Fusionsprotein, das cs130Fc, generiert. Hier wurden einerseits die Eigenschaft des sdAbs VHH6 den IL-6/sIL-6R Komplex zu stabilisieren (s. Abschnitt 3.1.2) und die inhibitorische Wirkung der sgp130 Domänen D1, D2 und D3 andererseits, miteinander kombiniert. Durch Aviditätseffekte konnte somit sowohl ein inhibitorisches Potential vergleichbar mit dem des sgp130Fc, als auch eine Spezifität für das IL-6 *trans-signaling*, erzielt werden. Dies wurde anhand von Proliferations- und Stimulationsassays mit Ba/F3-gp130-IL-12R β 1-IL-23R Zellen gezeigt, die eine Möglichkeit zur *in vitro* Darstellung von IL-6 *trans-signaling* bieten.

Die Zellen wurden mit 10 ng/mL HIL-6 oder 10 ng/mL IL-6 + 70 ng/mL sIL-6R zur Proliferation stimuliert und die konzentrationsabhängige Auswirkung durch Zugabe von cs130Fc oder sgp130Fc miteinander verglichen. Hier zeigte sich eine deutliche Inhibition der Proliferation, wobei sich die Wirkstärke von cs130Fc vergleichbar mit der von sgp130Fc zeigte (s. Abschnitt 3.2.2). Eine Wirkung des cs130Fc auf IL-6 *classic-signaling* konnte in Proliferations- und Stimulationsassays mit Ba/F3-gp130-IL6R Zellen nicht nachgewiesen werden (s. Abschnitt 3.2.3).

Die Spezifität ist insbesondere hinsichtlich einer Wirkung auf das IL-11 *signaling* von Bedeutung, da die Signaltransduktion der Zytokine IL-6 und IL-11 als Einzige aus der IL-6 Zytokinfamilie über eine gp130 Homodimerisierung erfolgt (Yin *et al.* 1993; Garbers, Scheller 2013). Der IL-11R weist dabei eine strukturelle und funktionelle Ähnlichkeit zum IL-6R auf und befindet sich unter anderem auf Lymphozyten, Osteoklasten und Endothelzellen (Hilton *et al.* 1994; Putoczki und Ernst 2010). Die Wirkung über die Bindung von IL-11 an den membranständigen IL-11R mit konsekutiver Bindung und Homodimerisierung von gp130 wird ebenfalls als *classic-signaling* bezeichnet (Garbers, Scheller 2013). Darüber hinaus wurde auch ein löslicher IL-11R (sIL-11R) nachgewiesen, der durch Ektodomänenshedding via ADAM10 entsteht (Lokau *et al.* 2016). Über den sIL-11R sind *trans- und cluster-signaling* möglich (Lokau *et al.* 2016; Lamertz *et al.* 2018). Eine schematische Übersicht über die IL-11 Signaltransduktion findet sich in Abbildung 34.

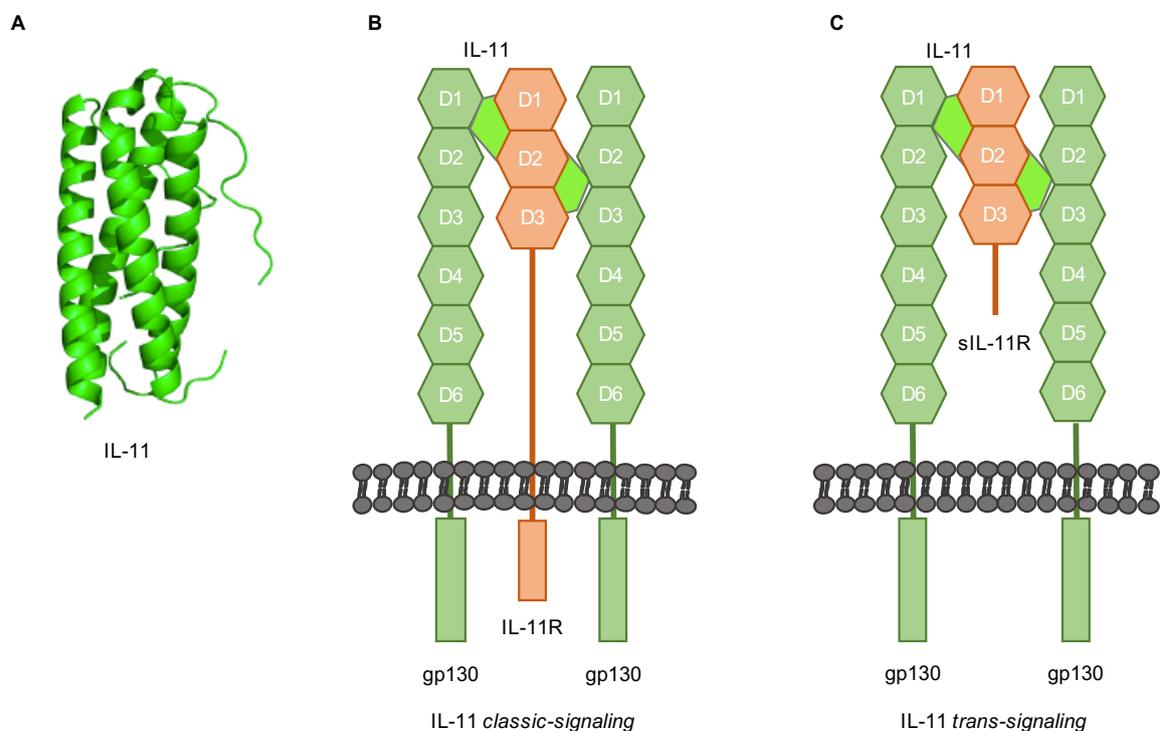


Abb. 34: Schematische Darstellung der IL-11 Signaltransduktion

(A) Proteinstruktur von IL-11 (PDB 4MHL, erstellt mit PyMOL). (B) Schematische Darstellung des IL-11 *classic-signaling*. Tetramerer Komplex aus zwei gp130 Molekülen, dem membranständigen IL-11R und IL-11. (C) Schematische Darstellung des IL-11 *trans-signaling*. Tetramerer Komplex aus zwei gp130 Molekülen, dem löslichen sIL-11R und IL-11. Die Darstellung in (B) und (C) wurde modifiziert nach Garbers, Scheller 2013.

Die IL-11 Wirkung ist insbesondere im Rahmen chondraler und epithelialer Gewebedifferenzierung von Bedeutung (Maier *et al.* 1993; Sims *et al.* 2005; Nieminen *et al.* 2011; Yan *et al.* 2013). Pathophysiologisch ist die Wirkung von IL-11 bei Fibrosierungsprozessen in unterschiedlichen Geweben relevant (Ng *et al.* 2020; Lim *et al.* 2020). Über die (patho-) physiologische Wirkung des IL-11 in Abhängigkeit der Signaltransduktionsmodalitäten ist allerdings noch wenig bekannt (Agthe *et al.* 2017; Garbers, Scheller 2013). IL-11 scheint dabei zum Teil gegensätzlich zu IL-6 zu wirken, was in der Verteilung der membranständigen IL-11 und IL-6 Rezeptoren begründet liegen kann (Garbers, Scheller 2013; Widjaja *et al.* 2020). Hinsichtlich des sgp130Fc ist hinreichend gezeigt worden, dass neben der selektiven Wirkung auf IL-6 *trans-signaling* auch eine inhibitorische Wirkung auf IL-11 *trans-* und *cluster-signaling* ausgeübt wird (Jostock *et al.* 2001; Lokau *et al.* 2016; Lamertz *et al.* 2018). Es sollte in weiteren Experimenten untersucht werden, welche der IL-11 Wirkungen über *classic-* oder *trans-signaling* vermittelt werden. Falls IL-11 *trans-signaling* regenerative Prozesse fördert wäre eine Inhibition nicht wünschenswert. Dies könnte eine Nebenwirkung von sgp130Fc sein. Die Spezifität eines IL-6 *trans-signaling* Inhibitors sollte dementsprechend bestenfalls nur minimale Wirkung auf IL-11 *trans-signaling* zeigen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, ob das Fusionsprotein cs130Fc auch IL-11 *trans-signaling* beeinflusst. Hierzu wurden Experimente mit Ba/F3-gp130-IL-12R β 1-IL-23R Zellen durchgeführt, die sowohl in Abhängigkeit von IL-6, als auch IL-11 proliferieren und somit die Möglichkeit bieten, die Wirkung des cs130Fc auf beide Signalwege zu untersuchen. In diesen Proliferations- und Stimulationsassays zeigte sich, dass cs130Fc die IL-6 *trans-signaling* abhängige Zellproliferation in deutlich stärkerem Ausmaß inhibiert als IL-11 *trans-signaling*. In Abhängigkeit der Konzentration inhibiert sgp130Fc IL-11 *trans-signaling*, wobei ab einer sgp130Fc Konzentration von 0,1 μ g/mL die Proliferation vollständig inhibiert wird. Im Vergleich dazu zeigte cs130Fc erst ab einer Konzentration von 0,5 μ g/mL eine Proliferationsinhibition über IL-11 *trans-signaling* (s. Abschnitt 3.2.4).

Die Konzentration zur halbmaximalen Proliferationsinhibition (IC_{50}) wurde hier für sgp130Fc mit 15 ng/mL deutlich niedriger berechnet im Vergleich zur IC_{50} von 83 ng/mL für cs130Fc (s. Abschnitt 3.2.4). Die geringere Kreuzreaktivität auf IL-11 *trans-signaling* ist dabei durch die Spezifität des VHH6 für den IL-6/sIL-6R Komplex, als Teil des Fusionsproteins cs130Fc, bedingt. Um die Funktionsweise und Spezifität näher zu untersuchen wurden auch Abwandlungen des cs130Fc generiert, wobei der VHH6 gegen GFPVHH (c_{GFP} s130Fc) ausgetauscht wurde oder eine Mutation in die sgp130Fc Domäne D2 eingebracht wurde (cs130Fc $_{D2mut}$). Der Einsatz dieser Fusionsproteine in Proliferationsassays mit Ba/F3-gp130-IL-12R β 1-IL-23R Zellen zeigte keine inhibitorische Wirkung auf IL-6 und IL-11 *trans-signaling* (s. Abschnitte 3.2.5 und 3.2.6).

