

Aus dem Institut für Biochemie und Molekularbiologie II  
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf  
Direktor: Univ.-Prof. Dr. Jürgen Scheller

**Herstellung und Charakterisierung von inhibitorischen  
Fusionsproteinen zur Modulation der Interleukin 6  
Signaltransduktion**

Dissertation

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

vorgelegt von

Denise Heise

Düsseldorf

2022

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

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. Jürgen Scheller

Zweitgutachterin: Prof. Dr. Martina Krüger

Drittgutachter: Prof. Dr. Christoph Garbers

*Diese Arbeit ist in voller Dankbarkeit meinen Eltern Manuela und Ingo Stark gewidmet.*

**Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:**

Heise, D.<sup>§</sup>, A. Derrac Soria<sup>§</sup>, S. Hansen<sup>§</sup>, 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. DOI: 10.1126/scisignal.abc3480

## ZUSAMMENFASSUNG DEUTSCH

Interleukin 6 hat pro- und antiinflammatorische Eigenschaften und ist an einer Vielzahl physiologischer, aber auch pathophysiologischer Prozesse beteiligt. Zur Initiierung der intrazellulären Signalkaskade erfolgt initial die Bindung von IL-6 an den IL-6 Rezeptor (IL-6R). Der IL-6/IL-6R Komplex bindet dann an den signaltransduzierenden Rezeptor gp130 und induziert dessen Dimerisierung. Die IL-6 Signaltransduktion über den membranständigen IL-6R Rezeptor wird als *Classic-Signaling* bezeichnet, während die Signaltransduktion über den löslichen IL-6R als *Trans-Signaling* bezeichnet wird. Das IL-6 *Classic-Signaling* wird eher mit regenerativen Eigenschaften wie Einleitung der Akute-Phase Reaktion oder Zellproliferation verbunden, wohingegen das IL-6 *Trans-Signaling* eher mit chronisch-entzündlichen Prozessen assoziiert ist. Lösliches gp130 (sgp130) wurde als spezifischer Inhibitor des *Trans-Signaling*s beschrieben. Eine kürzlich veröffentlichte Phase IIa-Studie zeigte vielversprechende Ergebnisse bei der Behandlung von Patienten mit Morbus Crohn und Colitis Ulcerosa durch sgp130Fc. Tierstudien zeigten, dass die alleinige Hemmung des IL-6 *Trans-Signaling*s nicht zu einer erhöhten Anfälligkeit gegenüber bakteriellen Infektionen führt, so dass anzunehmen ist, dass die selektive Hemmung des IL-6 *Trans-Signaling*s der gleichzeitigen Hemmung des IL-6 *Classic-* und des *Trans-Signaling*s überlegen ist. IL-11 ist das nächstverwandte Zytokin zu IL-6 und induziert ebenfalls eine Signaltransduktion über gp130 Dimerisierung. Hierfür benötigt IL-11 die initiale Bindung an den IL-11R. Für sgp130Fc wurde nicht nur eine Hemmung des IL-6 *Trans-Signaling*s beschrieben, sondern auch eine IL-11 *Trans-Signaling* Hemmung beobachtet. Generell ist anzunehmen, dass IL-11 an regenerativen Prozessen beteiligt ist und eine Hemmung möglichst vermieden werden sollte. Ziel dieser Arbeit war es, die Hemmung des IL-6 *Trans-Signaling*s durch optimierte sgp130Fc-Varianten zu verbessern und eine gleichzeitige Hemmung des IL-11 *Trans-Signaling*s zu verringern. Durch die Herstellung neuartiger Fusionsproteine, bestehend aus den drei zytokinbindenden Domänen von gp130 und einem IL-6/sIL-6R bindenden *Nanobody* (cs-130-Varianten), konnte die Affinität gegenüber IL-6/sIL-6R Komplexen im Vergleich zum sgp130Fc, deutlich erhöht werden. Die Einführung weiterer IL-6/sIL-6R affinitätssteigernden Mutationen im cs-130Fc (cs130<sup>Fly</sup>Fc) verbesserte darüber hinaus die Hemmung des IL-6 *Trans-Signaling*s noch weiter und verhinderte die Hemmung des IL-11 *Trans-Signaling*s nahezu komplett. Durch die Entwicklung dieser cs-130-Varianten wurde ein weiterer Schritt in Richtung der *second-generation* IL-6 *Trans-Signaling* Inhibitoren geleistet.

## ABSTRACT

Interleukin 6 has pro- and anti-inflammatory properties and is involved in a variety of physiological, but also pathophysiological processes. To initiate the intracellular signaling cascade, IL-6 initially binds to the IL-6 receptor (IL-6R). The IL-6/IL-6R complex then binds to the signal transducing receptor gp130 and induces its dimerization. IL-6 signal transduction via the membrane-bound IL-6R receptor is known as classic-signaling, whereas signal transduction via the soluble IL-6R is referred as trans-signaling. IL-6 classic signaling is more associated with regenerative properties such as initiation of acute-phase response or cell proliferation, whereas IL-6 trans-signaling is more associated with chronic inflammatory processes. Soluble gp130 (sgp130) has been described as a specific inhibitor of trans-signaling. A recently published phase IIa study showed promising results in the treatment of patients with crohn's disease and ulcerative colitis by sgp130Fc. Animal studies showed that inhibition of IL-6 trans-signaling alone did not result in increased susceptibility to bacterial infections, suggesting that selective inhibition of IL-6 trans-signaling is superior to simultaneous inhibition of both IL-6 classic- and trans-signaling. IL-11 is the closest related cytokine to IL-6 and as well induces signal transduction via gp130 dimerization. Therefore, IL-11 requires initial binding to the IL-11R. For sgp130Fc inhibition of IL-6 trans-signaling was described, but also IL-11 trans-signaling inhibition was observed. In general, it can be assumed that IL-11 is involved in regenerative processes and inhibition should be avoided if possible. The aim of this work was to improve inhibition of IL-6 trans-signaling by optimized sgp130Fc-variants and to reduce simultaneously inhibition of IL-11 trans-signaling. By creating novel fusion proteins consisting of the three cytokine-binding domains of gp130 and an IL-6/sIL-6R-binding nanobody (cs-130 variants), the affinity toward the IL-6/sIL-6R complex was significantly increased through the new cs-130-variants compared with sgp130Fc. Introduction of additional IL-6/sIL-6R affinity enhancing mutations in cs-130Fc (cs130<sup>Fly</sup>Fc) further improved inhibition of IL-6 trans-signaling and almost completely prevented inhibition of IL-11 trans-signaling. The development of cs-130-variants was another step towards the development of second-generation IL-6 trans-signaling inhibitors.

## ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

### Abkürzungen und Fachbegriffe

Å	Ångström
ADAM	<i>A Disintegrin and Metalloproteinase</i>
AS	Aminosäure(n)
Bp	Basenpaare
BCA	<i>bicinchoninic acid assay</i>
BSA	Bovines Serumalbumin
BSF-3	<i>B cell-stimulating factor-3</i>
°C	Grad Celsius
CDR	<i>Complementarity determining regions</i>
C <sub>H</sub>	Konstante schwere Kette ( <i>constant heavy chain</i> )
C <sub>L</sub>	Konstante leichte Kette ( <i>constant light chain</i> )
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
COVID-19	<i>Corona virus disease 19</i>
D	Domäne
Da	Dalton
dH <sub>2</sub> O	Destilliertes Wasser
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
DRP	Dosisabhängige Hemmkurve ( <i>dose-response-curve</i> )
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELP	<i>elastin-like peptide</i>
ERK	<i>Extracellular signal regulated kinase</i>
Fab	Antigen-bindendes Fragment ( <i>antigene binding fragment</i> )
Fc	Kristallisierbares Fragment ( <i>crystallizable fragment</i> )
FCS	Fetales Kälberserum
g	1. Gramm; 2. vielfaches der Erdbeschleunigung
GFP	<i>Green fluorescent protein</i>
gp130	Glykoprotein 130
h	Stunde(n)

---

H	Hyper
HCAb	Schwere-Kette-Antikörper ( <i>heavy chain antibody</i> )
HGF	<i>Hepatocyte growth factor</i>
IC <sub>50</sub>	Inhibitorische halbmaximale Konzentration ( <i>inhibitory concentration 50%</i> )
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IL-R	Interleukin-Rezeptor
IZD	Intrazelluläre Domäne
JAK	Januskinase
K <sub>D</sub>	Dissoziationskonstante
kDa	Kilodalton
k <sub>on</sub>	Assoziationsrate
k <sub>off</sub>	Dissoziationsrate
l	Liter
LIF	<i>Leukemia inhibitory factor</i>
M	Mol
MALS	Mehrwinkellichtstreuendetektor ( <i>Multi Angle Light Scattering</i> )
MAPK	<i>Mitogen activated protein kinase</i>
mg	Milligramm
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
min	Minute
mind.	Mindestens
ml	Milliliter
mRNA	<i>Messenger Ribonukleinsäure</i>
M <sub>w</sub> -Exp	Experimentell bestimmtes Molekulargewicht
M <sub>w</sub> -Th	Theoretisches Molekulargewicht
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NP-40	Octylphenoxypolyethoxyethanol ( <i>Nonident P-40</i> )
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerase Kettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
PEG	Polyethylenglycol

---

pEGFP	<i>Plasmid Encoding enhanced Green Fluorescent Protein</i>
pERK	<i>Phosphorylated extracellular signal regulated kinase</i>
pg	Pikogramm
pH	<i>Potential Hydrogenii</i>
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Phosphat-Kinase
POD	Peroxidase
pSTAT3	<i>Phosphorylated signal transducer and activator of transcription 3</i>
PVDF	Polyvinylidenfluorid
R	Rezeptor
RAPS	<i>rheumatoid arthritis antigenic peptide-bearing soluble form</i>
RLU	<i>Relative light units</i>
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Rotationen pro Minute ( <i>rounds per minute</i> )
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde(n)
s.	Siehe
SCR	Tyrosinkinase-SCR (Zusammengesetztes Akronym aus <i>cellular</i> und <i>sarcoma</i> )
sdAB	Einzeldomänenantikörper ( <i>single domain antibody; nanobody</i> )
SD	Standardabweichung ( <i>standard deviation</i> )
sdm-PCR	Zielgerichtete Mutagenese ( <i>site directed mutagenesis</i> ) PCR
SDS	<i>Sodium dodecyl sulfate</i>
SEC	Größenausschlusschromatographie ( <i>size exclusion chromatography</i> )
sIL-R	Löslicher ( <i>soluble</i> ) Interleukin-Rezeptor
SPR	Oberflächenplasmonenresonanz ( <i>surface plasmon resonance</i> )
sgp130	Lösliches ( <i>soluble</i> ) Glykoprotein 130
STAT3	<i>Signal transducer and activator of transcription 3</i>
TBS	<i>Tris buffered saline</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TEV	<i>Tabacco Etch Virus</i>
TGFs	<i>Transforming growth factor beta</i>
TMD	Transmembrandomäne
TRIS	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Tween 20	Polyoxyethylen(20)-sorbitanmonolaurat
U	<i>Units</i>

unv.	Unverteidigte (Dissertation)
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
V	Volt
VHH <sub>GFP</sub>	<i>Green fluorescent protein-variable heavy chain</i>
V <sub>H</sub> /VHH	Variable schwere Kette ( <i>variable heavy chain</i> )
V <sub>L</sub>	Variable leichte Kette ( <i>variable light chain</i> )
Wt	Wildtyp
YAP	<i>Yes-associated protein</i>
ZBM	Zytokinbindemodul

### 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

<b>1</b>	<b>Einleitung</b> .....	<b>1</b>
1.1.	Interleukin 6 als wichtiges Zytokin des Immunsystems .....	1
1.2.	Prinzipien der IL-6 Signalwege und deren Hemmung als Angriffspunkt in der Therapie autoimmuner Prozesse .....	2
1.3.	Sgp130Fc ist auch ein effektiver Hemmstoff des IL-11 <i>Trans-Signalings</i> .....	8
1.4.	Entwicklung anti-entzündlicher Therapien durch die Hemmung von IL-6 <i>Classic-</i> und/oder <i>Trans-Signaling</i> .....	10
1.5.	Vom Tiermodell in die Klinik: Hemmung des IL-6 <i>Trans-Signalings</i> bei chronisch- entzündlichen Darmerkrankungen im Patienten? .....	11
1.6.	Sgp130Fc als Vorläuferprotein für die Entwicklung von cs-130Fc.....	13
1.7.	Einzeldomänenantikörper: Spezifische und stabilisierende Eigenschaften .....	15
<b>2</b>	<b>Aufgabenstellung und Zielsetzung des Projekts</b> .....	<b>16</b>
<b>3</b>	<b>Material und Methoden</b> .....	<b>17</b>
3.1.	Materialien zur DNA-Präparation.....	17
3.1.1.	Nährmedien zur Kultivierung prokaryotischer Zellen.....	17
3.1.2.	Bakterienkulturen.....	17
3.1.3.	Plasmide.....	17
3.1.4.	Oligonukleotide (Primer).....	19
3.2.	Materialien zur Generierung rekombinanter Proteine in der Zellkultur .....	19
3.2.1.	Nährmedien zur Kultivierung eukaryotischer Zellen .....	19
3.2.2.	Zelllinien.....	20
3.2.3.	Antibiotika .....	21
3.3.	Materialien zum Nachweis von DNA und Proteinen.....	21
3.3.1.	Enzyme .....	21
3.3.2.	Sodiumdodecylsulfat-Gele.....	21
3.3.3.	Größenstandard .....	22
3.3.4.	Antikörper .....	22
3.4.	Materialien zur Analyse von rekombinanten Proteinen im Zellexperiment .....	23
3.4.1.	Zelllinien.....	23
3.4.2.	Rekombinante Proteine.....	23
3.5.	Chemikalien .....	24
3.6.	Puffer und Lösungen .....	27

---

3.7. Allgemeine Verbrauchsmaterialien und Geräte .....	29
3.7.1. Geräte .....	29
3.7.2. Verbrauchsmaterialien .....	31
3.7.3. Kits .....	32
3.8. Molekularbiologische Methoden .....	33
3.8.1. Bakterienkultivierung .....	33
3.8.2. Transformation chemisch-kompetenter <i>E.coli</i> -Bakterien .....	33
3.8.3. Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	33
3.8.4. Ligation von DNA-Fragmenten .....	34
3.8.5. Agarosegelelektrophorese .....	34
3.8.6. Restriktionsanalyse der Plasmid-DNA .....	35
3.8.7. Dephosphorylierung von DNA .....	35
3.8.8. Extraktion der DNA aus Agarosegelen .....	35
3.8.9. Bestimmung der DNA-Konzentrationen mittels UV-Spektroskopie .....	36
3.8.10. Midi-Präparation der Plasmid-DNA .....	36
3.8.11. Mini-Präparation von Plasmid-DNA .....	36
3.8.12. Sequenzierung von Plasmid-DNA .....	37
3.9. Proteinbiochemische Methoden .....	37
3.9.1. Zellyse .....	37
3.9.2. BCA Protein Assay Kit zur Bestimmung des Proteingehalts .....	37
3.9.3. Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS- <i>Page</i> ) .....	37
3.9.4. Western Blot .....	38
3.9.5. Detektion von Proteinen im Coomassiegele .....	38
3.9.6. Reinigung und Isolierung von Proteinen .....	39
3.9.7. Spaltung von Proteinen mittels TEV-Protease .....	39
3.9.8. Größenausschluss-Chromatographie .....	40
3.10. Zellbiologische Methoden .....	41
3.10.1. Kultivierung von Suspensionszellen .....	41
3.10.2. Kultivierung von adhärennten Zellen .....	41
3.10.3. Zellzahlbestimmung .....	41
3.10.4. Transiente Transfektion von adhärennten Zellen .....	41
3.10.5. Stabile Transfektion von adhärennten Zellen .....	42
3.10.6. Proliferationsassay .....	42
3.10.7. Stimulationsassay .....	43

3.10.8. Expression von Proteinen mittels <i>Rollerbottle</i> .....	43
3.11. Statistische Analysen .....	44
<b>4 Ergebnisse</b> .....	<b>45</b>
4.1. Entwicklung des neuartigen Fusionsproteins cs-130 <sup>FLY</sup> Fc auf Basis von sgp130 <sup>FLY</sup> Fc.	45
4.2. Hemmung des IL-6 <i>Trans-Signalings</i> durch cs-130 <sup>FLY</sup> Fc .....	48
4.3. Keine Hemmung des IL-11 <i>Trans-Signalings</i> durch cs-130 <sup>FLY</sup> Fc .....	52
4.4. Herstellung von monomeren cs-130 <sup>FLY</sup> durch TEV-Spaltung.....	55
4.5. Monomeres cs-130 <sup>FLY</sup> hemmt das IL-6 <i>Trans-Signaling</i> besser als cs-130 oder sgp130Fc .....	56
4.6. Fehlende Hemmung des IL-11 <i>Trans-Signalings</i> durch monomere cs-130-Varianten ..	58
4.7. Versuch der Herstellung von cs-130 <sup>D2D3</sup> durch TEV-Spaltung von cs-130 <sup>D1TEVD2D3</sup> Fc	60
4.8. Hemmung der intrazellulären Signale des IL-6 <i>Trans-Signalings</i> durch cs-130-Varianten .....	67
4.9. Keine Hemmung des IL-6 <i>Classic-Signalings</i> durch cs-130Fc-Varianten .....	70
<b>5 Diskussion</b> .....	<b>72</b>
5.1. Cs-130-Varianten hemmen das IL-6 <i>Trans-Signaling</i> nach Stimulation mit IL-6 und sIL-6R .....	72
5.2. Steigerung der IL-6 Affinität durch cs-130 <sup>FLY</sup> Fc.....	74
5.3. IL-11 <i>Trans-Signaling</i> wird durch cs-130 <sup>FLY</sup> Fc und cs-130 <sup>FLY</sup> nicht gehemmt .....	76
5.4. Größenreduktion von cs-130 <sup>D1TEVD2D3</sup> Fc durch TEV-Spaltung .....	79
5.5. Zusammenfassung und Ausblick .....	80
<b>6 Literaturverzeichnis</b> .....	<b>84</b>
<b>7 Anhang</b> .....	<b>104</b>
<b>8 Danksagung</b> .....	<b>109</b>

## ABBILDUNGSVERZEICHNIS

<b>Abb. 1:</b> Schematische Darstellung von Interleukin 6 und Glykoprotein 130.....	3
<b>Abb. 2:</b> Schematische Darstellung des IL-6 <i>Classic-Signalings</i> und des IL-6 <i>Trans-Signalings</i> .....	4
<b>Abb. 3:</b> Schematische Darstellung verschiedener sgp130-Derivate, modifiziert nach Hansen (2021).....	6
<b>Abb. 4:</b> Schematische Darstellung des IL-11 Rezeptors und der IL-11 Signaltransduktionen.....	9
<b>Abb. 5:</b> Schematische Darstellung von sgp130Fc und cs-130Fc, modifiziert nach Heise et al. (2021).....	14
<b>Abb. 6:</b> Schematische Darstellung von cs-130Fc-Kontrollvarianten .....	14
<b>Abb. 7:</b> Schematische Darstellung cs-130 <sup>FLY</sup> Fc im Vergleich mit sgp130Fc und cs-130-Varianten.....	45
<b>Abb. 8:</b> Sequenzvergleich von cs-130Fc und cs-130 <sup>FLY</sup> Fc.....	45
<b>Abb. 9:</b> Klonierungsstrategie für die Plasmid-DNA von cs-130 <sup>FLY</sup> Fc.....	46
<b>Abb. 10:</b> Expression von sgp130Fc und cs-130Fc-Varianten und Detektion im Western Blot .....	47
<b>Abb. 11:</b> Einzelklonselektion von cs-130 <sup>FLY</sup> Fc zur stabilen Transfektion in CHO-K1 Zellen und Detektion von cs-130 <sup>FLY</sup> Fc in der SDS- <i>Page</i> nach erfolgter Proteinreinigung.....	48
<b>Abb. 12:</b> Schematische Darstellung cs-130 <sup>FLY</sup> Fc im Vergleich mit sgp130Fc und cs-130-Varianten.....	49
<b>Abb. 13:</b> Inhibition des IL-6 <i>Trans-Signalings</i> durch cs-130 <sup>FLY</sup> Fc im Proliferationsassay ....	49
<b>Abb. 14:</b> Inhibition des IL-6 <i>Trans-Signalings</i> durch cs-130 <sup>FLY</sup> Fc und sgp130 <sup>FLY</sup> Fc und Messung der Zellproliferation.....	51
<b>Abb. 15:</b> Keine Inhibition des IL-11 <i>Trans-Signalings</i> durch cs-130 <sup>FLY</sup> Fc im Proliferationsassay .....	53
<b>Abb. 16:</b> Keine Inhibition des IL-11 <i>Trans-Signalings</i> durch cs-130 <sup>FLY</sup> Fc und sgp130 <sup>FLY</sup> Fc.....	54
<b>Abb. 17:</b> Schematische Darstellung von cs-130 <sup>FLY</sup> Fc und cs-130 <sup>FLY</sup> .....	55
<b>Abb. 18:</b> Trennung von gespaltenem cs-130 <sup>FLY</sup> Fc mittels SEC und anschließender SDS- <i>Page</i> .....	56

<b>Abb. 19:</b> Inhibition des IL-6 <i>Trans-Signalings</i> durch monomeres cs-130 <sup>FLY</sup> im Proliferationsassay .....	57
<b>Abb. 20:</b> Keine Inhibition des IL-11 <i>Trans-Signalings</i> durch monomeres cs-130 <sup>FLY</sup> im Proliferationsassay .....	59
<b>Abb. 21:</b> Schematische Darstellung von verkleinerten cs-130-Varianten .....	60
<b>Abb. 22:</b> Expression von cs-130Fc-Varianten nach Transfektion von CHO-K1 Zellen mit Plasmid-DNA .....	61
<b>Abb. 23:</b> Schematische Darstellung von cs-130 <sup>D1TEVD2D3</sup> Fc und cs-130 <sup>D2D3</sup> .....	61
<b>Abb. 24:</b> Sequenzvergleich von cs-130Fc und cs-130 <sup>D1TEVD2D3</sup> Fc .....	62
<b>Abb. 25:</b> Einzelklonselektion von cs-130 <sup>D1TEVD2D3</sup> Fc zur stabilen Transfektion in CHO-K1 Zellen und Detektion in der SDS- <i>Page</i> nach erfolgter Proteinreinigung .....	62
<b>Abb. 26:</b> Trennung von gespaltenem cs-130 <sup>D1TEVD2D3</sup> Fc mittels SEC und anschließender SDS- <i>Page</i> .....	63
<b>Abb. 27:</b> SDS- <i>Page</i> von cs-130 und Spaltprodukt 1 zum Vergleich der molekularen Größe .....	64
<b>Abb. 28:</b> Inhibition des IL-6 <i>Trans-Signalings</i> durch cs-130 <sup>D1TEVD2D3</sup> Fc im Proliferationsassay .....	65
<b>Abb. 29:</b> Hemmung des IL-6 <i>Trans-Signalings</i> durch sgp130Fc und cs-130-Varianten und Detektion von pSTAT3/ STAT3 im Western Blot .....	68
<b>Abb. 30:</b> Hemmung der intrazellulären Signale pERK/ ERK im IL-6 <i>Trans-Signaling</i> durch sgp130Fc und cs-130-Varianten .....	69
<b>Abb. 31:</b> Keine Inhibition des IL-6 <i>Classic-Signalings</i> durch cs-130 <sup>FLY</sup> Fc, sgp130 <sup>FLY</sup> Fc, sgp130Fc und cs-130-Varianten .....	71
<b>Abb. 32:</b> Schematische Darstellung der Hemmung des IL-6 und IL-11 <i>Trans-Signalings</i> durch sgp130Fc und cs-130 <sup>FLY</sup> Fc .....	77

## Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b> Plasmide .....	17
<b>Tabelle 2:</b> Oligonukleotide und ihre Nukleotidsequenz .....	19
<b>Tabelle 3:</b> Nährmedien zur Kultivierung eukaryotischer Zellen .....	19
<b>Tabelle 4:</b> Eukaryotisch adhärente Zelllinie zur Proteinexpression .....	20
<b>Tabelle 5:</b> Verwendete Antibiotika.....	21
<b>Tabelle 6:</b> Größenstandards und Marker .....	22
<b>Tabelle 7:</b> Antikörper und ihre Konzentration .....	22
<b>Tabelle 8:</b> Eukaryotische Suspensionszellen.....	23
<b>Tabelle 9:</b> Verwendete rekombinante Proteine.....	23
<b>Tabelle 10:</b> Chemikalien und ihre Hersteller.....	24
<b>Tabelle 11:</b> Puffer/ Lösungen und ihre Zusammensetzung .....	27
<b>Tabelle 12:</b> Angewandte Geräte und ihre Hersteller .....	30
<b>Tabelle 13:</b> Verbrauchsmaterialien und ihre Hersteller.....	31
<b>Tabelle 14:</b> Kits und ihre Hersteller.....	32
<b>Tabelle 15:</b> Inhibitorisches Profil von sgp130Fc und cs-130Fc-Varianten für das IL-6 <i>Trans-Signaling</i> .....	50
<b>Tabelle 16:</b> Inhibitorisches Profil von sgp130Fc und cs-130Fc-Varianten für das IL-11 <i>Trans-Signaling</i> .....	53
<b>Tabelle 17:</b> Inhibitorisches Profil von cs-130 <sup>FLY</sup> , cs-130 und sgp130Fc für das IL-6 <i>Trans-Signaling</i> .....	58
<b>Tabelle 18:</b> Inhibitorisches Profil von cs-130 <sup>FLY</sup> , cs-130 und sgp130Fc für das IL-11 <i>Trans-Signaling</i> .....	59
<b>Tabelle 19:</b> Inhibitorisches Profil von sgp130Fc und cs-130Fc-Varianten im Vergleich mit cs-130 <sup>D1TEVD2D3</sup> Fc.....	66
<b>Tabelle 20:</b> Vergleich der inhibitorischen Effektivität diverser sgp130-Varianten auf das IL-6 <i>Trans-Signaling</i> .....	104
<b>Tabelle 21:</b> Inhibitorische Effektivität der cs130-Varianten auf das IL-6 <i>Trans-Signaling</i> , modifiziert nach Heise et al. (2021).....	105
<b>Tabelle 22:</b> Vergleich der inhibitorischen Effektivität diverser sgp130-Mutanten mit sgp130Fc in Bezug auf der Hemmung des IL-6 <i>Trans-Signaling</i> s .....	106
<b>Tabelle 23:</b> Inhibitorische Effektivität der cs130-Varianten auf das IL-11 <i>Trans-Signaling</i> , modifiziert nach Heise et al. (2021).....	107

<b>Tabelle 24:</b> Vergleich der inhibitorischen Effektivität diverser sgp130-Mutanten mit sgp130Fc im IL-11 <i>Trans-Signaling</i> .....	108
---	-----

# 1 EINLEITUNG

## 1.1. Interleukin 6 als wichtiges Zytokin des Immunsystems

Die Behandlung immunvermittelter, chronisch-entzündlicher Erkrankungen stellt einen zentralen Ansatzpunkt in der heutigen Medizin dar. Bei der Entstehung von entzündlichen Erkrankungen spielen nicht nur genetische und epigenetische Faktoren, Umweltfaktoren oder das eigene Mikrobiom eine Rolle. Es sind die komplexen Zell-Zell-Kontakte des Immunsystems mit anderen Zellen, die eine Entzündung erst möglich machen (Schett et al., 2013). Dabei werden Mediatoren, sog. Zytokine wie Interleukin 6 (IL-6) ausgeschüttet, welche der Zielzelle Signale übermitteln. Dies führt zur Initiation einer intrazellulären Signalkaskade, die zur Expression spezifischer Zielgene führt. IL-6 ist ein pleiotropes Zytokin, welches hauptsächlich von Monozyten und Makrophagen ausgeschüttet wird. Aber auch T-Zellen, B-Zellen, endotheliale Zellen, Fibroblasten, Keratinozyten, mesangiale Zellen und Adipozyten sowie einige Tumorzellen können IL-6 konstitutiv oder nach Stimulation ausschütten (Chalaris et al., 2011, Garbers et al., 2011). Eine Ausschüttung von IL-6 hat diverse immunologische, sowie physiologische Prozesse zur Folge. Es ist ein wichtiges Protein der akuten Phase Reaktion und induziert die Bildung des C-reaktiven Proteins (CRP) und des Hepcidins (Kishimoto, 2010). IL-6 ist ein zentrales Zytokin der Inflammation, der Antigen-spezifischen Antwort, der Hämatopoese und der Apoptose. Zudem spielt IL-6 bei der T- und B-Zell Differenzierung eine Rolle und ist u.a. Bestandteil des zellulären Metabolismus (Hunter and Jones, 2015, Chalaris et al., 2011, Kishimoto, 2010). Eine Ausschüttung von IL-6 kann demnach eine Steigerung entzündlicher Prozesse zur Folge haben. Im Serum gesunder Menschen schwankt der Messbereich von IL-6 in einem Bereich von 1 - 5 pg/ml (Rose-John, 2017, Hunter and Jones, 2015, Akira et al., 1993). Kommt es jedoch zur Infektion oder Entzündung, so detektiert man erhöhte Messwert im ng/ml Bereich oder im Falle der Sepsis von 100 - 1000 ng/ml IL-6 (Jones et al., 2005, Waage et al., 1989).

Bereits im Jahr 1990, kurz nachdem es den Forschern gelang das IL-6 Gen zu isolieren (Hirano et al., 1986), konnten um den Faktor 14 bis 23-fach erhöhte IL-6 Serumspiegel bei Patienten mit kardialem Myxom nachgewiesen werden (Jourdan et al., 1990). Diese Patienten zeigten zudem Symptome wie erhöhtes Fieber, Polyarthritiden mit positivem Nachweis für nukleäre Antikörper, erhöhte CRP-Level und eine Hypergammaglobulinämie. Nach Entfernung der gutartigen Tumore der Patienten sank der IL-6 Serumspiegel unter die Nachweisgrenze. Diese

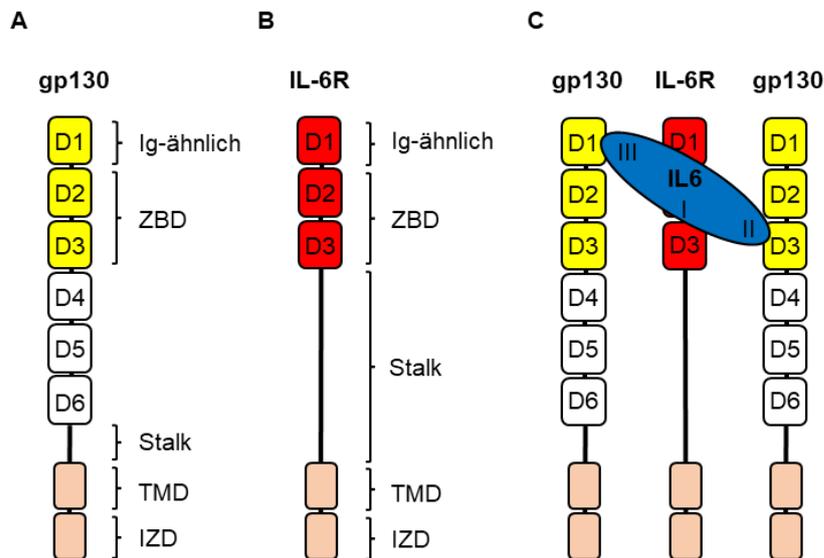
Beobachtungen zeigten schon damals, dass eine Überproduktion von IL-6 durch kardiale Myxomzellen in Verbindung mit einer systemischen Wirkung von IL-6 für die immunologischen Merkmale verantwortlich sein könnte, die denen ähneln, die bei echten Autoimmunerkrankungen, wie auch der rheumatoiden Arthritis, vorkommen (Jourdan et al., 1990, Hirano et al., 1987). Ebenso zeigte sich eine dysregulierte IL-6 Produktion in Synovialzellen bei Patienten mit rheumatoider Arthritis (Hirano et al., 1988), in tumorösen Myelomzellen (Kawano et al., 1988), im Rahmen des Morbus Castleman (Yoshizaki et al., 2018, Yoshizaki et al., 1989), sowie in zahlreichen anderen chronisch-entzündlichen, autoimmunen oder tumorösen Erkrankungen (Akira et al., 1993, Akira and Kishimoto, 1992). Es liegt nahe, dass aufgrund der vielfältigen Wirkungen von IL-6 insbesondere im Bereich der Entzündung, eine Modulation des IL-6 Signalweges für die Wissenschaft und Medizin von Interesse war und noch immer ist.

## 1.2. Prinzipien der IL-6 Signalwege und deren Hemmung als Angriffspunkt in der Therapie autoimmuner Prozesse

Ein Verständnis über die extra- und intrazellulären Prozesse des IL-6 Signalweges ist notwendig, um wissenschaftlich fundierte, therapeutische Angriffspunkte von IL-6 verstehen zu können. Beispielsweise beruhen viele der heute eingesetzten Therapeutika wie Tocilizumab (Sheppard et al., 2017), Sarilumab (Boyce et al., 2018) oder das sich in der Entwicklung befindliche Olamkicept (Schreiber et al., 2021) auf einer Hemmung des IL-6 Rezeptors oder auf einer Hemmung des Komplexes aus IL-6 und dem löslichem IL-6 Rezeptor. Wohingegen *small molecule* Inhibitoren (Tofacitinib, Baricitinib) auf der Hemmung von Janus-Kinasen beruhen (Solimani et al., 2019).

Das 26 kDa schwere Protein Interleukin 6 (IL-6), welches auch unter dem Namen B-Zell stimulierender Faktor 2, *IFN-beta 2*, *26-kDa protein*, *Hybridoma/ plasmacytoma growth factor* oder *HSF* bekannt ist (Hirano et al., 1986, Kawano et al., 1988, Van Damme et al., 1987, Gauldie et al., 1987, Haegeman et al., 1986), interagiert wie in **Abb. 1** zu sehen, gemeinsam mit dem Glykoprotein 130 (gp130) und dem Interleukin 6 Rezeptor (IL-6R) über insgesamt drei Bindungsstellen, sog. *Sites*. Über *Site I* bindet IL-6 an den IL-6R, über *Site II* die zytokinbindenden Domänen D2 und D3 von gp130 und über *Site III* die Ig-ähnliche Domäne D1 von gp130 (Boulanger et al., 2003, Grötzinger et al., 1999, Hammacher et al., 1998, Ehlers et al., 1994). Der Interleukin 6Rezeptor (IL-6R), in **Abb. 1B** zu sehen, wurde erstmals 1988 gentechnisch isoliert (Yamasaki et al., 1988). Dieser membrangebundene  $\alpha$ -Rezeptor mit einer

Molekülgröße von 80 kDa besteht aus den extrazellulären Domänen D1 bis D3, einer Stalk-Region, einer Transmembrandomäne (TMD) sowie einer intrazellulären Domäne (IZD). Die extrazellulären Domänen D1 bis D3, die maßgeblich an der Komplexbindung beteiligt sind, können unterteilt werden in eine Ig-ähnliche D1-Domäne, sowie in die Fibronektin Typ III ähnlichen zytokinbindenden Domänen (ZBD) D1 bis D3 (Hibi et al., 1990, Taga et al., 1989).



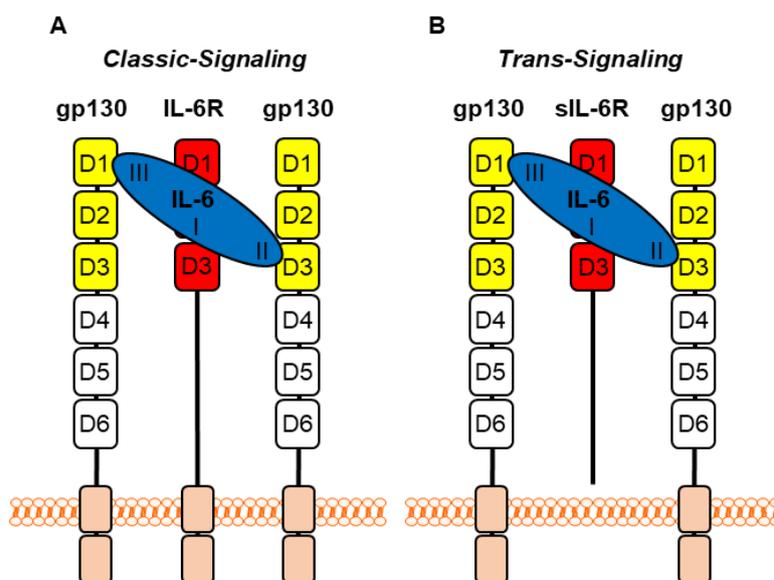
**Abb. 1: Schematische Darstellung von Interleukin 6 und Glykoprotein 130**

**(A) Glykoprotein 130 (gp130).** Die extrazellulären Domänen D1-D6, können in eine Ig-ähnliche D1-Domäne, in Fibronektin Typ III ähnliche D1-D6-Domänen sowie zytokinbindende Domänen (ZBD) D2-D3 eingeordnet werden. Darauf folgt eine Stalk-Region, eine Transmembrandomäne (TMD) und intrazelluläre Domäne (IZD) zur weiteren Signalübertragung. **(B) Interleukin 6Rezeptor (IL-6R).** Die extrazellulären Domänen D1-D3, können in eine Ig ähnliche D1-Domäne, sowie in zytokinbindende Fibronektin Typ III ähnliche Domänen (ZBD) D1-D3 eingeordnet werden. Darauf folgt eine Stalk-Region, eine Transmembrandomäne (TMD) und intrazelluläre Domäne (IZD) zur weiteren Signalübertragung. **(C) Interleukin 6(IL-6).** Zu sehen ist IL-6 (blau) mit seinen drei Sites. *Site I* bindet den IL-6R, *Site II* die zytokinbindenden Domänen D2-D3 des membrangebundenen gp130 und *Site III* bindet an die Ig-ähnliche Domäne D1 von gp130.

Das Glykoprotein 130 (gp130) ist ein ubiquitär auf allen Zellen, mit Ausnahme von Sirpα<sup>+</sup> dendritischen Zellen (Heink et al., 2017) und einiger Granulozytentypen (Wilkinson et al., 2018), befindlicher membrangebundener β-Rezeptor (Hibi et al., 1990), welcher allein nicht in der Lage ist, IL-6 zu binden (**Abb. 1A**). Erst die Interaktion von IL-6 mit dem IL-6R aktiviert die Bindungsstellen von IL-6 zu gp130 (Hibi et al., 1990). Die extrazelluläre Domäne von gp130 umfasst insgesamt sechs Fibronektin Typ III ähnliche Domänen (D1 bis D6), von denen die D1-Domäne Ig-ähnlich ist. Die Domänen 2 und 3 werden als zytokinbindende Domänen bezeichnet. Darauf folgt eine Stalk-Region, eine Transmembrandomäne (TMD) und eine intrazelluläre Domäne (IZD) zur weiteren Signalübertragung, so dass gp130 mit seiner Glykosylierung insgesamt ein Molekulargewicht von 130 kDa erreicht (Chow et al., 2001, Taga and Kishimoto, 1997). Die intrazelluläre Signaltransduktion umfasst u.a. die initiale

Aktivierung der gp130 assoziierten Janus-Kinasen, welche eine Phosphorylierung von STAT-Molekülen (*signal transducer and activator of transcription*) wie beispielweise STAT1, STAT3, STAT5 und ERK-Molekülen (*extracellular-signal regulated kinases*), sowie eine AKT/ PKB-Signaltransduktion (Uciechowski and Dempke, 2020, Kishimoto, 2010) oder eine Src/ YAP-Aktivierung zur Folge haben (Lokau and Garbers, 2019, Taniguchi et al., 2015).

Die IL-6 Signaltransduktion kann auf unterschiedlichen Wegen initiiert werden. Um verstehen zu können, wie eine Modulation der IL-6 Signaltransduktion möglich ist, werden exemplarisch nur die für diese Arbeit relevanten Wege erklärt. Im Fall der klassischen IL-6 Signaltransduktion, auch *Classic-Signaling* genannt, bindet IL-6 an den membrangebundenen IL-6 Rezeptor (IL-6R). Interessanterweise befindet sich der membrangebundene IL-6 Rezeptor lediglich auf Hepatozyten, Monozyten sowie Lymphozyten (Kang et al., 2019), so dass hierdurch das *Classic-Signaling* auf diese Zellarten beschränkt ist.



**Abb. 2: Schematische Darstellung des IL-6 *Classic-Signaling* und des IL-6 *Trans-Signaling***

(A) **IL-6 *Classic-Signaling*.** IL-6 (blau) bindet an den membrangebundenen IL-6R (rot), was dann in einem nächsten Schritt die Bindung an zwei membrangebundenen gp-130 Glykoproteinen (weiß-gelb) via *Sites* II und III ermöglicht. Eine Homodimerisierung von gp-130 mit dem IL-6R und IL-6 führt dann u.a. zur JAK-STAT Signaltransduktion, die zu einer Phosphorylierung von STAT3 und ERK führt. (B) **IL-6 *Trans-Signaling*.** Der lösliche IL-6R (rot) bindet mit IL-6 (blau) an zwei membrangebundene gp-130 Glykoproteine (weiß-gelb). Eine Homodimerisierung von gp-130 mit dem IL-6R und IL-6 führt dann zur JAK-STAT Signaltransduktion, die u.a. zu einer Phosphorylierung von STAT3 und ERK führt.