Für cs130Fc zeigte sich erneut die inhibitorische Wirkung auf IL-6 *trans-signaling*, sowohl bei Stimulation mit HIL-6, als auch IL-6/sIL-6R. Ebenso wurde die Spezifität des VHH6 im Fusionsprotein cs130Fc erneut bestätigt, da sowohl cs130Fc, als auch c_{GFP}s130Fc in gleichem Maße keinen Einfluss auf IL-11 *trans-signaling* zeigten (s. Abschnitt 3.2.6). Die inhibitorische Wirkung des cs130Fc scheint also auf dem Zusammenspiel des VHH6 mit den sgp130 Domänen D1, D2 und D3 zu beruhen (s. Abschnitt 3.2.6). Richards *et al.* stellten für das gp130-RAPS Molekül ebenfalls fest, dass für eine inhibitorische Wirkung die sgp130 Domänen D1, D2 und D3 ausreichend sind (Richards *et al.* 2006). Diese Ergebnisse passen somit zu den Beobachtungen in dieser Arbeit.

Darüber hinaus konnte das Fusionsprotein auch in eine monomere Form überführt werden. Das monomere cs130 hat im Vergleich zu sgp130Fc darüber hinaus den Vorteil eines deutlich geringeren Molekulargewichts. In dieser Arbeit wurde die Generierung des Monomers erfolgreich durch proteolytische Abspaltung des Fc-Fragments von cs130Fc an der spezifischen Erkennungssequenz für die TEV-Protease realisiert (s. Abschnitt 3.3.1). Darüber hinaus wurden Experimente mit Ba/F3-gp130-IL-12R β 1-IL-23R Zellen durchgeführt, um die Funktionstüchtigkeit des monomeren cs130 im Vergleich zu cs130Fc zu untersuchen. Die Ergebnisse legen nahe, dass auch cs130 das IL-6 *trans-signaling* inhibiert (s. Abschnitt 3.3.2).

Weitere Proliferations- und Stimulationsassays mit Ba/F3-gp130 Zellen, die in dieser Arbeitsgruppe von C. Dambietz und D. Heise durchgeführt wurden, bestätigen diese Beobachtung. Dabei weisen sgp130Fc, cs130Fc und cs130 vergleichbare IC₅₀ Werte auf, wobei cs130Fc mit einer IC₅₀ von 0.46 nM \pm 0.39 nM die beste inhibitorische Wirkung zeigt (Heise *et al.* 2021). Sgp130Fc wies eine IC₅₀ von 0.87 nM \pm 0.68 nM auf. Die etwas höhere IC₅₀ von monomerem cs130 von 1.46 nM \pm 1.46 nM lässt sich durch Aviditätseffekte erklären, welche beim Fusionsprotein cs130Fc stärker ausgeprägt sind (Heise *et al.* 2021). Ähnliche Beobachtungen wurden bereits in Bezug auf sgp130Fc gemacht, wobei dies eine etwa zehnfach stärkere biologische Aktivität aufweist als monomeres sgp130 (Jostock *et al.* 2001).

Darüber hinaus zeigten cs130Fc und cs130 einen inhibitorischen Effekt auf die IL-6 *trans-signaling* abhängige TH17 Zellexpansion, die im Rahmen der Pathophysiologie der rheumatoiden Arthritis (RA) eine Rolle spielt (Heise *et al.* 2021). Dies sind vielversprechende Befunde, die einen möglichen therapeutischen Nutzen von cs130Fc und cs130 nahelegen. Im Vergleich zu sgp130Fc zeigte cs130Fc dabei eine 2,5fach stärkere Wirkung. Monomeres cs130 zeigte eine etwas schwächere Wirkung auf die TH17 Zellexpansion, was insgesamt mit den vorher beschriebenen Ergebnissen in Einklang zu bringen ist (Heise *et al.* 2021).

4.3 Mögliche Anwendungsgebiete von cs130Fc und cs130 in der medizinischen Forschung und Therapie

Das Zytokin IL-6, sowie die weiteren Zytokine der IL-6 Familie spielen in vielen verschiedenen, (patho-)physiologischen Prozessen eine wichtige Rolle und sind daher sehr präsent in der gegenwärtigen Forschung (Hirano *et al.* 1986; Jones, Jenkins 2018). Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Wirkung der Fusionsproteine cs130Fc und sgp130Fc auf IL-6 und IL-11 *trans-signaling* miteinander verglichen, da diese beiden Zytokine der IL-6 Familie über eine gp130 Homodimerisierung ihre Wirkung entfalten (s. Abschnitt 4.2). Dies ist relevant, da der IL-6 *trans-signaling* Inhibitor sgp130Fc aufgrund der ähnlichen Signaltransduktion neben IL-6 auch IL-11 *trans-signaling* inhibiert (Jostock *et al.* 2001; Lokau *et al.* 2016). In Untersuchungen zum IL-6 *trans-signaling* mithilfe des sgp130Fc ist also zu berücksichtigen, dass bisher nicht sicher ausgeschlossen werden konnte, ob bestimmte Effekte die dem IL-6 *signaling* zugeschrieben wurden, nicht durch eine Wirkung über IL-11 (mit-)bedingt sind. An dieser Stelle könnte das Fusionsprotein cs130Fc gezielt zum Einsatz kommen, da es durch den VHH6 deutlich weniger Kreuzreaktivität zum IL-11 *signaling* aufweist (s. Abschnitt 3.2.4). Auf einen möglichen therapeutischen Nutzen der Fusionsproteine cs130Fc und cs130 wurde bereits in Abschnitt 4.2 hingewiesen.

Da überschießendes IL-6 *trans-signaling* bei verschiedenen Erkrankungen, insbesondere Autoimmunprozessen beteiligt ist, wurde bereits vielfach zu einer spezifischen Blockade dieses Signalwegs geforscht (s. Abschnitt 1.1.3). Ein prominentes Beispiel für die pathophysiologische Relevanz von IL-6 *signaling* ist dabei die rheumatoide Arthritis (RA), die hier zur Diskussion eines Einsatzes von cs130Fc bzw. cs130 exemplarisch herangezogen wird (Alonzi *et al.* 1998; Nowell *et al.* 2003). Bei der RA handelt es sich um eine chronisch-entzündliche Erkrankung, der ein Zusammenspiel aus genetischer Prädisposition und Autoimmunprozessen zugrunde liegt (Weyand, Goronzy 1997; McInnes, Schett 2011; Smolen *et al.* 2016). Die Erkrankung äußert sich dabei sowohl in progressiver Gelenkdestruktion, als auch systemischen Erscheinungen, die zu Invalidität und erhöhter Mortalität führen (Pincus *et al.* 1984; Lindqvist *et al.* 2002; Aletaha *et al.* 2010). Die Prävalenz von 0,3 - 1% in der Bevölkerung, sowie die individuelle Krankheitsbelastung unterstreichen die Relevanz dieser Erkrankung (Hense *et al.* 2016; Galloway *et al.* 2020). An den Autoimmunprozessen im Rahmen der RA sind besonders T- und B- Lymphozyten, verschiedene Zytokine, darunter IL-6, IL-11 und IL-17, sowie Wachstumsfaktoren und intrazelluläre Signalmoleküle beteiligt (Okamoto *et al.* 1997; Hermann *et al.* 1998; McInnes, Schett 2011; Yasuda *et al.* 2019). So konnten bei Patienten mit RA erhöhte IL-6 Werte, sowohl im Serum, als auch in der synovialen Flüssigkeit betroffener Gelenke nachgewiesen werden (Kotake *et al.* 1996; Robak *et al.* 1998; Chung *et al.* 2011).

Ebenso finden sich erhöhte sIL-6R Spiegel in Serum und synovialer Flüssigkeit betroffener Patienten, was auf verstärktes IL-6 *trans-signaling* hindeutet (De Benedetti *et al.* 1994; Kotake *et al.* 1996; Robak *et al.* 1998; Nowell *et al.* 2003; Chalaris *et al.* 2011). Für das Zytokin IL-11 konnten ebenfalls erhöhte Serumwerte bei Patienten mit RA festgestellt werden, die jedoch nicht mit der entzündlichen Aktivität korrelierten (Chung *et al.* 2011). Obwohl schon lange ein Nachweis von IL-11 auch in synovialer Flüssigkeit und synovialer Membran gelungen ist, konnte die genaue Rolle in der Pathogenese noch nicht aufgezeigt werden (Maier *et al.* 1993; Hermann *et al.* 1998; Chung *et al.* 2011). In einigen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass IL-11 über eine Inhibition von Makrophagen die Produktion proinflammatorischer Zytokine verringert (Walmsley *et al.* 1998). Eine therapeutische Wirkung von rekombinantem IL-11 bei Patienten mit RA konnte bisher jedoch nicht festgestellt werden (Moreland *et al.* 2001). Neben weiteren Untersuchungen zur pathophysiologischen Rolle von IL-11 in RA könnten Untersuchungen zum therapeutischen Einsatz von cs130Fc durchgeführt werden, da es mögliche antiinflammatorische Effekte über IL-11 weniger beeinflussen würde als sgp130Fc. Das komplexe Zusammenspiel verschiedener Zytokine und Effektorzellen ist dabei immer zu berücksichtigen.

In Mausmodellen konnte gezeigt werden, dass die Initiation der entzündlichen Reaktion in den Gelenken auf einer IL-6 abhängigen Aktivierung von Th17 Zellen, einer Subgruppe der T-Lymphozyten, beruht (Kimura *et al.* 2010; Yasuda *et al.* 2019). Diese Th17 Zellen führen zu einer Aktivierung synovialer Makrophagen, die wiederum eine chronische Entzündung unterhalten und die Gelenkdestruktion verursachen (Yasuda *et al.* 2019). Ebenso wie die Pathophysiologie der RA ist die medikamentöse Therapie dieser Erkrankung sehr komplex und hat sich stetig weiterentwickelt (Fiehn *et al.* 2018). In den letzten Jahren sind dabei vermehrt Arzneimittel mit Wirkung auf IL-6 *signaling* zum Einsatz gekommen, die eine gute Wirkung zeigen (Pandolfi *et al.* 2020). Ein Beispiel hierfür ist der bereits erwähnte monoklonale Antikörper Tocilizumab, der gegen den IL-6R gerichtet ist (Nishimoto *et al.* 2004). Dieser humanisierte monoklonale Antikörper mit Handelsnamen RoActemra[®] wurde 2009 zur Behandlung von rheumatoider Arthritis in der Mono- und Kombinationstherapie mit Methotrexat zugelassen (Venkiteshwaran 2009; Calabrese, Rose-John 2014).

Seitdem wurde die Zulassung zum therapeutischen Einsatz auf weitere Erkrankungen ausgeweitet (Tanaka *et al.* 2011). Die Bedeutung einer IL-6 *trans-signaling* spezifischen Inhibition ergibt sich aus den Nebenwirkungen, darunter schwere Infektionen, Malignome und Leberfunktionsstörung, die durch die Blockade sowohl von IL-6 *trans-* als auch *classic-signaling* bei der Anwendung von Tocilizumab auftreten können (Yamamoto *et al.* 2015). Die im Rahmen dieser Arbeit entwickelten Fusionsproteine cs130Fc und cs130 könnten als Ausgangspunkt für neue Therapiemöglichkeiten von IL-6 *trans-signaling* abhängigen (Autoimmun-)Erkrankungen dienen.

Gleichzeitig ist von einer Verringerung der Nebenwirkungen auszugehen, da IL-6 *classic-signaling* nicht beeinflusst wird. Im Gegensatz zu sgp130Fc, welches unter dem Namen Olamkicept als IL-6 *trans-signaling* Inhibitor aktuell in Phase II Studien (clinicaltrials.gov, ID: NCT03235752) zur Therapie von chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen evaluiert wird, ist auch der Einfluss des cs130Fc auf IL-11 *trans-signaling* stark vermindert.

Es konnte bereits gezeigt werden, dass eine Reduktion der TH17 Zellerexpansion in Modellen zu rheumatoider Arthritis durch eine Inhibition von IL-6 *trans-signaling* erreicht werden kann (Yoshida *et al.* 2011; Park *et al.* 2020). Dieser Effekt konnte in *in vitro* Experimenten zur TH17 Zellerexpansion für cs130Fc und cs130 ebenfalls gezeigt werden, wobei weitere Untersuchungen an spezifischen Modellen für rheumatoide Arthritis notwendig sind, um die Wirkung auch gezielt in Bezug auf diese Erkrankung nachzuweisen (Heise *et al.* 2021). Darüber hinaus ist die geringe Molekülgröße von 52 kDa des monomeren cs130 hervorzuheben, wobei für monoklonale Antikörper und deren Varianten eine inverse Korrelation zwischen Molekülgröße und Biodistribution bekannt ist (Li *et al.* 2016). Ob dies spezifisch für eine Anreicherung des cs130 beispielsweise in synovialer Flüssigkeit bei rheumatoider Arthritis zutrifft, könnte in weiteren Untersuchungen erforscht werden.

Neben den genannten Möglichkeiten in der therapeutischen Anwendung von cs130Fc und cs130 sind auch mögliche Einschränkungen zu berücksichtigen. So wurden im Rahmen anderer Studien zur therapeutischen Wirksamkeit von sgp130Fc Varianten bei rheumatoider Arthritis Autoantikörper gegen eben diese Moleküle nachgewiesen (Richards *et al.* 2006). Diese Autoantikörper, die eine Wirkabschwächung bewirken können, sind gegen die C-terminale Sequenz EEASGITYED-NIASF in sgp130Fc Varianten gerichtet (Richards *et al.* 2006). Ob diese Autoantikörper sich auch gegen cs130Fc und cs130 richten können, müsste untersucht werden.

Falls sich die Fusionsproteine cs130Fc und cs130 weiterhin als vielversprechende Therapeutika erweisen sollte auch der Herstellungsprozess betrachtet werden, vor allem bei industrieller Herstellung in größeren Mengen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde cs130Fc über die Expression einer zuvor klonierten cDNA in CHO-K1 Zellen mit anschließender Extraktion des sekretierten cs130Fc aus dem ZKÜ generiert (s. Abschnitt 3.2.1). In der Industrie ist die Herstellung rekombinanter Proteine aus CHO-K1 Zellen etabliert (Fischer *et al.* 2015). Monomeres cs130 wurde mittels proteolytischer Abspaltung des Fc-Fragments durch die TEV-Protease generiert. Hier besteht eine geringe *in vivo* Toxizität, da diese Protease eine hohe Substratspezifität aufweist und ihre Erkennungssequenz kaum in natürlichen Proteinen vorkommt (Parks *et al.* 1994; Sanchez *et al.* 2019). Diese Methode ist somit zur Herstellung von cs130 sehr gut geeignet.

4.4 Schlussfolgerungen

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Einzeldomänenantikörper (sdAb) VHH6 auf vielfältige Weise untersucht, als Bestandteil neuer Fusionsproteine weiterentwickelt und mögliche Anwendungsgebiete erschlossen.

Im Anschluss an die erfolgreiche Expression von VHH6 in *E.coli* konnte in Proliferations- und Stimulationsassays bestätigt werden, dass dieser sdAb IL-6 *trans-signaling* verstärkt (Adams *et al.* 2017; Baran *et al.* 2018). Eine Wirkung auf IL-6 *classic-signaling* wurde nicht nachgewiesen (Baran *et al.* 2018). Die Spezifität für IL-6 *trans-signaling* konnte genutzt werden um die Nachweisgrenze der Menge an detektierbarem IL-6/sIL-6R Komplex im Kit *Human IL-6/IL-6R α Complex DuoSet ELISA* von R&D Systems zu verbessern (Baran *et al.* 2018).

Darüber hinaus wurde der Einsatz von VHH6 im therapeutischen Bereich diskutiert. Denkbar wäre hier der Einsatz zur Unterstützung der Leberregeneration nach partieller Hepatektomie, welche unter anderem über IL-6 *trans-signaling* vermittelt wird (Peters *et al.* 2000; Galun *et al.* 2000; Fazel Modares *et al.* 2019).

In einem zweiten Teil dieser Arbeit wurde der sdAb VHH6 an Domänen des Moleküls sgp130Fc fusioniert, um ein neues Fusionsprotein mit inhibitorischer Wirkung auf IL-6 *trans-signaling* zu generieren. Es wurden drei unterschiedliche Varianten kloniert, wobei sich die Fusion der gp130 Domänen D1-D3 an den VHH6 und einem Fc-Fragment wirksam zeigte. Es folgten Experimente die eine inhibitorische Wirkung dieses neuen Fusionsproteins cs130Fc auf IL-6 *trans-signaling* zeigten. Neben der zu sgp130Fc vergleichbaren inhibitorischen Wirkstärke ist auch das geringe Molekulargewicht von 157 kDa, sowie die Spezifität für IL-6 *trans-signaling*, hervorzuheben. Im Gegensatz zu sgp130Fc zeigt cs130Fc kaum Wirkung auf IL-11 *trans-signaling* (Heise *et al.* 2021).

Eine weitere Reduktion des Molekulargewichts konnte durch die proteolytische Abspaltung des Fc-Fragments mittels TEV-Protease erreicht werden. Monomeres cs130 mit einem Molekulargewicht von 52 kDa zeigte sich ebenfalls biologisch aktiv im Sinne einer spezifischen IL-6 *trans-signaling* Inhibition (Heise *et al.* 2021).

Am Beispiel der rheumatoiden Arthritis wurde ein mögliches Anwendungsgebiet dieser neuen Fusionsproteine diskutiert. In Experimenten, welche auf diese Arbeit aufbauen, konnte eine effektive Reduktion der TH17 Zellexpansion gezeigt werden, die in der Pathophysiologie der rheumatoiden Arthritis eine entscheidende Rolle spielt (Heise *et al.* 2021). Bis hin zum klinischen Einsatz sind jedoch noch zahlreiche weitere Experimente nötig. Zusammenfassend sind die hier entwickelten Fusionsproteine cs130Fc und cs130 eine vielversprechende Möglichkeit zur Erforschung und der Therapie von IL-6 und/oder IL-11 abhängigen (patho-)physiologischen Vorgängen.

5 Literaturverzeichnis

Adams, R., R. J. Burnley, C. R. Valenzano, O. Qureshi, C. Doyle, S. Lumb, M. Del Carmen Lopez, R. Griffin, D. McMillan, R. D. Taylor, C. Meier, P. Mori, L. M. Griffin, U. Wernery, J. Kinne, S. Rapecki, T. S. Baker, A. D. Lawson, M. Wright and A. Ettore (2017). "Discovery of a junctional epitope antibody that stabilizes IL-6 and gp80 protein:protein interaction and modulates its downstream signaling." Sci Rep **7**(1): 37716.

Agthe, M., Y. Garbers, T. Putoczki and C. Garbers (2017). "Interleukin-11 classic but not trans-signaling is essential for fertility in mice." Placenta **57**(1): 13-16.

Aletaha, D., T. Neogi, A. J. Silman, J. Funovits, D. T. Felson, C. O. Bingham, 3rd, N. S. Birnbaum, G. R. Burmester, V. P. Bykerk, M. D. Cohen, B. Combe, K. H. Costenbader, M. Dougados, P. Emery, G. Ferraccioli, J. M. Hazes, K. Hobbs, T. W. Huizinga, A. Kavanaugh, J. Kay, T. K. Kvien, T. Laing, P. Mease, H. A. Menard, L. W. Moreland, R. L. Naden, T. Pincus, J. S. Smolen, E. Stanislawska-Biernat, D. Symmons, P. P. Tak, K. S. Upchurch, J. Vencovsky, F. Wolfe and G. Hawker (2010). "2010 Rheumatoid arthritis classification criteria: an American College of Rheumatology/European League Against Rheumatism collaborative initiative." Arthritis Rheum **62**(9): 2569-2581.

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

Althoff, K., P. Reddy, N. Voltz, S. Rose-John and J. Müllberg (2000). "Shedding of interleukin-6 receptor and tumor necrosis factor alpha. Contribution of the stalk sequence to the cleavage pattern of transmembrane proteins." Eur J Biochem **267**(9): 2624-2631.

Arbabi Ghahroudi, M., A. Desmyter, L. Wyns, R. Hamers and S. Muyldermans (1997). "Selection and identification of single domain antibody fragments from camel heavy-chain antibodies." FEBS Letters **414**(3): 521-526.