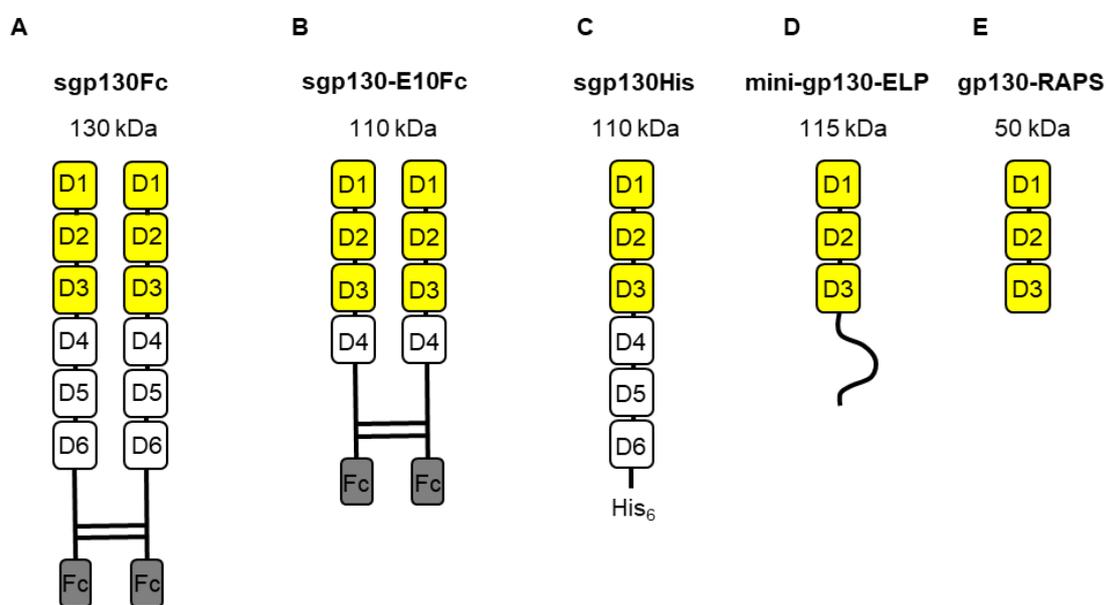
Wie in **Abb. 2A** zu sehen, führt die Komplexbildung von IL-6 und membrangebundenem IL-6R zur Homodimerisierung von gp130 und somit zur Initiation der Signaltransduktion (Murakami et al., 1993). Bereits 1992 konnte eine lösliche Form des IL-6 Rezeptors identifiziert werden, was zur späteren Differenzierung in *Classic-* und *Trans-Signaling* führte. Denn im Fall des IL-6 *Trans-Signaling* (**Abb. 2B**) kann der der IL-6R entweder durch alternatives *Splicing* (Lust et

al., 1992) oder durch posttranslationale Abspaltung, dem sog. *Shedding*, durch ADAM-Proteasen (ADAM10 und ADAM17) von der Membranoberfläche in eine lösliche Form überführt werden (Zunke and Rose-John, 2017, Müllberg et al., 1993). Dabei wird der IL-6R in einem höheren Maße über das *Shedding*, als über das alternative *Splicing* in eine lösliche Form überführt (Riethmueller et al., 2017). IL-6 bindet mit gleicher Affinität sowohl den membrangebundenen als auch den löslichen IL-6 Rezeptor (sIL-6R) (Riethmueller et al., 2017). Beim *Trans-Signaling* erfolgt also initial die Bindung von IL-6 an den löslichen IL-6R. Erst dann kommt es zur Bindung an membrangebundenes gp130, sowie zur Homodimerisierung und intrazellulären Signaltransduktion (Murakami et al., 1993).

In den 1990er Jahren wurde der erste Antikörper zur Blockade von IL-6 entwickelt. Hierbei handelte es sich um einen Antikörper, der an den IL-6R bindet und so die Interaktion mit IL-6 hemmt. Dieser erste Antikörper wurde Tocilizumab (RoActemra<sup>®</sup>, Roche, Schweiz) genannt und ist mittlerweile für die Humantherapie der rheumatoiden Arthritis, der systemischen Form der juvenilen idiopathischen Arthritis oder der polyartikulären Form der juvenilen rheumatoiden Arthritis, der Riesenzellerteriitis sowie für die Behandlung der eines lebensbedrohlichen Zytokinfreisetzungssyndroms in der EU zugelassen (Sheppard et al., 2017). Zudem kann Tocilizumab unter bestimmten Vorraussetzungen bei Erwachsenen mit Covid-19 angewandt werden, um das Zytokinfreisetzungssyndrom zu mildern (Cortegiani et al., 2021, European medicine agency, 2009). Tocilizumab und auch alle anderen anti-IL-6R Antikörper binden sowohl an den membranständigen als auch an den löslichen IL-6R (Uciechowski and Dempke, 2020, Kang et al., 2019, June and Olsen, 2016, Garbers et al., 2011). Damit hemmen diese Antikörper sowohl das IL-6 *Classic*- als auch das *Trans-Signaling*. Gleiches gilt für Antikörper, die direkt an IL-6 binden und somit die Interaktion an den IL-6R unterbinden (Kang et al., 2019, Tanaka et al., 2018, Barkhausen et al., 2011). Auch hier wird sowohl das IL-6 *Classic*- als auch das *Trans-Signaling* gehemmt. Jostock et al. (2001) beschrieben 2001 ein neues Molekül zur spezifischen Hemmung des IL-6 *Trans-Signalings*, das sogenannte lösliche gp130Fc (*soluble* gp130Fc, sgp130Fc). Sgp130Fc, wie in **Abb. 3A** zu sehen, besteht aus dem kompletten extrazellulären Bereich von gp130, fusioniert mit dem Fc-Teil eines IgG1 Antikörpers (Jostock et al., 2001). Die molekulare Grundlage, warum lösliches gp130 mit oder ohne Fc-Fusion selektiv nur das IL-6 *Trans-Signaling* hemmt, ist nach wie vor unklar. Sgp130Fc bindet, genauso wie membranständiges gp130, mit einer sehr hohen Affinität im picomolaren Bereich an den Komplex aus IL-6/ sIL-6R. Im Vergleich zum monomeren sgp130His (**Abb. 3C**), hemmt das dimere sgp130Fc IL-6 *Trans-Signaling* um den Faktor 10 besser (Jostock et al., 2001). Die besseren Hemmeigenschaften des dimerem sgp130Fc im

Vergleich zu monomerem sgp130 sind sehr wahrscheinlich an der gleichzeitigen, kooperativen Bindung von IL-6 (im Komplex mit dem sIL-6R) an sgp130Fc über *Site II* und *Site III* zu erklären, wohingegen IL-6 (im Komplex mit dem sIL-6R) nur einfach entweder über *Site II* oder *Site III* an sgp130 binden kann (Boulangier et al., 2003, Chow et al., 2001). Die erhöhte Affinität im Zuge der kooperativen Bindung wird Avidität genannt.

Nach der Entwicklung von sgp130Fc als effektiven IL-6 *Trans-Signaling* Hemmstoff gab es eine Reihe von Ansätzen, um sgp130 zu optimieren. Die Generierung folgender sgp130-Derivate wie sgp130-E10Fc, mini-gp130-ELP und gp130-RAPS zielten sowohl auf eine Reduktion der molekularen Größe als auch auf eine gleichbleibende oder erhöhte Affinität ab.



**Abb. 3: Schematische Darstellung verschiedener sgp130-Derivate, modifiziert nach Hansen (2021)**

(A) **sgp130Fc.** Zwei Domänen, jeweils bestehend aus D1-D6 von gp130, wurden mit einem Fc-Fragment fusioniert. (B) **sgp130-E10Fc.** Zwei Domänen D1-D4 von sgp130 sind mit einem Fc-Fragment fusioniert. (C) **sgp130His.** Die Domänen D1-D6 von gp130 wurden mit ein Hexa-Histidin *tag* versehen. (D) **mini-sgp130-ELP.** Die Domänen D1-D3 von gp130 wurden mit 100 *repeats* von *elastin-like peptides* fusioniert (gewundene schwarze Linie). (E) **gp130-RAPS.** Durch alternatives *Splicing* entsteht ein gp130-Derivat, welches nur die Domänen D1-D3 von gp130 enthält. (A-E) Angaben zum Molekulargewicht wurden anhand experimentell bestimmter molekularen Größen gemacht.

Das sgp130-E10 (Abb. 3B), eine natürlich im Körper vorkommende Isoform von sgp130, wurde erstmals in peripheren mononukleären Blutzellen entdeckt und weist als Monomer eine theoretische Molekülgröße von 70-80 kDa auf (Sommer et al., 2014). Diese Isoform besteht aus den Domänen D1-D4 sowie einer *loop*-Region zwischen D4 und D5. Ein rekombinant hinzugefügter Fc-*tag* ermöglichte in diesem Bezug die Dimerisierung von sgp130-E10Fc. Im Vergleich mit sgp130 wies sgp130-E10Fc jedoch eine 5-10-fach niedrigere Effektivität in der Hemmung des IL-6 *Trans-Signaling*s auf (Sommer et al., 2014). Das mini-gp130-ELP

(**Abb. 3D**), besteht aus den ersten drei Domänen (D1-D3) von gp130, fusioniert mit 100 *repeats* von *elastin-like-peptides*. Im Vergleich mit sgp130Fc, zeigte das mini-gp130-ELP, eine deutlich niedrigere Hemmeffektivität auf das *Trans-Signaling*, jedoch aber eine vergleichbare Hemmung wie die monomere Variante sgp130His, welche in **Abb. 3C** schematisch dargestellt ist (Lin et al., 2006). Das gp130-RAPS (RAPS, *for gp130 of the rheumatoid arthritis antigenic peptide-bearing soluble form*) ist eine weitere natürlich vorkommende Isoform und *Splice*-Variante von gp130, mit einem experimentell bestimmten Molekulargewicht von 50 kDa (Diamant et al., 1997). Diese gp130-Variante konnte u.a. in der Synovialflüssigkeit sowie im Plasma von Patienten mit rheumatoider Arthritis gefunden werden (**Abb. 3E**) und erwies sich im Vergleich mit sgp130 als funktionstüchtiger Inhibitor im Tiermodell der chronisch-entzündlichen Arthritis (Richards et al., 2006). Die beobachtete Affinität zu IL-6/sIL-6R Komplexen von gp130-RAPS war mit 6,9 nM gemessener  $K_D$  äquivalent zur bisher beschriebenen Affinität von monomeren sgp130 (Richards et al., 2006, Jostock et al., 2001). Jedoch sollte erwähnt sein, dass die im gp130-RAPS enthaltene terminale COOH-Sequenz bereits im Jahr 2000 als autoantigenes Epitop identifiziert worden ist (Tanaka et al., 2000). Bisher ist nicht geklärt, welche Auswirkung dies bei einer Therapie mit gp130-RAPS auf Patienten mit rheumatoider Arthritis haben könnte. Was hingegen gezeigt werden konnte ist, dass nur die Domänen D1-D3 von gp130 notwendig sind, um eine effektive Suppression von experimentell induzierter Arthritis zu bewirken (Richards et al., 2006).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass bei den beschriebenen sgp130-Derivaten zwar in Teilen eine Verringerung der Molekülgröße erreicht werden konnte, jedoch eine gleichzeitige Erhöhung der Hemmeffektivität im Vergleich zu sgp130Fc nicht möglich war. Zudem wurden ein Großteil der Experimente mit Hilfe eines Designerzytokins, auch Hyper-IL-6 genannt, durchgeführt und nur wenige Experimente erfolgten auf Basis des natürlich vorkommenden Komplexes aus IL-6/sIL-6R (Wolf et al., 2016, Sommer et al., 2014, Lin et al., 2006, Jostock et al., 2001). Das in einigen Experimenten verwendete Designerzytokin Hyper-IL-6 besteht aus einem Komplex aus IL-6 und sIL-6R Rezeptor, welcher über einen Polypeptid-Linker kovalent miteinander verbunden ist und so zur Stabilisierung des Komplexes beiträgt (Fischer et al., 1997).

Hyper-IL-6 kann nur das IL-6 *Trans-Signaling* induzieren und benötigt dafür eine 100 bis 1000-fach niedrigere Konzentration als die separat betrachteten Komponenten IL-6 und sIL-6R, bei vergleichbarer biologischer Signalstärke (Jostock et al., 1999, Fischer et al., 1997). Die initiale Charakterisierung der Hemmeigenschaften von sgp130 und seinen Derivaten mittels

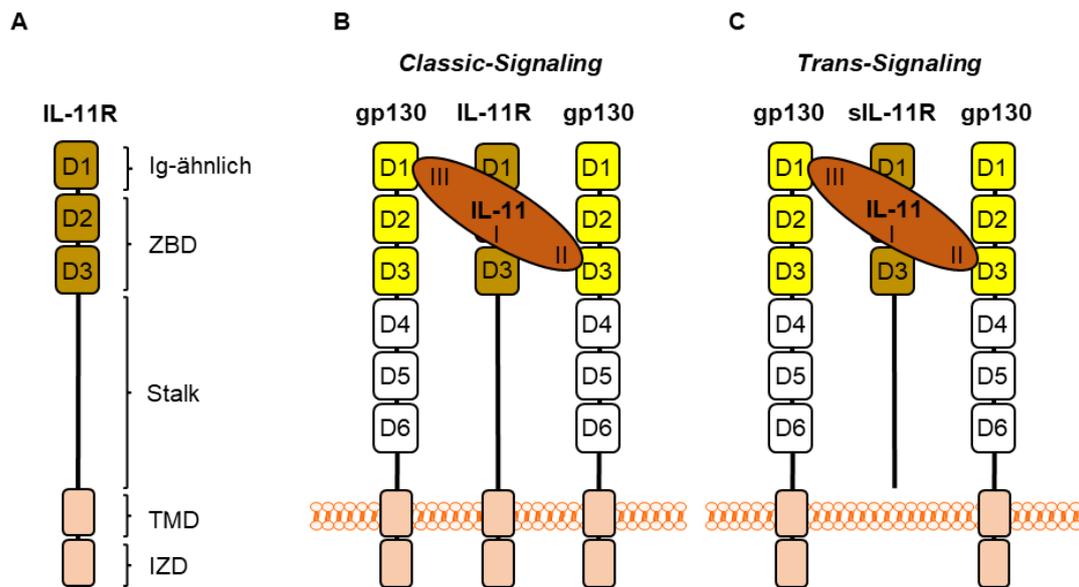
Hyper-IL-6 ist zwar ein artifizielles Testsystem, bildet aber dennoch sehr gut das IL-6 *Trans-Signaling in vitro* ab. Ausgehend von den oben genannten Erkenntnissen ist das beschriebene sgp130Fc bisher der mit Abstand potenteste Hemmstoff des IL-6 *Trans-Signalings*.

### 1.3. Sgp130Fc ist auch ein effektiver Hemmstoff des IL-11 *Trans-Signalings*

Interleukin 11 ist das nächstverwandte Zytokin zu IL-6, welches bereits 1990 als stimulierendes Protein einer murinen Plasmozytom Zelllinie beschrieben wurde (Paul et al., 1990). Wie IL-6, welches initial an den IL-6R bindet und dann zwei gp130 Rezeptoren rekrutiert, bindet IL-11, wie in **Abb. 4A** zu sehen, initial über *Site I* an den IL-11R und dann über *Site II* und *Site III* an zwei gp130 Rezeptoren (Barton et al., 1999, Tacke et al., 1999, Yin et al., 1993). Der IL-11R wurde bisher auf viele Zelltypen, darunter Lymphozyten, B-Zellen, Makrophagen, endothelialen Zellen und Osteoklasten identifiziert (Putoczki and Ernst, 2010).

IL-11 ist ebenso wie IL-6, an einer Reihe physiologischer und pathophysiologischer Prozesse des Körpers beteiligt. So wurde es zunächst als hämatopoetischer Faktor beschrieben, welcher eine Rolle bei der Reifung von Megakaryozyten spielt (Teramura et al., 1992, Musashi et al., 1991). Aber auch in der Lymphopoese (Anderson et al., 1992), Erythropoese (Quesniaux et al., 1992) und Myelopoese (Cairo et al., 1993) ist IL-11 involviert. Interessanterweise wurde IL-11 auch als Osteoblasten differenzierender Faktor entdeckt, welcher zur Knochenbildung beiträgt. Experimente an IL-11R defizienten Mäusen zeigten, dass die Abwesenheit des IL-11R zu abnormalen, kraniofaszialen Fehlbildungen führte (Johnson et al., 2015, Sims et al., 2005, Takeuchi et al., 2002). Umgekehrt konnte dies bei Menschen bestätigt werden, die inaktivierende genetische Mutationen im IL-11R aufwiesen. Diese zeigten Fehlbildungen im Sinne einer Kraniosynostose, bei der es zu einem verfrühten Verschluss der Wachstumsfugen im Bereich der Schädelknochen kommt (Agthe et al., 2018, Brischoux-Boucher et al., 2018, Keupp et al., 2013, Nieminen et al., 2011). In der Lunge von Patienten, die an virusinduziertem Asthma litten, konnten darüber hinaus ebenfalls erhöhte IL-11 Level nachgewiesen werden, was daraufhin deutet, dass IL-11 eine wichtige Rolle bei viralen Atemwegserkrankungen spielt (Einarsson et al., 1996). Zugleich ist IL-11 offenbar bei der Reproduktion von entscheidender Bedeutung. Es wurde gezeigt, dass Mäuse die keinen IL-11R aufwiesen infertil waren und dass die Entwicklung eines Embryos nicht möglich war (Robb et al., 1998). Auch bei fibrotischen Prozessen im Herzen (Schafer et al., 2017), der Lunge (Ng et al., 2020) und in der Leber (Widjaja et al., 2019) scheint IL-11 relevant zu sein. Darüber hinaus ist IL-11 genau wie IL-6

ein wichtiger Faktor bei Krebserkrankungen und ist beispielsweise an der Knochenmetastasierung bei Brustkrebserkrankungen beteiligt (Ren et al., 2013). Zudem wurden erhöhte IL-11 Level bei weiteren Krebserkrankungen gefunden, darunter in Pankreaskarzinomen (Bellone et al., 2006), Knochenmetastasen (Zhang et al., 1998), Osteosarkomen (Elias et al., 1995) sowie in Lymphknoten von Melanompatienten (Torisu-Itakura et al., 2007) oder in humanen Melanomzelllinien (Paglia et al., 1995).



**Abb. 4: Schematische Darstellung des IL-11 Rezeptors und der IL-11 Signaltransduktionen**  
**(A) Interleukin-11 Rezeptor (IL-11R).** Die extrazellulären Domänen D1-D3, können in eine Ig-ähnliche D1-Domäne, sowie in zytokinbindende Fibronectin Typ III ähnliche Domänen (ZBD) D1-D3 eingeordnet werden. Darauf folgt eine Stalk-Region, eine Transmembrandomäne (TMD) und intrazelluläre Domäne (IZD) zur weiteren Signalübertragung **(B) IL-11 Classic-Signaling.** Der membrangebundene IL-11R (dunkelgelb) bindet gemeinsam mit IL-11 (orange) an zwei membrangebundene gp-130 Glykoproteine (weiß-gelb). Eine Homodimerisierung von gp-130 mit dem IL-11R und IL-11 führt dann zur JAK-STAT Signaltransduktion, die u.a. zu einer Phosphorylierung von STAT3 und ERK führt. **(C) IL-11 Trans-Signaling.** Der lösliche IL-11R (dunkelgelb) bindet gemeinsam mit IL-11 (orange) an zwei membrangebundene gp-130 Glykoproteine (weiß-gelb). Eine Homodimerisierung von gp-130 mit dem IL-11R und IL-11 führt dann zur JAK-STAT Signaltransduktion, die u.a. zu einer Phosphorylierung von STAT3 und ERK führt.

Wie in **Abb. 4A** dargestellt, besteht der IL-11 Rezeptor aus den extrazellulären Domänen D1-D3, welche in eine Ig-ähnliche D1-Domäne, sowie in die zytokinbindenden Fibronectin Typ III ähnlichen Domänen (ZBD) D1-D3 eingeordnet werden kann. Darauf folgt eine Stalk-Region, eine Transmembrandomäne (TMD) und intrazelluläre Domäne (IZD) zur weiteren Signalübertragung (Hilton et al., 1994, Yin et al., 1992, Yang and Yin, 1992).

Kürzlich wurde beschrieben, dass der IL-11R durch die ADAM10-Protease, Serin-Proteasen wie die Neutrophile Elastase und Proteinase 3, Meprin  $\beta$  sowie durch die rhomboide Protease RHBDL2 in eine lösliche Form (sIL-11R) überführt werden kann (Koch et al., 2021, Sammel et al., 2019, Lokau et al., 2017, Lokau et al., 2016b). Der lösliche IL-11R kann dann analog zu

IL-6 mit IL-11 einen löslichen Komplex eingehen und über IL-11 *Trans-Signaling* (**Abb. 4C**) Zellen aktivieren, die keinen membranständigen IL-11R tragen (Moll et al., 2017, Lokau et al., 2016a, Dams-Kozłowska et al., 2012). Da IL-11, wie IL-6, über ein Homodimer aus gp130 signalisiert, ist sgp130Fc ebenfalls ein selektiver Hemmstoff des IL-11 *Trans-Signalings* (Heise et al., 2021, Berg et al., 2021, Lokau et al., 2021). Ob die parallele Hemmung des IL-6 *Trans-Signalings* und des IL-11 *Trans-Signalings* erwünschte oder unerwünschte Effekte hat, kann aktuell nicht abschließend beurteilt werden, weil die Funktion des IL-11 *Trans-Signalings in vivo* noch nicht näher charakterisiert wurde. Eine zeitgleiche Hemmung der IL-6 und IL-11 *Trans-Signaling* Wege ist wahrscheinlich nicht besonders problematisch, wobei aufgrund des Wirkprofils von IL-6 eine solitäre Hemmung des IL-6 *Trans-Signalings* durch sgp130 wünschenswert wäre. Im weiteren Verlauf der Arbeit wird gezeigt, dass die selektive Hemmung des IL-6 *Trans-Signalings* durch eine neue cs-130-Variante gelingen kann.

#### 1.4. Entwicklung anti-entzündlicher Therapien durch die Hemmung von IL-6 *Classic-* und/oder *Trans-Signaling*

Bereits in frühen Studien konnte anhand von IL-6 *knock-out* Mäusen gezeigt werden, dass IL-6 ein zentrales, pro-entzündliches Zytokin ist. So haben IL-6 *knock-out* Mäuse auf der einen Seite große Probleme in der Abwehr von bakteriellen und viralen Infektionen (Kopf et al., 1994) und andererseits ist die Entwicklung verschiedener Autoimmunerkrankungen wie der rheumatoiden Arthritis (Ohshima et al., 1998, Alonzi et al., 1998) oder der Multiplen Sklerose (Mendel et al., 1998) in IL-6 defizienten Mäusen komplett unterdrückt oder abgeschwächt. Im Tiermodell der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE) in Mäusen, welche der humanen Erkrankungen der multiple Sklerose sehr nahe kommt, war überraschenderweise nur die prophylaktische, nicht aber die therapeutische Gabe von IL-6R Antikörpern in der Lage, die Entwicklung einer multiplen Sklerose-Symptomatik zu unterdrücken (Serada et al., 2008).

Ein murines Modell der rheumatoiden Arthritis ist die Kollagen-induzierte Arthritis. Alonzi et al. zeigten bereits 1998, dass IL-6 defiziente Mäuse im Vergleich mit IL-6 Wildtyp Mäusen keine für die Krankheit typischen Gelenkschwellungen oder destruktive Entzündungen der Gelenke aufwiesen (Alonzi et al., 1998). Diese Befunde trugen maßgeblich zum Einsatz von Tocilizumab, einen gegen den IL-6R gerichteten humanisierten Antikörper, für Behandlung der rheumatoiden Arthritis bei (Venkiteshwaran, 2009, Mihara et al., 2005). Die therapeutische Anwendung des neutralisierenden IL-6R Antikörpers führte auch im Patienten zur Unterdrückung der rheumatoiden Arthritis (Nishimoto et al., 2004). Tocilizumab stellt bis heute

einen wichtigen Baustein in der Humantherapie der rheumatoiden Arthritis dar (Specker et al., 2021, Nishimoto et al., 2009a, Nishimoto et al., 2009b, Nishimoto et al., 2007). Andere Mausstudien, die den Effekt von sgp130Fc in Arthritis ähnlichen Modellen beleuchtet haben, konnten zeigen, dass durch die selektive Hemmung des IL-6 *Trans-Signalings* mittels sgp130Fc ebenfalls eine Reduktion der Arthritis ähnlichen Gelenkdestruktionen erreicht werden konnte (Nowell et al., 2009, Nowell et al., 2003). Eine lokale intraartikuläre Applikation von sgp130Fc im Gelenk von Ratten mit Antigen induzierter Arthritis (AIA) konnte bisher nur die Symptome der Hyperalgesie in der akute Phase bessern, eine Progression der Gelenkdestruktion jedoch nicht verhindern (Boettger et al., 2010). Dies lässt vermuten, dass eine spezifische Hemmung des IL-6 *Trans-Signalings* in Bezug auf die Erkrankung der rheumatoiden Arthritis im Menschen, einer Hemmung des *Classic-* und *Trans-Signalings* zumindest gleichwertig ist.

### 1.5. Vom Tiermodell in die Klinik: Hemmung des IL-6 *Trans-Signalings* bei chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen im Patienten?

Morbus Crohn und Colitis Ulcerosa sind progressive, chronisch-entzündliche Darmerkrankungen und eine Beteiligung von IL-6 in der Pathogenese wurde lange vermutet (Suzuki et al., 1990, Mitsuyama et al., 1991).

Im Jahr 2004 wurde erstmals ein Pilotprojekt mit insgesamt 36 Patienten gestartet, die den humanisierten monoklonalen anti-IL-6R Antikörper MRA (heute Tocilizumab) zur Behandlung der aktiven chronisch-entzündlichen Darmerkrankung Morbus Crohn erhielten. Diese Daten zeigten, dass eine zweiwöchige Infusion von 8 mg/kg über 12 Wochen bei 80 % der Patienten zur klinischen Besserung der Symptome, gemessen am CDAI Score (*Crohn's Disease Activity Index*), führte. Das Nebenwirkungsprofil beschränkte sich in 20 % der Patienten, die MRA erhielten auf normale Erkältungssymptome, Übelkeit, Erbrechen, Kopfschmerzen, Schlaflosigkeit und pharyngolaryngeale Schmerzen. Überraschenderweise konnte eine endoskopische und histologische Heilung in den Patienten, die von MRA profitierten, nicht festgestellt werden. Eine Besserung der Messwerte (*Erythrocyte sedimentation rate* (ESR), C-reaktives Protein (CRP), Serum amyloid A (SAA) und Fibrinogen) konnte dennoch beobachtet werden, was darauf hindeutet, dass IL-6 als zentrales Zytokin der Akute Phase Reaktion eine wesentliche Rolle bei Morbus Crohn spielt (Ito et al., 2004).

Es ist bekannt, dass chronisch-entzündliche Darmerkrankungen, wie Colitis Ulcerosa und Morbus Crohn das Risiko für Darmkrebs, im Vergleich zur Normalbevölkerung, erhöhen

(Cleveland and Rubin, 2021, Bernstein et al., 2001). In einem Darmkrebsähnlichen Mausmodell, konnten Grivennikov et al. (2009) eine Beteiligung von IL-6 *Trans-Signaling* am Tumorwachstum nachweisen, weshalb eine Modulation der IL-6 Signalwirkung auch für Kolonkarzinome von Relevanz sein könnte.

Interessanterweise führte der bisherige Einsatz des IL-6R neutralisierenden Antikörpers Tocilizumab in der Behandlung der rheumatoiden Arthritis (Iwasa et al., 2011), der juvenilen idiopathischen Arthritis, der Zöliakie (Borghini et al., 2021), bei COVID-19 Infektionen (Bruce-Hickman et al., 2020) oder in der Behandlung von chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen wie Colitis Ulcerosa (Atreya et al., 2015) in den aufgeführten *Case-report-Studies* nebenbefundlich zum Auftreten bzw. zur Progression gastrointestinaler Ulcera mit und ohne Perforation. Da ein Zusammenhang von Tocilizumab mit dem Auftreten von Darmperforationen nicht ausgeschlossen werden konnte, wurden Patienten die an rheumatoider Arthritis leiden und aus diesem Grund Tocilizumab erhielten beobachtet, und ein Zusammenhang mit gastrointestinalen Perforationen wurde untersucht (Strangfeld et al., 2017). Ausgehend von den Ergebnissen der Studie von Strangfeld et al. (2017) ist das Risiko einer unteren gastrointestinalen Perforation bei Patienten die Tocilizumab erhielten höher, als bei Patienten die csDMARD (*Disease-modifying anti-rheumatic drugs*), TNF-Blocker (Tumornekrosefaktor-Blocker) oder andere *Biologics* erhielten.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass zwar der Einsatz eines anti-IL-6R Antikörpers (Tocilizumab) im Pilotprojekt von 2004 mit 36 Patienten in Bezug auf Darmperforationen als sicher erwiesen hat (Ito et al., 2004), jedoch ein Auftreten von Darmblutungen oder Darmperforationen in oben genannten Fällen nicht abzustreiten ist. Ebenso deutet dies daraufhin, dass eine Hemmung von IL-6 *Classic-* und *Trans-Signaling* im Darm eventuell der alleinigen Hemmung des IL-6 *Trans-Signalings* unterlegen ist.

Atreya et al. zeigten im Jahr 2000, dass in verschiedenen murinen Modellen chronisch-entzündlicher Darmerkrankungen die selektive Hemmung des IL-6 *Trans-Signalings* durch sgp130Fc zu einer starken Abmilderung der Symptomatik führte. Es wurde gezeigt, dass beim IL-6 *Trans-Signaling* der Komplex aus IL-6/sIL-6R membrangebundenes gp130 auf Lamina propria T-Zellen des Darms stimulieren kann. Eine Stimulation dieser T-Zellen führte dazu, dass durch Verhinderung der Apoptose entzündliche Prozesse der Colitis weiter vorangetrieben wurden. Eine Förderung der intestinalen T-Zellapoptose durch den spezifischen *Trans-Signaling* Hemmstoff sgp130Fc führte so zur Besserung der chronischen Darmentzündung in Mäusen (Atreya et al., 2000).

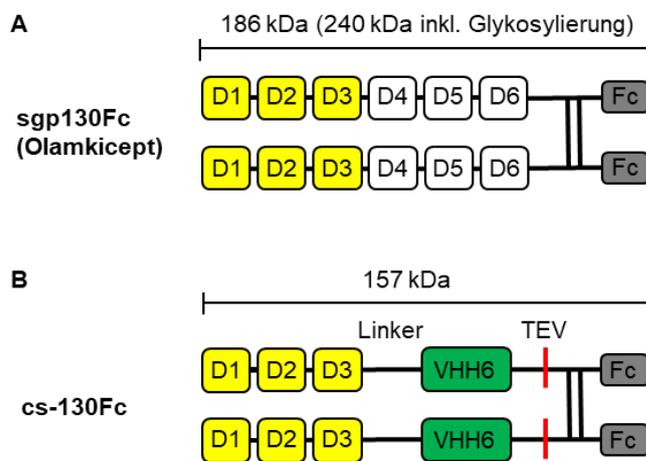
Ausgehend von Mausmodellen, welche die selektive Hemmung des IL-6 *Trans-Signalings* im Fokus sahen, wurde untersucht, ob auch Menschen mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen von einer Therapie mit sgp130Fc profitieren würden.

Eine kürzlich veröffentlichte klinische Phase IIa *open-label* Studie zum Einsatz von sgp130Fc in Patienten mit chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen präsentierte vielversprechende Ergebnisse. So wurden insgesamt 16 Patienten mit Colitis Ulcerosa oder Morbus Crohn mit je 600 mg Olamkicept (sgp130Fc) alle 2 Wochen über insgesamt 12 Wochen behandelt. Dabei wurde insbesondere die Aktivität der Erkrankung mit Hilfe des Mayo-Scores für Colitis Ulcerosa und des CDAI-Score für Morbus Crohn ermittelt und endoskopische Kontrollen in Verbindung mit CRP-Level Erhöhung durchgeführt. Dabei erreichten 44 % der Probanden eine klinische Remission, gemessen am Mayo- und CDAI-Score und drei dieser Patienten ebenfalls eine endoskopische Remission. Ein allgemeines Ansprechen der Therapie in klinischen und endoskopischen Untersuchungen wurde bei 37,5 % der Probanden gefunden. Die klinischen Beobachtungen konnten ebenfalls in Form einer reduzierten STAT3-Phosphorylierung sowie in Form von transkriptionalen Änderungen der entzündeten Mucosa auf Basis molekularer Untersuchungen bestätigt werden. Die eingeschlossenen Probanden wiesen unter der Therapie von Olamkicept in 81 % der Fälle Nebenwirkungen auf. Darunter zeigten Probanden am häufigsten Nebenwirkungen wie Infektionen des oberen und unteren Respirationstraktes, ein Auftreten von Herpes labiales, Erytheme, Ekzeme oder Schwellungen der Haut. Es wurden keine lebensbedrohlichen Nebenwirkungen beobachtet. Ebenso wenig wurden Zeichen einer signifikanten Immunsuppression oder einer intestinalen Perforationen gefunden. Auch wenn der zentrale Startpunkt der Studie nicht die Testung der klinischen Effektivität von Olamkicept im Vordergrund sah, kann auf eine positive Effektivität auf chronisch-entzündliche Darmerkrankungen wie Morbus Crohn oder Colitis Ulcerosa gehofft werden (Schreiber et al., 2021). Die klinische Effektivität von Olamkicept wird derzeit in einer *Multicenter* Phase II Studie, in Form einer randomisierten, doppelt-verblindeten, prospektiven, Placebo-kontrollierten Studie, an Patienten mit moderater bis schwerer aktiven Colitis Ulcerosa getestet und ausgewertet (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT03235752).

## 1.6. Sgp130Fc als Vorläuferprotein für die Entwicklung von cs-130Fc

Anlehnend an bisherige Erkenntnisse zur spezifischen IL-6 *Trans-Signaling* Hemmung, wurden bereits in vorherigen medizinischen Doktorarbeiten auf sgp130Fc aufbauende

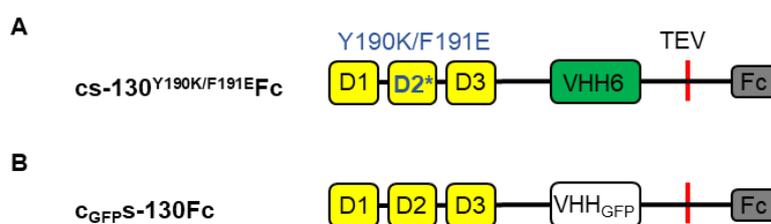
cs-130Fc-Fusionsproteine entwickelt und in Bezug auf ihre Hemmkapazität näher untersucht (Dambietz, 2022, Hansen, 2021).



**Abb. 5: Schematische Darstellung von sgp130Fc und cs-130Fc, modifiziert nach Heise et al. (2021)**

(A) **sgp130Fc**. Zwei Domänen D1-D6 von gp130 sind über Disulfidbrücken miteinander kovalent verbunden und je mit einem Fc-tag versehen. (B) **cs-130Fc**. Zwei Domänen D1-D3 von gp130 wurden über einen Linker mit einem VHH6 verbunden. Eine TEV-Site ermöglicht die Spaltung und Monomerisierung von cs-130Fc. Über Disulfidbrücken sind beide gp130-Moleküle miteinander kovalent verbunden und mit je einem Fc-tag versehen.

Diese neuartigen cs-130-Fusionsproteine bestehen aus den ersten drei zytokinbindenden Domänen D1-D3 von gp130, welche über einen 100 Å großen Linker mit einem VHH6 verbunden und über eine TEV-Site (TEV, *tobacco etch virus*) mit einem Fc-tag fusioniert sind (Heise et al., 2021). Im Vergleich mit sgp130Fc, welches als Dimer ohne Glykosylierungen eine Molekülgröße von 186 kDa aufweist, zeichnet sich das dimere cs-130Fc durch seine etwas geringere Molekülgröße von 157 kDa aus (Heise et al., 2021). Nach Spaltung der TEV-Site zwischen der D3-Region und dem Fc-Fragment lag das cs-130Fc als Monomer vor und konnte dadurch in seinem Molekulargewicht auf 75 kDa reduziert werden (Heise et al., 2021). Um das cs-130Fc und cs-130 hinsichtlich ihrer Effektivität zu testen, wurden zudem cs-130Fc-Kontrollvarianten beschrieben, die hierzu auf unterschiedliche Weise modifiziert worden sind (Heise et al., 2021).



**Abb. 6: Schematische Darstellung von cs-130Fc-Kontrollvarianten**

(A) **cs-130<sup>Y190K/F191E</sup>Fc**. Das cs-130Fc Protein wurde in seiner D2-Domäne durch eine Y190K/F191E-Mutation so verändert, dass diese seine Bindefähigkeit für IL-6 verliert. (B) **cGFPs-130Fc**. Der VHH6 im cs-130Fc wurde durch einen VHH<sub>GFP</sub> ersetzt, welcher den Komplex aus IL-6/sIL-6R nicht erkennen oder stabilisieren kann, sondern an GFP (*green fluorescent protein*) bindet.

Die erste cs-130-Kontrollvariante, cs-130<sup>Y190K/F191E</sup>Fc (**Abb. 6A**), wurde in der D2-Domäne durch eine Y<sup>190</sup>K/F<sup>191</sup>E-Mutation so mutiert, dass das Protein IL-6 über *Site* II nicht mehr binden kann und dadurch an Hemmeffizienz verliert. Die Bindung von IL-6 an die D1-Domäne über *Site* III und die Bindung von VHH6 an den Komplex aus IL-6 und sIL-6R blieben erhalten (Heise et al., 2021). Das zweite cs-130-Kontrollprotein (**Abb. 6B**) wurde c<sub>GFPS</sub>-130Fc genannt. Hierbei erfolgte ein Austausch des IL-6/sIL-6R stabilisierenden VHH6 durch VHH<sub>GFP</sub>. Dieser VHH<sub>GFP</sub> bindet an GFP (*green fluorescent protein*) und ist demnach nicht in der Lage IL-6 oder den sIL-6R bzw. IL-11 oder den sIL-11R zu erkennen oder zu stabilisieren und verliert somit seine stabilisierende Funktion in Bezug auf die IL-6 und IL-11 Signaltransduktion. Die Bindung der Domänen D1-D3 von gp130 zur *Site* II und III von IL-6 und IL-11 blieben hingegen erhalten (Heise et al., 2021).

Diese cs-130-Fusionsproteine wurden bereits charakterisiert und zeigten, bis auf die Kontrollvarianten, eine dem sgp130Fc vergleichbare Aktivität (Heise et al., 2021). Das IL-6 *Trans-Signaling* inhibitorische Protein cs-130Fc stellte die Grundlage für die in dieser Arbeit generierten Fusionsproteine dar.

## 1.7. Einzeldomänenantikörper: Spezifische und stabilisierende Eigenschaften

Der verwendete VHH6 ist ein aus dem Kamel gewonnener Einzeldomänen-Antikörper (*single domain antibody*, sdAB). Dieser ist spezifisch in der Lage ist, den Komplex aus IL-6 und sIL-6R im nanomolaren Bereich zu binden und zu stabilisieren, ohne jedoch an die Einzelkomponenten IL-6 oder sIL-6R zu binden (Adams et al., 2017). Der VHH6 bindet den Bereich zwischen IL-6 und der D1-Region vom IL-6R so, dass *Site* II und III für die Bindung mit gp130 verbleiben. Die VHH-Einzeldomänen-Antikörper (VHH-*Nanobodies*) weisen vielfältige biochemische Eigenschaften auf. Ihre geringe Größe von ca. 15 kDa und gute Löslichkeit sind Gründe für die effektive Gewebegängigkeit, wobei sie zudem umwelt- und thermostabile Eigenschaften aufweisen (Dumoulin et al., 2002, van der Linden et al., 1999). Durch die Nutzung unterschiedlichster Bibliotheken kann eine selektive Auswahl geeigneter VHH-Einzeldomänen-Antikörper erfolgen, die in Bezug auf Affinität und Stabilität geeignet sind, das gewünschte Antigen zu erkennen und mit einer hohen Spezifität zu binden. Dabei zeigen selektive *Nanobodies* Affinitäten im nanomolaren Bereich (Muyldermans, 2021, Monegal et al., 2009, Goldman et al., 2006). Aus diesem Grund werden *Nanobodies* als spezifische Antikörper mit geringer Molekülgröße aufgrund der Eigenschaften in der Forschung für verschiedene Zwecke verwendet.

## 2 AUFGABENSTELLUNG UND ZIELSETZUNG DES PROJEKTS

Ziel dieser Arbeit ist es, das sich bereits in der Phase II befindliche sgp130Fc (Olamkicept), mit eigens hergestellten, *Nanobody*-basierten, sgp130-artigen Fusionsproteinen hinsichtlich der IL-6 *Classic*- und *Trans-Signaling*, sowie der IL-11 *Trans-Signaling* Hemmwirkung zu vergleichen. Dabei soll eine potente Inhibition des IL-6 *Trans-Signalings*, mit reduzierten Auswirkungen auf die Signaltransduktion anderer Zytokine der IL-6 Familie wie z.B. IL-11 zu erreicht werden.