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

- Baran, P., S. Hansen, G. H. Waetzig, M. Akbarzadeh, L. Lamertz, H. J. Huber, M. R. Ahmadian, J. M. Moll and J. Scheller (2018). "The balance of interleukin (IL)-6, IL-6·soluble IL-6 receptor (sIL-6R), and IL-6·sIL-6R·sgp130 complexes allows simultaneous classic and trans-signaling." J Biol Chem **293**(18): 6762-6775.
- Bazan, J. F. (1989). "A novel family of growth factor receptors: a common binding domain in the growth hormone, prolactin, erythropoietin and IL-6 receptors, and the p75 IL-2 receptor beta-chain." Biochem Biophys Res Commun **164**(2): 788-795.
- Bazan, J. F. (1990). "Structural design and molecular evolution of a cytokine receptor superfamily." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(18): 6934-6938.
- Bazan, J. F. (1991). "Neurotrophic cytokines in the hematopoietic fold." Neuron **7**(2): 197-208.
- Becker, C., M. C. Fantini, C. Schramm, H. A. Lehr, S. Wirtz, A. Nikolaev, J. Burg, S. Strand, R. Kiesslich, S. Huber, H. Ito, N. Nishimoto, K. Yoshizaki, T. Kishimoto, P. R. Galle, M. Blessing, S. Rose-John and M. F. Neurath (2004). "TGF-beta suppresses tumor progression in colon cancer by inhibition of IL-6 trans-signaling." Immunity **21**(4): 491-501.
- Boulanger, M. J., D. C. Chow, E. E. Brevnova and K. C. Garcia (2003). "Hexameric structure and assembly of the interleukin-6/IL-6 alpha-receptor/gp130 complex." Science **300**(5628): 2101-2104.
- Boulton, T., N. Stahl and G. Yancopoulos (1994). "Ciliary neurotrophic factor leukemia inhibitory factor interleukin 6 oncostatin M family of cytokines induces tyrosine phosphorylation of a common set of proteins overlapping those induced by other cytokines and growth factors." J Biol Chem **269**(15): 11648-11655.
- Braun, G. S., Y. Nagayama, Y. Maruta, F. Heymann, C. R. van Roeyen, B. M. Klinkhammer, P. Boor, L. Villa, D. J. Salant, U. Raffetseder, S. Rose-John, T. Ostendorf and J. Floege (2016). "IL-6 Trans-Signaling Drives Murine Crescentic GN." J Am Soc Nephrol **27**(1): 132-142.
- Bravo, J., D. Staunton, J. K. Heath and E. Y. Jones (1998). "Crystal structure of a cytokine-binding region of gp130." EMBO J **17**(6): 1665-1674.
- Brooks, G. D., L. McLeod, S. Alhayyani, A. Miller, P. A. Russell, W. Ferlin, S. Rose-John, S. Ruwanpura and B. J. Jenkins (2016). "IL6 Trans-signaling Promotes KRAS-Driven Lung Carcinogenesis." Cancer Res **76**(4): 866-876.
- Calabrese, L. H. and S. Rose-John (2014). "IL-6 biology: implications for clinical targeting in rheumatic disease." Nat Rev Rheumatol **10**(12): 720-727.

Chalaris, A., C. Garbers, B. Rabe, S. Rose-John and J. Scheller (2011). "The soluble Interleukin 6 receptor: generation and role in inflammation and cancer." Eur J Cell Biol **90**(6-7): 484-494.

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

Chung, C. D., J. Liao, B. Liu, X. Rao, P. Jay, P. Berta and K. Shuai (1997). "Specific inhibition of Stat3 signal transduction by PIAS3." Science **278**(5344): 1803-1805.

Chung, S. J., Y. J. Kwon, M. C. Park, Y. B. Park and S. K. Lee (2011). "The correlation between increased serum concentrations of interleukin-6 family cytokines and disease activity in rheumatoid arthritis patients." Yonsei Med J **52**(1): 113-120.

D'Souza, A. A. and P. V. Devarajan (2015). "Asialoglycoprotein receptor mediated hepatocyte targeting - strategies and applications." J Control Release **203**: 126-139.

Darnell, J. E., Jr., I. M. Kerr and G. R. Stark (1994). "Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins." Science **264**(5164): 1415-1421.

De Benedetti, F., M. Massa, P. Pignatti, S. Albani, D. Novick and A. Martini (1994). "Serum soluble interleukin 6 (IL-6) receptor and IL-6/soluble IL-6 receptor complex in systemic juvenile rheumatoid arthritis." J Clin Invest **93**(5): 2114-2119.

De Genst, E., K. Silence, K. Decanniere, K. Conrath, R. Loris, J. Kinne, S. Muyldermans and L. Wyns (2006). "Molecular basis for the preferential cleft recognition by dromedary heavy-chain antibodies." Proc Natl Acad Sci U S A **103**(12): 4586-4591.

Desmyter, A., T. R. Transue, M. A. Ghahroudi, M.-H. Dao Thi, F. Poortmans, R. Hamers, S. Muyldermans and L. Wyns (1996). "Crystal structure of a camel single-domain VH antibody fragment in complex with lysozyme." Nat Struct Biol **3**(9): 803-811.

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

Dumoulin, M., A. M. Last, A. Desmyter, K. Decanniere, D. Canet, G. Larsson, A. Spencer, D. B. Archer, J. Sasse, S. Muyldermans, L. Wyns, C. Redfield, A. Matagne, C. V. Robinson and C. M. Dobson (2003). "A camelid antibody fragment inhibits the formation of amyloid fibrils by human lysozyme." Nature **424**(6950): 783-788.

- Ehlers, M., J. Grötzinger, F. D. deHon, J. Müllberg, J. P. Brakenhoff, J. Liu, A. Wollmer and S. Rose-John (1994). "Identification of two novel regions of human IL-6 responsible for receptor binding and signal transduction." J Immunol **153**(4): 1744-1753.
- Esteve, E., G. Villuendas, J. Mallolas, J. Vendrell, A. Lopez-Bermejo, M. Rodriguez, M. Recasens, W. Ricart, J. L. San Millan, H. Escobar-Morreale, C. Richart and J. M. Fernandez-Real (2006). "Polymorphisms in the interleukin-6 receptor gene are associated with body mass index and with characteristics of the metabolic syndrome." Clin Endocrinol (Oxf) **65**(1): 88-91.
- Eulenfeld, R., A. Dittrich, C. Khouri, P. J. Muller, B. Mutze, A. Wolf and F. Schaper (2012). "Interleukin-6 signalling: more than Jaks and STATs." Eur J Cell Biol **91**(6-7): 486-495.
- Eulenfeld, R. and F. Schaper (2009). "A new mechanism for the regulation of Gab1 recruitment to the plasma membrane." J Cell Sci **122**(Pt 1): 55-64.
- Fazel Modares, N., R. Polz, F. Haghighi, L. Lamertz, K. Behnke, Y. Zhuang, C. Kordes, D. Haussinger, U. R. Sorg, K. Pfeffer, D. M. Floss, J. M. Moll, R. P. Piekorz, M. R. Ahmadian, P. A. Lang and J. Scheller (2019). "IL-6 Trans-signaling Controls Liver Regeneration After Partial Hepatectomy." Hepatology **70**(6): 2075-2091.
- Fiehn, C., J. Holle, C. Iking-Konert, J. Leipe, C. Weseloh, M. Frerix, R. Alten, F. Behrens, C. Baerwald, J. Braun, H. Burkhardt, G. Burmester, J. Detert, M. Gaubitz, A. Gause, E. Gromnica-Ihle, H. Kellner, A. Krause, J. Kuipers, H. M. Lorenz, U. Muller-Ladner, M. Nothacker, H. Nusslein, A. Rubbert-Roth, M. Schneider, H. Schulze-Koops, S. Seitz, H. Sitter, C. Specker, H. P. Tony, S. Wassenberg, J. Wollenhaupt and K. Kruger (2018). "[S2e guideline: treatment of rheumatoid arthritis with disease-modifying drugs]." Z Rheumatol **77**(Suppl 2): 35-53.
- Fischer, M., J. Goldschmitt, C. Peschel, J. P. Brakenhoff, K. J. Kallen, A. Wollmer, J. Grötzinger and S. Rose-John (1997). "I. A bioactive designer cytokine for human hematopoietic progenitor cell expansion." Nat Biotechnol **15**(2): 142-145.
- Fischer, S., R. Handrick and K. Otte (2015). "The art of CHO cell engineering: A comprehensive retrospect and future perspectives." Biotechnol Adv **33**(8): 1878-1896.
- Frenken, L. G. J., R. H. J. van der Linden, P. W. J. J. Hermans, J. W. Bos, R. C. Ruuls, B. de Geus and C. T. Verrips (2000). "Isolation of antigen specific Llama VHH antibody fragments and their high level secretion by *Saccharomyces cerevisiae*." J Biotechnol **78**(1): 11-21.

Fukada, T., M. Hibi, Y. Yamanaka, M. Takahashi-Tezuka, Y. Fujitani, T. Yamaguchi, K. Nakajima and T. Hirano (1996). "Two Signals Are Necessary for Cell Proliferation Induced by a Cytokine Receptor gp130: Involvement of STAT3 in Anti-Apoptosis." Immunity **5**(5): 449-460.

Galloway, J., J. P. Capron, F. De Leonardis, W. Fakhouri, A. Rose, I. Kouris and T. Burke (2020). "The impact of disease severity and duration on cost, early retirement and ability to work in rheumatoid arthritis in Europe: an economic modelling study." Rheumatol Adv Pract **4**(2): rkaa041.

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

Garbers, C., S. Aparicio-Siegmund and S. Rose-John (2015). "The IL-6/gp130/STAT3 signaling axis: recent advances towards specific inhibition." Curr Opin Immunol **34**(1): 75-82.

Garbers, C. and J. Scheller (2013). "Interleukin-6 and interleukin-11: same same but different." Biol Chem **394**(9): 1145-1161.

Garbers, C., W. Thaiss, G. W. Jones, G. H. Waetzig, I. Lorenzen, F. Guilhot, R. Lissilaa, W. G. Ferlin, J. Grotzinger, S. A. Jones, S. Rose-John and J. Scheller (2011). "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." J Biol Chem **286**(50): 42959-42970.

Gauldie, J., C. Richards, D. Harnish, P. Lansdorp and H. Baumann (1987). "Interferon beta 2/B-cell stimulatory factor type 2 shares identity with monocyte-derived hepatocyte-stimulating factor and regulates the major acute phase protein response in liver cells." Proc Natl Acad Sci U S A **84**(20): 7251-7255.

Gerhartz, C., B. Heesel, J. Sasse, U. Hemmann, C. Landgraf, J. Schneider-Mergener, F. Horn, P. C. Heinrich and L. Graeve (1996). "Differential activation of acute phase response factor/STAT3 and STAT1 via the cytoplasmic domain of the interleukin 6 signal transducer gp130. I. Definition of a novel phosphotyrosine motif mediating STAT1 activation." J Biol Chem **271**(22): 12991-12998.