In dieser Arbeit sollen größenminimierte cs-130Fc-Fusionsproteine erstellt, die auf Basis der bisher in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Scheller hergestellten cs-130Fc Fusionsproteine aufgebaut werden. Die cs-130Fc Fusionsproteine sollen, die die relevanten Bindungsstellen von D1-D3 von sgp130 fusioniert an einen VHH6 beinhalten. Der *Nanobody* VHH6 ist ein Lama Einzeldomänenantikörper und ausschließlich in der Lage, den Komplex aus IL-6/sIL-6R zu binden und zu stabilisieren. Um das Protein als Dimer zu charakterisieren, wird über einen Linker ein Fc-Fragment angefügt.

Es ist einerseits geplant die D1-Domäne von cs-130Fc so zu verändern, dass eine Steigerung der Affinität zu IL-6/sIL-6R Komplexen erfolgt und gleichzeitig eine Hemmung des IL-11 *Trans-Signalings* reduziert wird. Andererseits soll eine Strukturänderung des cs-130Fc durch Einfügen einer Spaltstelle zwischen der D1- und D2-Domäne von cs-130Fc vorgenommen werden, um eine weitere Größenreduktion von cs-130Fc zu erreichen, was sehr wahrscheinlich zur Erhöhung der Bioverfügbarkeit führen würde. Die cs-130Fc basierten Fusionsproteine sollen mittels molekularbiologischer Methoden kloniert und mittels proteinbiochemischer Methoden gereinigt werden. In zellbasierten IL-6 *Classic*- und *Trans-Signaling* sowie in IL-11 *Trans-Signaling in vitro* Modellen sollen die cs-130Fc basierten Fusionsproteine in Bezug auf ihre Hemmwirkung getestet werden. Um die intrazellulären Signale wie pSTAT3/STAT3 und pERK/ERK nachzuweisen, werden Stimulationsassays mit bisherigen cs-130Fc-Varianten im Hinblick auf das IL-6 *Trans-Signaling* durchgeführt.

## 3 MATERIAL UND METHODEN

### 3.1. Materialien zur DNA-Präparation

#### 3.1.1. Nährmedien zur Kultivierung prokaryotischer Zellen

Für die Kultivierung prokaryotischer Zellen wurde Lysogeny-Broth (LB)-Medium mit 1 % NaCl, 0,5 % Hefeextrakt und 1 % Trypton verwendet. Um spezifisch Bakterienklone mit Antibiotikaresistenz zu züchten und zu separieren, wurde dem LB-Agarose mit 1 % NaCl, 0,5 % Hefeextrakt, 1 % Trypton, 1,5 % Agar entsprechendes Antibiotikum zugesetzt. Das LB-Medium, sowie die LB-Agarose wurden auf einen pH-Wert von 7,4 abgestimmt und bei 120 °C, 2 bar und 20 min autoklaviert.

#### 3.1.2. Bakterienkulturen

Die generierten DNA-Abschnitte wurden mittels Transformation in chemisch kompetente *Escherichia coli*-Bakterien (*E. coli*) vom Typ *XL1 blue* (Genotyp: recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac [F'proAB lacIqZΔM15 Tn10 (TetR)], Fa. Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) eingebracht.

#### 3.1.3. Plasmide

Die im Folgenden aufgelisteten Plasmide lagen entweder in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Jürgen Scheller vor, wurden von anderen Arbeitsgruppen bereitgestellt oder sind durch eigene Klonierungsarbeit entstanden. DNA-Plasmid Sequenzen, die nicht selbst von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Jürgen Scheller generiert worden sind, sind entsprechend gekennzeichnet. In **Tabelle 2: Oligonukleotide und ihre Nukleotidsequenz** aufgelistete spezifische Oligonukleotide wurden zur Modifikation und Synthese neuer eigens erstellter Plasmide herangezogen.

**Tabelle 1: Plasmide**

Vektor	Insert/ cDNA	Beschreibung
pcDNA3.1		Vektor für transiente und stabile Proteinexpression in Säugetierzellen von Invitrogen (Carlsbad, California USA).
pEGFP	EGFP	Expressionsplasmid, dessen cDNA für das <i>Plasmid Encoding enhanced Green</i>

		<i>Fluorescent Protein</i> codiert (erstellt in der AG Scheller).
pcDNADEST4	sgp130Fc	Expressionsplasmid, dessen cDNA für sgp130Fc codiert (Conaris Research Institut AG, Kiel).
pcDNA3.1	cs-130Fc	Expressionsplasmid, dessen cDNA für die Region D1 bis D3 von sgp130Fc codiert, welche über einen VHH6 und einer TEV- <i>Site</i> mit dem Fc-Teil verbunden wurde (erstellt in AG Scheller).
pcDNA3.1	cs-130 <sup>FLY</sup> Fc	Expressionsplasmid, dessen cDNA für die Region D1 bis D3 von sgp130Fc, sowie einer dreifach punktmultierten D1-Region (T <sup>102</sup> →Y <sup>102</sup> , Q <sup>113</sup> →F <sup>113</sup> , N <sup>114</sup> →L <sup>114</sup> ) codiert. Über einen VHH6 und einer TEV- <i>Site</i> wurde der Fc-Teil verbunden (erstellt durch Denise Heise).
pcDNA3.1	cs-130 <sup>D1TEVD2D3</sup> Fc	Expressionsplasmid, dessen cDNA für die Region D1 bis D3 von sgp130Fc, codiert. Dabei wurde zwischen der D1 und D2 Region eine TEV- <i>Site</i> eingebracht. Über einen VHH6 und einer zweiten TEV- <i>Site</i> wurde der Fc-Teil verbunden (erstellt in AG Scheller).
pcDNA3.1	c <sub>GFPS</sub> -130Fc	Expressionsplasmid, dessen cDNA für die Region D1 bis D3 von sgp130Fc codiert und über einen VHH <sub>GFP</sub> mit dem Fc-Teil verbunden wurde (erstellt in AG Scheller).
pcDNA3.1	cs-130 <sup>Y190K/F191E</sup> Fc	Expressionsplasmid, dessen cDNA für die Region D1 bis D3 von sgp130Fc, sowie einer punktmultierten D2-Region codiert. Über einen VHH6 und einer TEV- <i>Site</i> wurde der Fc-Teil verbunden (erstellt in AG Scheller).

### 3.1.4. Oligonukleotide (Primer)

Mit Hilfe der Oligonukleotide und ihrer synthetisierten Nukleotidsequenz der Firma Eurofins Genomics in Ebersberg konnten verschiedene Mutationen in bereits etablierte Plasmid-DNA Abschnitte eingebracht werden.

**Tabelle 2: Oligonukleotide und ihre Nukleotidsequenz**

<b>Name</b>	<b>Nukleotidsequenz (5'→3')</b>
T4 fw	TAATACGACTCACTATAGGG
PcDNA rv	AGGCACAGTCGAGGCTG
Q <sup>113</sup> F/N <sup>114</sup> L fw	GACCTTCGGCCAGCTGGAATTCCTAGTGTACGGC ATCACAATCATCAGC
Q <sup>113</sup> F/N <sup>114</sup> L rv	GCTGATGATTGTGATGCCGTACACTAGGAATTCC AGCTGGCCGAAGGTC
T <sup>102</sup> Y fw	CAGCCTGAACATCCAGCTGTATTGCAACATCCTG ACCTTCG
T <sup>102</sup> Y rv	CGAAGGTCAGGATGTTGCAATACAGCTGGATGT TCAGGCTG

## 3.2. Materialien zur Generierung rekombinanter Proteine in der Zellkultur

### 3.2.1. Nährmedien zur Kultivierung eukaryotischer Zellen

Zur Kultivierung und experimentellen Analyse der in der Arbeit verwendeten adhärenenten Zellen (s. **Tabelle 4: Eukaryotisch adhärenente Zelllinie zur Proteinexpression**) und Suspensionszellen (s. **Tabelle 8: Eukaryotische Suspensionszellen**) wurde folgendes Medium und deren Zusätze verwendet:

**Tabelle 3: Nährmedien zur Kultivierung eukaryotischer Zellen**

<b>Medium/Lösung</b>	<b>Beschreibung</b>
DMEM -/-	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium, high Glucose (4,5 g/l), with stable Glutamine</i>
DMEM +/+	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium, high Glucose (4,5 g/l), with stable Glutamine +10 % FBS, 1 % Penicillin/Streptomycin</i>

DMEM +/+	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium, high Glucose (4,5 g/l), with stable Glutamine +10 % FBS, 1 % Penicillin/Streptomycin, 0,9 % Geneticin (G418)</i>
Fötale Kälberserum (FCS)	Life Technologies, Darmstadt
<i>Ultra-Low IgG Fetal Bovine Serum</i> (FBS)	Life Technologies GmbH, Darmstadt
Penicilin (6 mg/ml)	Genaxxon Bioscience GmbH, Ulm
Streptomycin (10 mg/ml)	Genaxxon Bioscience GmbH, Ulm
Trypsin/ EDTA	Life Technologies, Darmstadt
TurboFect	<i>Transfection Reagent</i> , Thermo Scientific, Waltham, USA

### 3.2.2. Zelllinien

Für die vorliegende Arbeit wurde eine am Institut etablierte eukaryotische Zelllinie angewandt, die zur Expression von rekombinanten Proteinen dient, welche zuvor mittels Transfektion der Plasmid-DNA eingebracht worden sind.

**Tabelle 4: Eukaryotisch adhärente Zelllinie zur Proteinexpression**

<b>Zelllinie</b>	<b>Transfizierte cDNA</b>	<b>Beschreibung</b>
CHO-K1		Ovarielle Epithelzellen, adhärent, nicht-human ( <i>Cricetulus griseus</i> , chinesischer Hamster), als stabile Zelllinie geeignet (Leibniz-Institut, DMSZ Braunschweig).
CHO-K1	sgp130Fc	Stabile CHO-K1 Zelllinie, die mit der cDNA für sgp130Fc transfiziert wurde, lag in der AG Scheller vor).
CHO-K1	cs-130Fc	Stabile CHO-K1 Zelllinie, die mit der cDNA für cs-130Fc transfiziert wurde (erstellt in der AG Scheller).
CHO-K1	cs-130 <sup>FLY</sup> Fc	Stabile CHO-K1 Zelllinie, die mit der cDNA für cs-130 <sup>FLY</sup> Fc transfiziert wurde (erstellt durch Denise Heise).

CHO-K1	cs-130 <sup>D1TEVD2D3</sup> Fc	Stabile CHO-K1 Zelllinie, die mit der cDNA für cs-130 <sup>D1TEVD2D3</sup> Fc transfiziert wurde (erstellt durch Denise Heise).
CHO-K1	cGFPS-130Fc	Stabile CHO-K1 Zelllinie, die mit der cDNA für cGFPS-130Fc transfiziert wurde (erstellt in der AG Scheller).
CHO-K1	cs-130 <sup>Y190K/F191E</sup> Fc	Stabile CHO-K1 Zelllinie, die mit der cDNA für cs-130 <sup>Y190K/F191E</sup> Fc transfiziert wurde (erstellt in der AG Scheller).

### 3.2.3. Antibiotika

In dieser Arbeit wurde Ampicillin als Antibiotikum zur Selektion in der DNA-Präparation eingesetzt, während Geneticin (G418) als Antibiotikum zur Selektion stabiler Zelllinien in der Zellkultur verwendet wurde.

**Tabelle 5: Verwendete Antibiotika**

Antibiotikum	Konzentration	Arbeitskonzentration	Hersteller
Ampicillin	100 mg/ml	Agarplatten: 200 µg/ml Flüssigmedium: 100 µg/ml	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Geneticin (G418)	50 mg/ml	Flüssigmedium: 0,9 %	Genaxxon, Ulm

## 3.3. Materialien zum Nachweis von DNA und Proteinen

### 3.3.1. Enzyme

Der Einsatz von Enzymen fand im Rahmen der DNA-Plasmidpräparation oder zur Modifikation einzelner Proteine Verwendung. Alle verwendeten Enzyme (Polymerasen, Restriktionsenzyme, Ligasen etc.) entstammen entweder der Firma Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) oder wurden innerhalb der Arbeitsgruppe generiert. Zur Spaltung von Proteinen wurde eine sequenzspezifische Cysteinprotease (siehe Abschnitt 3.9.7) verwendet, die in der Arbeitsgruppe selbst hergestellt wurde.

### 3.3.2. Sodiumdodecylsulfat-Gele

Mit der Sodiumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (*SDS-Page*) werden Proteine entsprechend ihrer Größe voneinander getrennt und mittels *Western Blotting* detektiert. Dabei wurden in dieser Forschungsarbeit ausschließlich 10 %ige SDS-Trenngele mit entsprechendem

Sammelgel gegossen. Die verwendeten Chemikalien sind in **Tabelle 10: Chemikalien und ihre Hersteller** aufgelistet.

### 3.3.3. Größenstandard

Zur Quantifizierung der unterschiedlichen DNA- und Proteinfragmente wurden verschiedene unten aufgelistete Marker verwendet.

**Tabelle 6: Größenstandards und Marker**

Marker	Verwendungszweck	Hersteller
<i>GeneRuler Express DNA Ladder, ready-to-use</i>	DNA Größenstandard 100 - 5000 bp	Thermo Scientific, St. LeonRot
<i>PageRuler™ Prestained Protein Ladder</i>	Protein Größenstandard 10 - 180 kDa	Thermo Scientific, St. LeonRot

### 3.3.4. Antikörper

Alle in der **Tabelle 7: Antikörper und ihre Konzentration** genannten Antikörper wurden im Rahmen des *Western Blotting* verwendet. Durch die spezifischen Antikörper können einzelne Bestandteile eines Proteins nachgewiesen werden. In dieser Forschungsarbeit sind u.a. Antikörper zum Nachweis der intrazellulären Signaltransduktion von Bedeutung.

**Tabelle 7: Antikörper und ihre Konzentration**

Antikörper	Beschreibung
anti-Fc-POD („31318“)	Humaner IgG Antikörper aus dem Kaninchen, polyklonal, Konzentration des Stocks: 0,6 µg/µl, WB-Verdünnung: 1:2000, 5% BSA in TBS-T, Fa. Thermo Scientific, Darmstadt
anti-hIL-6Rα („4-11“)	Humaner IgG Antikörper aus der Maus, monoklonal, Konzentration des Stocks: 1 µg/µl, WB-Verdünnung: 1:1000, TBS-T-Milchpulver, Herstellung beschrieben in (Chalaris, Rabe <i>et al</i> 2007)
anti-P-STAT3 („Tyr705“)	Humaner IgG Antikörper aus dem Kaninchen, monoklonal, Konzentration des Stocks: 0,2 µg/µl, WB-Verdünnung: 1:1000, 5% BSA in TBS-T, Cell Signaling, Frankfurt a.M.
anti-STAT3 („124H6“)	Humaner IgG Antikörper aus der Maus, monoklonal, Konzentration des Stocks: 0,2 µg/µl, WB-Verdünnung: 1:1000,

	TBS-T-Milchpulver, Cell Signaling, Frankfurt a.M.
<i>anti-Mouse</i> -POD (Sekundär-AK) („A28174“)	Humaner IgG (H+L) Antikörper aus der Ziege, polyklonal, Konzentration des Stocks: 0,6 µg/µl, WB-Verdünnung:1:5000, TBS-T-Milchpulver, Fa. Thermo Scientific, Darmstadt
<i>anti-Rabbit</i> -POD (Sekundär-AK) („A27033“)	Humaner IgG (H+L) Antikörper aus der Ziege, polyklonal, Konzentration des Stocks: 0,6 µg/µl, WB-Verdünnung:1:5000, TBS-T-Milchpulver, Fa. Thermo Scientific, Darmstadt

### 3.4. Materialien zur Analyse von rekombinanten Proteinen im Zellexperiment

#### 3.4.1. Zelllinien

Mit Hilfe der im folgenden aufgelisteten Zelllinien wurde die Funktion der selbst hergestellten Inhibitoren und Proteine im Zellexperiment getestet, sowie die Signaltransduktion der Zelle näher analysiert.

**Tabelle 8: Eukaryotische Suspensionszellen**

<b>Zelllinie</b>	<b>Beschreibung</b>	<b>Herkunft</b>
Ba/F3-gp130	Prä-B-Lymphozyt, nicht-adhärent, murin stabile Transduktion mit gp130, Stimulation mit IL-6 und sIL-6R oder Hyperzytokinen (u.a. Hyper- IL-6) möglich	AG Scheller, Düsseldorf
Ba/F3-gp130-IL-6R	Prä-B-Lymphozyt, nicht-adhärent, murin, stabile Transduktion mit gp130 und humanen IL-6R, Stimulation mit IL-6 oder Hyperzytokinen möglich	AG Scheller, Düsseldorf

#### 3.4.2. Rekombinante Proteine

Zur Kultivierung, Stimulation und Inhibition von Zellen wurden verschiedene unten aufgeführte rekombinante Zytokine verwendet, die einerseits zur Proliferation der in **Tabelle 8: Eukaryotische Suspensionszellen** aufgeführten Ba/F3-Suspensionszellen führen oder zur Inhibition der Zellen beitragen.

**Tabelle 9: Verwendete rekombinante Proteine**

<b>Protein</b>	<b>Beschreibung/ Herkunft</b>
IL-6	Conaris Research Institute AG, Kiel

sIL-6R	Conaris Research Institute AG, Kiel
IL-11	Conaris Research Institute AG, Kiel
sIL-11R	Bio-Techne GmbH, Wiesbaden
Tocilizumab (RoActemra®)	Fa. Roche, Grenzach-Wyhlen
sgp130 <sup>102Y/Q113F/N114L</sup> Fc (sgp130 <sup>FLY</sup> Fc)	Conaris Research Institute AG, Kiel
VHH6	Variable Domäne eines Antikörpers, ein sog. „ <i>single-domain-Antibody</i> “ (Adams et al., 2017). Dieser Ein-Domänen-Antikörper stabilisiert den Komplex aus IL-6 und gp180 (sIL-6R). Hergestellt in AG Scheller.
GFP <sub>VHH</sub>	Variable Domäne eines Antikörpers, ein sog. „ <i>single-domain-Antibody</i> “, welcher mit einem <i>green fluorescent protein</i> gekoppelt ist. Hergestellt in AG Scheller.
TEV-Protease	Rekombinant hergestellte Protease, welche in der Lage ist, die Aminosäuresequenz ENLYFQ mit hoher Effizienz zu erkennen und eine Spaltung zwischen Q und G, S, A, M, C, oder H durchzuführen. Hergestellt in AG Scheller.

### 3.5. Chemikalien

Unterschiedliche Chemikalien wurden zu experimentellen Zwecken genutzt. Diese sind im Folgenden aufgelistet:

**Tabelle 10: Chemikalien und ihre Hersteller**

<b>Chemikalie</b>	<b>Hersteller</b>
Acrylamid-Mix 30%	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Agar	AppliChem GmbH, Darmstadt
Agarose	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf
Albumin Fraktion V (8076.3)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat (APS)	Merck KGaA, Darmstadt
Ampicillin	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe

---

<i>Bovine Serum Albumin A7030</i>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Brillant-Blau R250	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
$\beta$ -Mercaptoethanol	AppliChem GmbH, Darmstadt
Citronensäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
<i>Complete Protease Inhibitor Tabletes</i>	Roche Diagnostics, Mannheim
<i>Concanavalin-A-Sepharose</i>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
dATP	Thermo Scientific, St. LeonRot
dCTP	Thermo Scientific, St. LeonRot
dGTP	Thermo Scientific, St. LeonRot
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck KGaA, Darmstadt
dTTP	Thermo Scientific, St. LeonRot
<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i> (DMEM)	Thermo Scientific, St. LeonRot
Essigsäure	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Ethanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Ethidiumbromid	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Ethylenglycol-bis(aminoethylether)- N,N,N',N'-tetraessigsäure (EGTA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
HBS-P <sup>+</sup> Puffer	GE Healthcare, München
Geneticin (G418)	Genaxxon, Ulm, Deutschland
Gibco® <i>fetal bovine serum</i> (FBS)	Thermo Scientific, St. LeonRot
Glycerol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe

---

Glycin	Merck KGaA, Darmstadt
GW280264X (GW)	Glaxo Smith Kline, Stevenage, UK
Immobilon Western HRP Substrat	Merck KGaA, Darmstadt
Isopropanol	AppliChem GmbH, Darmstadt
Kaliumacetat	Merck KGaA, Darmstadt
Kaliumchlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Kaliumdihydrogenphosphat	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Kaliumhydrogenphosphat	Merck KGaA, Darmstadt
LB-Medium	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
<i>Loading-Dye Solution (6x)</i>	Thermo Scientific, St. LeonRot
Magermilchpulver	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Methanol	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumchlorid	AppliChem GmbH, Darmstadt
Natriumcitrat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Natriumhydroxid	Merck KGaA, Darmstadt
Orange G	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Penicillin	Genaxxon, Ulm
<i>Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA)</i>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Peroxidase (POD) Substrat	Roche Holding GmbH, Mannheim
Protein A Agarose	Roche Holding GmbH, Mannheim
RNase A	QIAGEN, Hilden
<i>Roswell Park Memorial Institute Medium</i> 1640 (RPMI)	Thermo Scientific, St. LeonRot
Schwefelsäure	AppliChem GmbH, Darmstadt

Streptomycin	Genaxxon, Ulm
Succrose	Merck KGaA, Darmstadt
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich, München
Tris	Bethesda Research Laboratories, USA
Triton X-100	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
<i>Trypan Blue Dye</i> , 0,4 %	BioRad Laboratories GmbH, München
Trypsin/EDTA (10 x)	Life Technologies, Darmstadt
TurboFect <sup>TM</sup> Transfektionsreagenz	Thermo Scientific, St. LeonRot
Tween-20	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

### 3.6. Puffer und Lösungen

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

**Tabelle 11: Puffer/ Lösungen und ihre Zusammensetzung**

<b>Puffer/Lösung</b>	<b>Zusammensetzung</b>	
Ammoniumperoxidsulfat (APS)- Lösung	10 % (m/v)	APS
<i>Blocking</i> Puffer für <i>Western</i>	150 mM	NaCl
<i>Blotting</i>	10 mM	Tris-HCl, pH 8,0
	0,05 %	Tween-20
	5 %	Milchtrockenpulver
Bindungspuffer für die ÄKTA	pH 7,2 - 7,4	PBS
<i>Destaining</i> Lösung für Coomassie Gele	700 ml	H <sub>2</sub> O
	200 ml	Ethanol
	100 ml	Essigsäure
DNA-Ladepuffer (Agarosegele)	20 %	Glycerol in TBE-Puffer
	0,1 %	Bromphenolblau
dNTPs	10mM	dATP
	10 mM	dCTP

	10 mM	dGTP
	10 mM	dTTP
Elutionspuffer I für ÄKTA	50 mM	Citratpuffer, pH 3,25
Elutionspuffer II für ÄKTA	50 mM	Citratpuffer, pH 5,5
Lämmli-puffer (5x)	125 mM	Tris-HCl pH 6,8
	10 %	SDS
	20 %	Glycerol in TBE-Puffer
	5 %	$\beta$ -Mercaptoethanol
	1 Spatelspitze	Bromphenolblau
<i>Orange-G-Loading Dye Buffer</i>	30 % (v/v)	Glycerol
(6x)	50 mM	EDTA
	0,05 % (v/v)	Tween-20
		in PBS
PBS ( <i>Phosphate Buffered Saline</i> )	150 mM	NaCl
	8 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , pH 7,4
	1,7 mM	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , pH 7,4
P-STAT3-Lysepuffer / <i>Mild Lysis Buffer</i>	50 mM	Tris-HCl, pH 7,4
(MLB)	150 mM	NaCl
	2 mM	EDTA
	1 %	Triton-X-100
	1 %	NP-40
	1 mM	Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>
	1 mM	NaF
	1 Tabl.	<i>complete</i> Protease-Inhibitor
SDS- <i>Page</i> Sammelgelpuffer	30,3 g	Tris-HCl, pH 6,8
	2 g	SDS
SDS- <i>Page</i> Trenngelpuffer	90,8 g	Tris-HCl, pH 8,4
	2 g	SDS
SDS- <i>Page</i> Laufpuffer	25 mM	Tris-HCl, pH 8,3
	192 mM	Glycin
	0,1 %	SDS
SDS- <i>Page</i> Transferpuffer (WB)	25,0 mM	Tris
	0,1 %	SDS

	20 %	Methanol
	192 mM	Glycin
SDS- <i>Page Stripping</i> -Puffer (WB)	62,5 mM	Tris-HCl, pH 6,8
	2 %	SDS
	0,1 %	$\beta$ -Mercaptoethanol
<i>Solution 1</i> (S1)	50 mM	Glucose
(Mini-Präparation)	25 mM	Tris-HCl, pH 8
	10 mM	EDTA, pH 8
	100 nM	RNase
<i>Solution 2</i> (S2)	0,2 M	NaOH
(Mini-Präparation)	1 %	SDS
<i>Solution 3</i> (S3)	60 ml 5 M	Kaliumacetat
(Mini-Präparation)	11,5 ml	Essigsäure
	28,5 ml	Wasser
<i>Staining-Lösung</i>	2 g	<i>Coomassie Brilliant Blue</i>
(Coomassie-Gele)		R-250
	400 ml	Methanol
	100 ml	Essigsäure
	500 ml	H <sub>2</sub> O
TAE-Puffer (50x)	2 mM	Tris
(Agarosegele)	100 mM	EDTA
	1 M	Essigsäure
TBS ( <i>Tris Buffered Saline</i> )	150 mM	NaCl
	10 mM	Tris-HCl, pH 8
TBS-T	150 mM	NaCl
	10 mM	Tris-HCl, pH 8
	0,05 %	Tween 20
Trypsin/EDTA-Lösung	10 % (v/v)	Trypsin/EDTA (10x) in PBS

### 3.7. Allgemeine Verbrauchsmaterialien und Geräte

#### 3.7.1. Geräte

Für die Durchführung verschiedener Experimente und die alltägliche Laborarbeit wurden die in **Tabelle 12: Angewandte Geräte und ihre Hersteller** verwendeten Geräte genutzt.

Tabelle 12: Angewandte Geräte und ihre Hersteller

<b>Gerät</b>	<b>Hersteller</b>
ÄKTA™ Start	GE Healthcare, Uppsala, Schweden
Absaugpumpe für die Sterilbank	HLC BioTech, Göttingen
ÄKTA <i>purifier</i>	Amersham pharmacia biotech, heute GE Healthcare, Solingen
Analysewaage Precisa 100M-300C	Hartenstein GmbH, Würzburg
Autoklav Laboklav 25	SHP Steriltechnik AG, Detzel Schloss/Satuelle
<i>Biacore X100 Plus Instruments</i>	GE Healthcare, Freiburg
Zentrifuge 5417R	Eppendorf GmbH, Hamburg
Zentrifuge 5424	Eppendorf GmbH, Hamburg
Zentrifuge 5810R	Eppendorf GmbH, Hamburg
<i>Centrifuge Bottle Assembly Polypropylene</i> 500 ml	Beckman Coulter®, Brea, Kalifornien, Vereinigte Staaten
CO <sub>2</sub> -Inkubator 150 (E2)	Binder GmbH, Tuttlingen
ECL <i>ChemoCam Imager</i>	INTAS Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen
Fluorometer <i>Infinite® M200 PRO reader</i>	Tecan GmbH, Maennedorf, Schweiz
Gefrierschrank <i>comfort</i>	Liebherr GmbH, Rostock
Flaschenroller	Integra biosciences GmbH, Biebertal
Gelelektrophoresekammer	BioRad Laboratories GmbH, München
Heizbad Julabo sw21	Julabo GmbH, Seelbach
<i>Heraeus Function Line T6 Trockenschrank</i>	Thermo Scientific, St. LeonRot
HP Scanjet G4010 Scanner	HP Inc., Palo Alto, Kalifornien, USA
Kühlschrank	Liebherr GmbH, Rostock
Magnetrührer mit Heizung	Heidolph Instruments GmbH, Schwabach
Mikropipetten Research®	Eppendorf GmbH, Hamburg
Mikrowelle Optiquick	Moulinex (Krups), Offenbach

Mini-PROTEAN Tetra System	BioRad Laboratories GmbH, München
Peqstar 2x Twin Block Thermal Cycler	PEQLAB Ltd, Crableck Lane, UK
pH-Meter	Sartorius, Ratingen
Pipetus®-Akku	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Primovort	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Göttingen
Rollerflasche Zellkultur 2300ml	Greinerbio-one, Solingen
Scanlaf Mars <i>Safety Class 2</i>	Weiss Labortechnik GmbH, Heroldsberg
Schüttler	INFORS AG, Schweiz, Bottmingen
Spannungsquelle Power Pac 300	BioRad Laboratories GmbH, Hercules, USA
Spektrophotometer NanoDrop 2000	Thermo Scientific, St. LeonRot
<i>Stuart Roller Mixer SRT 9D</i>	Bibby Scientific, Staffordshire, England
<i>TC10 Automated Cell Counter</i>	BioRad Laboratories GmbH, München
Thermomixer® Komfort	Eppendorf GmbH, Hamburg
<i>Thermal Cycler</i>	Peqlab, VWR, Erlangen
Trans-Blot® Turbo™	BioRad Laboratories GmbH, München
UV-Tisch	Bio-Budget Technologies GmbH
Vortex Mixer	IKA Labortechnik GmbH, Staufen

### 3.7.2. Verbrauchsmaterialien

**Tabelle 13: Verbrauchsmaterialien und ihre Hersteller** zeigt genutzte Verbrauchsmaterialien, die kontinuierlich Verwendung fanden.

**Tabelle 13: Verbrauchsmaterialien und ihre Hersteller**

<b>Name</b>	<b>Hersteller</b>
6-well Platte	Cyto-One, USA-Scientific, Waltham, USA
12-well Platte	Cyto-one, USA-Scientific, Waltham, USA
96-well Platte	Cyto-One, USA-Scientific, Waltham, USA
10-cm Schale, beschichtet TPP	Trasadingen, Schweiz
10-cm Schale	Greiner bio-one, Solingen
96-well Platte BSA	Greiner bio-one, Solingen
Amicon Ultra, 15 ml Filter	Merck, Darmstadt

<i>Bottle top</i> Filter Nalgene™	Thermo Scientific, Waltham, USA
<i>Rapid-Flow</i> ™, 0,45 µm	
<i>Cryotubes</i>	Thermo Scientific, Darmstadt
Einmal-Pipettenspitzen	Starlab, Hamburg
Eppendorf-Reaktionsgefäße	Eppendorf AG, Hamburg
Falcon-Röhrchen	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Filter 0,45 µm, Polyvinylidenfluorid	Roth, Karlsruhe
Kombitips	Eppendorf, Hamburg
NAP-Säule	GE Healthcare, München
Nitrilhandschuhe NitraTex	Ansell Healthcare, Brüssel
Pasteurpipetten	BRAND GmbH, Wertheim
PCR-Reaktionsgefäße	Starlab, Hamburg
Protein-A-Säulen	GE Healthcare, Solingen
PVDF-Membranen	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Omnifix Spritzen	Braun, Meisungen
Sterilpipetten	Corning, Corning, USA
Superdex 200 Increase 10/300 GL	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
<i>Whatman</i> -Cellulose- Papier	VWR Internat., Darmstadt
Zählkammern	BioRad Techn., München
Zellkulturflaschen	Greiner Bio-One, Frickenhausen

### 3.7.3. Kits

In **Tabelle 14** sind Kits aufgeführt, die gebrauchsfertig eingesetzt werden konnten.

**Tabelle 14: Kits und ihre Hersteller**

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

### 3.8. Molekularbiologische Methoden

#### 3.8.1. Bakterienkultivierung

Zur Kultivierung von Bakterien wurden die Bakterien mit LB-Medium oder LB-Agarplatten bei 37°C inkubiert. Um entsprechenden Selektionsdruck auf die Bakterien auszuüben, wurde dem LB-Medium bzw. den LB-Agarplatten 100 µg/ml Ampicillin zugesetzt. Flüssigkulturen wurden auf einem Thermoschüttler bei 900 rpm kultiviert, während die Kultivierung der LB-Agarplatten im Inkubator erfolgte.

#### 3.8.2. Transformation chemisch-kompetenter *E.coli*-Bakterien

Für die Transformation wurden 30 µl chemisch kompetente *Escherichia coli* XL-1 blue für 5 min auf Eis aufgetaut. Die Bakterien wurden dann mit 10 µg einer Plasmid-DNA oder mit 20 µl eines Ligationsansatzes versetzt. Es folgte eine Inkubation für 5 min auf Eis, ein anschließender Hitzeschock bei 42 °C für 60 s, sowie eine weitere Inkubation auf Eis für 5 min. Zur Vermehrung der DNA wurde 500 µl LB Medium (ohne Antibiotikum) zugegeben und das Gemisch bei 37 °C und 1400 rpm im Thermoschüttler geschüttelt. Anschließend wurden 50-500 µl der Bakteriensuspension auf Agarplatten, mit entsprechendem Antibiotikum ausgestrichen und diese bei 37 °C über Nacht inkubiert.

#### 3.8.3. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zur Amplifikation spezifischer DNA-Sequenzen wurde die *Phusion high fidelity* Polymerase verwendet, da diese über eine *proofreading* Funktion verfügt. Hierbei wurde ein Thermocycler (Peqlab, VWR, Erlangen) verwendet. Bei der *site-directed mutagenesis*-PCR wurden in zwei aufeinander folgenden PCR Reaktionen ausgewählte Nukleotide punktmutiert. Nach Abschluss der ersten *site-directed mutagenesis*-PCR wurde das Produkt der ersten PCR-Reaktion verwendet und erneut mit den in **Tabelle 2** verwendeten Oligonukleotide mutiert. Für jeden PCR-Ansatz ergaben sich unterschiedlich eingesetzte Oligonukleotide, die verwendet wurden:

Template	100 ng Plasmid
5' Oligonukleotid	10 µM
3' Oligonukleotid	10 µM
dNTP-Mix	10 mM
10 x HF Puffer	5 µl
<i>Phusion</i> Polymerase	1 U
dH <sub>2</sub> O	Σ 50 µl

Für die Polymerase-Kettenreaktion wurde folgendes Programm verwendet:

Initiale Denaturierung	98 °C	4 min		
Denaturierung	98 °C	1 min	}	15x
<i>Annaeling</i>	55 °C	1 min		
Elongation	72 °C	15-30 s/kb		
Finale Elongation	72°C	12 min		
Aufbewahrung	4°C	∞		

Die Elongationszeit wurde je nach Länge der DNA-Sequenzen variiert.

#### 3.8.4. Ligation von DNA-Fragmenten

Zur Ligation von *sticky-end*-Klonierungen wurde das geschnittene Insert mit dem geschnittenen und dephosphorylierten Zielvektor in einem Verhältnis von 3:1 und 5:1 inkubiert. Dabei wurden Insert und Vektor mit 1 U T4 DNA-Ligase, sowie entsprechendem Reaktionspuffer auf ein Gesamtvolumen von 20 µl mit dH<sub>2</sub>O aufgefüllt und bei Raumtemperatur für 1 h inkubiert. Bei einer *blunt-end* Ligation erfolgte die Inkubation von Insert und Vektor mit 2 U T4 DNA-Ligase, Ligase Puffer und einer 50 %igen (m/v) PEG4000-Lösung über Nacht bei 4 °C.

#### 3.8.5. Agarosegelelektrophorese

Mit Hilfe der Agarosegelelektrophorese erfolgte die Trennung und Größenbestimmung von DNA-Fragmenten (BioRad Laboratories GmbH, München). Zur DNA-Analyse wurden 1 %ige Agarosegele verwendet. Dabei wurde die Agarose mit Tris-Acetat-EDTA Puffer (TAE-Puffer) auf die gewünschte Menge aufgefüllt und erhitzt. Anschließend wurde diese in einen Schlitten, mit zusätzlichem Kamm für die Proben gegeben und mit 0,001 % *HD green* versetzt. Nach der Abkühlung und Erstarrung der Agarose wurde der Kamm entfernt und der Schlitten in eine Elektrophoresekammer überführt. In dieser erfolgte die Beladung der Proben, welche zuvor mit DNA-Ladepuffer (6 x) versetzt worden sind. Um die DNA-Fragmente ihrer Größe nach einordnen zu können, wurde entweder der DNA-Marker *Gene Ruler Express* oder *Gene Ruler* 1 kb verwendet. Die Trennung der DNA-Fragmente wurde bei 120 V durchgeführt. Zur

Dokumentation des Agarosegels wurde das Gel mittels *INTAS iX Imager* (INTAS Science Imaging Instruments) analysiert.

#### 3.8.6. Restriktionsanalyse der Plasmid-DNA

Eine enzymatische Spaltung und Fragmentierung von Plasmid-DNA im Rahmen der Klonierungen wurde mittels Restriktionsenzymen vorgenommen. Dabei wurde 10 µg Plasmid-DNA und 10 U des ausgewählten Restriktionsenzym mit entsprechendem Reaktionspuffer verwendet. Das Reaktionsgemisch wurde auf ein Gesamtvolumen von 50 µl mit dH<sub>2</sub>O aufgefüllt und bei 37 °C über Nacht inkubiert, so dass eine Spaltung der DNA erfolgen konnte. Am Folgetag konnte die gespaltene Plasmid-DNA elektrophoretisch auf einem Agarosegel getrennt und die DNA-Fragmente isoliert werden. Im Rahmen analytischer Arbeiten wurde 1 µg Plasmid-DNA in einem Gesamtvolumen von 20 µl verwendet und für mindestens 2 h oder über Nacht bei 37 °C inkubiert. Bei einer Doppelspaltung kam es zur Verwendung von zwei Restriktionsenzymen. Hierbei wurde der vom Hersteller empfohlene Puffer verwendet, bei dem für beide die höchste Aktivität vorlag.

#### 3.8.7. Dephosphorylierung von DNA

Um einer Relegierung des 5' und 3' Endes der linearisierten und bereits geschnittenen Plasmid-DNA entgegenzuwirken, wurde nach der Inkubation der Endonukleasen eine Inkubation mit 1 U Fast-AP vorgenommen. Für eine effektive Dephosphorylierung wurde das Reaktionsgemisch bei 37 °C für 30 min inkubiert und durch die Zugabe von Ladepuffer (6 x) gestoppt. Im Anschluss fanden eine elektrophoretische Trennung und Extraktion der DNA-Fragmente statt.

#### 3.8.8. Extraktion der DNA aus Agarosegelen

Im Anschluss an die enzymatische Spaltung der Plasmid-DNA konnten die DNA-Fragmente entsprechend der elektrophoretischen Trennung mit Hilfe eines UV-Tisches (Bio-Budget Technologies GmbH) bei einer Wellenlänge von 365 nm visualisiert werden. Mit einem Skalpell wurden die Fragmente aus dem Agarosegel geschnitten und in 2 ml große Reaktionsgefäße überführt. Um die im Gel enthaltene DNA zu isolieren, wurde das Kit *NucleoSpin® Gel and PCR Cleanup* (Machery-Nagel GmbH & Co. KG, Düren) verwendet.

### 3.8.9. Bestimmung der DNA-Konzentrationen mittels UV-Spektroskopie

Eine Messung der DNA-Konzentration wurde spektrometrisch durch den NanoDrop 2000 (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen) ermittelt. Das Absorptionsverhältnis von A<sub>260</sub>/ 280 und A<sub>230</sub>/ 260 gab hierbei die Reinheit der DNA an.

### 3.8.10. Midi-Präparation der Plasmid-DNA

Um größere Mengen an Plasmid-DNA zu isolieren wurde 100 ml LB-Medium wahlweise mit 100 µl der Mini-Präparation oder mit einer Einzelkolonie einer LB-Agarplatte angeimpft. Um einen gewünschten Selektionsdruck auf die Bakterien auszuüben, wurde dem LB-Medium Ampicillin als Antibiotikum zugesetzt und die Flüssigkultur über Nacht bei 37 °C im Schüttler (INFORS AG Schweiz) inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurde die Übernachtskultur mit 4.000 x g bei 4 °C für 15 Minuten zentrifugiert. Eine Reinigung der in den Pellets enthaltenen Plasmide erfolgte durch das Kit NucleoBond Xtra Midi (Machery-Nagel GmbH & Co. KG Düren) entsprechend dem Herstellerprotoll. Eine Messung der Konzentration des gereinigten Plasmids erfolgte mittels NanoDrop.

### 3.8.11. Mini-Präparation von Plasmid-DNA

Um kleinere Mengen an Plasmid-DNA zu isolieren, wurde 2 ml LB-Medium mit einer Einzelkolonie einer LB-Agarplatte angeimpft. Hierzu wurde das LB-Medium entsprechend mit Ampicillin als Antibiotikum versetzt. Die Inkubation der Kultur wurde bei 1400 rpm über Nacht bei 37 °C in einem Schüttler durchgeführt. Am darauffolgenden Tag wurde die Übernachtskultur bei 13000 rpm bei 4 °C für 5 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in 100 µl S1-Puffer resuspendiert und anschließend mit 200 µl S2-Puffer lysiert. Die Probe wurde anschließend fünf bis sechs Mal invertiert und es wurde 150 µl eiskalter S3-Puffer zugegeben. Es folgte eine Inkubation der Probe für 10 min auf Eis mit darauffolgender Zentrifugation bei 13000 rpm für 10 min und 4 °C. Der Überstand der Probe wurde in ein neues 2 ml großes Reaktionsgefäß überführt und mit 900 µl eiskaltem 100 %igen Ethanol versetzt sowie gevortext. Es fand eine weitere Zentrifugation bei 13000 rpm für 15 min und 4 °C und ein Verwerfen des Überstandes statt. Um das DNA-Zellpellet zu waschen, wurde 500 µl des 70 %igen Ethanols verwendet und die Probe bei 13000 rpm für 5 min und 4 °C zentrifugiert. Erneut wurde der Überstand verworfen und das DNA-Pellet bei 37 °C getrocknet. Zum Abschluss wurde das Pellet mit 30 µl destilliertem Wasser versetzt und resuspendiert. Eine Messung der DNA-Konzentration erfolgte mit Hilfe des NanoDrop durch Messung der Absorption bei 260 nm.

### 3.8.12. Sequenzierung von Plasmid-DNA

Zur Kontrolle der hergestellten Plasmid-DNA fand mittels Sanger-Sequenzierung der Firma SeqLab-Sequence Laboratories Göttingen GmbH eine Überprüfung ausgewählter Plasmide statt.

## 3.9. Proteinbiochemische Methoden

### 3.9.1. Zellyse

Zellen wurden nach dem Stimulationsassay von der 6-well Kulturschale in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und bei 1000 x g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet mit einer adäquaten Menge P-STAT Lysepuffer (100-200 µl) resuspendiert und für 2 h bei 4 °C gerollt. Anschließend wurden die Zellen bei 13000 rpm und 4 °C zentrifugiert und der Überstand in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, um mittels BCA-Assay den Proteingehalt zu messen.

### 3.9.2. BCA Protein Assay Kit zur Bestimmung des Proteingehalts

Um den Proteingehalt einer Probe nach Lyse der Zellen zu messen, ist der *Bicinchoninic acid assay* (BCA assay) angewandt worden. Dabei wurde gemäß Herstellerangaben das *BCA Protein Assay Kit* von Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) verwendet. In einem 1:20 Verhältnis wurden die Proben mit dH<sub>2</sub>O verdünnt und je 25 µl/Well in eine 96-well Platte pipettiert. Alle Proben wurden doppelt bestimmt. BSA Proben mit spezifischer Konzentration sind als definierten Standard für die Einordnung des Proteingehalts der Zelllysate herangezogen worden. Nach Zugabe der Reagenzien A und B, die in einem 50:1 Verhältnis den Proben zugegeben wurden, erfolgte die Inkubation bei 37 °C für 30 min. Mit Hilfe des *Infinite M200 PRO Microplate Reader* von TECAN (Maennedorf, Schweiz) konnte im Anschluss eine Absorption bei 562 nm gemessen werden und der Gesamtproteingehalt der Zelllysate durch die definierte BSA-Standardgerade bestimmt werden.

### 3.9.3. Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)

Proteine können entsprechend ihres Molekulargewichtes mittels *SDS-Page* der Größe nach voneinander getrennt werden. Dabei wurden zu Beginn alle Proben mit 5-fach Lämmli versetzt und bei 95 °C für 10 min erhitzt. Es wurden 50 µg Zelllysate oder 20 µl Zellkulturüberstand mit entsprechender Menge an 5-fach Lämmli-Puffer versetzt und in selbstgegossene Gele mit einer Dicke von 1,5 mm und 10er Probetaschen gegeben. Alle verwendeten SDS-Gele wurden mit

circa 1 cm hohen Sammelgel und einem 6 cm hohen und 10 %igen Trenngel versehen. Eine Größentrennung der Proteine erfolgte durch das Mini-PROTEAN Tetra System bei einer Spannung von 100 - 120 V und einem konstanten Amperewert. Als Größenstandard wurde der Protein Marker *PageRuler Prestained Protein Ladder* verwendet.

#### 3.9.4. Western Blot

Um die auf dem SDS-Gel voneinander getrennten Proteine mittels Western Blot nachzuweisen, werden die Proteine auf eine PVDF-Membran (Carl Roth GmbH & Co, KG, Karlsruhe) transferiert. Dazu wurde die PVDF-Membran für eine Minute in Methanol aktiviert und mit dH<sub>2</sub>O, sowie Transferpuffer für je eine Minute gewaschen. Es wurden insgesamt 6 Whatman-Papiere in Transfer-Puffer getränkt und anschließend in die *Blotting* Kassette gelegt. Nacheinander wurden dann drei Whatman-Papiere, die aktivierte PVDF-Membran, das SDS-Gel und die restlichen drei Whatman-Papiere geschichtet und Luftblasen ausgestrichen. Der elektrophoretische Transfer, auch *Blotting* genannt, wurde bei einer konstanten Spannung von 25 V, bei 1 A für 40 min durchgeführt. Im Anschluss folgte die Überführung der PVDF-Membran in ein 50 ml Reaktionsgefäß. Der *Blocking*-Prozess wurde mit 10 ml 5 %igem Milchpulver, gelöst in 10 ml TBS-T, für 2 h bei Raumtemperatur durchgeführt. Eine Inkubation der PVDF-Membran mit Primärantikörpern erfolgte nach dreimaligem Waschen der Membran mit TBS-T (3 x 10 min) über Nacht bei 4 °C. Am darauffolgenden Tag wurde der Primärantikörper entfernt und die Membran erneut dreimal mit TBS-T für 10 min gewaschen. War nur ein Antikörper notwendig (siehe Abschnitt 3.3.4 anti-Fc-POD), wurde nach Entfernung des Antikörpers zweimal mit TBS-T und einmal mit TBS für je 10 min gewaschen und die Proteine mittels Immobilon Western Blot Detektions-Kit am INTAS Chemo *Cam Imager* detektiert. Bei Verwendung eines Sekundärantikörpers wurde dieser für 1 h bei RT oder über Nacht bei 4 °C inkubiert. Um die Proteine zu detektieren, wurde der Sekundärantikörper entfernt, die Membran dreimal mit TBS-T und einmal mit TBS für je 10 min gewaschen und auch mittels Immobilon Western Blot Detektions-Kit am INTAS Chemo *Cam Imager* detektiert.

#### 3.9.5. Detektion von Proteinen im Coomassiegele

Um die Reinheit der Proteine nach ihrer Reinigung zu überprüfen, wurden die Proben mit definierter Proteinmenge von mindestens 2 µg und 5 µg auf ein SDS-Gel geladen. Nachdem die Lauffront das Ende des Trenngels erreicht hatte, wurde das SDS-Gel entnommen und mit Coomassie Brilliantblau R350 *Staining* Lösung (15 min, konstantes Schwenken) inkubiert.

Eine Entfärbung des SDS-Gels erfolgte durch Coomassie *Destaining* Lösung über Nacht. Zur Dokumentation wurde das Gel mittels HP Scanjet G4010 Scanner archiviert.

### 3.9.6. Reinigung und Isolierung von Proteinen

Für die Reinigung der in dieser Arbeit vorgestellten Proteine wurden jeweils 1,2 l Zellkulturüberstand aus einer *Rollerbottle* generiert. Der Prozess der Generierung von Zellkulturüberstand mittels *Rollerbottle* wird in Abschnitt 3.10.8 erläutert. Um den aufgetauten Zellkulturüberstand von weiteren Zellresten zu befreien, wurde dieser mit einem *Bottle top* Filter Nalgene™ Rapid-Flow™ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) mit einer Porengröße von 45 µm gefiltert. Im Anschluss wurde der gefilterte Zellkulturüberstand über eine ÄKTA™ Start (GE-Lifesciences) auf eine Protein A HiTrap Säule 1 ml (GE-Lifesciences) geladen. Mit einer Säulenbindungskapazität von 20 mg IgG/ml kann die Protein A HiTrap Säule alle mit einem Fc-Tag versehenen Proteine binden. Nach Äquilibration der Säule mit PBS (10 cv; 1 ml/ min) wurde der Zellkulturüberstand geladen und die darin enthaltenen Proteine an die Säule gebunden. Anschließend wurde die Säule mit PBS (40 ml Säulenvolumen) gewaschen. Um das an der Protein A Säule gebundene Protein zu eluieren, wurde ein pH-Wechsel mit einem Citratpuffer A (50 mM, pH 5,5) sowie einem Citratpuffer B (50 mM, pH 3,25) durchgeführt. In einem Verhältnis von 30:70 wurde das Protein von der Säule eluiert und in 15 ml Reaktionsgefäße mit 1 M Tris pH 11 neutralisiert. Im späteren Verlauf wurden durch erneuten Pufferwechsel mit Einsatz von Citratpuffer B (50 mM, pH 3,25) auch die restlichen Bestandteile eluiert und ebenfalls in 15 ml Reaktionsgefäße mit 1 M Tris pH 11 neutralisiert. Eine Konzentrierung des Proteins erfolgte über einen mit PBS äquilibrierten 20 ml 10 K Konzentrador (Macrosep®, *Advance Centrifugal Filter*, Pall Laboratory, USA). Ein Pufferwechsel von Tris auf PBS erfolgte durch eine NAP 25 Säule (GE Healthcare, München, Deutschland). Entsprechend Herstellerprotokoll wurde das Protein an die NAP 25 Säule gebunden, das im Eluat befindliche Tris entfernt und mit PBS von der Säule gewaschen. Im NanoDrop2000 (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen) wurde die Extinktion des Proteins bestimmt, das Protein in 1,5 ml Reaktionsgefäße aliquotiert und in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

### 3.9.7. Spaltung von Proteinen mittels TEV-Protease

Die TEV-Protease (TEV, *Tobacco Etch Virus*) ist eine sequenz-spezifische Cystein-Protease aus dem *Tobacco Etch Virus* (Kapust et al., 2002, Parks et al., 1994). Diese TEV-Protease ist in der Lage die Aminosäuresequenz ENLYFQ S/ G/ A/ M/ C/ H mit hoher Effizienz zu

erkennen und eine Spaltung zwischen Q und S/ G/ A/ M/ C oder H durchzuführen. Ihre strenge Sequenzspezifität, ihre einfache Herstellung und ihre Fähigkeit, eine Vielzahl von Sequenzendungen an der P1'-Position ihrer Erkennungsstelle zu tolerieren, haben dazu beigetragen, dass die TEV-Protease als endoproteolytisches Reagenz in vielfacher Weise eingesetzt wird (Raran-Kurussi et al., 2017, Cesaratto et al., 2016).

Um eine Spaltung des Fc-Teils vom generierten Inhibitor zu ermöglichen, wurde molekularbiologisch eine TEV-*Site* N-terminal des Fc-Fragmentes integriert. Bereits gereinigte Proteine konnten durch die Inkubation von 1 mg Protein mit 100 µl TEV-Protease (4 °C, über Nacht gerollt) effektiv vom Fc-Teil getrennt werden. Ein Nachweis der Trennung vom Fc-Teil konnte mit Hilfe des Coomassie Gels, Western Blot und der Größenausschluss-Chromatographie erreicht werden.

#### 3.9.8. Größenausschluss-Chromatographie

Durch die Größenausschluss-Chromatographie können Proteine ihrer Größe nach getrennt werden, so dass größere Moleküle schneller durch das in der Chromatographiesäule befindliche Polymergranulat laufen als kleinere Moleküle. Diese können durch ihr geringeres hydrodynamisches Volumen stärker in die porösen Polymere eindringen, wodurch sich ihr Diffusionsvolumen vergrößert, und die Retentionszeit verlängert. Somit werden große Moleküle eher eluiert als kleine Moleküle. Im Elutionsprofil werden die eluierten Moleküle in Form von UV-Signalen abgebildet. Einzelne in dieser Arbeit verwendeten und generierten Proteine wurden mittels TEV-Protease gespalten (siehe Abschnitt 3.9.739). Durch die Größenausschluss-Chromatographie konnte eine spezifische Trennung vom Protein und Fc-Teil erfolgen, da sich die Größe der Moleküle deutlich voneinander unterscheidet. Somit konnten die vom Fc-Teil getrennten Proteine auch als Monomere näher untersucht werden. Zur Größentrennung wurde eine Superdex® 200 Increase 10/300 GL Säule (GE Healthcare Life Sciences, München, Deutschland) verwendet. Mit einem Probenvolumen von je 500 µl wurde das Protein in einem PBS-Laufpuffer bei konstanter Flussrate von 0,5 ml/min auf die Säule auftragen. Die Säule wurde mittels „*high molecular mass standard*“ und „*low molecular mass standard*“ kalibriert. Eine Messung des UV-Spektrums wurde bei 280 nm ermittelt.

### 3.10. Zellbiologische Methoden

#### 3.10.1. Kultivierung von Suspensionszellen

Als Suspensionszelllinie wurden Ba/F3-Zellen und ihre transduzierten Subtypen verwendet. Diese wurden in 10 cm Petrischalen mit 10 ml DMEM<sup>+/+</sup> und entsprechendem Zytokin bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> in einer gesättigten Wasserdampfatosphäre kultiviert. Die Zellen wurden ein- bis zweimal wöchentlich in einem Verhältnis von 1:10000 passagiert.

#### 3.10.2. Kultivierung von adhärenenten Zellen

Als adhärenente Zelllinie wurde die CHO-K1-Zelllinie und ihre transfizierten Subtypen verwendet. Diese wurden auf 10 cm Petrischalen mit 10 ml DMEM<sup>+/+</sup> und entsprechendem Zytokin bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> in einer gesättigten Wasserdampfatosphäre kultiviert. Die Zellen wurden zweimal wöchentlich passagiert. Dabei wurden die Zellen mit 5 ml PBS gewaschen, sowie mit 2 ml Trypsin/ EDTA (Life Technologies, Darmstadt) für zwei Minuten inkubiert und von der Petrischale gelöst. Anschließend wurden die Zellen jeweils in einem Verhältnis von 10:10000 passagiert.

#### 3.10.3. Zellzahlbestimmung

Um die Zellen zu zählen wurden 5 µl der Zellsuspension mit 5 µl *Trypan Blue Dye* vermennt. Die Suspension wurde anschließend auf einen Objektträger TC10 *System Counting Slides Dual Chamber* geladen und die Zellzahl durch den TC10 *Automated Cell Counter* gemessen.

#### 3.10.4. Transiente Transfektion von adhärenenten Zellen

Für die transiente Transfektion von CHO-K1 Zellen wurden 5 x 10<sup>5</sup> Zellen auf eine 10 cm große Petrischale mit 10 ml DMEM<sup>+/+</sup> ausgesät und über Nacht kultiviert. Am nächsten Tag wurde 5 µg Plasmid-DNA und 10 µl Turbofect (Thermo Fisher Scientific, St. LeonRot, Deutschland) mit 1 ml DMEM<sup>-/-</sup> vermennt und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Inkubation der Suspension wurde diese auf die Zellen gegeben und das Zell-Suspensions-Gemisch für weitere 5 h bei 37 °C inkubiert. Es folgte ein Mediumswechsel mit 10 ml DMEM<sup>+/+</sup> und eine anschließende Kultivierung im Inkubator für 48 h. Nach 48 h konnte der Zellkulturüberstand, sowie die Zellen für analytische Zwecke verwendet werden. Eine Einschätzung der Transfektionseffizienz konnte durch die Transfektion der Zellen mit der Plasmid-DNA, dessen cDNA für pEGFP codiert, erreicht werden.

### 3.10.5. Stabile Transfektion von adhärenenten Zellen

Um CHO-K1 Zellen stabil zu transfizieren wurden  $1 \times 10^6$  Zellen verwendet. Nachfolgende Schritte der Transfektion wurden wie in Abschnitt 3.10.4 durchgeführt. Nach 48 h Inkubation wurden die Zellen mit 5 ml PBS gewaschen, mit 2 ml Trypsin/EDTA abgelöst, zentrifugiert und auf eine neue 10 cm Petrischale mit 10 ml DMEM<sup>+/+</sup> und 225  $\mu$ l G418 übertragen. An den darauffolgenden Tagen wurden die Zellen hinsichtlich der Überlebensrate überprüft und nach etwa drei Tagen fand ein erneuter Mediumwechsel mit DMEM<sup>+/+/+</sup> statt. Nach zweimaligem Passagieren der Zellen auf 10 cm Schalen, wurde eine Einzelklonselektion durchgeführt, indem Zellen auf eine 96-well Kulturschale übertragen wurden, so dass rechnerisch pro Vertiefung etwa 0,5 Zellen vereinzelt wurden. Dabei wurde jedem Well 200  $\mu$ l DMEM<sup>+/+/+</sup> Selektionsmedium zugeführt. An den darauffolgenden Tagen wurden die Zellen beobachtet und ausgewählte Klone im Western Blot hinsichtlich der Expression des gesuchten Proteins im Zellkulturüberstand überprüft. Nach Selektion der exprimierenden Klone wurden ein bis zwei dieser Klone auf eine 10 cm Petrischale mit 10 ml DMEM<sup>+/+/+</sup> übertragen und kultiviert.

### 3.10.6. Proliferationsassay

Um die Proliferation von Zellen zu messen, wurden Ba/F3-gp130 Zellen für das IL-6 oder IL-11 *Trans-Signaling in vitro* Modell oder Ba/F3-gp130-IL-6R Zellen für das IL-6 *Classic-Signaling in vitro* Modell verwendet. Die Zellen wurden hierfür dreimal mit 10 ml PBS gewaschen, in DMEM<sup>+/+</sup> aufgenommen und mittels *Cell counter* TC10 gezählt wurden. Die Zellen wurden auf eine Zellzahl von  $5 \times 10^3$  Zellen pro 96-well Kavität eingestellt und in 100  $\mu$ l/well als Triplikate auf die 96-well Platte gegeben. Für IL-6 *Trans-Signaling* Proliferationsassays wurden Ba/F3-gp130 Zellen zunächst mit je 50 ng/ml IL-6 und 100 ng/ml sIL-6R zur Proliferation stimuliert, während für das IL-11 *Trans-Signaling* je 10 ng/ml IL-11 und 100 ng/ml sIL-11R verwendet wurden. Beim IL-6 *Classic-Signaling* wurden Ba/F3-gp130-IL-6R Zellen verwendet, die mit IL-6 zytokinabhängig proliferieren. Anschließend erfolgte eine inhibitorische Konzentrationsreihe der jeweiligen Inhibitoren mit 11 Konditionen, bei dem absteigende Hemmkonzentrationen von 100 bis 0,001 nmol/l verwendet wurden. Zu Beginn der Konzentrationsreihe wurden 100 nmol/l Inhibitor in 50  $\mu$ l zu der stimulierten 100  $\mu$ l Zellsuspension hinzugegeben und die Inhibitorzellsuspension durch Auf- und Abpipettieren vermenget. Anschließend wurden 50  $\mu$ l aus der ersten Well-Kavität in die darauffolgende Well-Kavität übertragen und eine Mischung der Zellsuspension durchgeführt. Dieser Prozess führte zur Verdünnung der Inhibitoren von 100 nmol/l bis hin zu 0,001 nmol/l (Verdünnung je 1/3 pro Kondition). Die 96-well Platte mit der Zellsuspension

bestehend aus Ba/F3-gp130 Zellen, Zytokinen und Inhibitoren wurde für 48 Stunden bei 37 °C mit 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach Inkubation der Zellen wurde mit Hilfe des *Cell-Titer-Blue Viability Assay* jedem *Well* 20 µl *Cell-Titer-Blue* zugegeben und die Proliferation der Zellen am *Tecan Infinite M200 pro Reader* (ex-Filter 530/25, em-Filter 590/35) gemessen. Alle Messwerte wurden vom 0 min Wert subtrahiert und die Proliferation als normalisierte relative Proliferation angegeben.

### 3.10.7. Stimulationsassay

Zur Überprüfung der intrazellulären Signalwege der Zellen wurden Ba/F3-gp130 Zellen dreimal mit PBS gewaschen, in DMEM<sup>-/-</sup> aufgenommen und auf 6-*well* Platten aufgeteilt. Hierzu wurden 1 x 10<sup>6</sup> Zellen Ba/F3-gp130 Zellen pro Kondition ausgesät und für 5 h bei 37 °C inkubiert. Durch das Fehlen von Nährmedien wie FCS oder Zytokinen werden die Signalwege der Zellen vorerst in einen inaktiven Zustand versetzt. Eine 15 min vor Ablauf der 5 h Inkubation wurden die Zytokine (50 ng/ml IL-6 und 100 ng/ml sIL-6R) mit den zu untersuchenden Inhibitoren für 15 min bei 37 °C inkubiert. Eine Stimulation der Ba/F3-gp130 Zellen mit Zytokinen und Inhibitor erfolgte für 30 min bei 37 °C. Als Negativkontrolle wurden Zellen ohne Zytokin und als Positivkontrolle Zellen mit 10 ng/ml Hyper-IL-6 stimuliert. Anschließend wurden die stimulierten Zellen von der 6-*well* Zellkulturschale gelöst, in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und bei 1000 x g für 5 min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen für 2 h und 4 °C lysiert (siehe Abschnitt 3.9.1).

### 3.10.8. Expression von Proteinen mittels *Rollerbottle*

Um ausreichend Zellkulturüberstand für die Reinigung des Proteins mittels Protein A Säule zu generieren, wurden CHO-K1 Zellen, die das gewünschte Protein stabil exprimieren von 10 cm Schalen auf 14 x 15 cm Petrischalen mit 20 ml DMEM<sup>+/+</sup> und G418 passagiert. Nachdem sich lichtmikroskopisch eine ausreichend hohe Konfluenz zeigte, wurden die Zellen jeweils mit 10 ml PBS gewaschen und mit etwa 300 µl Trypsin/EDTA von der Petrischale gelöst. Der Zellsuspension wurden 20 ml DMEM<sup>+/+/+</sup> zugefügt und diese für 5 min bei 1000 x g und Raumtemperatur zentrifugiert. Nach Zentrifugation wurde der Überstand abgesaugt und die Zellen in 10 ml DMEM<sup>+/+/+</sup> resuspendiert. Nachdem alle 14 Schalen in je 10 ml DMEM<sup>+/+/+</sup> resuspendiert wurden, wurden diese in die *Rollerbottle* überführt und das Volumen auf 400 ml mit DMEM<sup>+/+/+</sup> aufgefüllt, sowie die *Rollerbottle* bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> in einer gesättigten Wasserdampf-atmosphäre kultiviert. Nach 72 h wurde der erste Zellkulturüberstand verworfen und neues Medium bestehend aus DMEM<sup>+/+/+</sup>, mit dem Zusatz an 10 % Ultra low IgG FBS

anstelle des FBS, der *Rollerbottle* zugeführt. Nach Kultivierung der Zellen in der *Rollerbottle* über 72 h wurde der Zellkulturüberstand entnommen und in je 2 x 400 ml Zentrifugationstubes übertragen, sowie erst bei 2000 x g für 30 min und 4 °C und dann bei 10000 x g für 15 min und 4 °C zentrifugiert. Insgesamt wurde 1,5 l Zellkulturüberstand für die Reinigung über die Protein A Säule gesammelt. Zur Analyse wurden Proben des zentrifugierten Zellkulturüberstandes im Western Blot nachgewiesen.

### 3.11. Statistische Analysen

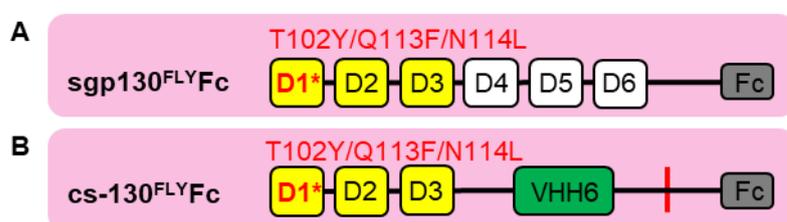
Alle Experimente, welche auf einer Messung der Proliferation von Ba/F3-gp130 Zellen basieren, wurden mindestens in dreifacher Weise  $n \geq 3$  durchgeführt und zeigen vergleichbare Ergebnisse. Die angegebenen Daten wurden durch die Bildung des Mittelwertes und der Standardabweichung (SD) ermittelt. Entsprechend kalkulierte  $IC_{50}$ -Werte ( $IC_{50}$ , inhibitorische halbmaximale Konzentration) wurden für jeden Inhibitor durch die nicht-lineare Regressionsanalyse mittels GraphPad Prism 6.0 (Version 6.00 für Windows, *GraphPad Software*, La Jolla, CA, USA; [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com)) ausgehend von  $n \geq 3$  individuellen Experimenten ermittelt.

Die Quantifizierungen der Daten aus den Western wurden mittels *Image Studio Lite version 5.2* (Li-COR) für  $n \geq 3$  individuelle Experimente ermittelt. Die resultierenden Intensitäten wurden auf die Positivkontrollen normalisiert. Für Mehrfachvergleiche wurde die Methode der *one-way analysis of variance* (ANOVA), gefolgt von der Dunnett-Korrektur verwendet (GraphPad Prism 6.0). Die statistische Signifikanz wurde auf das Niveau  $p < 0,05$  festgelegt. Die Werte zeigen, wie signifikant das errechnete Ergebnis ist. Dabei ist  $p \leq 0,05$  signifikant,  $p \leq 0,01$  sehr signifikant und  $p \leq 0,001$  hoch signifikant.

## 4 ERGEBNISSE

### 4.1. Entwicklung des neuartigen Fusionsproteins cs-130<sup>FLY</sup>Fc auf Basis von sgp130<sup>FLY</sup>Fc

Um eine affinitätssteigernde Wirkung von sgp130Fc in Bezug auf die IL-6 Bindung zu erreichen wurde in dieser Arbeit das cs-130<sup>FLY</sup>Fc generiert. Die Entwicklung von cs-130<sup>FLY</sup>Fc erfolgte auf Grundlage des Fusionsproteins cs-130Fc, welches analog zum sgp130<sup>T102Y/Q113F/N114L</sup>Fc (sgp130<sup>FLY</sup>Fc) (Tenhumberg et al., 2008) in der D1-Region mutiert wurde (**Abb. 7**).



**Abb. 7: Schematische Darstellung cs-130<sup>FLY</sup>Fc im Vergleich mit sgp130Fc und cs-130-Varianten**  
**(A) Sgp130<sup>FLY</sup>Fc.** Domänen D1-D6 sind mit einem Fc-Fragment verbunden. Die zytokinbindende Domäne D1 wurde hinsichtlich ihrer IL-6 Bindeeigenschaften durch Austausch von den Aminosäuren T<sup>102</sup>→Y<sup>102</sup>, Q<sup>113</sup>→F<sup>113</sup> und N<sup>114</sup>→L<sup>114</sup> verändert. **(B) Cs-130<sup>FLY</sup>Fc.** Die D1-Domäne wurde entsprechend dem sgp130<sup>FLY</sup>Fc mutiert. Die Domänen D1-D3 von gp130 sind über einen VHH6 mit der TEV-Site und dem Fc-Fragment verbunden.

Das Protein cs-130<sup>FLY</sup>Fc besteht aus den Domänen D1-D3 von gp130, die über eine Linker-Sequenz mit dem VHH6 verbunden und über eine TEV-Site mit dem IgG1-Fc-Fragment fusioniert sind. Die TEV-Site zwischen dem VHH6 und dem Fc-Fragment sollte die Abspaltung des Fc-Fragments und somit die Monomerisierung des Proteins ermöglichen. Wie in **Abb. 8** zu sehen, wurden analog zum sgp130<sup>FLY</sup>Fc im cs-130Fc die Aminosäuren der D1-Region T<sup>102</sup>, Q<sup>113</sup> und N<sup>114</sup> durch Y<sup>102</sup>, F<sup>113</sup> und L<sup>114</sup> ersetzt (D1<sup>FLY</sup>-Mutation).

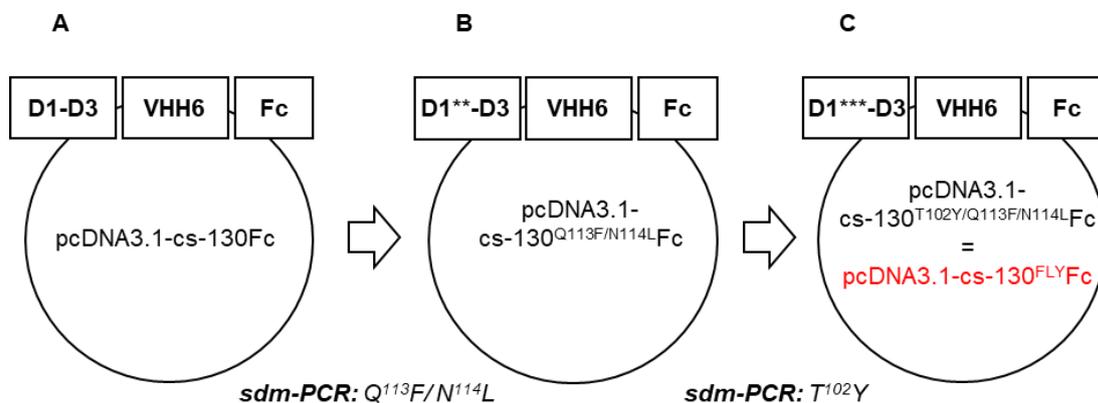
cs-130Fc	N <sup>98</sup> IQLTCNILTFGQLEQNVYG
cs-130 <sup>FLY</sup> Fc	N <sup>98</sup> IQLYCNILTFGQLEFLVYG

**Abb. 8: Sequenzvergleich von cs-130Fc und cs-130<sup>FLY</sup>Fc**

Ein Ausschnitt der DNA-Sequenzen von cs-130Fc (Aminosäureaustausch, blau) und cs-130<sup>FLY</sup>Fc (Aminosäureaustausch, rot) sind in Form der Aminosäuresequenz zum Vergleich beider Sequenzen dargestellt. Dabei wurde ein Aminosäureaustausch des Proteins cs-130Fc in der D1-Region T<sup>102</sup>→Y<sup>102</sup>, Q<sup>113</sup>→F<sup>113</sup> und N<sup>114</sup>→L<sup>114</sup> durchgeführt und das Protein cs-130<sup>FLY</sup>Fc generiert.

Hierfür wurde das Expressionsplasmid pcDNA3.1-cs-130Fc zur Klonierung verwendet (**Abb. 9A**), um mittels *site-directed-mutagenesis* PCR das Plasmid pcDNA3.1-cs-30<sup>FLY</sup>Fc (**Abb. 9C**) zu generieren.

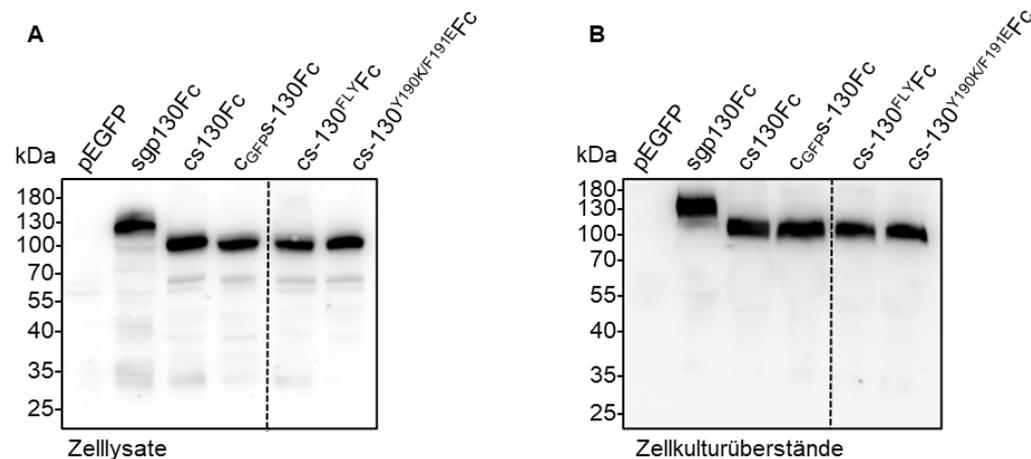
In der ersten *site-directed-mutagenesis* PCR wurde, wie in Abschnitt 3.8.3 beschrieben, mit Verwendung der Primer Q<sup>113</sup>F/N<sup>114</sup>L *fw* und *rv* aus **Tabelle 2** eine Punktmutation und Austausch der Aminosäuren Q<sup>113</sup> und N<sup>114</sup> in F<sup>113</sup> und L<sup>114</sup> der D1-Domäne von cs-130Fc durchgeführt, so dass das neue Expressionsplasmid pcDNA3.1-cs-130<sup>Q113F/N114L</sup>Fc amplifiziert wurde (**Abb. 9B**).



**Abb. 9: Klonierungsstrategie für die Plasmid-DNA von cs-130<sup>FLY</sup>Fc**

Im ersten Schritt wurde die Plasmid-DNA pcDNA3.1-cs-130Fc verwendet, um mittels erster *site-directed-mutagenesis* PCR mit den Primern Q<sup>113</sup>F/N<sup>114</sup>L *fw* und Q<sup>113</sup>F/N<sup>114</sup>L *rv* das Plasmid pcDNA3.1-cs-130<sup>Q113F/N114L</sup>Fc zu generieren. Die Plasmid-DNA pcDNA3.1-cs-130<sup>Q113F/N114L</sup>Fc wurde für die zweite *sdm*-PCR mit den Primern T<sup>102</sup>Y *fw* und T<sup>102</sup>Y *rv* verwendet und dadurch die Plasmid-DNA pcDNA3.1-cs-130<sup>T102Y/Q113F/N114L</sup>Fc generiert.

Dieses Expressionsplasmid wurde in einer zweiten *site-directed-mutagenesis* PCR erneut in der D1-Domäne mutiert. Hierfür wurden die Primer N<sup>114</sup>/L<sup>114</sup> *fw* und *rv* aus **Tabelle 2** für die Punktmutation der Aminosäure N<sup>114</sup> in L<sup>114</sup> verwendet. Nach Durchführung der zweiten *Site-directed-mutagenesis* PCR wurde so das neue Expressionsplasmid pcDNA3.1-cs-130<sup>T102Y/Q113F/N114L</sup>Fc (pcDNA3.1-cs-30<sup>FLY</sup>Fc) generiert (**Abb. 9C**). Nach erfolgter Klonierung des Expressionsplasmids pcDNA3.1-cs-30<sup>FLY</sup>Fc erfolgte eine transiente Transfektion der Expressionsplasmide pcDNA3.1-pEGFP, pcDNA3.1-sgp130Fc, pcDNA3.1-cs-130Fc, pcDNA3.1-cGFPS-130Fc, pcDNA3.1-cs-130<sup>Y190K/F191E</sup>Fc und pcDNA3.1-cs-130<sup>FLY</sup>Fc in CHO-K1 Zellen und eine Detektion der exprimierten rekombinanten Proteine im Western Blot mittels humanen Fc-POD Antikörper (**Abb. 10**).



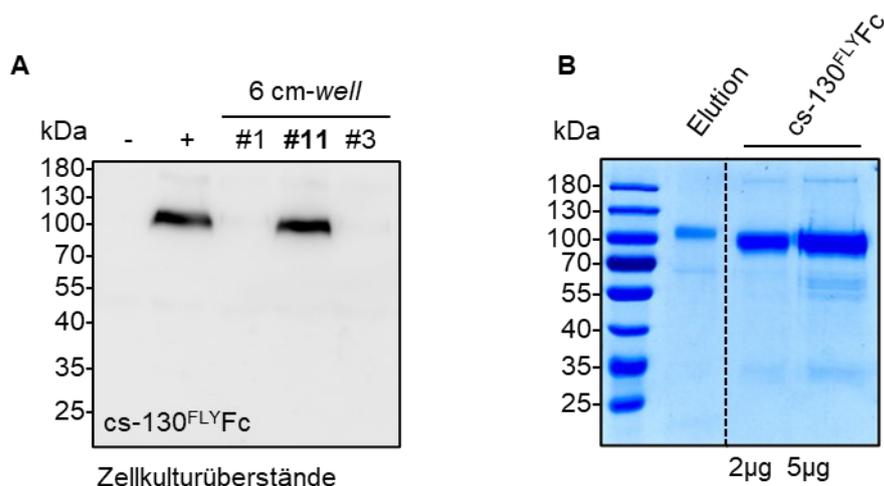
**Abb. 10: Expression von sgp130Fc und cs-130Fc-Varianten und Detektion im Western Blot**  
 Detektion von Zelllysaten (A) und Zellkulturüberständen (B) transient in CHO-K1 Zellen exprimierter Proteine mittels Western Blot durch humanen anti-Fc-POD.

Alle transient transfizierten Expressionsplasmide konnten im Vergleich zur Kontrolle pEGFP sowohl im Zelllysate, als auch im Zellkulturüberstand der CHO-K1 Zellen durch Verwendung des humanen Fc-POD (Peroxidase) Antiköpers nachgewiesen werden.

Um das Protein cs-130<sup>FLY</sup>Fc in größeren Mengen zu produzieren wurden CHO-K1 Zellen wie in Abschnitt 3.10.5 beschrieben, stabil mit dem Expressionsplasmid pcDNA3.1- cs-130<sup>FLY</sup>Fc transfiziert. Eine Selektion der Zellen, die das Protein cs-130<sup>FLY</sup>Fc im Zellkulturüberstand exprimierten, erfolgte durch mehrfaches Passagieren der Zellen in Anwesenheit des Selektionsantibiotikums Geneticin (G418), gefolgt von der Einzelklonselektion durch *Limited Dilution*. Nach erfolgter Einzelklonselektion wurden die Zellkulturüberstände der resultierenden Klone mittels *Western Blotting* auf die Expression der inhibitorischen Proteine untersucht (**Abb. 10A**).

Letztlich wurde der stabile Klon #11 für weitere Arbeiten ausgewählt. Um größere Proteinmengen von cs-130<sup>FLY</sup>Fc zu generieren, wurden stabile Zellen des Klons #11 (**Abb. 11A**) in das *Rollerbottle*-System, wie in Abschnitt 3.10.8 beschrieben, überführt.

Dabei wurden 1,2 l Zellkulturüberstand generiert und das rekombinante Protein cs-130<sup>FLY</sup>Fc mit Hilfe der Protein A Säule, wie in Abschnitt 3.9.6, beschrieben, gereinigt. Gereinigtes cs-130<sup>FLY</sup>Fc wurde durch die SDS-Page, wie in Abschnitt 3.9.5 beschrieben durchgeführt und in Bezug auf die Reinheit und Größe analysiert (**Abb. 11B**). Hierzu wurden je 2 µg und 5 µg Protein mit der Elutionsfraktion verglichen, so dass für das Protein cs-130<sup>FLY</sup>Fc experimentell ein Molekulargewicht von ca. 100 kDa ermittelt wurde.



**Abb. 11: Einzelklonselektion von cs-130<sup>FLYFc</sup> zur stabilen Transfektion in CHO-K1 Zellen und Detektion von cs-130<sup>FLYFc</sup> in der SDS-Page nach erfolgter Proteinreinigung**

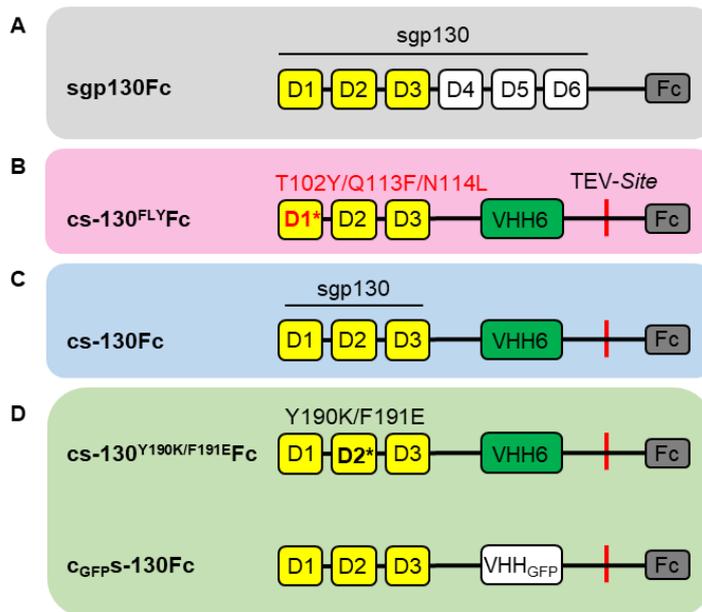
(A) Die Plasmid DNA pcDNA3.1 cs-130<sup>FLYFc</sup> wurde in CHO-K1 Zellen transfiziert und stabile Klone wurden generiert. Die Detektion von Zellkulturüberständen erfolgte durch *Western blotting* mittels humanen anti-Fc-POD. Positivkontrolle (+) Stimulation mit Hyper-IL-6. Für die weiteren Arbeiten wurde Klon #11 ausgewählt. (B) SDS-Page Analyse mittels *Coomassie Brilliant Blue* Färbung nach Proteinreinigung von cs-130<sup>FLYFc</sup>. Dabei wurden 2 und 5 µg gereinigtes Protein auf das SDS-Gel aufgetragen und mit der Elutions-Fraktion verglichen.