- Ghoreschi, K., M. I. Jesson, X. Li, J. L. Lee, S. Ghosh, J. W. Alsup, J. D. Warner, M. Tanaka, S. M. Steward-Tharp, M. Gadina, C. J. Thomas, J. C. Minnerly, C. E. Storer, T. P. LaBranche, Z. A. Radi, M. E. Dowty, R. D. Head, D. M. Meyer, N. Kishore and J. J. O'Shea (2011). "Modulation of innate and adaptive immune responses by tofacitinib (CP-690,550)." J Immunol **186**(7): 4234-4243.
- Goldman, E. R., G. P. Anderson, J. L. Liu, J. B. Delehanty, L. J. Sherwood, L. E. Osborn, L. B. Cummins and A. Hayhurst (2006). "Facile Generation of Heat-Stable Antiviral and Antitoxin Single Domain Antibodies from a Semisynthetic Llama Library." Anal Chem **78**(24): 8245-8255.
- Govaert, J., M. Pellis, N. Deschacht, C. Vincke, K. Conrath, S. Muyldermans and D. Saerens (2012). "Dual beneficial effect of interloop disulfide bond for single domain antibody fragments." J Biol Chem **287**(3): 1970-1979.
- Grötzinger, J., T. Kernebeck, K. J. Kallen and S. Rose-John (1999). "IL-6 type cytokine receptor complexes: hexamer, tetramer or both?" Biol Chem **380**(7-8): 803-813.
- Hamers-Casterman, C., T. Atarhouch, S. Muyldermans, G. Robinson, C. Hamers, E. B. Songa, N. Bendahman and R. Hamers (1993). "Naturally occurring antibodies devoid of light chains." Nature **363**(6428): 446-448.
- Hamid, Y. H., S. A. Urhammer, D. P. Jensen, C. Glumer, K. Borch-Johnsen, T. Jorgensen, T. Hansen and O. Pedersen (2004). "Variation in the interleukin-6 receptor gene associates with type 2 diabetes in Danish whites." Diabetes **53**(12): 3342-3345.
- Hammacher, A., R. T. Richardson, J. E. Layton, D. K. Smith, L. J. L. Angus, D. J. Hilton, N. A. Nicola, J. Wijdenes and R. J. Simpson (1998). "The Immunoglobulin-like Module of gp130 Is Required for Signaling by Interleukin-6, but Not by Leukemia Inhibitory Factor." J Biol Chem **273**(35): 22701-22707.
- Harmsen, M. M. and H. J. De Haard (2007). "Properties, production, and applications of camelid single-domain antibody fragments." Appl Microbiol Biotechnol **77**(1): 13-22.
- Heinrich, P. C., I. Behrmann, S. Haan, H. M. Hermanns, G. Müller-Newen and F. Schaper (2003). "Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation." Biochem J **374**(1): 1-20.
- Heinrich, P. C., I. Behrmann, G. Müller-Newen, F. Schaper and L. Graeve (1998). "Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway." Biochem J **334**(2): 297-314.

Heise, D., A. D. Soria, S. Hansen, C. Dambietz, M. Akbarzadeh, A. F. Berg, G. H. Waetzig, S. Jones, R. Dvorsky, M. R. Ahmadian, J. Scheller, J. M. Moll (2021). "Selective inhibition of IL-6 trans-signaling by a miniaturized, optimized chimeric soluble gp130 inhibits TH17 cell expansion." Sci Signal **14**(696): eabc3480.

Hense, S., A. Luque Ramos, J. Callhoff, K. Albrecht, A. Zink and F. Hoffmann (2016). "[Prevalence of rheumatoid arthritis in Germany based on health insurance data : Regional differences and first results of the PROCLAIR study]." Z Rheumatol **75**(8): 819-827.

Herce, H. D., W. Deng, J. Helma, H. Leonhardt and M. C. Cardoso (2013). "Visualization and targeted disruption of protein interactions in living cells." Nat Commun **4**(1): 2660.

Hermann, J. A., M. A. Hall, R. N. Maini, M. Feldmann and F. M. Brennan (1998). "Important immunoregulatory role of interleukin-11 in the inflammatory process in rheumatoid arthritis." Arthritis Rheum **41**(8): 1388-1397.

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

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

Hirano, T., K. Yasukawa, H. Harada, T. Taga, Y. Watanabe, T. Matsuda, S. Kashiwamura, K. Nakajima, K. Koyama, A. Iwamatsu, S. Tsunasawa, F. Sakiyama, H. Matsui, Y. Takahara, T. Taniguchi and T. Kishimoto (1986). "Complementary-DNA for a Novel Human Interleukin (Bsf-2) That Induces Lymphocytes-B to Produce Immunoglobulin." Nature **324**(6092): 73-76.

Hirata, Y., T. Taga, M. Hibi, N. Nakano, T. Hirano and T. Kishimoto (1989). "Characterization of IL-6 receptor expression by monoclonal and polyclonal antibodies." J Immunol **143**(9): 2900-2906.

Hodge, D. R., E. M. Hurt and W. L. Farrar (2005). "The role of IL-6 and STAT3 in inflammation and cancer." Eur J Cancer **41**(16): 2502-2512.

Horiuchi, S., Y. Koyanagi, Y. Zhou, H. Miyamoto, Y. Tanaka, M. Waki, A. Matsumoto, M. Yamamoto and N. Yamamoto (1994). "Soluble interleukin-6 receptors released from T cell or granulocyte/macrophage cell lines and human peripheral blood mononuclear cells are generated through an alternative splicing mechanism." Eur J Immunol **24**(8): 1945-1948.

- Horsten, U., G. Müller-Newen, C. Gerhartz, A. Wollmer, J. Wijdenes, P. C. Heinrich and J. Grötzinger (1997). "Molecular Modeling-guided Mutagenesis of the Extracellular Part of gp130 Leads to the Identification of Contact Sites in the Interleukin-6 (IL-6)·IL-6 receptor·gp130 Complex." J Biol Chem **272**(38): 23748-23757.
- Hu, Y., C. Liu and S. Muyldermans (2017). "Nanobody-Based Delivery Systems for Diagnosis and Targeted Tumor Therapy." Front Immunol **8**(1): 1442.
- Huang, L., L. O. Gaiokam, V. Caveliers, C. Vanhove, M. Keyaerts, P. De Baetselier, A. Bossuyt, H. Revets and T. Lahoutte (2008). "SPECT imaging with 99mTc-labeled EGFR-specific nanobody for in vivo monitoring of EGFR expression." Mol Imaging Biol **10**(3): 167-175.
- Ip, N. Y., S. H. Nye, T. G. Boulton, S. Davis, T. Taga, Y. Li, S. J. Birren, K. Yasukawa, T. Kishimoto, D. J. Anderson, N. Stahl and G. D. Yancopoulos (1992). "CNTF and LIF act on neuronal cells via shared signaling pathways that involve the IL-6 signal transducing receptor component gp130." Cell **69**(7): 1121-1132.
- Ismaili, A., M. Jalali-Javaran, Mohammad J. Rasaei, F. Rahbarizadeh, M. Forouzandeh-Moghadam and Hamid R. Memari (2007). "Production and characterization of anti-(mucin MUC1) single-domain antibody in tobacco (*Nicotiana tabacum* cultivar Xanthi)." Biotechnol Appl Biochem **47**(1): 11-19.
- Jones, G. W., R. M. McLoughlin, V. J. Hammond, C. R. Parker, J. D. Williams, R. Malhotra, J. Scheller, A. S. Williams, S. Rose-John, N. Topley and S. A. Jones (2010). "Loss of CD4+ T cell IL-6R expression during inflammation underlines a role for IL-6 trans signaling in the local maintenance of Th17 cells." J Immunol **184**(4): 2130-2139.
- Jones, S. A. and B. J. Jenkins (2018). "Recent insights into targeting the IL-6 cytokine family in inflammatory diseases and cancer." Nat Rev Immunol **18**(12): 773-789.
- Jones, S. A., J. Scheller and S. Rose-John (2011). "Therapeutic strategies for the clinical blockade of IL-6/gp130 signaling." J Clin Invest **121**(9): 3375-3383.
- Jostock, T., J. Müllberg, S. Ozbek, R. Atreya, G. Blinn, N. Voltz, M. Fischer, M. F. Neurath and S. Rose-John (2001). "Soluble gp130 is the natural inhibitor of soluble interleukin-6 receptor transsignaling responses." Eur J Biochem **268**(1): 160-167.
- Kawano, M., T. Hirano, T. Matsuda, T. Taga, Y. Horii, K. Iwato, H. Asaoku, B. Tang, O. Tanabe, H. Tanaka and et al. (1988). "Autocrine generation and requirement of BSF-2/IL-6 for human multiple myelomas." Nature **332**(6159): 83-85.
- Kimura, A. and T. Kishimoto (2010). "IL-6: regulator of Treg/Th17 balance." Eur J Immunol **40**(7): 1830-1835.

- Kishimoto, T., S. Akira, M. Narazaki and T. Taga (1995). "Interleukin-6 family of cytokines and gp130." Blood **86**(4): 1243-1254.
- Kishimoto, T., S. Akira and T. Taga (1992). "Interleukin-6 and its receptor: a paradigm for cytokines." Science **258**(5082): 593-597.
- Klooster, R., B. T. Maassen, J. C. Stam, P. W. Hermans, M. R. Ten Haaf, F. J. Detmers, H. J. de Haard, J. A. Post and C. Theo Verrips (2007). "Improved anti-IgG and HSA affinity ligands: clinical application of VHH antibody technology." J Immunol Methods **324**(1-2): 1-12.
- Kotake, S., K. Sato, K. J. Kim, N. Takahashi, N. Udagawa, I. Nakamura, A. Yamaguchi, T. Kishimoto, T. Suda and S. Kashiwazaki (1996). "Interleukin-6 and soluble interleukin-6 receptors in the synovial fluids from rheumatoid arthritis patients are responsible for osteoclast-like cell formation." J Bone Miner Res **11**(1): 88-95.
- Lamertz, L., F. Rummel, R. Polz, P. Baran, S. Hansen, G. H. Waetzig, J. M. Moll, D. M. Floss and J. Scheller (2018). "Soluble gp130 prevents interleukin-6 and interleukin-11 cluster signaling but not intracellular autocrine responses." Sci Signal **11**(550): eaar7388.
- Li, Z., B. F. Krippendorff, S. Sharma, A. C. Walz, T. Lave and D. K. Shah (2016). "Influence of molecular size on tissue distribution of antibody fragments." MAbs **8**(1): 113-119.
- Lim, W. W., B. Corden, B. Ng, K. Vanezis, G. D'Agostino, A. A. Widjaja, W. H. Song, C. Xie, L. Su, X. Y. Kwek, N. G. Z. Tee, J. Dong, N. S. J. Ko, M. Wang, C. J. Pua, M. H. Jamal, B. Soh, S. Viswanathan, S. Schafer and S. A. Cook (2020). "Interleukin-11 is important for vascular smooth muscle phenotypic switching and aortic inflammation, fibrosis and remodeling in mouse models." Sci Rep **10**(1): 17853.
- Lin, M., S. Rose-John, J. Grötzinger, U. Conrad and J. Scheller (2006). "Functional expression of a biologically active fragment of soluble gp130 as an ELP-fusion protein in transgenic plants: purification via inverse transition cycling." Biochem J **398**(3): 577-583.
- Lindqvist, E., T. Saxne, P. Geborek and K. Eberhardt (2002). "Ten year outcome in a cohort of patients with early rheumatoid arthritis: health status, disease process, and damage." Ann Rheum Dis **61**(12): 1055-1059.
- Lokau, J., R. Nitz, M. Agthe, N. Monhasery, S. Aparicio-Siegmund, N. Schumacher, J. Wolf, K. Moller-Hackbarth, G. H. Waetzig, J. Grötzinger, G. Müller-Newen, S. Rose-John, J. Scheller and C. Garbers (2016). "Proteolytic Cleavage Governs Interleukin-11 Trans-signaling." Cell Rep **14**(7): 1761-1773.

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

Maier, R., V. Ganu and M. Lotz (1993). "Interleukin-11, an inducible cytokine in human articular chondrocytes and synoviocytes, stimulates the production of the tissue inhibitor of metalloproteinases." J Biol Chem **268**(29): 21527-21532.

Malik, N., J. C. Kallestad, N. L. Gunderson, S. D. Austin, M. G. Neubauer, V. Ochs, H. Marquardt, J. M. Zarling, M. Shoyab, C. M. Wei and et al. (1989). "Molecular cloning, sequence analysis, and functional expression of a novel growth regulator, oncostatin M." Mol Cell Biol **9**(7): 2847-2853.

Matthews, V., B. Schuster, S. Schutze, I. Bussmeyer, A. Ludwig, C. Hundhausen, T. Sadowski, P. Saftig, D. Hartmann, K. J. Kallen and S. Rose-John (2003). "Cellular cholesterol depletion triggers shedding of the human interleukin-6 receptor by ADAM10 and ADAM17 (TACE)." J Biol Chem **278**(40): 38829-38839.

McInnes, I. B. and G. Schett (2011). "The pathogenesis of rheumatoid arthritis." N Engl J Med **365**(23): 2205-2219.

Minayoshi, Y., H. Maeda, H. Yanagisawa, K. Hamasaki, Y. Mizuta, K. Nishida, R. Kinoshita, Y. Enoki, T. Imafuku, V. T. G. Chuang, T. Koga, Y. Fujiwara, M. Takeya, K. Sonoda, T. Wakayama, K. Taguchi, Y. Ishima, T. Ishida, Y. Iwakiri, M. Tanaka, Y. Sasaki, H. Watanabe, M. Otagiri and T. Maruyama (2018). "Development of Kupffer cell targeting type-I interferon for the treatment of hepatitis via inducing anti-inflammatory and immunomodulatory actions." Drug Deliv **25**(1): 1067-1077.

Mitsuyama, K., A. Toyonaga, E. Sasaki, O. Ishida, H. Ikeda, O. Tsuruta, K. Harada, H. Tateishi, T. Nishiyama and K. Tanikawa (1995). "Soluble interleukin-6 receptors in inflammatory bowel disease: relation to circulating interleukin-6." Gut **36**(1): 45-49.

Moreland, L., R. Gugliotti, K. King, W. Chase, M. Weisman, T. Greco, R. Fife, J. Korn, R. Simms, J. Tesser, J. Hillson, J. Caldwell, T. Schnitzer, D. Lyons and U. Schwertschlag (2001). "Results of a phase-I/II randomized, masked, placebo-controlled trial of recombinant human interleukin-11 (rhIL-11) in the treatment of subjects with active rheumatoid arthritis." Arthritis Res **3**(4): 247-252.

Müllberg, J., H. Schooltink, T. Stoyan, M. Gunther, L. Graeve, G. Buse, A. Mackiewicz, P. C. Heinrich and S. Rose-John (1993). "The soluble interleukin-6 receptor is generated by shedding." Eur J Immunol **23**(2): 473-480.

- Müller-Newen, G., C. Kohne, R. Keul, U. Hemmann, W. Müller-Esterl, J. Wijdenes, J. P. Brakenhoff, M. H. Hart and P. C. Heinrich (1996). "Purification and characterization of the soluble interleukin-6 receptor from human plasma and identification of an isoform generated through alternative splicing." Eur J Biochem **236**(3): 837-842.
- Muraguchi, A., T. Hirano, B. Tang, T. Matsuda, Y. Horii, K. Nakajima and T. Kishimoto (1988). "The essential role of B cell stimulatory factor 2 (BSF-2/IL-6) for the terminal differentiation of B cells." J Exp Med **167**(2): 332-344.
- Murakami, M., M. Hibi, N. Nakagawa, T. Nakagawa, K. Yasukawa, K. Yamanishi, T. Taga and T. Kishimoto (1993). "IL-6-induced homodimerization of gp130 and associated activation of a tyrosine kinase." Science **260**(5115): 1808-1810.
- Murphy, K. and C. Weaver (2018). Janeway Immunologie, Springer Spektrum, Berlin, Heidelberg.
- Muyldermans, S. (2013). "Nanobodies: natural single-domain antibodies." Annu Rev Biochem **82**(1): 775-797.
- Muyldermans, S., T. Atarhouch, J. Saldanha, J. A. Barbosa and R. Hamers (1994). "Sequence and structure of VH domain from naturally occurring camel heavy chain immunoglobulins lacking light chains." Protein Eng **7**(9): 1129-1135.
- Nakajima, T., S. Kinoshita, T. Sasagawa, K. Sasaki, M. Naruto, T. Kishimoto and S. Akira (1993). "Phosphorylation at threonine-235 by a ras-dependent mitogen-activated protein kinase cascade is essential for transcription factor NF-IL6." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(6): 2207-2211.
- Narazaki, M., B. A. Witthuhn, K. Yoshida, O. Silvennoinen, K. Yasukawa, J. N. Ihle, T. Kishimoto and T. Taga (1994). "Activation of JAK2 kinase mediated by the interleukin 6 signal transducer gp130." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(6): 2285-2289.
- Narazaki, M., K. Yasukawa, T. Saito, Y. Ohsugi, H. Fukui, Y. Koishihara, G. D. Yancopoulos, T. Taga and T. Kishimoto (1993). "Soluble Forms of the Interleukin-6 Signal-Transducing Receptor Component Gp130 in Human Serum Possessing a Potential to Inhibit Signals through Membrane-Anchored Gp130." Blood **82**(4): 1120-1126.
- Ng, B., J. Dong, S. Viswanathan, A. A. Widjaja, B. S. Paleja, E. Adami, N. S. J. Ko, M. Wang, S. Lim, J. Tan, S. P. Chothani, S. Albani, S. Schafer and S. A. Cook (2020). "Fibroblast-specific IL11 signaling drives chronic inflammation in murine fibrotic lung disease." FASEB J **34**(9): 11802-11815.

- Nguyen, V. K., R. Hamers, L. Wyns and S. Muyldermans (1999). "Loss of splice consensus signal is responsible for the removal of the entire CH1 domain of the functional camel IGG2A heavy-chain antibodies." Mol Immunol **36**(8): 515-524.
- Nguyen, V. K., R. Hamers, L. Wyns and S. Muyldermans (2000). "Camel heavy-chain antibodies: diverse germline V(H)H and specific mechanisms enlarge the antigen-binding repertoire." EMBO J **19**(5): 921-930.
- Nicholson, S. E., D. De Souza, L. J. Fabri, J. Corbin, T. A. Willson, J. G. Zhang, A. Silva, M. Asimakis, A. Farley, A. D. Nash, D. Metcalf, D. J. Hilton, N. A. Nicola and M. Baca (2000). "Suppressor of cytokine signaling-3 preferentially binds to the SHP-2-binding site on the shared cytokine receptor subunit gp130." Proc Natl Acad Sci U S A **97**(12): 6493-6498.
- Nieminen, P., N. V. Morgan, A. L. Fenwick, S. Parmanen, L. Veistinen, M. L. Mikkola, P. J. van der Spek, A. Giraud, L. Judd, S. Arte, L. A. Brueton, S. A. Wall, I. M. Mathijssen, E. R. Maher, A. O. Wilkie, S. Kreiborg and I. Thesleff (2011). "Inactivation of IL11 signaling causes craniosynostosis, delayed tooth eruption, and supernumerary teeth." Am J Hum Genet **89**(1): 67-81.
- Nishimoto, N., K. Yoshizaki, N. Miyasaka, K. Yamamoto, S. Kawai, T. Takeuchi, J. Hashimoto, J. Azuma and T. Kishimoto (2004). "Treatment of rheumatoid arthritis with humanized anti-interleukin-6 receptor antibody: a multicenter, double-blind, placebo-controlled trial." Arthritis Rheum **50**(6): 1761-1769.
- Nowell, M. A., P. J. Richards, S. Horiuchi, N. Yamamoto, S. Rose-John, N. Topley, A. S. Williams and S. A. Jones (2003). "Soluble IL-6 receptor governs IL-6 activity in experimental arthritis: blockade of arthritis severity by soluble glycoprotein 130." J Immunol **171**(6): 3202-3209.
- Oh, K., O. Y. Lee, S. Y. Shon, O. Nam, P. M. Ryu, M. W. Seo and D. S. Lee (2013). "A mutual activation loop between breast cancer cells and myeloid-derived suppressor cells facilitates spontaneous metastasis through IL-6 trans-signaling in a murine model." Breast Cancer Res **15**(5): R79.
- Okamoto, H., M. Yamamura, Y. Morita, S. Harada, H. Makino and Z. Ota (1997). "The synovial expression and serum levels of interleukin-6, interleukin-11, leukemia inhibitory factor, and oncostatin M in rheumatoid arthritis." Arthritis Rheum **40**(6): 1096-1105.
- Padlan, E. A. (1994). "Anatomy of the antibody molecule." Mol Immunol **31**(3): 169-217.
- Pandolfi, F., L. Franza, V. Carusi, S. Altamura, G. Andriollo and E. Nucera (2020). "Interleukin-6 in Rheumatoid Arthritis." Int J Mol Sci **21**(15): 5238.

Pant, N., A. Hultberg, Y. Zhao, L. Svensson, Q. Pan-Hammarström, K. Johansen, Peter H. Pouwels, Franco M. Ruggeri, P. Hermans, L. Frenken, T. Borén, H. Marcotte and L. Hammarström (2006). "Lactobacilli Expressing Variable Domain of Llama Heavy-Chain Antibody Fragments (Lactobodies) Confer Protection against Rotavirus-Induced Diarrhea." J Infect Dis **194**(11): 1580-1588.