Zusammenfassend wurde das Plasmid pcDNA3.1-cs-130<sup>FLYFc</sup> kloniert, in CHO-K1 Zellen stabil transfiziert und die Zellkulturüberstände von cs-130<sup>FLYFc</sup> exprimierenden CHO-K1 Zellen in regelmäßigen Abständen gesammelt. Daran anschließend wurde das Protein cs-130<sup>FLYFc</sup> mittels Protein A Säule gereinigt und 1,57 mg Protein aus 1,2 l Zellkulturüberstand gewonnen.

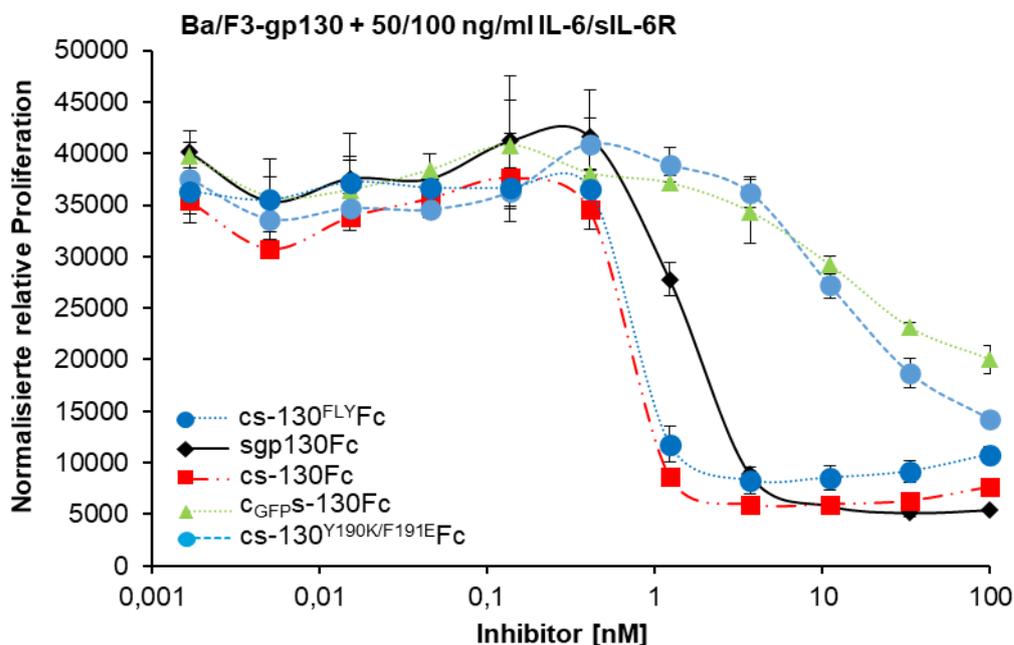
#### 4.2. Hemmung des IL-6 *Trans-Signalings* durch cs-130<sup>FLYFc</sup>

Die Hemmung des IL-6 *Trans-Signalings* durch das gereinigte Fusionsprotein cs-130<sup>FLYFc</sup> wurde in Form einer dosisabhängigen inhibitorischen Konzentrationsreihe im Vergleich mit den Referenzproteinen sgp130Fc und cs-130Fc sowie den cs-130-Kontrollvarianten c<sub>GFPS</sub>-130Fc und cs-130<sup>Y190K/F191E</sup>Fc (Abb. 12), wie in Abschnitt 3.10.6 beschrieben, untersucht (Abb. 13).

Dabei wurden Ba/F3-gp130 Zellen mit je 50 ng/ml IL-6 und 100 ng/ml sIL-6R zur Proliferation stimuliert. Bei den Ba/F3 Zellen handelt es sich um murine Prä-B-Zellen, die mit gp130 stabil transduziert wurden (Ba/F3-gp130) und in der Lage sind, zytokinabhängig mit Verwendung von IL-6 und sIL-6R zu proliferieren. In diesem Experiment wurden ansteigende Konzentrationen der Proteine cs-130<sup>FLYFc</sup>, der Referenzproteine sgp130Fc und cs-130Fc sowie der cs-130-Kontrollvarianten c<sub>GFPS</sub>-130Fc und cs-130<sup>Y190K/F191E</sup>Fc zugegeben und der Effekt auf die IL-6 *Trans-Signaling* abhängige Proliferation untersucht. Die Zellproliferation wurde nach 72 h mittels eines *Cell-Titer-Blue* Assays (Promega) quantifiziert.



**Abb. 12: Schematische Darstellung cs-130<sup>FLY</sup>Fc im Vergleich mit sgp130Fc und cs-130-Varianten**  
**(A) Sgp130.** Domänen D1-D6 sind mit einem Fc-Fragment verbunden. **(B) Cs-130<sup>FLY</sup>Fc.** Die zytokinbindende Domäne D1 wurde hinsichtlich ihrer IL-6 Bindeeigenschaften durch Austausch von den Aminosäuren verändert. Die Domänen D1-D3 von gp130 sind über einen VHH6 mit der TEV-Site und dem Fc-Fragment verbunden. **(C) Cs-130Fc.** Die zytokinbindenden Domänen D1-D3 von gp130 wurden jeweils über einen Linker mit VHH6 verbunden. Darauf folgt eine TEV-Site, die eine Spaltung und Monomerisierung von cs-130 möglich macht. **(D) Kontrollproteine.** Cs-130<sup>Y190K/F191E</sup>Fc wurde durch Mutation in der D2-Domäne in der Bindeeigenschaft zum IL-6 verändert. Beim C<sub>GFPs</sub>-130Fc wurde der VHH6 durch einen VHH<sub>GFP</sub> ausgetauscht.



**Abb. 13: Inhibition des IL-6 Trans-Signaling durch cs-130<sup>FLY</sup>Fc im Proliferationsassay**  
 Ba/F3-gp130 Zellen wurden mit 50 ng/ml IL-6 und 100 ng/ml sIL-6R inkubiert und ansteigende Konzentrationen des gereinigten cs-130<sup>FLY</sup>Fc wurden im Vergleich mit den cs-130Fc-Varianten und sgp130Fc aufgetragen. Nach 72-stündiger Inkubation (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) wurden den Proben Cell-Titer-Blue hinzugefügt und eine Messung der Proliferation am Tecan Infinite M200 pro Reader durchgeführt. Für jedes inhibitorische Protein wurde das Experiment in gleicher Ausführung drei Mal wiederholt und ein Mittelwert des Zellwachstums bestimmt.

Dabei konnte in Anwesenheit von cs-130<sup>FLY</sup>Fc im Vergleich mit den Referenzproteinen sgp130Fc und cs-130Fc eine konzentrationsabhängige Hemmung der Proliferation detektiert werden, während die Kontrollen c<sub>GFP</sub>S-130Fc und cs-130<sup>Y190K/F191E</sup>Fc verringerte Hemmungen der Zellproliferation zeigten (**Abb. 13**). Das Referenzprotein sgp130Fc zeigte im Vergleich mit dem neuartigen Fusionsprotein cs-130<sup>FLY</sup>Fc eine vollständige Hemmung des IL-6 *Trans-Signalings* erst bei 10 nM, während cs-130<sup>FLY</sup>Fc bereits eine Hemmung des IL-6 *Trans-Signalings* bei 5 nM zeigte. Wie in **Tabelle 15** zu sehen, bestätigten entsprechende IC<sub>50</sub>-Werte, dass sgp130Fc mit  $0,97 \pm 0,62$  nM weniger effektive Hemmungen des IL-6 *Trans-Signalings* zeigte, als das cs-130<sup>FLY</sup>Fc mit einem ermittelten IC<sub>50</sub>-Wert von  $0,46 \pm 0,14$  nM.

**Tabelle 15: Inhibitorisches Profil von sgp130Fc und cs-130Fc-Varianten für das IL-6 *Trans-Signaling***

Ba/F3-gp130 Zellen wurden mit 50 ng/ml IL-6 und 100 ng/ml sIL-6R zur Proliferation stimuliert. Ansteigende Hemmkonzentrationen [0,001 – 100 nmol/l] von sgp130Fc und cs-130Fc-Varianten wurden eingesetzt und IC<sub>50</sub>-Werte für jeden Inhibitor ermittelt. IC<sub>50</sub>-Werte wurden für sgp130Fc für n=9, cs-130Fc und cs-130<sup>FLY</sup>Fc für n=6 Experimente berechnet, während die restlichen Inhibitoren auf der Basis von n=3 Experimenten berechnet wurden.

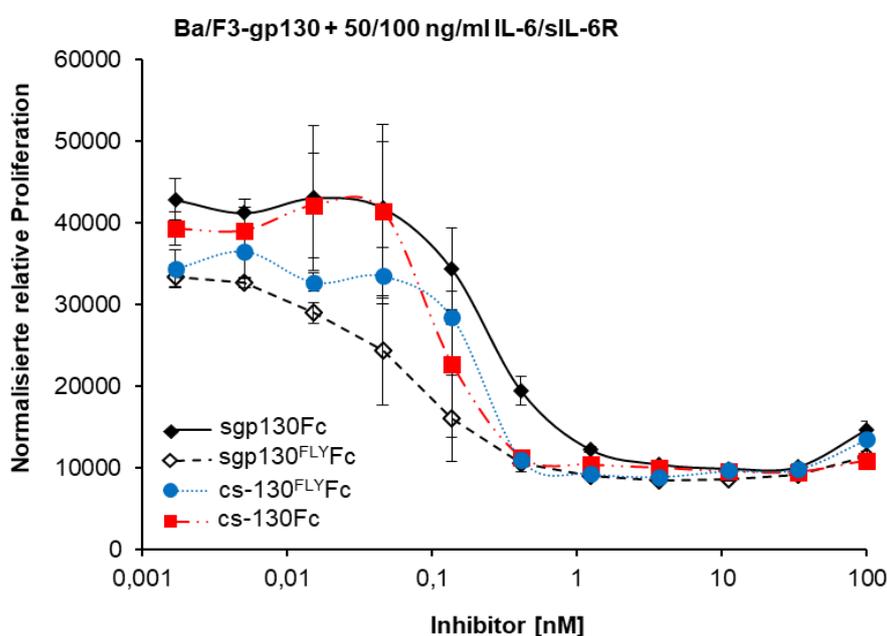
Inhibitor	Zytokinstimulation	IC <sub>50</sub>	
		ng/ml	nM
sgp130Fc	IL-6/sIL-6R (50/100)	252,0 ± 162,2	0,97 ± 0,62
sgp130 <sup>FLY</sup> Fc	IL-6/sIL-6R (50/100)	70,1 ± 34,0	0,27 ± 0,18
cs-130 <sup>FLY</sup> Fc	IL-6/sIL-6R (50/100)	87,8 ± 26,9	0,46 ± 0,14
cs-130Fc	IL-6/sIL-6R (50/100)	61,9 ± 34,0	0,33 ± 0,18
c <sub>GFP</sub> S-130Fc	IL-6/sIL-6R (50/100)	1243,0 ± 957,6	6,54 ± 5,04
cs-130 <sup>Y190K/F191E</sup> Fc	IL-6/sIL-6R (50/100)	1963,3 ± 1153,9	7,55 ± 6,07

Im Vergleich mit cs-130Fc wurde für cs-130<sup>FLY</sup>Fc eine vergleichbare Hemmung des IL-6 *Trans-Signalings* bei 5 nM beobachtet. Ermittelte IC<sub>50</sub>-Werte bestätigten die inhibitorische Effektivität des cs-130<sup>FLY</sup>Fc von  $0,46 \pm 0,14$  nM im Vergleich mit  $0,33 \pm 0,18$  nM für cs-130Fc.

Daher waren sowohl cs-130Fc als auch das neue Fusionsprotein cs-130<sup>FLY</sup>Fc in der Lage die Zellproliferation im Rahmen des IL-6 *Trans-Signalings* effektiv zu hemmen. Die Kontrollproteine c<sub>GFP</sub>S-130Fc und cs-130<sup>Y190K/F191E</sup>Fc zeigten hingegen reduzierte Hemmungen des IL-6 *Trans-Signalings*. Dabei konnte auch durch den Einsatz von 100 nM c<sub>GFP</sub>S-130Fc und cs-130<sup>Y190K/F191E</sup>Fc keine vollständige Inhibition der Zellproliferation gezeigt werden. Ermittelte IC<sub>50</sub>-Werte von  $6,54 \pm 5,04$  nM für c<sub>GFP</sub>S-130Fc und  $7,55 \pm 6,07$  nM für cs-130<sup>Y190K/F191E</sup>Fc machten deutlich, dass diese Kontrollproteine im Vergleich mit cs-130<sup>FLY</sup>Fc und cs-130Fc das IL-6 *Trans-Signaling* deutlich schlechter hemmten.

Zusammenfassend wurde durch diesen IL-6 *Trans-Signaling* Proliferationsassay gezeigt, dass cs-130<sup>FLY</sup>Fc eine vergleichbare inhibitorische Aktivität auf das IL-6 *Trans-Signaling* aufwies, wie cs-130Fc und eine verbesserte Hemmung der Zellproliferation im Vergleich mit sgp130Fc erreicht werden konnte.

Um herauszufinden, inwieweit eine Verbesserung der IL-6 Affinität durch Mutation der D1-Domäne (D1<sup>FLY</sup>) von cs-130<sup>FLY</sup>Fc im Vergleich mit sgp130<sup>FLY</sup>Fc erreicht werden konnte, wurde eine weitere inhibitorische Konzentrationsreihe zur Hemmung des IL-6 *Trans-Signaling*s in Form eines Proliferationsassays durchgeführt (**Abb. 14**).



**Abb. 14: Inhibition des IL-6 *Trans-Signaling*s durch cs-130<sup>FLY</sup>Fc und sgp130<sup>FLY</sup>Fc und Messung der Zellproliferation**

Ba/F3-gp130 Zellen wurden mit 50 ng/ml IL-6 und 100 ng/ml sIL-6R inkubiert und ansteigende Konzentrationen des gereinigten cs-130<sup>FLY</sup>Fc wurden im Vergleich mit sgp130<sup>FLY</sup>Fc, sgp130Fc und cs-130Fc aufgetragen. Nach 72-stündiger Inkubation (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) wurden den Proben *Cell-Titer-Blue* hinzugefügt und eine Messung der Proliferation am *Tecan Infinite M200 pro Reader* durchgeführt. Für jedes inhibitorische Protein wurde das Experiment in gleicher Ausführung drei Mal wiederholt und ein Mittelwert des Zellwachstums bestimmt.

Hierfür wurden Ba/F3-gp130 Zellen erneut mit je 50 ng/ml IL-6 und 100 ng/ml sIL-6R zur Proliferation stimuliert. Anschließend wurden ansteigende Konzentrationen der Proteine cs-130<sup>FLY</sup>Fc, sgp130<sup>FLY</sup>Fc, sgp130Fc und cs-130Fc zugegeben und der Effekt auf die IL-6 *Trans-Signaling* abhängige Zellproliferation untersucht. Die Zellproliferation wurde nach 72 h mittels eines *Cell-Titer-Blue* Assays (Promega) ausgewertet. Eine Übersicht über die inhibitorische halbmaximale Konzentration (IC<sub>50</sub>) der verwendeten Inhibitoren ist in **Tabelle 15** dargestellt.

Die sgp130-Mutante sgp130<sup>FLY</sup>Fc (Tenhumberg et al., 2008), zeigte im Vergleich mit dem Fusionsprotein cs-130<sup>FLY</sup>Fc eine vergleichbare Hemmung des IL-6 *Trans-Signalings* bei bereits 1 nM InhibitorKonzentration. Dabei wurde auch für cs-130Fc eine vollständige Hemmung des IL-6 *Trans-Signalings* bei nahezu gleicher InhibitorKonzentration festgestellt. Das Referenzprotein sgp130Fc hingegen wies erst bei 5 nM eine vollständige Inhibition des IL-6 *Trans-Signalings* auf und zeigte damit eine um den Faktor 5 schlechtere Hemmung als cs-130<sup>FLY</sup>Fc.

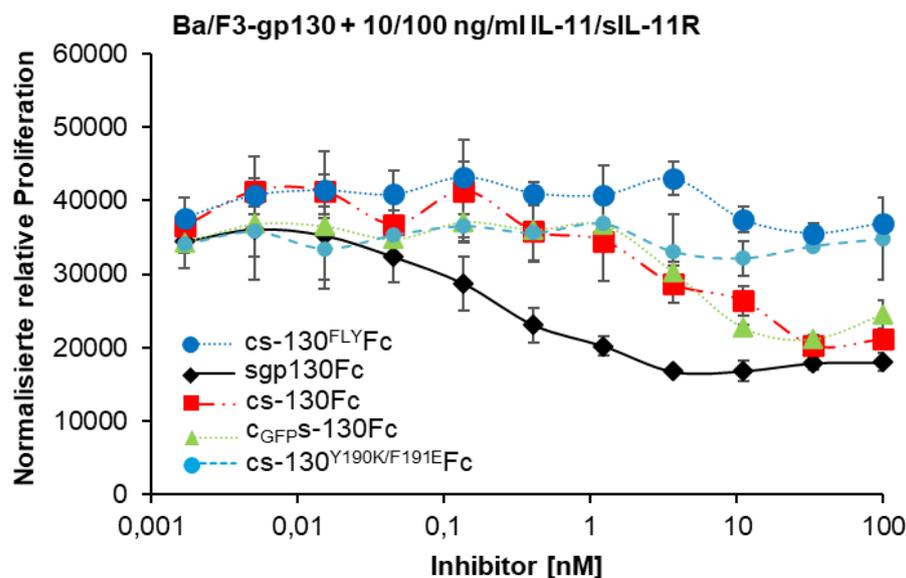
Wie in **Tabelle 15** zu sehen, bestätigen entsprechende IC<sub>50</sub>-Werte, dass sgp130<sup>FLY</sup>Fc bei  $0,27 \pm 0,18$  nM und cs-130<sup>FLY</sup>Fc bei  $0,46 \pm 0,14$  nM das IL-6 *Trans-Signaling* nahezu genauso gut hemmen, wie cs-130Fc bei  $0,33 \pm 0,18$  nM und damit bessere Hemmungen des IL-6 *Trans-Signalings* aufwiesen als sgp130Fc (IC<sub>50</sub>:  $0,97 \pm 0,62$  nM).

Daraus resultiert, dass im Vergleich zum sgp130Fc die Punktmutationen der D1-Domäne (D1<sup>FLY</sup>) im sgp130<sup>FLY</sup>Fc zur deutlichen Erhöhung der Affinität zu IL-6/ sIL-6R Komplexen beitrug, während das cs-130<sup>FLY</sup>Fc im Vergleich mit cs-130Fc nur eine minimal verbesserte Hemmung des IL-6 *Trans-Signalings* erzielen konnte.

#### 4.3. Keine Hemmung des IL-11 *Trans-Signalings* durch cs-130<sup>FLY</sup>Fc

Zur Untersuchung des Effekts von cs-130<sup>FLY</sup>Fc auf das IL-11 *Trans-Signaling* wurden Ba/F3-gp130 Zellen in Anwesenheit von ansteigenden Konzentrationen der Referenzproteine sgp130Fc und cs-130Fc, sowie der Kontrollproteine c<sub>GFPS</sub>-130Fc und cs-130<sup>Y190K/F191E</sup>Fc mit je 10 ng/ml IL-11 und 100 ng/ml sIL-11R stimuliert. Nach 72 h erfolgte die Messung der Zellproliferation durch den *Cell-Titer-Blue* Assay (Promega) (**Abb. 15**).

Interessanterweise zeigte das neuartige Fusionsprotein cs-130<sup>FLY</sup>Fc keine Hemmung des IL-11 *Trans-Signalings*, während sgp130Fc bei 10 nM oder cs-130Fc bei 50 nM eine vollständige Hemmung des IL-11 *Trans-Signalings* aufwiesen. Auch entsprechende IC<sub>50</sub>-Werte (**Tabelle 16**) bestätigen, dass sgp130Fc mit  $0,22 \pm 0,02$  nM und cs-130Fc mit  $7,14 \pm 3,77$  nM in der Lage waren, das IL-11 *Trans-Signaling* zu hemmen. Das Kontrollprotein c<sub>GFPS</sub>-130Fc zeigte reduzierte Hemmungen des IL-11 *Trans-Signalings* bei ca. 50 nM (IC<sub>50</sub>:  $16,67 \pm 14,92$  nM), während für cs-130<sup>Y190K/F191E</sup>Fc keine IL-11 *Trans-Signaling* Hemmung beobachtet wurde.



**Abb. 15: Keine Inhibition des IL-11 *Trans-Signalings* durch cs-130<sup>FLY</sup>Fc im Proliferationsassay**

Ba/F3-gp130 Zellen wurden mit 10 ng/ml IL-11 und 100 ng/ml sIL-11R inkubiert und ansteigende Konzentrationen des gereinigten cs-130<sup>FLY</sup>Fc wurden im Vergleich mit cs-130Fc-Varianten und sgp130Fc aufgetragen. Nach 72-stündiger Inkubation (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) wurden den Proben *Cell-Titer-Blue* hinzugefügt und eine Messung der Zellproliferation durchgeführt. Für jedes inhibitorische Protein wurde das Experiment in gleicher Ausführung drei Mal wiederholt und ein Mittelwert des Zellwachstums bestimmt.

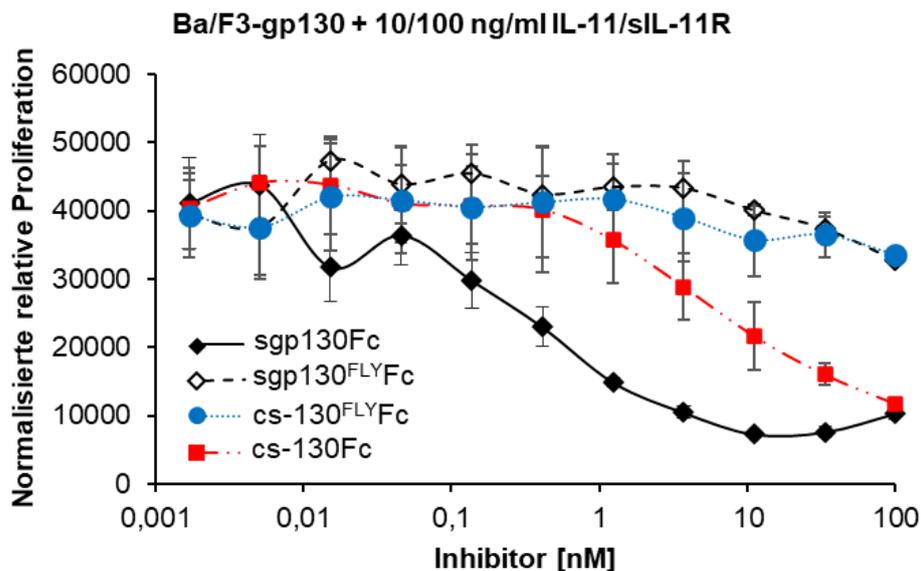
Zusammenfassend wurde durch diesen IL-11 *Trans-Signaling* Proliferationsassay gezeigt, dass das neuartige Fusionsprotein cs-130<sup>FLY</sup>Fc im Vergleich mit sgp130Fc und cs-130Fc nicht mehr in der Lage war, das IL-11 *Trans-Signaling* zu hemmen. Insbesondere im Vergleich mit dem Referenzprotein cs-130Fc wurde gezeigt, dass die Mutation der D1-Domäne zur Erhöhung der IL-6 Affinität von cs-130<sup>FLY</sup>Fc führte, jedoch eine Erhöhung der Affinität in Bezug auf IL-11 in diesem IL-11 *Trans-Signaling in vitro* Modell nicht beobachtet werden konnte.

**Tabelle 16: Inhibitorisches Profil von sgp130Fc und cs-130Fc-Varianten für das IL-11 *Trans-Signaling***

Ba/F3-gp130 wurden mit 10 ng/ml IL-11 und 100 ng/ml sIL-11R zur Proliferation stimuliert. Ansteigende Hemmkonzentrationen [0,001 – 100 nmol/l] von sgp130Fc und cs-130Fc-Varianten wurden eingesetzt und IC<sub>50</sub>-Werte für jeden Inhibitor ermittelt. IC<sub>50</sub>-Werte wurden für sgp130Fc für n=9 und cs-130Fc für n=8 Experimente berechnet, während die restlichen Inhibitoren auf der Basis von n=3 Experimenten berechnet wurden.

Inhibitor	Zytokinstimulation	IC <sub>50</sub>	
Bezeichnung	ng/ml	ng/ml	nM
sgp130Fc	IL-11/sIL-11R (10/100)	160,1 ± 106,8	0,62 ± 0,41
sgp130 <sup>FLY</sup> Fc	IL-11/sIL-11R (10/100)	Keine Inhibition	Keine Inhibition
cs-130 <sup>FLY</sup> Fc	IL-11/sIL-11R (10/100)	Keine Inhibition	Keine Inhibition
cs-130Fc	IL-11/sIL-11R (10/100)	1269,1 ± 521,0	6,68 ± 2,74
cGFPs-130Fc	IL-11/sIL-11R (10/100)	3181,5 ± 2834,8	16,67 ± 14,92
cs-130 <sup>Y190K/F191E</sup> Fc	IL-11/sIL-11R (10/100)	Keine Inhibition	Keine Inhibition

Um die verringerte IL-11 Affinität der D1<sup>FLY</sup>-mutierten Inhibitoren miteinander zu vergleichen, wurden die inhibitorischen Effekte des neuartigen Fusionsproteins cs-130<sup>FLY</sup>Fc mit denen der ursprünglichen sgp130<sup>FLY</sup>Fc Variante in einem weiteren IL-11 *Trans-Signaling* Proliferationsassay gegenübergestellt. Ein Vergleich dieser Inhibitoren erfolgte ebenfalls mit den Referenzproteinen sgp130Fc und cs-130Fc in einem zellbasierten konzentrationsabhängigen IL-11 *Trans-Signaling* Proliferationsassay (**Abb. 16**).



**Abb. 16: Keine Inhibition des IL-11 *Trans-Signaling* durch cs-130<sup>FLY</sup>Fc und sgp130<sup>FLY</sup>Fc**

Ba/F3-gp130 Zellen wurden mit 10 ng/ml IL-11 und 100 ng/ml sIL-11R inkubiert und ansteigende Konzentrationen des gereinigten cs-130<sup>FLY</sup>Fc wurden im Vergleich mit sgp130Fc, sgp130<sup>FLY</sup>Fc und cs-130Fc und aufgetragen. Nach 72-stündiger Inkubation (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) wurden den Proben *Cell-Titer-Blue* hinzugefügt und eine Messung der Proliferation am *Tecan Infinite M200 pro Reader* durchgeführt. Für jedes inhibitorische Protein wurde das Experiment in gleicher Ausführung drei Mal wiederholt und ein Mittelwert des Zellwachstums bestimmt.

Ba/F3-gp130 Zellen wurden erneut mit je 10 ng/ml IL-11 und 100 ng/ml sIL-11R, wie in Abschnitt 3.10.6 beschrieben, zur Proliferation stimuliert und mit ansteigenden Inhibitorkonzentrationen von cs-130<sup>FLY</sup>Fc und sgp130<sup>FLY</sup>Fc sowie sgp130Fc und cs-130Fc inkubiert. Eine Messung der Zellproliferation erfolgte nach 72 h durch Verwendung des *Cell-Titer-Blue* Assays (Promega). Eine Übersicht über die inhibitorische halbmaximale Konzentration (IC<sub>50</sub>) der Inhibitoren ist in **Tabelle 16** dargestellt.

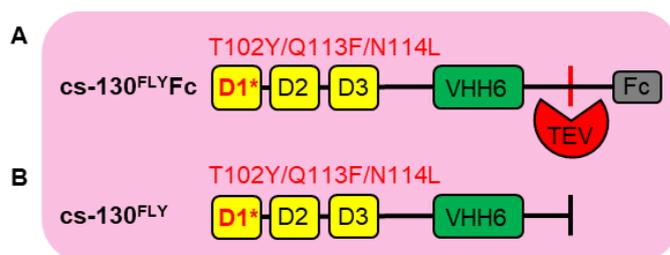
In diesem IL-11 *Trans-Signaling* Proliferationsassay (**Abb. 16**) wurde sehr deutlich, dass die D1<sup>FLY</sup>-mutierten Proteine cs-130<sup>FLY</sup>Fc und sgp130<sup>FLY</sup>Fc keine Inhibition der Zellproliferation der mit IL-11 und sIL-11R stimulierten Zellen zeigten, während sgp130Fc deutliche (IC<sub>50</sub>: 0,22 ± 0,02 nM) und cs-130Fc weniger deutliche (IC<sub>50</sub>: 7,14 ± 3,77 nM) Hemmungen der Zellproliferation zeigten. Sgp130Fc wies auch in diesem Fall eine absolute Hemmung des

IL-11 *Trans-Signalings* bei 10 nM auf, wohingegen cs-130Fc in diesem IL-11 *Trans-Signaling* Proliferationsassay geringere Hemmung der Zellproliferation bei ca. 100 nM zeigte und das IL-11 *Trans-Signaling* somit um den Faktor 10 schlechter hemmte als sgp130Fc.

Es lässt sich festhalten, dass die Mutation der D1-Domäne (D1<sup>FLY</sup>) für die fehlende Hemmung des IL-11 *Trans-Signalings* von entscheidender Bedeutung war. Denn sowohl sgp130<sup>FLY</sup>Fc, als auch das neuartige Fusionsprotein cs-130<sup>FLY</sup>Fc waren nicht in der Lage das IL-11 *Trans-Signaling* zu hemmen, während sgp130Fc und cs-130Fc das IL-11 *Trans-Signaling* hemmen konnten.

#### 4.4. Herstellung von monomeren cs-130<sup>FLY</sup> durch TEV-Spaltung

Da dimeres cs-130<sup>FLY</sup>Fc bereits eine effektive Hemmung des IL-6 *Trans-Signalings in vitro* erzielen konnte, blieb die Frage offen, inwieweit eine Monomerisierung des Proteins cs-130<sup>FLY</sup>Fc (**Abb. 17A**) Einfluss auf die Hemmeffizienz haben würde.



**Abb. 17: Schematische Darstellung von cs-130<sup>FLY</sup>Fc und cs-130<sup>FLY</sup>**

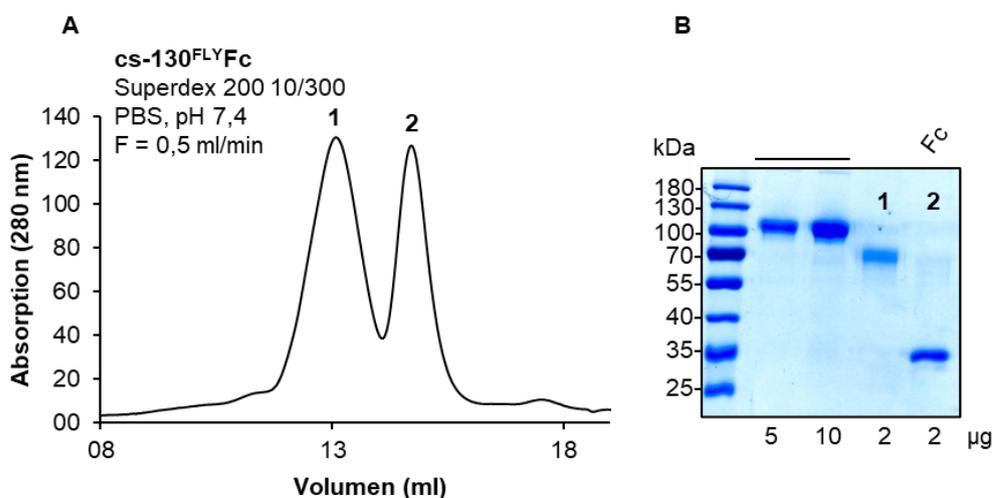
(A) cs-130<sup>FLY</sup>Fc. Die Domänen D1-D3 von gp130 sind über einen Linker mit dem VHH6 verbunden und über eine TEV-Site mit dem Fc-tag fusioniert. Dabei ist die TEV-Protease (rot) in der Lage die TEV-Site zu spalten und somit den Fc-tag zu entfernen. (B) cs-130<sup>FLY</sup>. Nach Abspaltung des Fc-tags liegt cs-130<sup>FLY</sup> als monomere cs-130-Fc-Variante vor und besteht lediglich aus den Domänen D1-D3 von gp130, welche über einen Linker mit dem VHH6 verbunden sind.

Eine Abspaltung des Fc-Fragments durch Spaltung der TEV-Site von cs-130<sup>FLY</sup>Fc mittels TEV-Protease führte zur Monomerisierung des Proteins cs-130<sup>FLY</sup>, wie in **Abb. 17** dargestellt.

Für die Spaltung der TEV-Site von cs-130<sup>FLY</sup>Fc wurde 0,5 mg/ml cs-130<sup>FLY</sup>Fc mit 0,5 mg/ml TEV-Protease über Nacht bei 4°C inkubiert und die Spaltprodukte mittels Größenausschluss-Chromatographie, wie in Abschnitt 3.9.8 beschrieben, voneinander getrennt.

Es wurden zwei Spaltprodukte detektiert (**Abb. 18A**), wobei die Proteine der Größe nach voneinander getrennt wurden. Proteine mit größerem Molekulargewicht wurden zuerst eluiert (**Abb. 18A**, Spaltprodukt 1), während Proteine mit kleinerem Molekulargewicht darauffolgend eluiert wurden (**Abb. 18A**, Spaltprodukt 2).

Eine Kontrolle der Spaltprodukte 1 und 2 erfolgte durch Nachweis in der SDS-Page (s. Abschnitt 3.9.5) im Vergleich zum bereits gereinigten cs-130<sup>FLY</sup>Fc. Dabei wurden je 5 µg und 10 µg cs-130<sup>FLY</sup>Fc mit je 2 µg von Spaltprodukt 1 und Spaltprodukt 2 hinsichtlich der Reinheit und Größe verglichen (Abb. 18B). Eine deutliche Größenreduktion von ca. 70 kDa wurde für Spaltprodukt 1 detektiert. Im Vergleich mit dem ca. 100 kDa schweren cs-130<sup>FLY</sup>Fc wurde das Spaltprodukt 1 dem Protein cs-130<sup>FLY</sup> zugeordnet. Während das kleinere Spaltprodukt 2 eine Größenreduktion auf ca. 35 kDa aufwies und als Fc-Fragment identifiziert wurde (Abb. 18B).



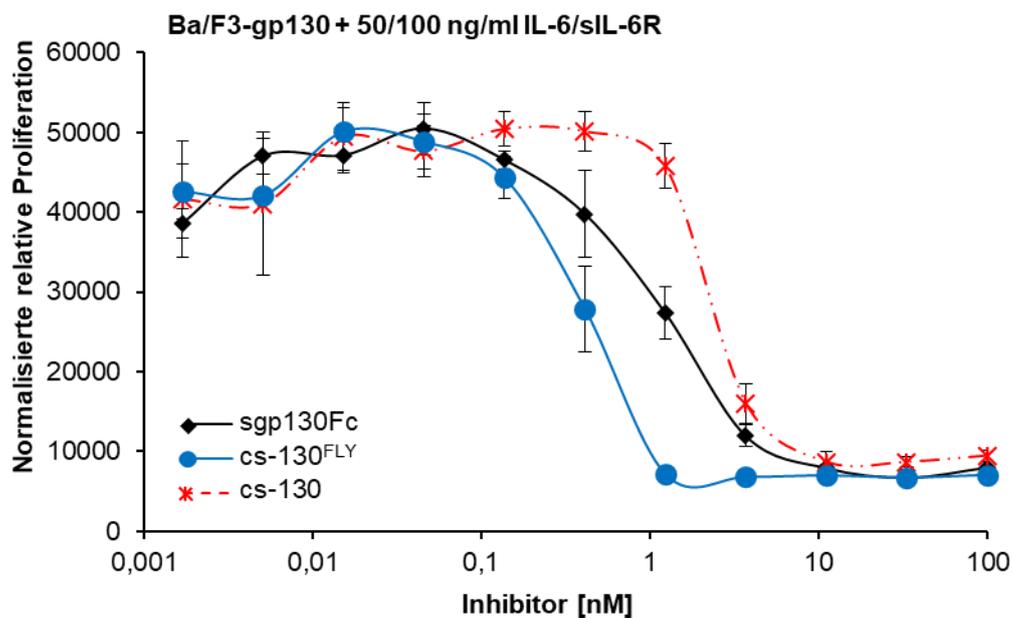
**Abb. 18: Trennung von gespaltenem cs-130<sup>FLY</sup>Fc mittels SEC und anschließender SDS-Page**  
(A) **Größenausschlusschromatographie (SEC, size exclusion chromatography).** Die Filtration erfolgte durch die Chromatographiesäule Superdex 200 10/300 GL. Die Elution der geladenen Proteine wurde mit PBS bei einem pH von 7,4 und einer Durchflussgeschwindigkeit F= 0.5 ml/min durchgeführt. Eine Lichtabsorption der getrennten Spaltprodukte erfolgte bei einer Wellenlänge von 280 nm. (B) **SDS-Page Analyse nach TEV-Spaltung und Trennung der Spaltprodukte mittels SEC.** Die SDS-Page Analyse mittels *Coomassie Brilliant Blue* Färbung erfolgte nach TEV-Spaltung von cs-130<sup>FLY</sup>Fc und Größentrennung der Spaltprodukte durch die SEC. Dabei wurden 5 µg und 10 µg des bereits gereinigten Proteins cs-130<sup>FLY</sup>Fc zum Vergleich auf das SDS-Gel aufgetragen und mit 2 µg des getrennten Spaltprodukts 1 (cs-130<sup>FLY</sup>) und Spaltprodukt 2 (Fc-Fragment) aus der SEC hinsichtlich der Reinheit und Größe verglichen.

So konnte durch Spaltung der TEV-Site von cs-130<sup>FLY</sup>Fc eine gereinigte monomere Variante cs-130<sup>FLY</sup> gewonnen und in Bezug auf ihre Hemmeffizienz näher untersucht werden.

#### 4.5. Monomeres cs-130<sup>FLY</sup> hemmt das IL-6 *Trans-Signaling* besser als cs-130 oder sgp130Fc

Um zu testen, welche Auswirkungen eine Monomerisierung des inhibitorischen Proteins cs-130<sup>FLY</sup> auf die Hemmung des IL-6 *Trans-Signaling* hat, wurde erneut ein *in vitro* IL-6 *Trans-Signaling* Experiment mit Verwendung von Ba/F3-gp130 Zellen durchgeführt (Abb. 19).

Hierfür wurden Ba/F3-gp130 Zellen zunächst mit je 50 ng/ml IL-6 und 100 ng/ml sIL-6R zur Proliferation stimuliert. Ein Vergleich des monomeren Proteins cs-130<sup>FLY</sup> wurde in Bezug auf sgp130Fc und dem monomeren cs-130 hergestellt, sowie eine Hemmkurve in Bezug auf die Zellproliferation von Ba/F3-gp130 Zellen bestimmt. Die Zellproliferation wurde nach 72 h mittels eines *Cell-Titer-Blue* Assays (Promega) quantifiziert. Eine Übersicht über die inhibitorische halbmaximale Konzentration (IC<sub>50</sub>) der verwendeten Inhibitoren ist in **Tabelle 17** dargestellt.



**Abb. 19: Inhibition des IL-6 *Trans-Signalings* durch monomeres cs-130<sup>FLY</sup> im Proliferationsassay**

Ba/F3-gp130 Zellen wurden mit 50 ng/ml IL-6 und 100 ng/ml sIL-6R inkubiert und ansteigende Konzentrationen des gereinigten cs-130<sup>FLY</sup> wurden im Vergleich mit cs-130 und sgp130Fc aufgetragen. Nach 72-stündiger Inkubation (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) wurden den Proben *Cell-Titer-Blue* hinzugefügt und eine Messung der Proliferation am *Tecan Infinite M200 pro Reader* durchgeführt. Für jedes inhibitorische Protein wurde das Experiment in gleicher Ausführung drei Mal wiederholt und ein Mittelwert des Zellwachstums bestimmt.

Dabei wurde eine vollständige Hemmung des IL-6 *Trans-Signaling* für cs-130<sup>FLY</sup> bereits bei ca. 5 nM beobachtet, während monomeres cs-130 eine Hemmung der Zellproliferation erst bei ca. 10 nM erreichen konnte. Dies wurde ebenso für das dimere sgp130Fc beobachtet. Ermittelte IC<sub>50</sub>-Werte (**Tabelle 17**) bestätigten, dass monomeres cs-130<sup>FLY</sup> (IC<sub>50</sub>: 0,48 ± 0,08 nM) im Vergleich mit monomeren cs-130 (IC<sub>50</sub>: 1,13 ± 0,62 nM) oder dimeren sgp130Fc (IC<sub>50</sub>: 0,97 ± 0,62 nM) eine erhöhte Hemmung des IL-6 *Trans-Signalings* aufwies.

**Tabelle 17: Inhibitorisches Profil von cs-130<sup>FLY</sup>, cs-130 und sgp130Fc für das IL-6 *Trans-Signaling***

Ba/F3-gp130 wurden mit 50 ng/ml IL-6 und 100 ng/ml sIL-6R zur Proliferation stimuliert. Ansteigende Hemmkonzentrationen [0,001 – 100 nmol/l] von cs-130<sup>FLY</sup>, cs-130 und sgp130Fc wurden eingesetzt und IC<sub>50</sub>-Werte für jeden Inhibitor ermittelt. Jeder Inhibitor wurde in drei unabhängigen Experimenten in gleicher Weise getestet. IC<sub>50</sub>-Werte wurden für sgp130Fc für n=9 und cs-130 für n=6 Experimente berechnet, während cs-130<sup>FLY</sup> auf der Basis von n=3 Experimenten berechnet wurden.