Paonessa, G., R. Graziani, A. De Serio, R. Savino, L. Ciapponi, A. Lahm, A. L. Salvati, C. Toniatti and G. Ciliberto (1995). "Two distinct and independent sites on IL-6 trigger gp 130 dimer formation and signalling." EMBO J **14**(9): 1942-1951.

Park, Y. H., H. J. Kim and T. H. Heo (2020). "A directly GP130-targeting small molecule ameliorates collagen-induced arthritis (CIA) by inhibiting IL-6/GP130 signalling and Th17 differentiation." Clin Exp Pharmacol Physiol **47**(4): 628-639.

Parks, T. D., K. K. Leuther, E. D. Howard, S. A. Johnston and W. G. Dougherty (1994). "Release of Proteins and Peptides from Fusion Proteins Using a Recombinant Plant-Virus Proteinase." Anal Biochem **216**(2): 413-417.

Pennica, D., K. L. King, K. J. Shaw, E. Luis, J. Rullamas, S. M. Luoh, W. C. Darbonne, D. S. Knutzon, R. Yen, K. R. Chien and et al. (1995). "Expression cloning of cardiotrophin 1, a cytokine that induces cardiac myocyte hypertrophy." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(4): 1142-1146.

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

Pflanz, S., J. C. Timans, J. Cheung, R. Rosales, H. Kanzler, J. Gilbert, L. Hibbert, T. Churakova, M. Travis, E. Vaisberg, W. M. Blumenschein, J. D. Mattson, J. L. Wagner, W. To, S. Zurawski, T. K. McClanahan, D. M. Gorman, J. F. Bazan, R. de Waal Malefyt, D. Rennick and R. A. Kastelein (2002). "IL-27, a Heterodimeric Cytokine Composed of EBI3 and p28 Protein, Induces Proliferation of Naive CD4+ T Cells." Immunity **16**(6): 779-790.

Pincus, T., L. F. Callahan, W. G. Sale, A. L. Brooks, L. E. Payne and W. K. Vaughn (1984). "Severe functional declines, work disability, and increased mortality in seventy-five rheumatoid arthritis patients studied over nine years." Arthritis Rheum **27**(8): 864-872.

Putoczki, T. and M. Ernst (2010). "More than a sidekick: the IL-6 family cytokine IL-11 links inflammation to cancer." J Leukoc Biol **88**(6): 1109-1117.

Rakemann, T., M. Niehof, S. Kubicka, M. Fischer, M. P. Manns, S. Rose-John and C. Trautwein (1999). "The designer cytokine hyper-interleukin-6 is a potent activator of STAT3-dependent gene transcription in vivo and in vitro." J Biol Chem **274**(3): 1257-1266.

Riazi, A., P. C. R. Strong, R. Coleman, W. Chen, T. Hirama, H. van Faassen, M. Henry, S. M. Logan, C. M. Szymanski, R. MacKenzie and M. A. Ghahroudi (2013). "Pentavalent Single-Domain Antibodies Reduce *Campylobacter jejuni* Motility and Colonization in Chickens." PLoS ONE **8**(12): e83928.

Richards, P. J., M. A. Nowell, S. Horiuchi, R. M. McLoughlin, C. A. Fielding, S. Grau, N. Yamamoto, M. Ehrmann, S. Rose-John, A. S. Williams, N. Topley and S. A. Jones (2006). "Functional characterization of a soluble gp130 isoform and its therapeutic capacity in an experimental model of inflammatory arthritis." Arthritis Rheum **54**(5): 1662-1672.

Robak, T., A. Gladalska, H. Stepień and E. Robak (1998). "Serum levels of interleukin-6 type cytokines and soluble interleukin-6 receptor in patients with rheumatoid arthritis." Mediators Inflamm **7**(5): 347-353.

Rose-John, S. (2012). "IL-6 trans-signaling via the soluble IL-6 receptor: importance for the pro-inflammatory activities of IL-6." Int J Biol Sci **8**(9): 1237-1247.

Rose-John, S. (2017). "The Soluble Interleukin 6 Receptor: Advanced Therapeutic Options in Inflammation." Clin Pharmacol Ther **102**(4): 591-598.

Rose-John, S. (2018). "Interleukin-6 Family Cytokines." Cold Spring Harb Perspect Biol **10**(2): a028415.

Rose-John, S. and P. C. Heinrich (1994). "Soluble receptors for cytokines and growth factors: generation and biological function." Biochem J **300**(Pt 2): 281-290.

Rose-John, S., J. Scheller, G. Elson and S. A. Jones (2006). "Interleukin-6 biology is coordinated by membrane-bound and soluble receptors: role in inflammation and cancer." J Leukoc Biol **80**(2): 227-236.

Saerens, D. and S. Muyldermans (2012). "Single Domain Antibodies Methods and Protocols." Springer-Verlag New York, LLC.

Sanchez, M. I. and A. Y. Ting (2019). "Directed evolution improves the catalytic efficiency of TEV protease." Nat Methods **17**(2): 167-174.

Sarosiek, S., R. Shah and N. C. Munshi (2016). "Review of siltuximab in the treatment of multicentric Castleman's disease." Ther Adv Hematol **7**(6): 360-366.

Sato, K., M. Tsuchiya, J. Saldanha, Y. Koishihara, Y. Ohsugi, T. Kishimoto and M. M. Bendig (1993). "Reshaping a human antibody to inhibit the interleukin 6-dependent tumor cell growth." Cancer Res **53**(4): 851-856.

Schaper, F., C. Gendo, M. Eck, J. Schmitz, C. Grimm, D. Anhuf, I. M. Kerr and P. C. Heinrich (1998). "Activation of the protein tyrosine phosphatase SHP2 via the interleukin-6 signal transducing receptor protein gp130 requires tyrosine kinase Jak1 and limits acute-phase protein expression." Biochem J **335**(Pt 3): 557-565.

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

Schuett, H., R. Oestreich, G. H. Waetzig, W. Annema, M. Luchtefeld, A. Hillmer, U. Bavendiek, J. von Felden, D. Divchev, T. Kempf, K. C. Wollert, D. Seegert, S. Rose-John, U. J. Tietge, B. Schieffer and K. Grote (2012). "Transsignaling of interleukin-6 crucially contributes to atherosclerosis in mice." Arterioscler Thromb Vasc Biol **32**(2): 281-290.

Shaw, S., T. Bourne, C. Meier, B. Carrington, R. Gelinas, A. Henry, A. Popplewell, R. Adams, T. Baker, S. Rapecki, D. Marshall, A. Moore, H. Neale and A. Lawson (2014). "Discovery and characterization of olokizumab: a humanized antibody targeting interleukin-6 and neutralizing gp130-signaling." MAbs **6**(3): 774-782.

Simpson, R. J., A. Hammacher, D. K. Smith, J. M. Matthews and L. D. Ward (1997). "Interleukin-6: structure-function relationships." Protein Sci **6**(5): 929-955.

Sims, N. A., B. J. Jenkins, A. Nakamura, J. M. Quinn, R. Li, M. T. Gillespie, M. Ernst, L. Robb and T. J. Martin (2005). "Interleukin-11 receptor signaling is required for normal bone remodeling." J Bone Miner Res **20**(7): 1093-1102.

Siontorou, C. G. (2013). "Nanobodies as novel agents for disease diagnosis and therapy." Int J Nanomedicine **8**(1): 4215-4227.

Smolen, J. S., D. Aletaha and I. B. McInnes (2016). "Rheumatoid arthritis." Lancet **388**(10055): 2023-2038.

Sommer, J., C. Garbers, J. Wolf, A. Trad, J. M. Moll, M. Sack, R. Fischer, J. Grötzinger, G. H. Waetzig, D. M. Floss and J. Scheller (2014). "Alternative intronic polyadenylation generates the interleukin-6 trans-signaling inhibitor sgp130-E10." J Biol Chem **289**(32): 22140-22150.

Spangler, J. B., I. Moraga, J. L. Mendoza and K. C. Garcia (2015). "Insights into cytokine-receptor interactions from cytokine engineering." Annu Rev Immunol **33**: 139-167.

Stahl, N., T. G. Boulton, T. Farruggella, N. Y. Ip, S. Davis, B. A. Witthuhn, F. W. Quelle, O. Silvennoinen, G. Barbieri, S. Pellegrini and et al. (1994). "Association and activation of Jak-Tyk kinases by CNTF-LIF-OSM-IL-6 beta receptor components." Science **263**(5143): 92-95.

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

Steeland, S., L. Puimège, R. E. Vandenbroucke, F. Van Hauwermeiren, J. Haustraete, N. Devoogdt, P. Hulpiau, G. Leroux-Roels, D. Laukens, P. Meuleman, M. De Vos and C. Libert (2015). "Generation and Characterization of Small Single Domain Antibodies Inhibiting Human Tumor Necrosis Factor Receptor 1." J Biol Chem **290**(7): 4022-4037.

Steeland, S., R. E. Vandenbroucke and C. Libert (2016). "Nanobodies as therapeutics: big opportunities for small antibodies." Drug Discov Today **21**(7): 1076-1113.

Symes, A., N. Stahl, S. A. Reeves, T. Farruggella, T. Servidei, T. Gearan, G. Yancopoulos and J. S. Fink (1997). "The protein tyrosine phosphatase SHP-2 negatively regulates ciliary neurotrophic factor induction of gene expression." Curr Biol **7**(9): 697-700.

Taga, T. (1992). "IL6 signalling through IL6 receptor and receptor-associated signal transducer, gp130." Res Immunol **143**(7): 737-739.

Taga, T. (1996). "Gp130, a shared signal transducing receptor component for hematopoietic and neuropoietic cytokines." J Neurochem **67**(1): 1-10.

Taga, T., M. Hibi, Y. Hirata, K. Yamasaki, K. Yasukawa, T. Matsuda, T. Hirano and T. Kishimoto (1989). "Interleukin-6 triggers the association of its receptor with a possible signal transducer, gp130." Cell **58**(3): 573-581.

Taga, T. and T. Kishimoto (1997). "Gp130 and the interleukin-6 family of cytokines." Annu Rev Immunol **15**(1): 797-819.

Takahashi-Tezuka, M., Y. Yoshida, T. Fukada, T. Ohtani, Y. Yamanaka, K. Nishida, K. Nakajima, M. Hibi and T. Hirano (1998). "Gab1 acts as an adapter molecule linking the cytokine receptor gp130 to ERK mitogen-activated protein kinase." Mol Cell Biol **18**(7): 4109-4117.