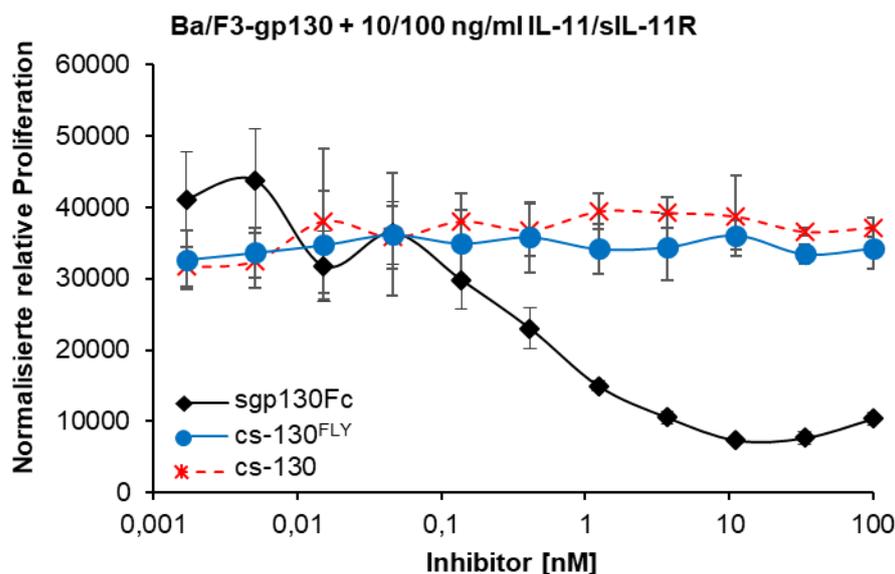
Inhibitor	Zytokinstimulation	IC <sub>50</sub>	
Bezeichnung	ng/ml	ng/ml	nM
sgp130Fc	IL-6/sIL-6R (50/100)	252,0 ± 162,2	0,97 ± 0,62
cs-130 <sup>FLY</sup>	IL-6/sIL-6R (50/100)	33,5 ± 14,9	0,48 ± 0,08
cs-130	IL-6/sIL-6R (50/100)	78,9 ± 43,2	1,13 ± 0,62

Zusammenfassend wurde gezeigt, dass die Monomerisierung des Proteins cs-130<sup>FLY</sup> durch Abspaltung des Fc-Fragmentes nicht zur verminderten Hemmung des IL-6 *Trans-Signalings in vitro* führte, sondern ganz im Gegenteil, im Vergleich zum monomeren Fusionsprotein cs-130 oder dimeren sgp130Fc zur Erhöhung der IL-6 Affinität und damit zur stärkeren Hemmung des IL-6 *Trans-Signalings in vitro* beitrug.

#### 4.6. Fehlende Hemmung des IL-11 *Trans-Signalings* durch monomere cs-130-Varianten

Um herauszufinden inwieweit sich die Monomerisierung von cs-130<sup>FLY</sup> auf die Hemmung des IL-11 *Trans-Signaling* auswirkt, wurde ein konzentrationsabhängiger zellbasierter IL-11 *Trans-Signaling* Proliferationsassay im Vergleich mit den Proteinen sgp130Fc und cs-130 durchgeführt (**Abb. 20**).

Hierfür wurden Ba/F3-gp130 Zellen mit je 10 ng/ml IL-11 und 100 ng/ml sIL-11R zur Proliferation stimuliert. Anschließend erfolgte die inhibitorische Konzentrationsreihe mit cs-130<sup>FLY</sup>, dem monomeren Protein cs-130 und sgp130Fc. Ansteigende Hemmkonzentrationen der Proteine wurden für das IL-11 *Trans-Signaling* verwendet und die Zellproliferation nach 72 h mittels eines *Cell-Titer-Blue* Assays (Promega) quantifiziert.



**Abb. 20: Keine Inhibition des IL-11 *Trans-Signalings* durch monomeres cs-130<sup>FLY</sup> im Proliferationsassay**  
Ba/F3-gp130 Zellen wurden mit 10 ng/ml IL-11 und 100 ng/ml sIL-11R inkubiert und ansteigende Konzentrationen des gereinigten cs-130<sup>FLY</sup> wurden im Vergleich mit sgp130Fc und monomeren cs-130 aufgetragen. Nach 72-stündiger Inkubation (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) wurden den Proben *Cell-Titer-Blue* hinzugefügt und eine Messung der Proliferation am *Tecan Infinite M200 pro Reader* durchgeführt. Für jedes inhibitorische Protein wurde das Experiment in gleicher Ausführung drei Mal wiederholt und ein Mittelwert des Zellwachstums bestimmt.

Eine Übersicht über die halbmaximale inhibitorische Konzentration (IC<sub>50</sub>) der Inhibitoren ist in **Tabelle 18** dargestellt. Im Kontrast zur Hemmung des IL-11 *Trans-Signalings* durch sgp130Fc mit 10 nM vollständiger Inhibition, wurde für monomeres cs-130<sup>FLY</sup> und cs-130 keine IL-11 *Trans-Signaling* Hemmung beobachtet. Auf Basis der inhibitorischen halbmaximalen Konzentration (IC<sub>50</sub>) wurden diese Ergebnisse nochmals bestätigt. Hierbei zeigte sgp130Fc als einziges Protein eine deutliche Hemmung des IL-11 *Trans-Signalings* bei  $0,62 \pm 0,41$  nM und bestätigte somit zuvor ermittelte Ergebnisse dieser Arbeit.

**Tabelle 18: Inhibitorisches Profil von cs-130<sup>FLY</sup>, cs-130 und sgp130Fc für das IL-11 *Trans-Signaling***

Ba/F3-gp130 Zellen wurden mit 10 ng/ml IL-11 und 100 ng/ml sIL-11R zur Proliferation stimuliert. Ansteigende Hemmkonzentrationen [0,001 – 100 nmol/l] von cs-130<sup>FLY</sup>, sgp130Fc und cs-130 wurden eingesetzt und IC<sub>50</sub>-Werte für jeden Inhibitor ermittelt. IC<sub>50</sub>-Werte wurden für sgp130Fc für n=9 Experimente berechnet, während die restlichen Inhibitoren auf der Basis von n=3 Experimenten berechnet wurden.

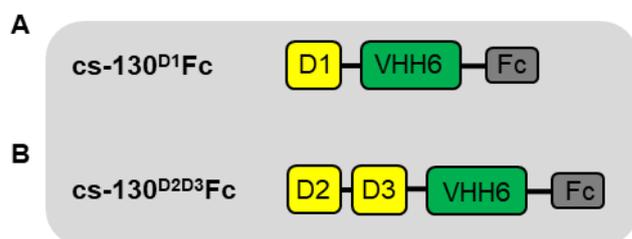
Inhibitor	Zytokinstimulation	IC <sub>50</sub>	
Bezeichnung	ng/ml	ng/ml	nM
sgp130Fc	IL-11/sIL-11R (10/100)	160,1 ± 106,8	0,62 ± 0,41
cs-130 <sup>FLY</sup>	IL-11/sIL-11R (10/100)	Keine Inhibition	Keine Inhibition
cs-130	IL-11/sIL-11R (10/100)	Keine Inhibition	Keine Inhibition

Diese Daten zeigen, dass cs-130<sup>FLY</sup>Fc sowohl als Monomer als auch als Dimer, nicht in der Lage war, das IL-11 *Trans-Signaling in vitro* zu hemmen. Im Gegensatz dazu, wurde für dimeres cs-130Fc eine Hemmung des IL-11 *Trans-Signaling*s beobachtet, während monomeres cs-130 diese Hemmungen nicht zeigte. Das Referenzprotein sgp130Fc hingegen zeigte gleichermaßen sowohl Hemmungen des IL-6 *Trans-Signaling*s als auch Hemmungen des IL-11 *Trans-Signaling*s.

#### 4.7. Versuch der Herstellung von cs-130<sup>D2D3</sup> durch TEV-Spaltung von cs-130<sup>D1TEVD2D3</sup>Fc

In vorangegangenen medizinischen Doktorarbeiten von Selina Hansen wurde eine Größenreduktion von cs-130-Varianten bereits durch die Generierung von cs-130<sup>D1</sup>Fc und cs-130<sup>D2D3</sup>Fc beschrieben (Hansen, 2021).

Die verkleinerte cs-130-Variante cs-130<sup>D1</sup>Fc bestand lediglich aus der D1-Domäne von gp130, dem VHH6 und dem über einen Linker verbundenen Fc-Fragment (**Abb. 21A**). Die cs-130-Variante cs-130<sup>D2D3</sup>Fc hingegen bestand aus den Domänen D2 und D3 von gp130, welche über den VHH6 und Linker mit dem Fc-Fragment verbunden sind (**Abb. 21B**).



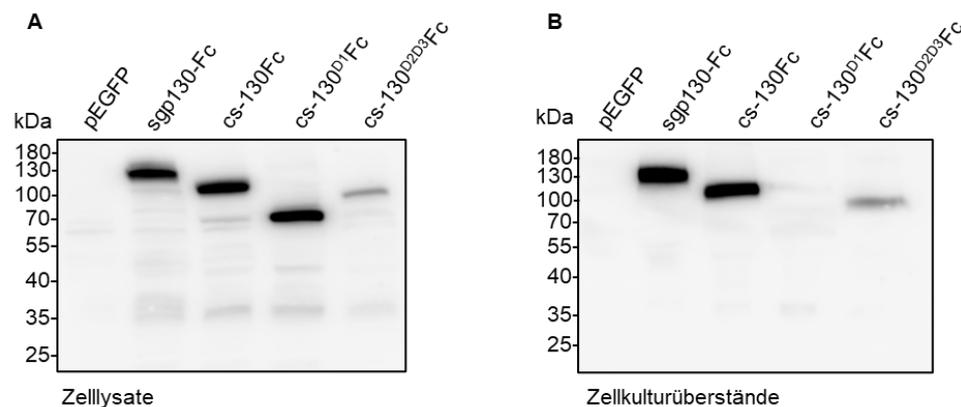
**Abb. 21: Schematische Darstellung von verkleinerten cs-130-Varianten**

(A) cs-130<sup>D1</sup>Fc. Die D1-Domäne von gp130 ist über einen Linker mit dem VHH6 und daran anschließenden Fc-Fragment fusioniert. (B) cs-130<sup>D2-D3</sup>Fc. Die Domänen D2-D3 von gp130 sind über einen Linker mit dem VHH6 und daran anschließenden Fc-Fragment fusioniert.

Da es sich in der Arbeit von Selina Hansen lediglich um eine transiente Transfektion in CHO-K1 Zellen gehandelt hat, war die Idee in dieser Arbeit reine Proteine, definierter Menge durch stabile Transfektion der CHO-K1 Zellen mit anschließender Proteinreinigung zu generieren.

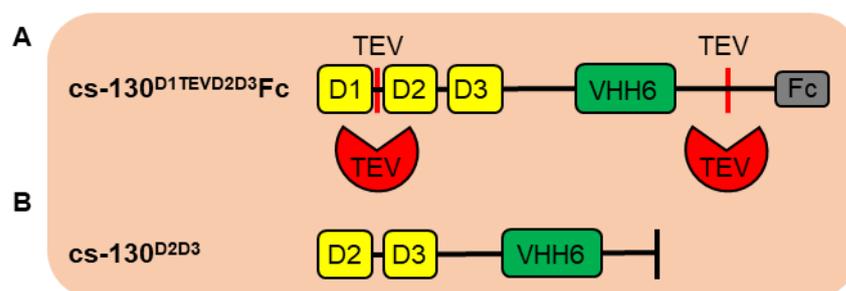
Nach zunächst transients Transfektion der Expressionsplasmide pcDNA3.1-pEGFP, pcDNA3.1-sgp130Fc, pcDNA3.1-cs-130Fc, pcDNA3.1-cs-130<sup>D1</sup>Fc und pcDNA3.1-cs-130<sup>D2D3</sup>Fc in CHO-K1 Zellen und Detektion der exprimierten rekombinanten Proteine im Western Blot mittels humanen Fc-POD Antikörper (**Abb. 22**), zeigte sich, dass nur sehr geringe

Mengen der cs-130-Varianten cs-130<sup>D1</sup>Fc oder cs-130<sup>D2D3</sup>Fc im Zellkulturüberstand nachzuweisen waren. Damit wurden die Ergebnisse von Frau Hansen bestätigt (Hansen, 2021).



**Abb. 22: Expression von cs-130Fc-Varianten nach Transfektion von CHO-K1 Zellen mit Plasmid-DNA**  
 Detektion von Zelllysaten (A) und Zellkulturüberständen (B) transient in CHO-K1 Zellen exprimierter Proteine mittels Western Blot durch humanen Anti-Fc-POD. Sgp130Fc wurde hierbei als Vergleichsprotein herangezogen.

Aufgrund der geringen Expression von cs-130<sup>D2D3</sup>Fc, sollte daher eine alternative Strategie zu einer cs-130-Variante führen, die die Klonierung von cs-130<sup>D1TEVD2D3</sup>Fc (Abb. 23A) beinhaltet. Diese cs-130-Variante bestand aus den ersten drei Domänen von gp130, wobei zwischen der ersten und zweiten Domäne eine TEV-Site integriert wurde. Wie bei allen anderen cs-130-Varianten, ist auch bei cs-130<sup>D1TEVD2D3</sup>Fc die D1-D3-Region mit dem VHH6 verbunden und über eine zweite TEV-Site mit dem Fc-Fragment fusioniert. Eine erste Spaltung der TEV-Site zwischen der D1 und D2-Domäne, sowie eine zweite Spaltung der TEV-Site zwischen dem VHH6 und Fc-Fragment hätte eine Verkleinerung von cs-130<sup>D1TEVD2D3</sup>Fc zur Folge, so dass lediglich die Domäne D2-D3 mit dem VHH6 fusioniert blieben (Abb. 23B).



**Abb. 23: Schematische Darstellung von cs-130<sup>D1TEVD2D3</sup>Fc und cs-130<sup>D2D3</sup>**  
 (A) cs-130<sup>D1TEVD2D3</sup>Fc. Domäne D1 von gp130 ist über eine TEV-Site mit den Domänen D2-D3 von gp130 verbunden. Über einen Linker schließt sich der VHH6 an, welcher wiederum über eine zweite TEV-Site mit dem Fc-Fragment fusioniert ist. Über einer Spaltung des Proteins mittels TEV-Protease kann theoretisch eine verkleinerte cs-130-Variante generiert werden. (B) cs-130<sup>D2D3</sup>. Eine erste Spaltung zwischen der D1 und D2-Domäne sowie die zweite Spaltung zwischen dem VHH6 und Fc-Fragment verkleinert das cs-130<sup>D1TEVD2D3</sup>Fc wesentlich, so dass lediglich die Domäne D2-D3 mit dem VHH6 fusioniert bleiben.

Dieser Gedanke wurde bereits in Arbeiten der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Jürgen Scheller in Form der Klonierung des Expressionsplasmids pcDNA3.1-cs-130<sup>D1TEVD2D3</sup>Fc begonnen.

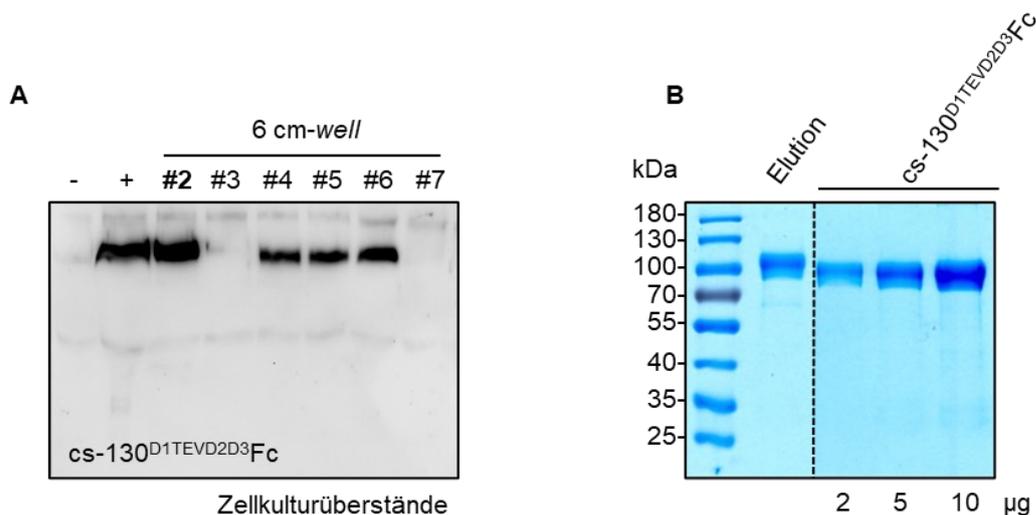


**Abb. 24: Sequenzvergleich von cs-130Fc und cs-130<sup>D1TEVD2D3</sup>Fc**

Ein Ausschnitt der DNA-Sequenzen von cs-130Fc und cs-130<sup>D1TEVD2D3</sup>Fc sind in Form der Aminosäuresequenz zum Vergleich beider Sequenzen dargestellt. Dabei ist an Position S<sup>123</sup> die Aminosäuresequenz für die TEV-Site von cs-130<sup>D1TEVD2D3</sup>Fc in rot markiert. Die Aminosäuresequenz der Linker-Region (blau) zwischen der D1- und D2-Domäne ist für beide Proteine identisch.

Hierbei wurde wie in **Abb. 24** zu sehen, nachfolgend an die D1-Region von cs-130Fc an Position S<sup>123</sup> die Aminosäuresequenz für die TEV-Site [ENLYFQ/S, Spaltung zwischen Q und S] kloniert (Kapust et al., 2002, Parks et al., 1994). Daran anschließend folgt ab Position G<sup>130</sup> die natürliche Linker-Region zwischen der D1- und D2-Domäne von gp130 (Xu et al., 2010, Chow et al., 2001). An die natürliche Linker-Region von gp130 schließt ab Position K<sup>137</sup> an die D2-Domäne. Somit wurde für cs-130<sup>D1TEVD2D3</sup>Fc die TEV-Site direkt vor den Beginn der Linkerregion von cs-130Fc kloniert.

In dieser Arbeit wurde das Expressionsplasmid pcDNA3.1-cs-130<sup>D1TEVD2D3</sup>Fc wurde, wie in Abschnitt 3.10.5 beschrieben, in CHO-K1 Zellen stabil transfiziert (**Abb. 25A**).



**Abb. 25: Einzelklonselektion von cs-130<sup>D1TEVD2D3</sup>Fc zur stabilen Transfektion in CHO-K1 Zellen und Detektion in der SDS-Page nach erfolgter Proteinreinigung**

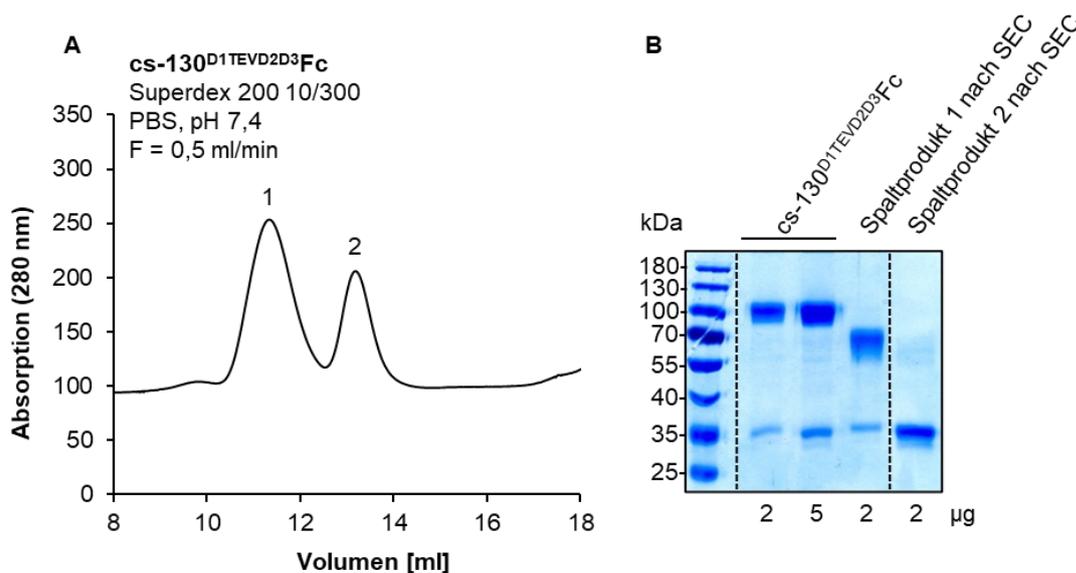
(A) Die Plasmid DNA von cs-130<sup>D1TEVD2D3</sup>Fc wurde in CHO-K1 Zellen transfiziert und stabile Klone wurden generiert. Die Detektion der Zellkulturüberstände erfolgte durch *Western blotting* mittels humanen anti-Fc-POD. Für weitere Arbeiten wurde Klon #2 ausgewählt. (B) SDS-Page Analyse mittels *Coomassie Brilliant Blue* Färbung nach Proteinreinigung von cs-130<sup>D1TEVD2D3</sup>Fc. Dabei wurden 2, 5 und 10 µg gereinigtes Protein auf das SDS-Gel aufgetragen.

Eine Selektion der Zellen, die cs-130<sup>D1TEVD2D3</sup>Fc exprimierten, erfolgte durch mehrfaches Passagieren der Zellen unter Verwendung des Selektion-Antibiotikums Geneticin (G418) und wiederholter Kontrolle des Zellkulturüberstandes von cs-130<sup>D1TEVD2D3</sup>Fc im Western Blot

mittels humanen Fc-POD Antikörper. Letztlich wurde der stabile Klon #2 ausgewählt. Um größere Proteinmengen zu generieren, wurden stabile Zellen des Klons #2 in das *Rollerbottle*-System (s. Abschnitt 3.10.8) überführt. Dabei wurden 1,2 l Zellkulturüberstand generiert und das rekombinante Protein cs-130<sup>D1TEVD2D3</sup>Fc mit Hilfe der Protein A Säule, wie in Abschnitt 3.9.6 beschrieben, gereinigt. Gereinigtes cs-130<sup>D1TEVD2D3</sup>Fc wurde durch die *SDS-Page* (s. Abschnitt 3.9.5) in Bezug auf die Reinheit und Größe analysiert (**Abb. 25B**).

Hierfür wurden je 2, 5 und 10 µg Protein mit der Elutionsfraktion verglichen, so dass für cs-130<sup>D1TEVD2D3</sup>Fc ein Molekulargewicht von ca. 100 kDa ermittelt wurde. Insgesamt wurde 1,23 mg cs-130<sup>D1TEVD2D3</sup>Fc aus 1,2 l Zellkulturüberstand gereinigt.

Um das gereinigte cs-130<sup>D1TEVD2D3</sup>Fc zu spalten, wurde 0,5 mg/ml Protein 0,5 mg/ml TEV-Protease über Nacht bei 4°C inkubiert und die Spaltprodukte mittels Größenausschlusschromatographie voneinander getrennt (**Abb. 26A**).

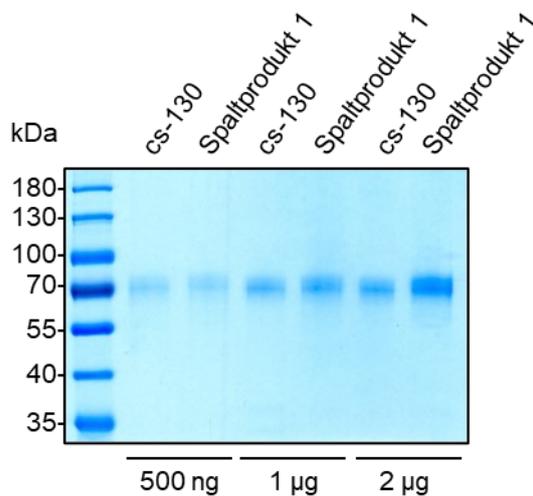


**Abb. 26: Trennung von gespaltenem cs-130<sup>D1TEVD2D3</sup>Fc mittels SEC und anschließender SDS-Page**  
**(A) Größenausschlusschromatographie (SEC, *size exclusion chromatography*).** Die Filtration erfolgte durch die Chromatographiesäule Superdex 200 10/300 GL. Die Elution der geladenen Proteine wurde mit PBS bei einem pH von 7,4 und einer Durchflussgeschwindigkeit  $F = 0.5$  ml/min durchgeführt. Eine Lichtabsorption der getrennten Spaltprodukte erfolgte bei einer Wellenlänge von 280 nm. Moleküle mit höherem Molekulargewicht wurden zuerst eluiert (1) Spaltprodukt 1, dann folgten kleinere Proteine mit geringerem Molekulargewicht (2) wie dem Spaltprodukt 2. **(B) SDS-Page Analyse nach TEV-Spaltung und Trennung der Spaltprodukte mittels SEC.** Die SDS-Page Analyse mittels *Coomassie Brilliant Blue* Färbung erfolgte nach TEV-Spaltung von cs-130<sup>D1TEVD2D3</sup>Fc und Auftrennung der Spaltprodukte mittels SEC. Dabei wurden 2 µg und 5 µg des bereits gereinigten Proteins cs-130<sup>D1TEVD2D3</sup>Fc zum Vergleich auf das SDS-Gel aufgetragen und mit 2 µg des getrennten Spaltprodukts 1 und Spaltprodukt 2 aus der SEC hinsichtlich der Reinheit und Größe verglichen.

Dabei erfolgte die Filtration des mit TEV-Protease gespaltenen cs-130<sup>D1TEVD2D3</sup>Fc unter Einsatz der Chromatographiesäule wie in Abschnitt 3.9.8 beschrieben. Obwohl drei Spaltprodukte (D1-Domäne, cs130<sup>D2D3</sup> und Fc) erwartet wurden, wurden nur zwei Spaltprodukte in der SEC

detektiert, wobei die Proteine der Größe nach voneinander getrennt wurden. Eine Kontrolle der Spaltprodukte 1 und 2 erfolgte mittels *SDS-Page* im Vergleich zum bereits gereinigten cs-130<sup>D1TEVD2D3</sup>Fc. Dabei wurden 2 µg und 5 µg cs-130<sup>D1TEVD2D3</sup>Fc mit je 2 µg von Spaltprodukt 1 und Spaltprodukt 2 hinsichtlich der Reinheit und Größe verglichen (**Abb. 26B**). Dabei wurde eine deutliche Größenreduktion von ca. 70 kDa für Spaltprodukt 1 im Vergleich mit ca. 100 kDa für cs-130<sup>D1TEVD2D3</sup>Fc sichtbar, während das kleinere Spaltprodukt 2 eine Größenreduktion auf ca. 35 kDa aufwies.

Um das gereinigte Spaltprodukt 1 hinsichtlich der Größe ebenfalls mit der monomeren cs-130-Variante zu vergleichen, wurde eine weitere *SDS-Page* mit cs-130 und Spaltprodukt 1 im Vergleich durchgeführt (**Abb. 27**). Hierfür wurden je 500 ng, 1 µg und 2 µg von cs-130 und dem Spaltprodukt 1 aufgetragen und hinsichtlich der Größe und Reinheit analysiert. Wie in **Abb. 27** zu sehen, wurden für die gereinigten Proteine cs-130 und dem Spaltprodukt 1 ein Molekulargewicht von ca. 100 kDa ermittelt und daher nahezu kein Unterschied in Bezug auf das Molekulargewicht festgestellt.



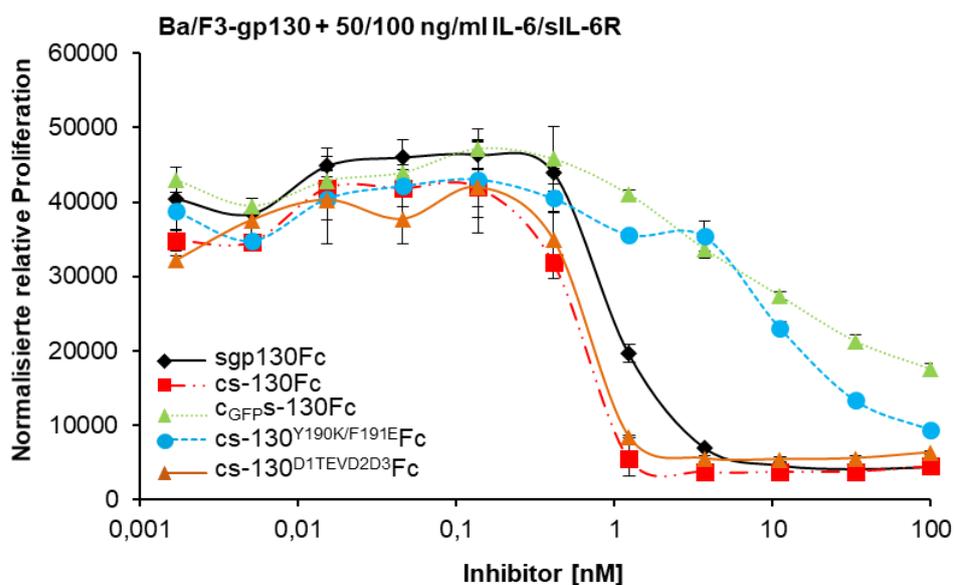
**Abb. 27: SDS-Page von cs-130 und Spaltprodukt 1 zum Vergleich der molekularen Größe**

Jeweils 500 ng, 1 µg und 2 µg von cs-130 und Spaltprodukt 1 wurden auf das SDS-Gel aufgetragen. Die Färbung des SDS-Gels erfolgte mittels *Coomassie Brilliant Blue*.

In der Zusammenschau der Ergebnisse der *SDS-Page* von **Abb. 26** und **Abb. 27** sowie den Ergebnissen aus der Größenausschlusschromatographie ist davon auszugehen, dass die Abspaltung der D1-Domäne von gp130 nicht erfolgreich war. Dadurch, dass keine dritte Fraktion in der SEC (*size exclusion chromatography*) gemessen werden konnte und eine Größendifferenz zwischen cs-130 und cs-130<sup>D2D3</sup> in der *SDS-Page* nicht nachzuweisen war, erfolgte nur die Abspaltung des Fc-Fragments von cs-130<sup>D1TEVD2D3</sup>Fc (**Abb. 27B**, Spaltprodukt 2). Dies deutete darauf hin, dass die *TEV-Site* zwischen der D1- und der D2-

Domäne von  $\text{cs-130}^{\text{D1TEVD2D3}}$ Fc für die TEV-Protease nicht zugänglich war. Es blieb daher die Frage offen, inwieweit dieser vergrößerte Bereich, durch Einsatz der TEV-Site zwischen der D1- und D2-Domäne, Einfluss auf die Hemmeffektivität von  $\text{cs-130}^{\text{D1TEVD2D3}}$ Fc im IL-6 *Trans-Signaling* hat.

Daher wurde daran anschließend ein IL-6 *Trans-Signaling* Proliferationsassay (s. Abschnitt 3.10.6) mit Verwendung von Ba/F3-gp130 Zellen und Stimulation durch 50 ng/ml IL-6, sowie 100 ng/ml sIL-6R durchgeführt (**Abb. 28**). Dabei wurden ansteigende Hemmkonzentrationen der Inhibitoren verwendet und die Hemmeffektivität von  $\text{cs-130}^{\text{D1TEVD2D3}}$ Fc mit der Hemmeffektivität von sgp130Fc und cs-130Fc verglichen. Zur Kontrolle wurden  $\text{c}_{\text{GFPs-130Fc}}$  und  $\text{cs-130}^{\text{Y190K/F191E}}$ Fc ebenfalls in ansteigender Hemmkonzentration getestet. Eine Messung und Auswertung der Zellproliferation zur Bestimmung der Hemmeffektivität erfolgte nach 72 h durch den *Cell-Titer-Blue* Assays (Promega).



**Abb. 28: Inhibition des IL-6 *Trans-Signaling* durch  $\text{cs-130}^{\text{D1TEVD2D3}}$ Fc im Proliferationsassay**

Ba/F3-gp130 Zellen wurden mit 50 ng/ml IL-6 und 100 ng/ml sIL-6R inkubiert und ansteigende Konzentrationen der cs-130Fc-Varianten und sgp130Fc wurden hinzugegeben. Nach 72-stündiger Inkubation (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) wurden den Proben *Cell-Titer-Blue* hinzugefügt und eine Messung der Proliferation am *Tecan Infinite M200 pro Reader* durchgeführt. Für jedes inhibitorische Protein wurde das Experiment in gleicher Ausführung drei Mal wiederholt und ein Mittelwert des Zellwachstums bestimmt.

In diesem IL-6 *Trans-Signaling* Proliferationsassay (**Abb. 28**) zeigte  $\text{cs-130}^{\text{D1TEVD2D3}}$ Fc eine vergleichbare Hemmung des IL-6 *Trans-Signaling*s wie cs-130Fc bei bereits 5 nM, während sgp130Fc eine vollständige Hemmung der Zellproliferation erst bei 10 nM aufwies. Eine Übersicht der inhibitorischen halbmaximalen Konzentrationen (IC<sub>50</sub>) der Inhibitoren ist in **Tabelle 19** dargestellt. Die dargestellten IC<sub>50</sub>-Werte bestätigten die vergleichbare inhibitorische

Effektivität der Fusionsproteins  $cs-130^{D1TEVD2D3}Fc$  ( $IC_{50}$ :  $0,78 \pm 0,30$  nM) und  $cs-130Fc$  ( $IC_{50}$ :  $0,33 \pm 0,18$  nM), während  $sgp130Fc$  ( $IC_{50}$ :  $0,97 \pm 0,62$  nM) das IL-6 *Trans-Signaling* weniger effektiv hemmte. Die Kontrollproteine  $c_{GFPS}-130Fc$  und  $cs-130^{Y190K/F191E}Fc$  zeigten hingegen erneut reduzierte Hemmungen des IL-6 *Trans-Signalings*. Dabei konnte auch durch den Einsatz von 100 nM  $c_{GFPS}-130Fc$  und  $cs-130^{Y190K/F191E}Fc$  keine vollständige Inhibition des IL-6 *Trans-Signalings* gezeigt werden, was durch die Berechnung entsprechender  $IC_{50}$ -Werte bestätigt wurde.

**Tabelle 19: Inhibitorisches Profil von  $sgp130Fc$  und  $cs-130Fc$ -Varianten im Vergleich mit  $cs-130^{D1TEVD2D3}Fc$**  Ba/F3-gp130 wurden mit 50 ng/ ml IL-6 und 100 ng/ ml sIL-6R zur Proliferation stimuliert. Ansteigende Hemmkonzentrationen [0,001 – 100 nmol/l] von  $sgp130Fc$  und  $cs-130Fc$ -Varianten und  $cs-130^{D1TEVD2D3}Fc$  wurden eingesetzt und  $IC_{50}$ -Werte für jeden Inhibitor ermittelt.

Inhibitor	Zytokin-Stimulation	$IC_{50}$	
Bezeichnung	ng/ml	ng/ml	nM
$sgp130Fc$	IL-6/sIL-6R (50/100)	$252,0 \pm 162,2$	$0,97 \pm 0,62$
$cs-130Fc$	IL-6/sIL-6R (50/100)	$61,9 \pm 34,0$	$0,33 \pm 0,18$
$cs-130^{D1TEVD2D3}Fc$	IL-6/sIL-6R (50/100)	$148,3 \pm 57,7$	$0,78 \pm 0,30$
$c_{GFPS}-130Fc$	IL-6/sIL-6R (50/100)	$1243,0 \pm 957,6$	$6,54 \pm 5,04$
$cs-130^{Y190K/F191E}Fc$	IL-6/sIL-6R (50/100)	$1963,3 \pm 1153,9$	$7,55 \pm 6,07$

Zusammenfassend wurde durch diesen IL-6 *Trans-Signaling* Proliferationsassay gezeigt, dass  $cs-130^{D1TEVD2D3}Fc$  ähnlich effektive Hemmungen des IL-6 *Trans-Signaling* aufwies, wie das Fusionsprotein  $cs-130Fc$ . Insbesondere im Vergleich mit  $sgp130Fc$  zeigte das Fusionsprotein  $cs-130^{D1TEVD2D3}Fc$  eine verbesserte Hemmeffektivität des IL-6 *Trans-Signalings*. Interessanterweise störte die TEV-Site zwischen der D1- und D2-Domäne von  $cs-130^{D1TEVD2D3}Fc$  die Hemmaktivität des Proteins nicht, daher ist eine weitere Modifikation der Linker-Region zwischen der D1- und D2-Region sehr wahrscheinlich möglich. Da jedoch eine Spaltung zwischen der D1- und D2-Region nicht erfolgreich war, wurde auf die Durchführung einer weiteren Hemmkurve für das Spaltprodukt 1, was sehr wahrscheinlich dem  $cs-130$  inkl. konsistenter TEV-Site zwischen der D1- und D2 Region entspricht, verzichtet. Für zukünftige Projekte könnte die TEV-Site entweder versetzt oder die Linker-Region durch Einfügen weiterer Aminosäuren verlängert werden, um zu gewährleisten, dass die TEV-Protease für die TEV-Site zugänglich ist und die Abspaltung der D1-Domäne erfolgen kann.

#### 4.8. Hemmung der intrazellulären Signale des IL-6 *Trans-Signalings* durch cs-130-Varianten

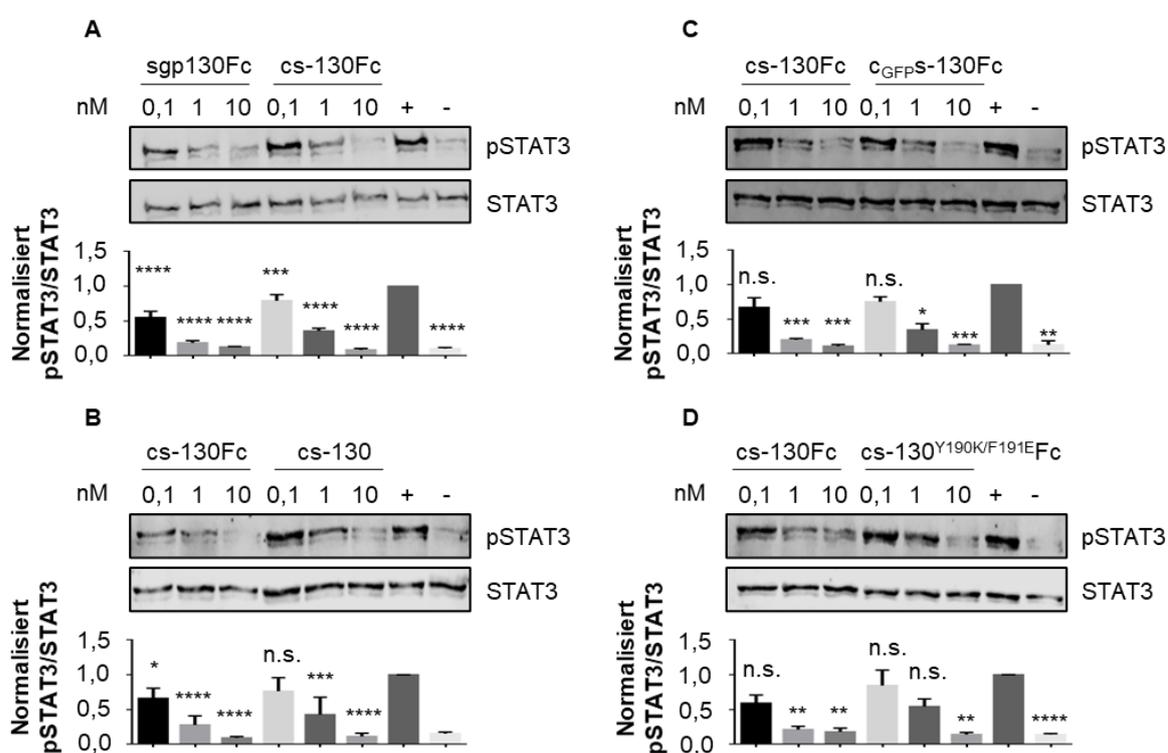
Eine Hemmung des IL-6 *Trans-Signalings* durch die unterschiedlichen cs-130-Varianten wurde bereits in zahlreichen zellbasierten Proliferationsassays dieser Arbeit beschrieben. Wie aber eine Hemmung der intrazellulären Signalkaskade durch vorherige Stimulation mit den Einzelkomponenten IL-6 und sIL-6R durch die cs-130Fc-Varianten im Vergleich mit sgp130Fc gelingen kann, wurde bisher nicht getestet. Experimente bei denen eine Testung dieser Inhibitoren durch Stimulation von Ba/F3 Zellen mit Hyper-IL-6 erfolgte, wurden bereits in einer vorherigen (noch unverteidigten) medizinischen Doktorarbeit von Frau Dambietz gezeigt (Dambietz, 2022).

Daher wurden die bisher getesteten IL-6 *Trans-Signaling* Inhibitoren sgp130Fc, die aktiven cs-130-Varianten cs-130Fc und cs-130, sowie die cs-130-Kontrollvarianten, c<sub>GFPS</sub>-130Fc und cs-130<sup>Y190K/F191E</sup>Fc in Bezug auf die Hemmeffizienz der intrazellulären Signale STAT3/pSTAT3 und ERK/pERK untersucht.