Tanaka, M., M. Kishimura, S. Ozaki, F. Osakada, H. Hashimoto, M. Okubo, M. Murakami and K. Nakao (2000). "Cloning of novel soluble gp130 and detection of its neutralizing autoantibodies in rheumatoid arthritis." J Clin Invest **106**(1): 137-144.

Tanaka, T., M. Narazaki and T. Kishimoto (2011). "Anti-interleukin-6 receptor antibody, tocilizumab, for the treatment of autoimmune diseases." FEBS Lett **585**(23): 3699-3709.

Taub, R. (2004). "Liver regeneration: from myth to mechanism." Nat Rev Mol Cell Biol **5**(10): 836-847.

- van der Linden, R. H. J., L. G. J. Frenken, B. de Geus, M. M. Harmsen, R. C. Ruuls, W. Stok, L. de Ron, S. Wilson, P. Davis and C. T. Verrips (1999). "Comparison of physical chemical properties of llama VHH antibody fragments and mouse monoclonal antibodies." Biochim Biophys Acta **1431**(1): 37-46.
- Vaneycken, I., N. Devoogdt, N. Van Gassen, C. Vincke, C. Xavier, U. Wernery, S. Muyltermans, T. Lahoutte and V. Caveliers (2011). "Preclinical screening of anti-HER2 nanobodies for molecular imaging of breast cancer." FASEB J **25**(7): 2433-2446.
- Varghese, J. N., R. L. Moritz, M. Z. Lou, A. Van Donkelaar, H. Ji, N. Ivancic, K. M. Branson, N. E. Hall and R. J. Simpson (2002). "Structure of the extracellular domains of the human interleukin-6 receptor alpha -chain." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(25): 15959-15964.
- Venkiteswaran, A. (2009). "Tocilizumab." MAbs **1**(5): 432-438.
- Verstovsek, S., H. Kantarjian, R. A. Mesa, A. D. Pardanani, J. Cortes-Franco, D. A. Thomas, Z. Estrov, J. S. Fridman, E. C. Bradley, S. Erickson-Viitanen, K. Vaddi, R. Levy and A. Tefferi (2010). "Safety and efficacy of INCB018424, a JAK1 and JAK2 inhibitor, in myelofibrosis." N Engl J Med **363**(12): 1117-1127.
- Verstovsek, S., R. A. Mesa, J. Gotlib, R. S. Levy, V. Gupta, J. F. DiPersio, J. V. Catalano, M. Deininger, C. Miller, R. T. Silver, M. Talpaz, E. F. Winton, J. H. Harvey, Jr., M. O. Arcasoy, E. Hexner, R. M. Lyons, R. Paquette, A. Raza, K. Vaddi, S. Erickson-Viitanen, I. L. Koumenis, W. Sun, V. Sandor and H. M. Kantarjian (2012). "A double-blind, placebo-controlled trial of ruxolitinib for myelofibrosis." N Engl J Med **366**(9): 799-807.
- Vu, K. B., M. A. Ghahroudi, L. Wyns and S. Muyltermans (1997). "Comparison of llama VH sequences from conventional and heavy chain antibodies." Mol Immunol **34**(16-17): 1121-1131.
- Walmsley, M., D. M. Butler, L. Marinova-Mutafchieva and M. Feldmann (1998). "An anti-inflammatory role for interleukin-11 in established murine collagen-induced arthritis." Immunology **95**(1): 31-37.
- Wang, Y., Z. Fan, L. Shao, X. Kong, X. Hou, D. Tian, Y. Sun, Y. Xiao and L. Yu (2016). "Nanobody-derived nanobiotechnology tool kits for diverse biomedical and biotechnology applications." Int J Nanomedicine **11**(1): 3287-3303.
- Ward, L. D., G. J. Howlett, G. Discolo, K. Yasukawa, A. Hammacher, R. L. Moritz and R. J. Simpson (1994). "High affinity interleukin-6 receptor is a hexameric complex consisting of two molecules each of interleukin-6, interleukin-6 receptor, and gp130." J Biol Chem **269**(37): 23286-23289.

Wegenka, U. M., J. Buschmann, C. Luttkien, P. C. Heinrich and F. Horn (1993). "Acute-phase response factor, a nuclear factor binding to acute-phase response elements, is rapidly activated by interleukin-6 at the posttranslational level." Mol Cell Biol **13**(1): 276-288.

Wesolowski, J., V. Alzogaray, J. Reyelt, M. Unger, K. Juarez, M. Urrutia, A. Cauerhff, W. Danquah, B. Rissiek, F. Scheuplein, N. Schwarz, S. Adriouch, O. Boyer, M. Seman, A. Licea, D. V. Serreze, F. A. Goldbaum, F. Haag and F. Koch-Nolte (2009). "Single domain antibodies: promising experimental and therapeutic tools in infection and immunity." Med Microbiol Immunol **198**(3): 157-174.

Weyand, C. M. and J. J. Goronzy (1997). "Pathogenesis of Rheumatoid Arthritis." Med Clin North Am **81**(1): 29-55.

Widjaja, A. A., S. P. Chothani and S. A. Cook (2020). "Different roles of interleukin 6 and interleukin 11 in the liver: implications for therapy." Hum Vaccin Immunother **16**(10): 2357-2362.

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

Wolf, J., G. H. Waetzig, A. Chalaris, T. M. Reinheimer, H. Wege, S. Rose-John and C. Garbers (2016). "Different Soluble Forms of the Interleukin-6 Family Signal Transducer gp130 Fine-tune the Blockade of Interleukin-6 Trans-signaling." J Biol Chem **291**(31): 16186-16196.

Wolford, J. K., P. B. Colligan, J. D. Gruber and C. Bogardus (2003). "Variants in the interleukin 6 receptor gene are associated with obesity in Pima Indians." Mol Genet Metab **80**(3): 338-343.

Woolven, B. P., L. G. Frenken, P. van der Logt and P. J. Nicholls (1999). "The structure of the llama heavy chain constant genes reveals a mechanism for heavy-chain antibody formation." Immunogenetics **50**(1-2): 98-101.

Yamamoto, K., H. Goto, K. Hirao, A. Nakajima, H. Origasa, K. Tanaka, M. Tomobe and K. Totsuka (2015). "Longterm Safety of Tocilizumab: Results from 3 Years of Followup Postmarketing Surveillance of 5573 Patients with Rheumatoid Arthritis in Japan." J Rheumatol **42**(8): 1368-1375.

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

- Yan, D. Y., R. Kc, D. Chen, G. Z. Xiao and H. J. Im (2013). "Bovine Lactoferricin-induced Anti-inflammation Is, in Part, via Up-regulation of Interleukin-11 by Secondary Activation of STAT3 in Human Articular Cartilage." J Biol Chem **288**(44): 31655-31669.
- Yasuda, K., Y. Takeuchi and K. Hirota (2019). "The pathogenicity of Th17 cells in autoimmune diseases." Semin Immunopathol **41**(3): 283-297.
- Yasukawa, K., T. Saito, T. Fukunaga, Y. Sekimori, Y. Koishihara, H. Fukui, Y. Ohsugi, T. Matsuda, H. Yawata, T. Hirano and et al. (1990). "Purification and characterization of soluble human IL-6 receptor expressed in CHO cells." J Biochem **108**(4): 673-676.
- Yin, T., T. Taga, M. L. Tsang, K. Yasukawa, T. Kishimoto and Y. C. Yang (1993). "Involvement of IL-6 signal transducer gp130 in IL-11-mediated signal transduction." J Immunol **151**(5): 2555-2561.
- Yokoyama, A., N. Kohno, K. Sakai, K. Kondo, Y. Hirasawa and K. Hiwada (1997). "Circulating levels of soluble interleukin-6 receptor in patients with bronchial asthma." Am J Respir Crit Care Med **156**(5): 1688-1691.
- Yoshida, H., M. Hashizume and M. Mihara (2011). "IL-6 blockade preferentially inhibits Th17 differentiation in collagen-induced arthritis." Rheumatol Int **31**(1): 127-131.
- Yoshizaki, K., N. Nishimoto, M. Mihara and T. Kishimoto (1998). "Therapy of rheumatoid arthritis by blocking IL-6 signal transduction with a humanized anti-IL-6 receptor antibody." Springer Semin Immunopathol **20**(1-2): 247-259.
- Zhong, Z., Z. Wen and J. E. Darnell, Jr. (1994). "Stat3: a STAT family member activated by tyrosine phosphorylation in response to epidermal growth factor and interleukin-6." Science **264**(5155): 95-98.
- Zhu, M., X. Gong, Y. Hu, W. Ou and Y. Wan (2014). "Streptavidin-biotin-based directional double Nanobody sandwich ELISA for clinical rapid and sensitive detection of influenza H5N1." J Transl Med **12**(1): 3

Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Jürgen Scheller ganz herzlich bedanken, dass ich diese Arbeit am Institut für Biochemie und Molekularbiologie II durchführen durfte. Die gute Betreuung und die zahlreichen konstruktiven Gespräche haben mir einen sehr guten Einstieg in das wissenschaftliche Arbeiten ermöglicht.

Ein ganz besonderes Dankeschön gilt Herrn Dr. Jens Moll für sein außerordentliches Engagement und die andauernde Unterstützung, sowohl in der täglichen Laborarbeit als auch während der Ausarbeitung dieser Arbeit.

Mein Dank gilt weiterhin den Mitarbeiter*innen des Instituts die für eine angenehme, kollegiale Arbeitsatmosphäre gesorgt haben und mich ebenfalls in der Laborarbeit mit hilfreichen Ratschlägen unterstützt haben, allen voran Dr. Paul Baran, Dr. Larissa Lamertz, Dr. Erika Engelowski, PD Dr. Doreen Floß, Dr. Manuel Franke und Dr. Sofie Moßner. Petra Oprée-Jeremic danke ich herzlich für die stetige Hilfsbereitschaft.

Besonders erwähnen möchte ich darüber hinaus die vertrauensvolle Freundschaft sowie Unterstützung im Studium und während der Doktorarbeit von meiner Kollegin Celine Chiu. Ich freue mich sehr auf die weitere Zusammenarbeit mit ihr.

Mein Dank aus tiefstem Herzen gebührt nicht zuletzt meinen Eltern und drei Schwestern, die mich auf dem Weg meines Studiums und der Doktorarbeit mit viel Freude und Verständnis begleitet haben. Besonders meiner Schwester Carolina danke ich für die gemeinsamen Unternehmungen und den regen Gedankenaustausch, der mich immer wieder motiviert und inspiriert hat.