Hierzu wurden Stimationsassays, wie in Abschnitt 3.10.7 beschrieben, durchgeführt. Zunächst wurden die zu untersuchenden Inhibitoren für 15 min bei 37 °C mit den Zytokinen IL-6 (50 ng/ml) und sIL-6R (100 ng/ml) inkubiert. Dann erfolgte die Stimulation der Ba/F3-gp130 Zellen mit IL-6 und dem sIL-6R, sowie dem jeweiligen Inhibitor in aufsteigenden Konzentration [0,1, 1 und 10 nM] für 30 min bei 37 °C im Inkubator. Nach erfolgter Zentrifugation erfolgte die Lyse der Zellen wie in Abschnitt 3.9.1 beschrieben. Die Bestimmung des Proteingehaltes wurde durch das *BCA Protein Assay Kit* wie in Abschnitt 3.9.2 durchgeführt. Für jeweils zwei der zu untersuchenden Inhibitoren (sgp130Fc und cs-130Fc; cs-130Fc und cs-130; cs-130Fc und c<sub>GFPS</sub>-130Fc; cs-130Fc und cs-130<sup>Y190K/F191E</sup>Fc) wurden Proben wie in **Abb. 29** und **Abb. 30** und zu sehen, aufgetragen und mittels *SDS-Page* (s. Abschnitt 3.9.3) und Western Blot (s. Abschnitt 3.9.4) nachgewiesen.

Hierzu wurden einerseits Antikörper verwendet, die die intrazellulären Signale STAT3/pSTAT3 (**Abb. 29**) nachweisen, sowie andererseits Antikörper verwendet, die die intrazellulären Signale ERK/ pERK (**Abb. 30**) nachweisen konnten. Die Quantifizierungen der Western Blots (n=3) erfolgte mit den in Abschnitt 3.11 verwendeten Methoden. Dabei wurden die resultierenden Intensitäten auf die Positivkontrollen normiert. Die Western Blot Signale wurden mittels ANOVA Test auf statistische Signifikanzen untersucht.

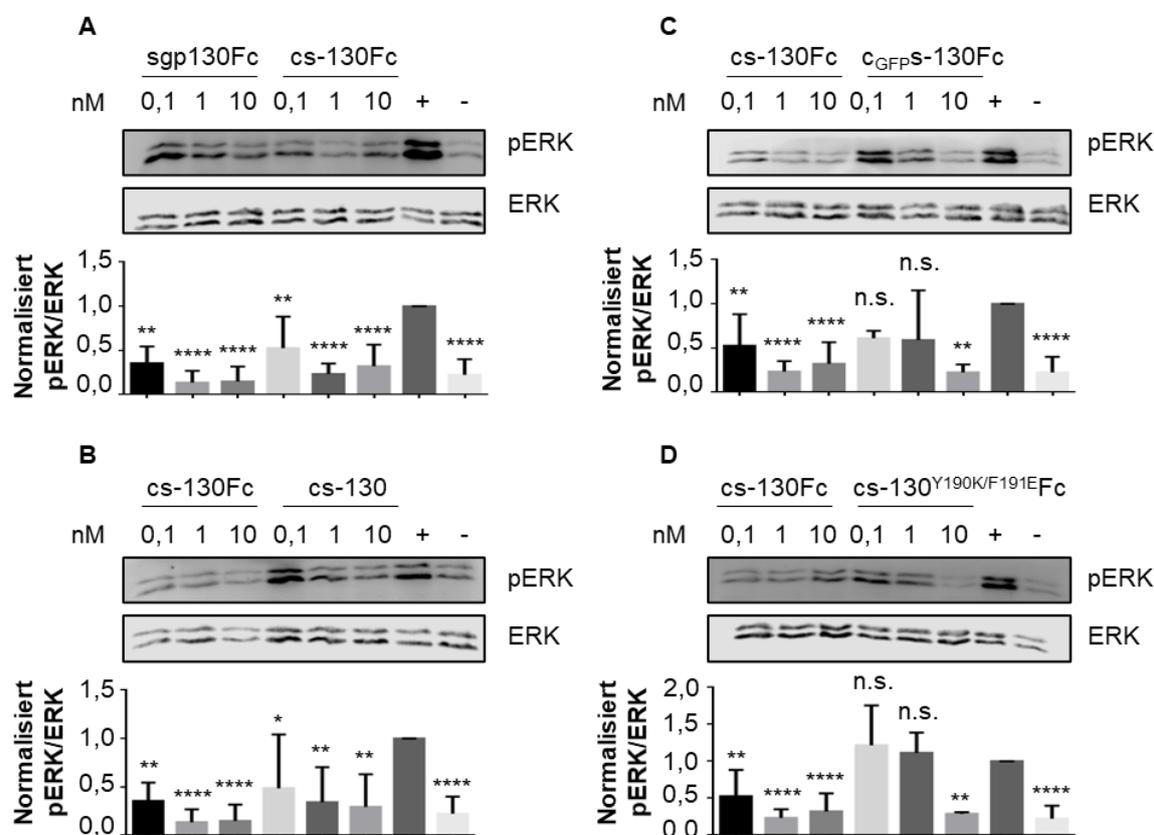
Wie in **Abb. 29A** zu sehen, wurde eine vollständige Inhibition der Phosphorylierung des STAT3-Signals durch sgp130Fc bei 10 nM erreicht. Bei einer Inhibitorkonzentration von 1 nM war eine reduzierte Hemmung von pSTAT3 zu erkennen, wohingegen bei 0,1 nM Inhibitorkonzentration nur eine minimale Hemmung des pSTAT3-Signals gemessen wurde. Das inhibitorische Protein cs-130Fc erwies sich bereits im Proliferationsassay als potenter Inhibitor des IL-6 *Trans-Signalings* und zeigte ebenfalls ein vergleichbares inhibitorisches Potential auf die Inhibierung des pSTAT3-Signals wie sgp130Fc. Das monomere Protein cs-130 (**Abb. 29B**) zeigte eine vollständige Inhibition von pSTAT3 bei 10 nM und reduzierte Inhibition des pSTAT3-Signals bei 1 nM. Die Konzentration von 0,1 nM des Proteins cs-130 reichte hingegen nicht aus, ähnlich wie bei dem dimeren sgp130Fc, um eine Hemmung der Phosphorylierung von STAT3 zu erreichen. Die affinitätsgeschwächten cs-130-Kontrollvarianten c<sub>GFP</sub>S-130Fc und cs-130<sup>Y190K/F191E</sup>Fc (**Abb. 29C** und **Abb. 29D**) zeigten hemmende Aktivitäten erst bei 10 nM.



**Abb. 29: Hemmung des IL-6 *Trans-Signalings* durch sgp130Fc und cs-130-Varianten und Detektion von pSTAT3/ STAT3 im Western Blot**

Ba/F3-gp130 Zellen wurden für 30 min mit IL-6 (50 ng/ml) und sIL-6R (100 ng/ml) stimuliert. Die Positivkontrolle (“+”) enthält keinen Inhibitor, aber Zytokinstimulation mit IL-6/sIL-6R, während die Negativkontrolle (“-”) keine Stimulation durch Zytokine und keinen Inhibitor enthält. Absteigende Konzentrationen von sgp130Fc und cs-130-Varianten [0,1, 1, 10 nM] wurde den mit IL-6/sIL-6R stimulierten Zellen hinzugegeben. Zuvor wurden die Inhibitoren gemeinsam mit IL-6 und dem sIL-6R für 30 min inkubiert. Der Nachweis von STAT3 (pSTAT3) wurde im Western Blot detektiert. Alle Western Blots wurden in dreifacher Weise wiederholt und vergleichbare Ergebnisse erzielt. Die Quantifizierungsdaten inkl. der Standardabweichungen wurden mittels *analysis of variance (ANOVA)* Test und *Dunnett’s correction* durchgeführt. Die Angaben der Signifikanzen entsprechen: \*P ≤ 0,05, \*\*P ≤ 0,01, \*\*\*P ≤ 0,001, \*\*\*\*P ≤ 0,0001 und n.s.= nicht signifikant.

Eine vollständige Inhibition der Phosphorylierung des ERK-Signals durch sgp130Fc wurde bei 10 nM erreicht (Abb. 30A).



**Abb. 30: Hemmung der intrazellulären Signale pERK/ ERK im IL-6 *Trans-Signaling* durch sgp130Fc und cs-130-Varianten**

Ba/F3-gp130 Zellen wurden für 30 min mit IL-6 (50 ng/ml) und sIL-6R (100 ng/ml) stimuliert. Die Positivkontrolle (“+”) enthält keinen Inhibitor, aber Zytokinstimulation mit IL-6/sIL-6R, während die Negativkontrolle (“-”) keine Stimulation durch Zytokine und keinen Inhibitor enthält. Absteigende Konzentrationen von sgp130Fc und cs-130-Varianten [0,1, 1, 10 nM] wurde den mit IL-6/sIL-6R stimulierten Zellen hinzugegeben. Zuvor wurden die Inhibitoren gemeinsam mit IL-6 und dem sIL-6R für 30 min inkubiert. Der Nachweis von ERK (pERK) wurde im Western Blot detektiert. Die Western Blots wurden in zweifacher Weise wiederholt und vergleichbare Ergebnisse wurden erzielt. Die Quantifizierungsdaten inkl. der Standardabweichungen wurden mittels *analysis of variance* (ANOVA) Test und *Dunnett’s correction* durchgeführt. Die Angaben der Signifikanzen entsprechen: \* $P \leq 0,05$ , \*\* $P \leq 0,01$ , \*\*\* $P \leq 0,001$ , \*\*\*\* $P \leq 0,0001$  und n.s.= nicht signifikant.

Eine minimale Hemmung des pERK-Signals wurde bei 1 nM festgestellt, während eine Inhibitorkonzentration von 0,1 nM keine Hemmung des pERK Signals zur Folge hatte. Das inhibitorische Protein cs-130Fc zeigte ähnliche inhibitorische Effekte auf das IL-6 *Trans-Signaling* im Stimulationsassay. Auch die Phosphorylierung von ERK wurde durch 10 nM Inhibitorkonzentration vollständig gehemmt, während bei 1 nM Inhibitorkonzentration eine minimale Hemmung und bei 0,1 nM keine Hemmung von pERK ersichtlich waren. Das monomere Protein cs-130 zeigte eine vollständige Inhibition von pERK bei 10 nM und reduzierte Inhibition des pERK-Signals bei 1 nM. Die Konzentration von 0,1 nM des Proteins cs-130 reichte nicht aus, ähnlich wie bei dem dimeren sgp130Fc, um eine Hemmung der

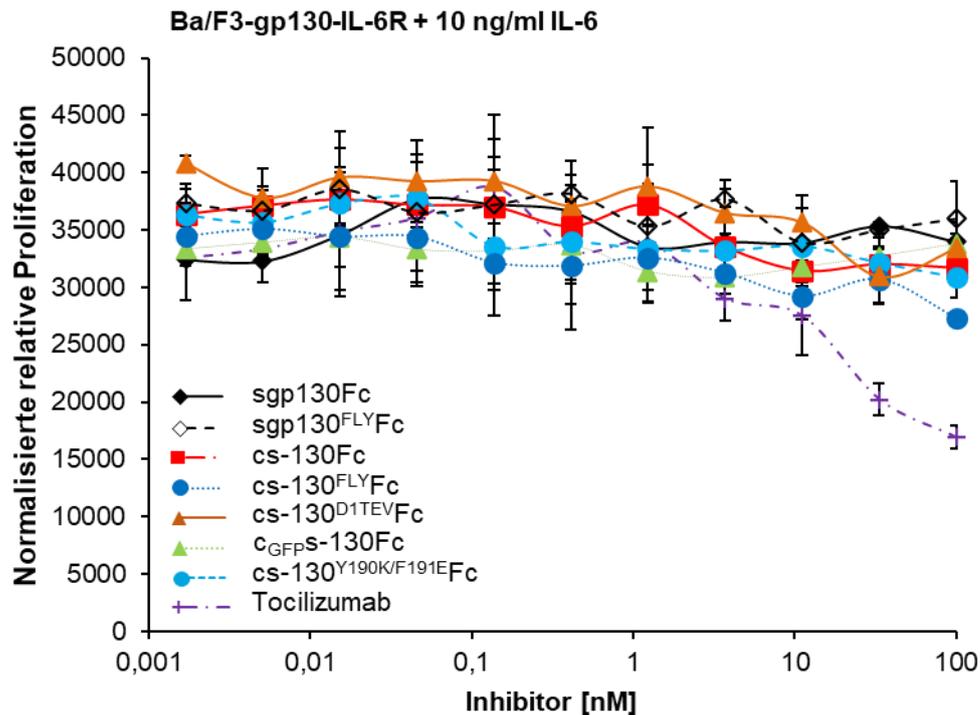
Phosphorylierung von ERK zu erreichen. Die affinitätsgeschwächten cs-130-Kontrollvarianten c<sub>GFP</sub>S-130Fc und cs-130<sup>Y190K/F191E</sup>Fc zeigten im Vergleich mit sgp130Fc und cs-130Fc nur eine reduzierte Hemmung ab 10 nM.

Insgesamt lässt sich sagen, dass eine Hemmung intrazellulärer Signale wie pSTAT3 und pERK durch sgp130Fc ähnlich effektiv auch durch cs-130Fc hervorgerufen werden konnte. Hierbei zeigte das monomere cs-130 im Vergleich mit cs-130Fc oder sgp130Fc interessanterweise nur minimal reduziertere Hemmungen der intrazellulären Signale des IL-6 *Trans-Signalings*, so dass sowohl das dimere cs-130Fc als auch das monomere cs-130 gegenüber dem sgp130Fc vergleichbare Inhibitoren des IL-6 *Trans-Signalings* hervorrufen konnten.

#### 4.9. Keine Hemmung des IL-6 *Classic-Signalings* durch cs-130Fc-Varianten

Das IL-6 *Classic-Signaling* wird in der Literatur mit antiinflammatorischen oder regenerativen Effekten des Körpers in Verbindung gebracht und aus diesen Gründen sollte eine Hemmung wahrscheinlich eher vermieden werden (Rose-John, 2020). Monoklonale Antikörper wie Tocilizumab werden in der Therapie humaner Erkrankungen eingesetzt, die nachweislich dazu in der Lage sind, das IL-6 *Classic-* und IL-6 *Trans-Signaling* hemmen. Lösliches gp130 (sgp130Fc) zeigt eine Spezifität für die Hemmung des IL-6 *Trans-Signalings*, kann aber, wenn es in erhöhten Dosen eingesetzt wird, IL-6 *Classic-Signaling* hemmen, wenn es einen molaren Überschuss von sIL-6R über IL-6 gibt. (Garbers et al., 2011). Aus diesem Grund wurden zur Kontrolle ebenfalls alle bisher entwickelten inhibitorischen Proteine im Vergleich mit sgp130Fc in einem zellbasierten IL-6 *Classic-Signaling* Proliferationsassay untersucht.

Hierzu wurden Ba/F3-gp130-IL-6R Zellen verwendet, die im Vergleich mit herkömmlichen Ba/F3-gp130 Zellen stabil transduzierte IL-6 Rezeptoren auf der Membranoberfläche tragen. Dies ermöglicht eine Untersuchung des IL-6 *Classic-Signalings in vitro*. Dabei wurden Ba/F3-gp130-IL-6R zunächst mit 10 ng/ml IL-6 zur Proliferation stimuliert und ansteigende Konzentrationen diverser cs-130-Varianten im Vergleich mit dem monoklonalen IL-6R Inhibitor Tocilizumab getestet (**Abb. 31**). Die Bestimmung der Zellproliferation und der Hemmeffektivität der Inhibitoren erfolgte nach 72 h durch den *Cell-Titer-Blue* Assay (Promega).



**Abb. 31: Keine Inhibition des IL-6 *Classic-Signalings* durch cs-130<sup>FLY</sup>Fc, sgp130<sup>FLY</sup>Fc, sgp130Fc und cs-130-Varianten**

Ba/F3-gp130-IL-6R Zellen wurden mit 10 ng/ml IL-6 inkubiert und ansteigende Konzentrationen der cs-130Fc-Varianten und sgp130Fc wurden hinzugegeben. Nach 72-stündiger Inkubation (37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>) wurden den Proben *Cell-Titer-Blue* hinzugefügt und eine Messung der Proliferation am *Tecan Infinite M200 pro Reader* durchgeführt. Für jedes inhibitorische Protein wurde das Experiment in gleicher Ausführung drei Mal wiederholt und ein Mittelwert des Zellwachstums bestimmt.

Ein Vergleich der Hemmkurven des IL-6 *Classic-Signalings* verdeutlicht, dass lediglich der IL-6 Rezeptorblocker Tocilizumab in der Lage war, das IL-6 *Classic-Signaling* zu hemmen. Auch wenn eine vollständige Hemmung durch Verwendung von 100 nM des Inhibitors nicht erreicht werden konnte, zeigte sich ein deutlicher Trend hin zur Inhibition des IL-6 *Classic-Signaling*. Die vergleichsweise schwache Hemmaktivität von Tocilizumab wurde bereits früher schon beschrieben (Garbers et al., 2011).

Die Fusionsproteine cs-130<sup>FLY</sup>Fc und cs-130<sup>D1TEVD2D3</sup>Fc, sowie die Referenzproteine sgp130Fc und cs-130Fc zeigten eine Spezifität für das IL-6 *Trans-Signaling*, nicht aber für das IL-6 *Classic-Signaling*. Die spezifische Mutation der D1-Region (D1<sup>FLY</sup>) von cs-130<sup>FLY</sup>Fc schien ebenfalls keinen Einfluss auf die Hemmung des IL-6 *Classic-Signalings* zu haben, da sgp130<sup>FLY</sup>Fc wie auch cs-130<sup>FLY</sup>Fc gleichermaßen nicht in der Lage waren das IL-6 *Classic-Signaling* zu hemmen. Die Hemmkurven der cs-130-Kontrollproteine cGFPs-130Fc und cs-130<sup>Y190K/F191E</sup>Fc zeigten ähnliche Ergebnisse, wie die der anderen cs-130-Varianten.

## 5 DISKUSSION

### 5.1. Cs-130-Varianten hemmen das IL-6 *Trans-Signaling* nach Stimulation mit IL-6 und sIL-6R

Interleukin 6 ist ein multifunktionales Zytokin. So ist IL-6 nicht nur Teil der Akute Phase Reaktion, sondern auch an regenerativen und antiapoptotischen Prozessen beteiligt. Diese Wirkungen von IL-6 werden eher dem IL-6 *Classic-Signaling* zugeschrieben, bei dem der IL-6R membrangebunden vorzufinden ist. Wohingegen das IL-6 *Trans-Signaling*, bei dem der IL-6 Rezeptor in löslicher Form vorliegt, nach Aktivierung durch IL-6 eher mit chronisch-entzündlichen oder autoimmunen Prozessen diverser Erkrankungen in Verbindung gebracht wird (Rose-John, 2012).

Ein bereits in der Klinik etablierter IL-6R-Blocker ist Tocilizumab. Tocilizumab wird in der Behandlung der rheumatoiden Arthritis eingesetzt und ist in der Lage den IL-6R sowohl in löslicher als auch in membrangebundener Form zu binden und zu blockieren. Dies führt dazu, dass nicht nur das IL-6 *Trans-Signaling*, sondern auch das IL-6 *Classic-Signaling* gleichermaßen gehemmt werden (Kang et al., 2019, Garbers et al., 2011). Im Gegensatz dazu wurde kürzlich das sgp130Fc als weiterer IL-6 Signalweg modulierender Hemmstoff im Rahmen einer Phase II Studie für Colitis Ulcerosa näher untersucht (Schreiber et al., 2021). Sgp130Fc hemmt im Gegensatz zum Tocilizumab das IL-6 *Classic-Signaling* nicht und wurde somit als spezifischer Hemmstoff des IL-6 *Trans-Signalings* beschrieben (Jostock et al., 2001, Lokau et al., 2016b). Weitere bisher beschriebene Inhibitoren des IL-6 Signalweges wie das sgp130-ELP (115 kDa), sgp130-E10Fc (110 kDa), sgp130His (110 kDa) oder das gp130-RAPS (50 kDa) zeigten zwar eine Reduktion der molekularen Größe im Vergleich mit sgp130Fc (130 kDa), konnten aber keine vergleichbare Hemmeffektivität zum sgp130Fc erreichen (Sommer et al., 2014, Lin et al., 2006, Jostock et al., 2001, Diamant et al., 1997). Eine Übersicht über die Unterschiede der IL-6 *Trans-Signaling* Hemmungen ist der **Tabelle 20** im Anhang zu entnehmen. Somit ist sgp130Fc bisher der potenteste Hemmstoff des IL-6 *Trans-Signalings*.

Ein Reduktion der molekularen Größe von Proteinen oder Antikörpern kann zur verbesserten Gewebepenetration führen und somit Zellen erreichen, die für Hemmstoffe wie sgp130Fc aufgrund der molekularen Größe nicht erreichbar sind (Li et al., 2016). Andererseits ist die Spezifizierung hinsichtlich des IL-6 *Trans-Signalings* wie beim sgp130Fc von Vorteil, um die eher regenerativen Eigenschaften des IL-6 *Classic-Signalings* nicht zu blockieren.

Um diese Spezifität für das IL-6 *Trans-Signaling* weiter zu verbessern und eine weitere Größenreduktion zu erreichen, wurden sog. cs-130-Varianten erstellt und charakterisiert (Heise et al., 2021). Die cs-130-Varianten beinhalten die Domänen D1-D3 von gp130, fusioniert an den VHH6, der über einen Linker mit einem IgG1-Fc-Fragment verbunden wurde. Das cs-130-Fc zeigte im Vergleich mit sgp130Fc (240 kDa, Dimer, inkl. Glykosylierungen) nicht nur eine Verkleinerung der molekularen Größe auf 157 kDa (Dimer, inkl. Glykosylierungen), sondern darüber hinaus auch eine verbesserte Hemmung des IL-6 *Trans-Signalings* als sgp130Fc (Heise et al., 2021). Der im cs-130Fc enthaltene Nanobody VHH6 stabilisierte hierbei die Bindung an IL-6/sIL-6R Komplexen (Adams et al., 2017).

In dieser Arbeit wurde dimeres cs-130Fc und monomeres cs-130 mit sgp130Fc und den cs-130Fc-Kontrollvarianten c<sub>GFPS</sub>-130Fc und cs-130<sup>Y190K/F191E</sup>Fc verglichen und nochmals in Bezug auf die Hemmung IL-6 *Trans-Signaling* untersucht. Während die intrazelluläre Stimulation der Zellen in vorherigen Doktorarbeiten lediglich mit dem Fusionszytokin Hyper-IL-6 erfolgte (Dambietz, 2022, Hansen, 2021), wurden in dieser Arbeit IL-6 *Trans-Signaling* Proliferations- und Stimulationsassays beleuchtet, bei denen eine Stimulation der Zellen ausschließlich durch die Einzelkomponenten bestehend aus IL-6 und dem sIL-6R erfolgte. Da eine Stimulation von Ba/F3-gp130 Zellen mit rekombinantem Hyper-IL-6 zwar ein *in vitro* IL-6 *Trans-Signaling* Modell nachstellt, aber die physiologischen Prozesse des IL-6 *Trans-Signalings* im humanen System nicht genau abbildet, stellt die Verwendung der Einzelkomponenten (IL-6 und sIL-6R) eine höhere Relevanz für die experimentelle und klinische Weiterentwicklung der cs-130-Varianten dar. Denn Hyper-IL-6 ist nur in der Lage das IL-6 *Trans-Signaling* zu induzieren, während eine Verwendung der Einzelkomponenten (IL-6/sIL-6R) je nach Konzentration zur Induktion des IL-6 *Classic*- und/oder *Trans-Signalings* führen können (Garbers et al., 2011).

Um in diesem Bezug zu zeigen, dass die intrazellulären Hemmungen die für cs-130Fc und cs-130 im Vergleich mit sgp130Fc ermittelt werden konnten, auch nach Stimulation der Zellen mit den Einzelkomponenten aus IL-6 und sIL-6R erreicht werden können, wurden *in vitro* IL-6 *Trans-Signaling* Stimulationsassays mit Testung der intrazellulären Signale STAT3 und ERK durchgeführt.

Dabei wurden sgp130Fc, cs-130Fc und cs-130, sowie die cs-130-Kontrollvarianten c<sub>GFPS</sub>-130Fc und cs-130<sup>Y190K/F191E</sup>Fc eingesetzt, um die mit 50 ng/ml IL-6 und 100 ng/ml IL-6R stimulierten Ba/F3-gp130 Zellen zu inhibieren.

Die Ergebnisse der in dieser Arbeit durchgeführten Western Blot Analysen zeigten, dass cs-130Fc im Vergleich mit sgp130Fc eine ähnlich effektive Hemmung der intrazellulären Signale pSTAT3 und pERK bei bereits 1 nM aufwies. Auch das monomere cs-130 erreichte eine vergleichbare Hemmung wie sgp130Fc und cs-130Fc bei 10 nM InhibitorKonzentration, jedoch reduzierte Hemmungen des pSTAT3 und pERK Signals bei 1 nM InhibitorKonzentration. Die cs-130-Kontrollvarianten c<sub>GFP</sub>S-130Fc und cs-130<sup>Y190K/F191E</sup>Fc zeigten weniger effektive Hemmungen der intrazellulären Signale pSTAT3 und pERK. Diese reduzierte Hemmeffektivität ging zum einen hervor durch die Änderung der Bindefähigkeit für IL-6, aufgrund einer Mutation der D2-Domäne von cs-130<sup>Y190K/F191E</sup>Fc. Und zum anderen beruhte die reduzierte Hemmeffektivität bei c<sub>GFP</sub>S-130Fc auf dem Ersatz des VHH6, welcher initial den Komplex aus IL-6/sIL-6R stabilisierte, hin zur Verwendung des VHH<sub>GFP</sub>, welcher diesen Komplex nicht mehr erkennt.

Zusammenfassend wurde gezeigt, dass Hemmungen der intrazellulären Signale des IL-6 *Trans-Signalings* auf Basis einer Komplexstimulation (IL-6/sIL-6) durch sgp130Fc ähnlich effektiv auch für cs-130Fc und cs-130 erreicht werden konnten und somit bisherig ermittelte Ergebnisse von Frau Hansen und Frau Dambietz bestätigt wurden (Dambietz, 2022, Hansen, 2021, Heise et al., 2021). Dabei wurden diese Hemmeffekte ebenfalls in unterschiedlichen IL-6 *Trans-Signaling* Proliferationsassays dieser Arbeit beobachtet, so dass cs-130Fc und cs-130 im Vergleich mit sgp130Fc als effektive *second-generation* IL-6 *Trans-Signaling* Inhibitoren betrachtet werden können.

## 5.2. Steigerung der IL-6 Affinität durch cs-130<sup>FLY</sup>Fc

Um das cs-130Fc zu modifizieren und in seiner IL-6/sIL-6R Affinität weiter zu steigern, wurde in dieser Arbeit das cs-130<sup>FLY</sup>Fc generiert. Dabei wurden die Aminosäuren der Site III (D1-Domäne) von cs-130Fc so mutiert, dass analog zum sgp130<sup>FLY</sup>Fc (Tenhumberg et al., 2008) eine Steigerung der Affinität zu IL-6/IL-6R Komplexen erwartet wurde.

Im Vergleich mit Wildtyp sgp130Fc erwies sich sgp130<sup>FLY</sup>Fc, bei dem alle drei Aminosäuren Y<sup>102</sup>, F<sup>113</sup>, L<sup>114</sup> punktmutiert vorlagen, im Hinblick auf eine IL-6 *Trans-Signaling* Hemmung als effektiverer IL-6 *Trans-Signaling* Hemmstoff (Lokau et al., 2021, Tenhumberg et al., 2008). Dabei wurde für sgp130<sup>FLY</sup>Fc eine im Vergleich mit Wildtyp sgp130Fc um den Faktor 6 verbesserte Affinität zum immobilisierten Hyper-IL-6 ermittelt (Tenhumberg et al., 2008). Interessanterweise führte weder der singuläre Aminosäureaustausch von T<sup>102</sup>Y oder Q<sup>113</sup>F, noch der duale Aminosäureaustausch von T<sup>102</sup> und Q<sup>113</sup>F im sgp130Fc (sgp130<sup>T102Y</sup>Fc,

sgp130<sup>Q113F</sup>Fc, sgp130<sup>T102Y/Q113F</sup>Fc) zur Verbesserung der IL-6 *Trans-Signaling* Hemmung (Lokau et al., 2021, Tenhumberg et al., 2008). Lediglich die dreifache Punktmutation der D1-Domäne (D1<sup>FLY</sup>) konnte die IL-6 *Trans-Signaling* Hemmung positiv beeinflussen, was für die Entwicklung von cs-130<sup>FLY</sup>Fc von entscheidender Bedeutung war.

Das geringere Molekulargewicht des cs-130<sup>FLY</sup>Fc, kombiniert mit der affinitätssteigernden Mutation der D1-Region, sollte nicht nur den Vorteil der besseren Gewebegängigkeit erbringen, sondern zudem zur verbesserten Hemmung des IL-6 *Trans-Signaling*s und höheren Bioverfügbarkeit im Vergleich mit sgp130Fc beitragen. Eine Steigerung der Hemmeffektivität könnte im klinischen Gebrauch sehr wahrscheinlich zur Dosisreduktion des Therapeutikums und damit verbundenen geringeren Nebenwirkungen führen.

Nach erfolgter Klonierung und Reinigung des cs-130<sup>FLY</sup>Fc wurde das inhibitorische Protein im *in vitro* IL-6 *Trans-Signaling* Modell mit Ba/F3-gp130 Zellen nach Stimulation von IL-6/sIL-6R hinsichtlich der Hemmwirkung im Vergleich mit sgp130<sup>FLY</sup>Fc sowie weiteren cs-130-Varianten untersucht (siehe Anhang, **Tabelle 21**). Dabei zeigten die Proteine cs-130<sup>FLY</sup>Fc, cs-130Fc und sgp130<sup>FLY</sup>Fc alle gemeinsam einen erhöhten Hemmeffekt auf das IL-6 *Trans-Signaling* im Vergleich mit sgp130Fc. Bisherige Ergebnisse zur Steigerung der IL-6 *Trans-Signaling* Hemmung für das mutierte sgp130<sup>FLY</sup>Fc im Vergleich mit Wildtyp sgp130Fc wurden in dieser Arbeit nochmals bestätigt. Interessanterweise zeigte das dimere Fusionsprotein cs-130<sup>FLY</sup>Fc im Vergleich mit cs-130Fc keinen relevanten Unterschied in der IL-6 *Trans-Signaling* Hemmung auf, während das in dieser Arbeit hergestellte monomere cs-130<sup>FLY</sup> trotz Abspaltung des Fc-Fragmentes, eine verbesserte Hemmung zum monomeren cs-130 zeigte und vergleichbare Hemmungen zum dimeren cs-130Fc aufwies.

Das monomere cs-130<sup>FLY</sup> ist die verkleinerte Variante des cs-130<sup>FLY</sup>Fc, welches durch Abspaltung des Fc-Fragments in seiner theoretischen Molekülgröße von ca. 79 kDa auf ca. 52 kDa für cs-130<sup>FLY</sup> reduziert werden konnte. Eine Überprüfung der molekularen Größe von cs-130<sup>FLY</sup> in der SDS-*Page* ergab ein Molekulargewicht von ca. 70 kDa. Überraschenderweise zeigte das monomere Protein cs-130<sup>FLY</sup> vergleichbare Hemmungen des IL-6 *Trans-Signaling*s, wie dimeres cs-130Fc, cs-130<sup>FLY</sup>Fc oder sgp130<sup>FLY</sup>Fc, welches sich ebenfalls in berechneten IC<sub>50</sub>-Werten widerspiegelt, jedoch bei deutlicher Reduktion des Molekulargewichtes (siehe Anhang, **Tabelle 21, 22**). Somit stellt cs-130<sup>FLY</sup> das in dieser Arbeit kleinste und dennoch effektivste inhibitorische IL-6 *Trans-Signaling* Protein dar.

Bisher wurde nur das im menschlichen Körper physiologisch vorkommende gp130-RAPS als kleinste sgp130 Variante mit einem Molekulargewicht von ca. 50 kDa beschrieben (Richards et al., 2006). In einem Peritonitis ähnlichen Mausmodell zeigte gp130-RAPS lediglich vergleichbare Hemmungen des IL-6 *Trans-Signalings* wie sgp130Fc. In dieser Arbeit gelang es jedoch durch Verwendung von monomeren cs-130<sup>FLY</sup>, das IL-6 *Trans-Signaling* im *in vitro* Proliferationsassay nahezu doppelt so gut zu hemmen wie durch sgp130Fc.

Zusammenfassend wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass die Punktmutationen der Aminosäuren T<sup>102</sup>Y, Q<sup>113</sup>F und N<sup>114</sup>L in der D1-Region von cs-130<sup>FLY</sup>Fc die IL-6 *Trans-Signaling* Hemmung im Vergleich mit cs-130Fc nicht maßgeblich beeinflusste, wohingegen eine deutliche Verbesserung der IL-6 *Trans-Signaling* Hemmung für monomeres cs-130<sup>FLY</sup> im Vergleich mit monomeren cs-130 beobachtet werden konnte. Das sgp130<sup>FLY</sup>Fc hingegen konnte allein durch die D1<sup>FLY</sup>-Mutation eine im Vergleich mit Wildtyp sgp130Fc verbesserte Hemmung der mit IL-6/sIL-6R stimulierten Zellen (IL-6 *Trans-Signaling*) erzielen. Eine Hemmung des IL-6 *Classic-Signalings* wurde hierbei für keines der Proteine detektiert, was für eine Selektivität in Bezug auf die Hemmung des IL-6 *Trans-Signalings* spricht.

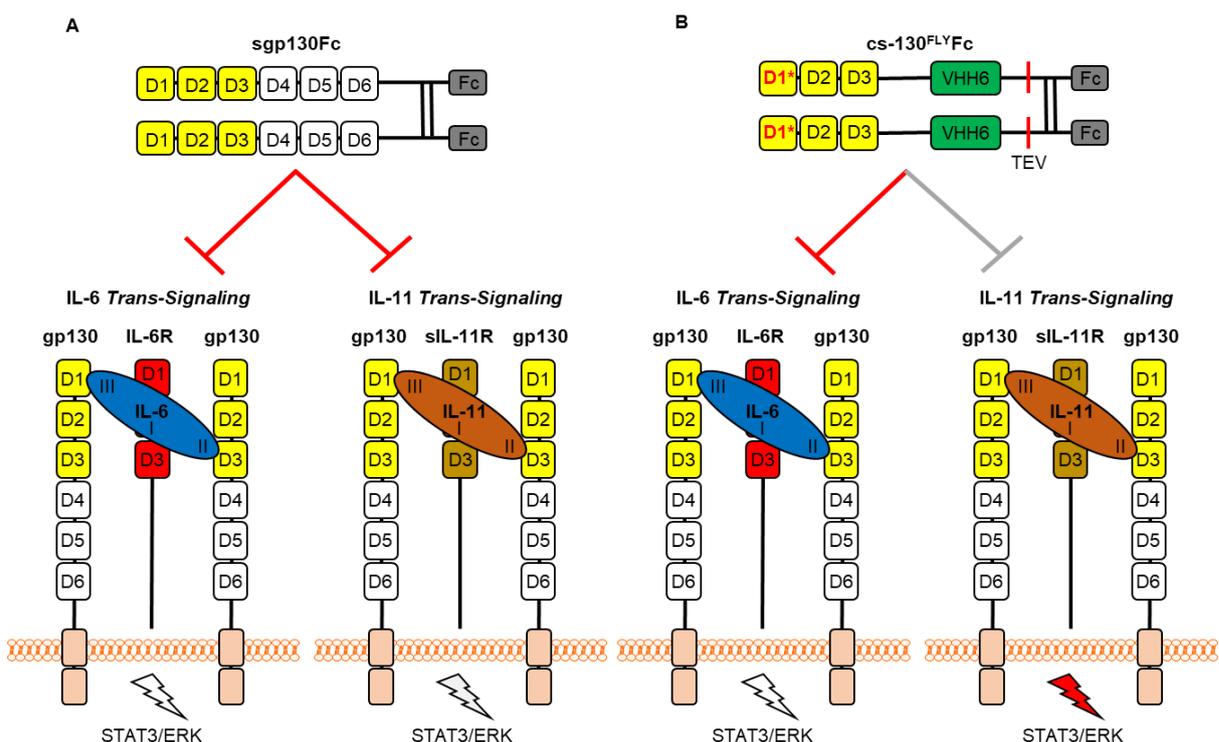
### 5.3. IL-11 *Trans-Signaling* wird durch cs-130<sup>FLY</sup>Fc und cs-130<sup>FLY</sup> nicht gehemmt

Weiterhin wurde beschrieben, dass sgp130Fc nicht nur das IL-6 *Trans-Signaling*, sondern auch das IL-11 *Trans-Signaling* hemmt (Moll et al., 2017, Lokau et al., 2016b).

IL-11 ist in der Lage, mit seinem IL-11R, ähnlich dem IL-6, zwei gp130-Homodimere zu binden und eine intrazelluläre Signaltransduktion zu bewirken (Barton et al., 1999, Tacke et al., 1999, Yin et al., 1993). Da der IL-11R sowohl membrangebunden, als auch in löslicher Form (sIL-11R) im humanen Serum vorkommt, kann eine Signaltransduktion analog zum IL-6, in *Classic-* und *Trans-Signaling* unterteilt werden (Moll et al., 2017, Lokau et al., 2016a, Dams-Kozłowska et al., 2012). Jedoch scheint IL-11 im Vergleich zum IL-6 eher gegensätzliche Auswirkungen auf Zellen zu haben, was sehr wahrscheinlich auf die Unterschiede in der Verfügbarkeit der membranständigen Rezeptoren auf den jeweiligen Zellen beruht (Widjaja et al., 2020, Garbers and Scheller, 2013). IL-11 ist ein Zytokin, welches u.a. einen Effekt auf Hepatozyten, B-Zellen, Makrophagen, Osteoklasten und kardiale Myozyten aufweist. IL-11 scheint ein wichtiger Faktor bei der kardialen Regeneration und Fibrose zu sein, ist in der Regeneration von Zellen des Darmes beteiligt und spielt eine Rolle im Knochenmetabolismus und bei Krebserkrankungen (Garbers and Scheller, 2013, Schafer et al., 2017).

Aus diesem Grund sollte die Hemmung des IL-6 *Trans-Signalings* immer auch eine Betrachtung der Hemmung anderer Zytokine, wie IL-11 beinhalten. Würde die IL-11 *Trans-Signaling* Wirkung eher mit regenerativen Prozessen in Verbindung gebracht werden, sollte eine Hemmung daher eher vermieden werden.

Um herauszufinden, inwieweit dimeres cs-130<sup>FLY</sup>Fc und monomeres cs-130<sup>FLY</sup> das IL-11 *Trans-Signaling* hemmen, wurden *in vitro* IL-11 *Trans-Signaling* Proliferationsassays im Vergleich mit den Referenzproteinen cs-130Fc, cs-130 sowie sgp130<sup>FLY</sup>Fc durchgeführt.



**Abb. 32:** Schematische Darstellung der Hemmung des IL-6 und IL-11 *Trans-Signalings* durch sgp130Fc und cs-130<sup>FLY</sup>Fc

(A) Zellen die gp130 membrangebunden aufweisen, bei denen aber der IL-6R oder IL-11R in löslicher Form vorkommt, können nach Stimulation IL-6/sIL-6R oder IL-11/IL-11R durch sgp130Fc in der Proliferation gehemmt werden (*Trans-Signaling*) und somit finden verringerte Phosphorylierungen von STAT3 oder ERK statt. (B) cs-130<sup>FLY</sup>Fc hemmt selektiv das IL-6 *Trans-Signaling*, nicht aber das IL-11 *Trans-Signaling*.

Interessanterweise wurde weder für dimeres cs-130<sup>FLY</sup>Fc noch für monomeres cs-130<sup>FLY</sup> eine Hemmung der Proliferation der mit IL-11/sIL-11R stimulierten Ba/F3-gp130 Zellen (IL-11 *Trans-Signaling*) beobachtet, während sgp130Fc eine deutliche Hemmung der Zellproliferation zeigte (**Abb. 32**). Diese Hemmp Profile spiegeln sich ebenso in berechneten IC<sub>50</sub>-Werten wider (siehe Anhang, **Tabelle 23**). Hiermit wurden bisher publizierte Ergebnisse hinsichtlich der IL-11 *Trans-Signaling* Hemmung für sgp130Fc bestätigt (Berg et al., 2021, Lokau et al., 2016b). Für cs-130Fc wurden ebenfalls IL-11 *Trans-Signaling* Hemmungen beobachtet, wenn auch mit wesentlich geringerer Effektivität als für das IL-6 *Trans-Signaling*,

was die Ergebnisse von Frau Dambietz und Frau Hansen unterstützt (Dambietz, 2022, Hansen, 2021). Ein Vergleich der  $K_D$ -Werte aus SPR-Analysen, die mit immobilisiertem Hyper-IL-11 durchgeführt wurden, verdeutlichen die verminderte IL-11 *Trans-Signaling* Hemmung von cs-130Fc ( $K_D$ : 8,6 nM) im Vergleich mit der erhöhten Hemmung von sgp130Fc ( $K_D$ : 0,031 nM) (Heise et al., 2021). Monomeres cs-130 zeigte, ähnlich wie monomeres cs-130<sup>FLY</sup>, keine Hemmung der Zellproliferation im IL-11 *Trans-Signaling* Proliferationsassay, was sich bereits durch die schlechtere IL-11 *Trans-Signaling* Hemmung des dimeren cs-130Fc abzeichnete. Für das cs-130-Kontrollprotein cGFPS-130Fc wurde eine deutlich verminderte IL-11 *Trans-Signaling* Hemmung und für cs-130<sup>Y190K/F191E</sup>Fc nahezu keine Hemmung beobachtet. Dass eine Hemmung für cGFPS-130Fc dennoch möglich war, lag sehr wahrscheinlich daran, dass die Domänen D1-D3 weiterhin in der Lage waren IL-11, ähnlich wie IL-6, zu erkennen und zu hemmen.

Die sgp130-Mutante sgp130<sup>FLY</sup>Fc zeigte im Vergleich mit den Fusionsproteinen cs-130<sup>FLY</sup>Fc und cs-130<sup>FLY</sup> ebenfalls keine Hemmung der Ba/F3-gp130 Zellproliferation, die zuvor mit den Einzelkomponenten IL-11 und sIL-11R zur Proliferation stimuliert wurden (siehe Anhang, **Tabelle 23**). Eine kürzlich veröffentlichte Studie konnte in diesem Bezug ebenfalls zeigen, dass sgp130<sup>FLY</sup>Fc im *in vitro* IL-11 *Trans-Signaling* Proliferationsassays keine nennenswerte Hemmung der Zellproliferation selbst bei der höchsten Konzentration erreichen konnte (Lokau et al., 2021) (siehe Anhang, **Tabelle 24**). Interessanterweise wurde die IL-11 *Trans-Signaling* Hemmung nicht verhindert, wenn nur Q<sup>113</sup>F oder T<sup>102</sup>Y mutiert vorlagen (Lokau et al., 2021). Dies deutet daraufhin, dass der Bereich um Q<sup>113</sup> im gp130 für die Diskriminierung zwischen der IL-6 und IL-11 *Trans-Signaling* Hemmung verantwortlich sein könnte. Weiterhin wurde gezeigt, dass sgp130<sup>FLY</sup>Fc nicht nur eine verringerte IL-11 *Trans-Signaling* Hemmung im Proliferationsassay zeigte, sondern auch eine um den Faktor 10 verringerte Affinität zum immobilisierten Hyper-IL-11 aufwies als sgp130Fc (Berg et al., 2021) (siehe Anhang, **Tabelle 24**). Der dreifache Austausch der Aminosäuren T<sup>102</sup>Y/Q<sup>113</sup>F/N<sup>114</sup>L führte also zu einer stark verminderten IL-11 *Trans-Signaling* Hemmung.

Insgesamt wurde durch diese Arbeit ein weiterer Schritt zur Diskriminierung des IL-6 und IL-11 *Trans-Signaling*s geleistet, bei der das Fusionsprotein cs-130<sup>FLY</sup>Fc im Vergleich mit sgp130Fc nicht nur eine verbesserte Hemmung des IL-6 *Trans-Signaling*s erreichen konnte, sondern darüber hinaus im Gegensatz zum sgp130Fc keine IL-11 *Trans-Signaling* Hemmung zeigte.

Eine Abspaltung des Fc-Fragmentes von cs-130<sup>FLY</sup>Fc führte nicht nur zur verbesserten Hemmung des IL-6 *Trans-Signalings* im Vergleich mit cs-130, cs-130Fc, sgp130Fc und sgp130<sup>FLY</sup>Fc, sondern hatte ebenfalls den Vorteil der fehlenden IL-11 *Trans-Signaling* Hemmung. Das mutierte sgp130<sup>FLY</sup>Fc wies ähnliche Hemmeffekte in Bezug auf das IL-6 oder IL-11 *Trans-Signaling* auf wie cs-130<sup>FLY</sup>Fc bzw. cs-130<sup>FLY</sup>. Es sollte jedoch erwähnt sein, dass die in dieser Arbeit generierten Fusionsproteine cs-130<sup>FLY</sup>Fc und cs-130<sup>FLY</sup> diesen Effekt, bei weitaus geringerem Molekulargewicht erreichen konnten, was cs-130<sup>FLY</sup>Fc und cs-130<sup>FLY</sup> nicht nur zu verkleinerten, sondern auch zu selektiveren IL-6 *Trans-Signaling* Inhibitoren macht.

#### 5.4. Größenreduktion von cs-130<sup>D1TEVD2D3</sup>Fc durch TEV-Spaltung

Um cs-130Fc als solches in Bezug auf seine molekulare Größe weiter zu verkleinern, wurde das Fusionsprotein cs-130<sup>D1TEVD2D3</sup>Fc generiert.

Das Protein cs-130<sup>D1TEVD2D3</sup>Fc besteht wie cs-130Fc aus den ersten drei Domänen von gp130, jedoch mit eingefügter TEV-*Site* zwischen der D1- und D2-Domäne. Über eine zweite TEV-*Site* sollte die Abspaltung vom Fc-Fragment möglich sein und zur Verkleinerung von cs-130<sup>D1TEVD2D3</sup>Fc hin zum monomeren cs-130<sup>D2D3</sup> führen. Das theoretische Molekulargewicht von 79 kDa (cs-130<sup>D1TEVD2D3</sup>Fc, Monomer) sollte somit auf 41 kDa (cs-130<sup>D2D3</sup>, Monomer) reduziert werden.

Nach Herstellung und Reinigung des Proteins cs-130<sup>D1TEVD2D3</sup>Fc wurde das cs-130<sup>D1TEVD2D3</sup>Fc im IL-6 *Trans-Signaling* Proliferationsassay in Bezug auf die Hemmeffizienz untersucht. Dabei wurde für cs-130<sup>D1TEVD2D3</sup>Fc eine vergleichbare Hemmung des IL-6 *Trans-Signalings* im Vergleich mit cs-130Fc und eine erhöhte Hemmung des IL-6 *Trans-Signalings* zum sgp130Fc festgestellt. Die Hemmung des *Classic-Signalings*, welches aufgrund der eher regenerativen Effekte nicht blockiert werden sollte, wurde weder für cs-130<sup>D1TEVD2D3</sup>Fc noch für sgp130Fc festgestellt, während der IL-6R-Blocker Tocilizumab IL-6 *Classic-Signaling* Hemmungen aufwies.

Nach Spaltung von cs-130<sup>D1TEVD2D3</sup>Fc durch die TEV-Protease, zeigte sich bereits in der SEC (*size exclusion chromatography*), dass nur zwei anstatt der drei erwarteten Spaltprodukte identifiziert werden konnten. Eine SDS-*Page* Analyse ergab im Vergleich mit cs-130, dass die Spaltung zwischen der D1- und D2-Domäne von cs-130<sup>D1TEVD2D3</sup>Fc sehr wahrscheinlich nicht erfolgreich war. Da das cs-130<sup>D1TEVD2D3</sup>Fc trotz der verlängerten Linkerregion zwischen der D1- und D2-Region eine effektive Hemmung des IL-6 *Trans-Signalings* zeigte, wäre eine Modifikation durch Einfügen weiterer Aminosäuren zur Verlängerung der Linkerregion sehr

wahrscheinlich möglich. Dies würde der TEV-Protease den Zugang zur Linker-Region womöglich erleichtern und zur vollständigen Spaltung zwischen den Domänen D1 und D2 führen. Da die Spaltung cs-130<sup>D1TEVD2D3</sup>Fc hin zum cs-130<sup>D2D3</sup> nicht erfolgreich war, kann über eine mögliche Hemmung von cs-130<sup>D2D3</sup> auf das IL-6 *Trans-Signaling* daher nur spekuliert werden.

Im Vergleich mit bisherig untersuchten sgp130Fc-Mutanten, wie sgp130-ELP (115 kDa), sgp130-E10Fc (110 kDa), sgp130His (110 kDa) oder das gp130-RAPS (50 kDa) (Sommer et al., 2014, Lin et al., 2006, Jostock et al., 2001, Diamant et al., 1997), zeigte sich das Protein cs-130<sup>D1TEVD2D3</sup>Fc weiterhin als verbesserter IL-6 *Trans-Signaling* Inhibitor. Auch die Reduktion der molekularen Größe von cs-130<sup>D1TEVD2D3</sup>Fc auf 115 kDa (experimentell im Western Blot bestimmtes Molekulargewicht) verdeutlicht, dass es durch diese Arbeit gelang, einen effektiven IL-6 *Trans-Signaling* Inhibitor zu generieren, der in der Lage war das IL-6 *Trans-Signaling* im nanomolaren Bereich zu hemmen, während oben genannte sgp130-Varianten schlechtere Hemmungen zeigten. Tatsächlich führte die stetige Verkleinerung des Molekulargewichtes von sgp130Fc bei den sgp130 Mutanten sgp130-ELP, sgp130-E10Fc, sgp130His und gp130-RAPS auch zur Verringerung der IL-6 Affinität (Sommer et al., 2014, Lin et al., 2006, Jostock et al., 2001, Diamant et al., 1997), während das cs-130<sup>D1TEVD2D3</sup>Fc keine Reduktion der IL-6 *Trans-Signaling* Hemmung im Vergleich mit sgp130Fc zeigte.

Zusammengefasst konnte durch die Herstellung und Testung von cs-130<sup>D1TEVD2D3</sup>Fc im IL-6 *Trans-Signaling* Proliferationsassay gezeigt werden, dass eine Modifikation von cs-130Fc mittels Linkervergrößerung durch Einsatz einer TEV-Spaltstelle zwischen der D1- und D2-Domäne gelingen kann. Eine TEV-vermittelte Abspaltung der D1-Domäne war hingegen nicht möglich. Hier sollte in weiterführenden Experimenten der Linker erweitert werden, um der TEV-Protease den Zugang zur Schnittstelle zu ermöglichen. Jedoch wies cs-130<sup>D1TEVD2D3</sup>Fc bisher eine zum cs-130Fc vergleichbare Hemmeffektivität auf und sogar eine verbesserte Hemmung des IL-6 *Trans-Signaling* im Vergleich mit sgp130Fc im nanomolaren Bereich.

## 5.5. Zusammenfassung und Ausblick

Ein erster Schritt hin zur selektiven IL-6 *Trans-Signaling* Hemmung wurde bereits durch sgp130Fc im Rahmen einer klinischen Phase IIa Studie für Colitis Ulcerosa und Morbus Crohn näher untersucht. Das Nebenwirkungsprofil der Probanden erwies sich mit dem Auftreten von respiratorischen Infekten, dem Wiederauftreten von Herpes labiales und anderen

Hauterscheinungen als überschaubar, während lebensbedrohliche Nebenwirkungen nicht beobachtet wurden (Schreiber et al., 2021). Jedoch war die Probandengruppe bisher noch zu gering, um eine abschließende Aussage über die Sicherheit von sgp130Fc zu treffen.

In dieser Arbeit wurden die cs-130-Fusionsproteine cs-130<sup>FLY</sup>Fc, cs-130<sup>FLY</sup> und cs-130<sup>D1TEVD2D3</sup>Fc entwickelt, die ähnlich dem sgp130Fc, nicht nur eine verbesserte Selektivität und Affinität für das IL-6 *Trans-Signaling* aufwiesen, sondern zusätzlich in der molekularen Größe minimiert werden konnten. Es ist bekannt, dass die geringere molekulare Größe eines Proteins zur effektiveren Gewebegängigkeit führen kann (Li et al., 2016). Darüber hinaus konnte bisher keine der beschriebenen sgp130 Mutanten sgp130-ELP, sgp130-E10Fc, sgp130His oder das sgp130-RAPS, eine Steigerung der IL-6 *Trans-Signaling* Hemmung im Vergleich mit sgp130Fc erreichen (Sommer et al., 2014, Lin et al., 2006, Jostock et al., 2001, Diamant et al., 1997), während cs-130<sup>FLY</sup>Fc, cs-130<sup>FLY</sup> und cs-130<sup>D1TEVD2D3</sup>Fc allesamt in der Lage waren, das IL-6 *Trans-Signaling* im Vergleich mit sgp130Fc effektiver zu hemmen.

Über die selektive IL-6 *Trans-Signaling* Hemmung hinaus, wurde für sgp130Fc zusätzlich eine Hemmung des IL-11 *Trans-Signalings* beobachtet (Moll et al., 2017, Lokau et al., 2016b, Jostock et al., 2001). Bisher ist nicht geklärt, inwieweit eine Hemmung des IL-11 *Trans-Signalings* sich positiv oder negativ auf (patho-) physiologische Prozesse des Körpers auswirkt. Eine Testung der Fusionsproteine cs-130<sup>FLY</sup>Fc und cs-130<sup>FLY</sup> in Bezug auf eine IL-11 *Trans-Signaling* Hemmung führte zur Erkenntnis, dass cs-130<sup>FLY</sup>Fc und cs-130<sup>FLY</sup> das IL-6 *Trans-Signaling* spezifisch hemmen und eine IL-11 *Trans-Signaling* Hemmung nicht beobachtet werden konnte. Für die fehlende Hemmung waren die Punktmutationen der D1-Region (T<sup>102</sup>Y/ Q<sup>113</sup>F/ N<sup>114</sup>L) von entscheidender Bedeutung, so dass auch sgp130<sup>FLY</sup>Fc (Tenhumberg et al., 2008) diese fehlende Hemmung des IL-11 *Trans-Signalings* aufwies. Eine spezifischere Hemmung des IL-6 *Trans-Signalings* könnte zur Steigerung regenerativer Prozesse durch die fehlende Hemmung des IL 11 *Trans-Signalings* und dadurch zur weiteren Verbesserung des Nebenwirkungsprofils im Vergleich mit sgp130Fc beitragen.

In der Phase IIa Studie wurden sgp130Fc hemmende Effekte ebenfalls auf transkriptionaler Ebene bei Patienten mit chronisch-entzündlicher Darmerkrankung untersucht und Änderungen im Vergleich mit IL-6R Antikörpern, welche das IL-6 *Classic-* und *Trans-Signaling* hemmen, festgestellt (Schreiber et al., 2021). Für weitere Studien könnten nicht nur transkriptionale Signale relevant sein, die in Bezug auf das IL-6 *Classic-* und *Trans-Signaling* untersucht werden, sondern auch die Testung weiterer Signalwege von Zytokinen wie IL-11, LIF und OSM beinhalten, die allesamt wie IL-6, Signaltransduktionen über gp130 Homodimere

induzieren. Eine Verwendung der Fusionsproteine cs-130<sup>FLY</sup>Fc oder cs-130<sup>FLY</sup> könnte in diesem Bezug im Vergleich mit sgp130Fc zur weiteren Diskriminierung intrazellulärer Signale wie IL-6, IL-11 oder weiteren Zytokinen beitragen.

Ein wichtiger Unterschied zum sgp130Fc ist der im cs-130<sup>FLY</sup>Fc und anderen cs-130-Varianten verwendete *Nanobody* VHH6. Dieser stabilisiert die Bindung zum humanen IL-6/sIL-6R-Komplex, ist jedoch nicht in der Lage, murine IL-6/sIL-6R Komplexe zu erkennen (Adams et al., 2017). Dadurch kann die Aktivität von cs-130<sup>FLY</sup>Fc bisher noch nicht in murinen Modellen humaner Erkrankungen untersucht werden, was die präklinische Weiterentwicklung von cs-130<sup>FLY</sup>Fc erschweren könnte. Für die Entwicklung muriner Modelle wäre es daher sinnvoll, einen kreuzreaktiven *Nanobody* zu generieren, der neben humane auch murine IL-6/sIL-6R Komplexe erkennen kann. Durch die Entwicklung von murinen cs-130-Varianten, könnten entsprechende Experimente ebenfalls in Mausmodellen durchgeführt werden und eine experimentelle Weiterentwicklung dadurch gefördert werden. Alternativ wäre auch die Entwicklung gentechnisch veränderter humanisierter IL-6/sIL-6R Mäuse möglich, die ein *in vivo* Modell zum bisherigen *in vitro* IL-6 *Trans-Signaling* Modell darstellen könnten.

Neben chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen spielt eine Modulation der IL-6 Signaltransduktion auch bei der Behandlung der rheumatoiden Arthritis eine wesentliche Rolle. Am Krankheitsmodell der rheumatoiden Arthritis wurde bereits gezeigt, dass eine Hemmung IL-6 abhängiger Signalwege auch die IL-6 vermittelte TH17 Zellvermehrung mindern kann (Yoshida et al., 2011, Fujimoto et al., 2008). TH17 Zellen spielen eine wichtige Rolle bei entzündlichen und autoimmun bedingten Erkrankungen wie der rheumatoiden Arthritis und ein Zusammenhang von IL-6 bei der TH17 Zelldifferenzierung wurde bereits beschrieben (Yasuda et al., 2019, Kimura et al., 2007). Die Unterdrückung der TH17 Zelldifferenzierung ist deshalb ein wichtiger Ansatzpunkt, um die damit einhergehende Entzündung zu reduzieren, die im Zusammenhang mit einer erhöhten IL-6 Produktion gefördert wird (Samson et al., 2012). In Übereinstimmung mit den Ergebnissen, die durch sgp130Fc erreicht wurden, zeigten auch die Fusionsproteine cs-130Fc und cs-130 hemmende Wirkungen auf die TH17 Zellexpansion (Heise et al., 2021), was in weiteren *in vivo* Mausmodellen zum Krankheitsmodell der rheumatoiden Arthritis sehr wahrscheinlich zur Reduktion der Gelenkdestruktionen führen könnte. Aufgrund der verbesserten Bindungskinetik, der geringeren Größe und der verminderten IL-11 Reaktivität deutet vieles darauf hin, dass die cs-130-Varianten in Bezug auf die pharmakologische Hemmung der TH17 Zellbildung im Vergleich mit sgp130Fc geeigneter sind, eine selektivere und effektivere IL-6 *Trans-Signaling* Hemmung zu erreichen

(Heise et al., 2021). In diesem Bezug stellen vor allem die in dieser Arbeit hergestellten cs-130Varianten cs-130<sup>FLY</sup>Fc und cs-130<sup>FLY</sup> einen Fortschritt zum cs-130Fc dar, welches weiterhin Hemmungen des IL-11 *Trans-Signalings* aufwies.

Mit dieser medizinischen Doktorarbeit konnte gezeigt werden, dass im humanen *in vitro* System eine Selektion hin zur spezifischen IL-6 *Trans-Signaling* Hemmung insbesondere durch cs-130<sup>FLY</sup>Fc und cs-130<sup>FLY</sup> erreicht wurde und somit ein weiterer Schritt in Richtung der *second-generation* selektiven IL-6 *Trans-Signaling* Inhibitoren geleistet werden konnte.

---

## 6 LITERATURVERZEICHNIS

- ADAMS, R., BURNLEY, R. J., VALENZANO, C. R., QURESHI, O., DOYLE, C., LUMB, S., DEL CARMEN LOPEZ, M., GRIFFIN, R., MCMILLAN, D., TAYLOR, R. D., MEIER, C., MORI, P., GRIFFIN, L. M., WERNERY, U., KINNE, J., RAPECKI, S., BAKER, T. S., LAWSON, A. D., WRIGHT, M. & ETTORRE, A. 2017. Discovery of a junctional epitope antibody that stabilizes IL-6 and gp80 protein:protein interaction and modulates its downstream signaling. *Sci Rep*, 7, 37716.
- AGTHE, M., BRUGGE, J., GARBERS, Y., WANDEL, M., KESPOHL, B., ARNOLD, P., FLYNN, C. M., LOKAU, J., APARICIO-SIEGMUND, S., BRETSCHER, C., ROSEJOHN, S., WAETZIG, G. H., PUTOCZKI, T., GROTZINGER, J. & GARBERS, C. 2018. Mutations in Craniosynostosis Patients Cause Defective Interleukin-11 Receptor Maturation and Drive Craniosynostosis-like Disease in Mice. *Cell Rep*, 25, 10-18 e5.
- AKIRA, S. & KISHIMOTO, T. 1992. The evidence for interleukin-6 as an autocrine growth factor in malignancy. *Semin Cancer Biol*, 3, 17-26.
- AKIRA, S., TAGA, T. & KISHIMOTO, T. 1993. Interleukin-6 in biology and medicine. *Adv Immunol*, 54, 1-78.
- ALONZI, T., FATTORI, E., LAZZARO, D., COSTA, P., PROBERT, L., KOLLIAS, G., DE BENEDETTI, F., POLI, V. & CILIBERTO, G. 1998. Interleukin 6 is required for the development of collagen-induced arthritis. *J Exp Med*, 187, 461-8.
- ANDERSON, K. C., MORIMOTO, C., PAUL, S. R., CHAUHAN, D., WILLIAMS, D., COCHRAN, M. & BARUT, B. A. 1992. Interleukin-11 promotes accessory cell-dependent B-cell differentiation in humans. *Blood*, 80, 2797-804.
- ATREYA, R., BILLMEIER, U., RATH, T., MUDTER, J., VIETH, M., NEUMANN, H. & NEURATH, M. F. 2015. First case report of exacerbated ulcerative colitis after anti-interleukin-6R salvage therapy. *World J Gastroenterol*, 21, 12963-9.

- ATREYA, R., MUDTER, J., FINOTTO, S., MÜLLBERG, J., JOSTOCK, T., WIRTZ, S., SCHÜTZ, M., BARTSCH, B., HOLTSMANN, M., BECKER, C., STRAND, D., CZAJA, J., SCHLAAK, J. F., LEHR, H. A., AUTSCHBACH, F., SCHÜRSMANN, G., NISHIMOTO, N., YOSHIZAKI, K., ITO, H., KISHIMOTO, T., GALLE, P. R., ROSE-JOHN, S. & NEURATH, M. F. 2000. Blockade of interleukin 6 trans signaling suppresses T-cell resistance against apoptosis in chronic intestinal inflammation: evidence in crohn disease and experimental colitis in vivo. *Nat Med*, 6, 583-8.
- BARKHAUSEN, T., TSCHERNIG, T., ROSENSTIEL, P., VAN GRIENSVEN, M., VONBERG, R. P., DORSCH, M., MUELLER-HEINE, A., CHALARIS, A., SCHELLER, J., ROSE-JOHN, S., SEEGERT, D., KRETTEK, C. & WAETZIG, G. H. 2011. Selective blockade of interleukin-6 trans-signaling improves survival in a murine polymicrobial sepsis model. *Crit Care Med*, 39, 1407-13.
- BARTON, V. A., HUDSON, K. R. & HEATH, J. K. 1999. Identification of three distinct receptor binding sites of murine interleukin-11. *J Biol Chem*, 274, 5755-61.
- BELLONE, G., SMIRNE, C., MAURI, F. A., TONEL, E., CARBONE, A., BUFFOLINO, A., DUGHERA, L., ROBECCHI, A., PIRISI, M. & EMANUELLI, G. 2006. Cytokine expression profile in human pancreatic carcinoma cells and in surgical specimens: implications for survival. *Cancer Immunol Immunother*, 55, 684-98.
- BERG, A. F., ETTICH, J., WEITZ, H. T., KRUSCHE, M., FLOSS, D. M., SCHELLER, J. & MOLL, J. M. 2021. Exclusive inhibition of IL-6 trans-signaling by soluble gp130(FlyR)Fc. *Cytokine X*, 3, 100058.
- BERNSTEIN, C. N., BLANCHARD, J. F., KLIEWER, E. & WAJDA, A. 2001. Cancer risk in patients with inflammatory bowel disease: a population-based study. *Cancer*, 91, 854-62.
- BOETTGER, M. K., LEUCHTWEIS, J., KÜMMEL, D., GAJDA, M., BRÄUER, R. & SCHAIBLE, H. G. 2010. Differential effects of locally and systemically administered soluble glycoprotein 130 on pain and inflammation in experimental arthritis. *Arthritis Res Ther*, 12, R140.

- BOULANGER, M. J., CHOW, D. C., BREVNOVA, E. E. & GARCIA, K. C. 2003. Hexameric structure and assembly of the interleukin-6/IL-6 alpha-receptor/gp130 complex. *Science*, 300, 2101-2104.
- BOYCE, E. G., ROGAN, E. L., VYAS, D., PRASAD, N. & MAI, Y. 2018. Sarilumab: Review of a Second IL-6 Receptor Antagonist Indicated for the Treatment of Rheumatoid Arthritis. *Ann Pharmacother*, 52, 780-791.
- BRISCHOUX-BOUCHER, E., TRIMOUILLE, A., BAUJAT, G., GOLDENBERG, A., SCHAEFER, E., GUICHARD, B., HANNEQUIN, P., PATERNOSTER, G., BAER, S., CABROL, C., WEBER, E., GODFRIN, G., LENOIR, M., LACOMBE, D., COLLET, C. & VAN MALDERGEM, L. 2018. IL11RA-related Crouzon-like autosomal recessive craniosynostosis in 10 new patients: Resemblances and differences. *Clin Genet*, 94, 373-380.
- BRUCE-HICKMAN, D., SAJEED, S. M., PANG, Y. H., SEOW, C. S., CHEN, W. & GULATI KANSAL, M. 2020. Bowel ulceration following tocilizumab administration in a COVID-19 patient. *BMJ Open Gastroenterol*, 7.
- CAIRO, M. S., PLUNKETT, J. M., NGUYEN, A., SCHENDEL, P. & VAN DE VEN, C. 1993. Effect of interleukin-11 with and without granulocyte colony-stimulating factor on in vivo neonatal rat hematopoiesis: induction of neonatal thrombocytosis by interleukin-11 and synergistic enhancement of neutrophilia by interleukin-11 + granulocyte colony-stimulating factor. *Pediatr Res*, 34, 56-61.
- CESARATTO, F., BURRONE, O. R. & PETRIS, G. 2016. Tobacco Etch Virus protease: A shortcut across biotechnologies. *J Biotechnol*, 231, 239-249.
- CHALARIS, A., GARBERS, C., RABE, B., ROSE-JOHN, S. & SCHELLER, J. 2011. The soluble Interleukin 6 receptor: generation and role in inflammation and cancer. *Eur J Cell Biol*, 90, 484-94.
- CHOW, D., HE, X., SNOW, A. L., ROSE-JOHN, S. & GARCIA, K. C. 2001. Structure of an extracellular gp130 cytokine receptor signaling complex. *Science*, 291, 2150-5.

- CLEVELAND, N. K. & RUBIN, D. T. 2021. CANCER PREVENTION IN PATIENTS WITH INFLAMMATORY BOWEL DISEASE. *Pract Gastroenterol*, 45, 12-28.
- CORTEGIANI, A., IPPOLITO, M., GRECO, M., GRANONE, V., PROTTI, A., GREGORETTI, C., GIARRATANO, A., EINAIV, S. & CECCONI, M. 2021. Rationale and evidence on the use of tocilizumab in COVID-19: a systematic review. *Pulmonology*, 27, 52-66.
- DAMBIETZ, C. A. 2022. Inhibition des IL-6 Trans Signaling durch Nanobody-Fusionsproteine. Unv. medizinische Dissertation. Institut für Biochemie und Molekularbiologie II der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- DAMS-KOZLOWSKA, H., GRYSKA, K., KWIATKOWSKA-BOROWCZYK, E., IZYCKI, D., ROSE-JOHN, S. & MACKIEWICZ, A. 2012. A designer hyper interleukin 11 (H11) is a biologically active cytokine. *BMC Biotechnol*, 12, 8.
- DIAMANT, M., RIENECK, K., MECHTI, N., ZHANG, X. G., SVENSON, M., BENDTZEN, K. & KLEIN, B. 1997. Cloning and expression of an alternatively spliced mRNA encoding a soluble form of the human interleukin-6 signal transducer gp130. *FEBS Lett*, 412, 379-84.
- DUMOULIN, M., CONRATH, K., VAN MEIRHAEGHE, A., MEERSMAN, F., HEREMANS, K., FRENKEN, L. G., MUYLDERMANS, S., WYNS, L. & MATAGNE, A. 2002. Single-domain antibody fragments with high conformational stability. *Protein Sci*, 11, 500-15.
- EHLERS, M., GRÖTZINGER, J., DEHON, F. D., MÜLLBERG, J., BRAKENHOFF, J. P., LIU, J., WOLLMER, A. & ROSE-JOHN, S. 1994. Identification of two novel regions of human IL-6 responsible for receptor binding and signal transduction. *J Immunol*, 153, 1744-53.
- EINARSSON, O., GEBA, G. P., ZHU, Z., LANDRY, M. & ELIAS, J. A. 1996. Interleukin-11: stimulation in vivo and in vitro by respiratory viruses and induction of airways hyperresponsiveness. *J Clin Invest*, 97, 915-24.

- ELIAS, J. A., TANG, W. & HOROWITZ, M. C. 1995. Cytokine and hormonal stimulation of human osteosarcoma interleukin-11 production. *Endocrinology*, 136, 489-98.
- EUROPEAN MEDICINE AGENCY, E. 2009. *RoActemra (tocilizumab)*. European medicine agency: Roche Registration GmbH. Verfügbar unter der Webseite: <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/roactemra#authorisation-details-section> [Zu letzt abgerufen am 25.05.2022, um 12:00 Uhr].
- FISCHER, M., GOLDSCHMITT, J., PESCHEL, C., BRAKENHOFF, J. P., KALLEN, K. J., WOLLMER, A., GRÖTZINGER, J. & ROSE-JOHN, S. 1997. I. A bioactive designer cytokine for human hematopoietic progenitor cell expansion. *Nat Biotechnol*, 15, 142-5.
- FUJIMOTO, M., SERADA, S., MIHARA, M., UCHIYAMA, Y., YOSHIDA, H., KOIKE, N., OHSUGI, Y., NISHIKAWA, T., RIPLEY, B., KIMURA, A., KISHIMOTO, T. & NAKA, T. 2008. Interleukin-6 blockade suppresses autoimmune arthritis in mice by the inhibition of inflammatory Th17 responses. *Arthritis Rheum*, 58, 3710-9.
- GARBERS, C. & SCHELLER, J. 2013. Interleukin-6 and interleukin-11: same same but different. *Biol Chem*, 394, 1145-61.
- GARBERS, C., THAISS, W., JONES, G. W., WAETZIG, G. H., LORENZEN, I., GUILHOT, F., LISSILAA, R., FERLIN, W. G., GROTZINGER, J., JONES, S. A., ROSE-JOHN, S. & SCHELLER, J. 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, 42959-70.
- GAULDIE, J., RICHARDS, C., HARNISH, D., LANSDORP, P. & BAUMANN, H. 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 USA*, 84, 7251-5.

- GOLDMAN, E. R., ANDERSON, G. P., LIU, J. L., DELEHANTY, J. B., SHERWOOD, L. J., OSBORN, L. E., CUMMINS, L. B. & HAYHURST, A. 2006. Facile generation of heat-stable antiviral and antitoxin single domain antibodies from a semisynthetic llama library. *Anal Chem*, 78, 8245-55.
- GRIVENNIKOV, S., KARIN, E., TERZIC, J., MUCIDA, D., YU, G. Y., VALLABHAPURAPU, S., SCHELLER, J., ROSE-JOHN, S., CHEROUTRE, H., ECKMANN, L. & KARIN, M. 2009. IL-6 and Stat3 are required for survival of intestinal epithelial cells and development of colitis-associated cancer. *Cancer Cell*, 15, 103-13.
- GRÖTZINGER, J., KERNEBECK, T., KALLEN, K. J. & ROSE-JOHN, S. 1999. IL-6 type cytokine receptor complexes: hexamer, tetramer or both? *Biol Chem*, 380, 803-13.
- HAEGEMAN, G., CONTENT, J., VOLCKAERT, G., DERYNCK, R., TAVERNIER, J. & FIERS, W. 1986. Structural analysis of the sequence coding for an inducible 26-kDa protein in human fibroblasts. *Eur J Biochem*, 159, 625-32.
- HAMMACHER, A., RICHARDSON, R. T., LAYTON, J. E., SMITH, D. K., ANGUS, L. J., HILTON, D. J., NICOLA, N. A., WIJDENES, J. & SIMPSON, R. J. 1998. The immunoglobulin-like module of gp130 is required for signaling by interleukin-6, but not by leukemia inhibitory factor. *J Biol Chem*, 273, 22701-7.
- HANSEN, S. 2021. Charakterisierung von Einzeldomänenantikörpern und neuen Fusionsproteinen mit Wirkung auf den Interleukin-6 Signalweg. Medizinische Dissertation. Institut für Biochemie und Molekularbiologie II der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
- HEINK, S., YOGEV, N., GARBERS, C., HERWERTH, M., ALY, L., GASPERI, C., HUSTERER, V., CROXFORD, A. L., MÖLLER-HACKBARTH, K., BARTSCH, H. S., SOTLAR, K., KREBS, S., REGEN, T., BLUM, H., HEMMER, B., MISGELD, T., WUNDERLICH, T. F., HIDALGO, J., OUKKA, M., ROSE-JOHN, S., SCHMIDT-SUPPRIAN, M., WAISMAN, A. & KORN, T. 2017. Trans-presentation of IL-6 by dendritic cells is required for the priming of pathogenic T(H)17 cells. *Nat Immunol*, 18, 74-85.

- HEISE, D., DERRAC SORIA, A., HANSEN, S., DAMBIETZ, C., AKBARZADEH, M., BERG, A. F., WAETZIG, G. H., JONES, S. A., DVORSKY, R., AHMADIAN, M. R., SCHELLER, J. & MOLL, J. M. 2021. Selective inhibition of IL-6 trans-signaling by a miniaturized, optimized chimeric soluble gp130 inhibits TH17 cell expansion. *Sci Signal*, 14.
- HIBI, M., MURAKAMI, M., SAITO, M., HIRANO, T., TAGA, T. & KISHIMOTO, T. 1990. Molecular cloning and expression of an IL-6 signal transducer, gp130. *Cell*, 63, 1149-57.
- HILTON, D. J., HILTON, A. A., RAICEVIC, A., RAKAR, S., HARRISON-SMITH, M., GOUGH, N. M., BEGLEY, C. G., METCALF, D., NICOLA, N. A. & WILLSON, T. A. 1994. Cloning of a murine IL-11 receptor alpha-chain; requirement for gp130 for high affinity binding and signal transduction. *EMBO J*, 13, 4765-75.
- HIRANO, T., MATSUDA, T., TURNER, M., MIYASAKA, N., BUCHAN, G., TANG, B., SATO, K., SHIMIZU, M., MAINI, R., FELDMANN, M. & ET AL. 1988. Excessive production of interleukin 6/B cell stimulatory factor-2 in rheumatoid arthritis. *Eur J Immunol*, 18, 1797-801.
- HIRANO, T., TAGA, T., YASUKAWA, K., NAKAJIMA, K., NAKANO, N., TAKATSUKI, F., SHIMIZU, M., MURASHIMA, A., TSUNASAWA, S., SAKIYAMA, F. & ET AL. 1987. Human B-cell differentiation factor defined by an anti-peptide antibody and its possible role in autoantibody production. *Proc Natl Acad Sci USA*, 84, 228-31.
- HIRANO, T., YASUKAWA, K., HARADA, H., TAGA, T., WATANABE, Y., MATSUDA, T., KASHIWAMURA, S., NAKAJIMA, K., KOYAMA, K., IWAMATSU, A. & ET AL. 1986. Complementary DNA for a novel human interleukin (BSF-2) that induces B lymphocytes to produce immunoglobulin. *Nature*, 324, 73-6.
- HUNTER, C. A. & JONES, S. A. 2015. IL-6 as a keystone cytokine in health and disease. *Nat Immunol*, 16, 448-57.

- ITO, H., TAKAZOE, M., FUKUDA, Y., HIBI, T., KUSUGAMI, K., ANDOH, A., MATSUMOTO, T., YAMAMURA, T., AZUMA, J., NISHIMOTO, N., YOSHIZAKI, K., SHIMOYAMA, T. & KISHIMOTO, T. 2004. A pilot randomized trial of a human anti-interleukin-6 receptor monoclonal antibody in active Crohn's disease. *Gastroenterology*, 126, 989-96.
- IWASA, T., NAKAMURA, K., OGINO, H., ITABA, S., AKIHO, H., OKAMOTO, R., IBOSHI, Y., ASO, A., MURAO, H., KANAYAMA, K., ITO, T. & TAKAYANAGI, R. 2011. Multiple ulcers in the small and large intestines occurred during tocilizumab therapy for rheumatoid arthritis. *Endoscopy*, 43, 70-2.
- JOHNSON, R. W., MCGREGOR, N. E., BRENNAN, H. J., CRIMEEN-IRWIN, B., POULTON, I. J., MARTIN, T. J. & SIMS, N. A. 2015. Glycoprotein130 (Gp130)/interleukin-6 (IL-6) signalling in osteoclasts promotes bone formation in periosteal and trabecular bone. *Bone*, 81, 343-351.
- JONES, S. A., RICHARDS, P. J., SCHELLER, J. & ROSE-JOHN, S. 2005. IL-6 transsignaling: the in vivo consequences. *J Interferon Cytokine Res*, 25, 241-53.
- JOSTOCK, T., BLINN, G., RENNÉ, C., KALLEN, K. J., ROSE-JOHN, S. & MÜLLBERG, J. 1999. Immunoadhesins of interleukin-6 and the IL-6/soluble IL-6R fusion protein hyper-IL-6. *J Immunol Methods*, 223, 171-83.
- JOSTOCK, T., MULLBERG, J., OZBEK, S., ATREYA, R., BLINN, G., VOLTZ, N., FISCHER, M., NEURATH, M. F. & ROSE-JOHN, S. 2001. Soluble gp130 is the natural inhibitor of soluble interleukin-6 receptor transsignaling responses. *Eur J Biochem*, 268, 160-167.
- JOURDAN, M., BATAILLE, R., SEGUIN, J., ZHANG, X. G., CHAPTAL, P. A. & KLEIN, B. 1990. Constitutive production of interleukin-6 and immunologic features in cardiac myxomas. *Arthritis Rheum*, 33, 398-402.
- JUNE, R. R. & OLSEN, N. J. 2016. Room for more IL-6 blockade? Sarilumab for the treatment of rheumatoid arthritis. *Expert Opin Biol Ther*, 16, 1303-9.

- KANG, S., TANAKA, T., NARAZAKI, M. & KISHIMOTO, T. 2019. Targeting Interleukin-6 Signaling in Clinic. *Immunity*, 50, 1007-1023.
- KAPUST, R. B., TÖZSÉR, J., COPELAND, T. D. & WAUGH, D. S. 2002. The P1' specificity of tobacco etch virus protease. *Biochem Biophys Res Commun*, 294, 949-55.
- KAWANO, M., HIRANO, T., MATSUDA, T., TAGA, T., HORII, Y., IWATO, K., ASAOKU, H., TANG, B., TANABE, O., TANAKA, H. & ET AL. 1988. Autocrine generation and requirement of BSF-2/IL-6 for human multiple myelomas. *Nature*, 332, 83-5.
- KEUPP, K., LI, Y., VARGEL, I., HOISCHEN, A., RICHARDSON, R., NEVELING, K., ALANAY, Y., UZ, E., ELCIOĞLU, N., RACHWALSKI, M., KAMACI, S., TUNÇBILEK, G., AKIN, B., GRÖTZINGER, J., KONAS, E., MAVILI, E., MÜLLER-NEWEN, G., COLLMANN, H., ROSCIOLI, T., BUCKLEY, M. F., YIGIT, G., GILISSEN, C., KRESS, W., VELTMAN, J., HAMMERSCHMIDT, M., AKARSU, N. A. & WOLLNIK, B. 2013. Mutations in the interleukin receptor IL11RA cause autosomal recessive Crouzon-like craniosynostosis. *Mol Genet Genomic Med*, 1, 223-37.
- KIMURA, A., NAKA, T. & KISHIMOTO, T. 2007. IL-6-dependent and -independent pathways in the development of interleukin 17-producing T helper cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 104, 12099-104.
- KISHIMOTO, T. 2010. IL-6: from its discovery to clinical applications. *Int Immunol*, 22, 347-52.
- KOCH, L., KESPOHL, B., AGTHE, M., SCHUMERTL, T., DUSTERHOFT, S., LEMBERG, M. K., LOKAU, J. & GARBERS, C. 2021. Interleukin-11 (IL-11) receptor cleavage by the rhomboid protease RHBDL2 induces IL-11 trans-signaling. *FASEB J*, 35, e21380.
- KOPF, M., BAUMANN, H., FREER, G., FREUDENBERG, M., LAMERS, M., KISHIMOTO, T., ZINKERNAGEL, R., BLUETHMANN, H. & KÖHLER, G. 1994. Impaired immune and acute-phase responses in interleukin-6-deficient mice. *Nature*, 368, 339-42.

- LI, Z., KRIPPENDORFF, B. F., SHARMA, S., WALZ, A. C., LAVÉ, T. & SHAH, D. K. 2016. Influence of molecular size on tissue distribution of antibody fragments. *MAbs*, 8, 113-9.
- LIN, M., ROSE-JOHN, S., GRÖTZINGER, J., CONRAD, U. & SCHELLER, J. 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, 577-83.
- LOKAU, J., AGTHE, M. & GARBERS, C. 2016a. Generation of Soluble Interleukin-11 and Interleukin-6 Receptors: A Crucial Function for Proteases during Inflammation. *Mediators Inflamm*, 2016, 1785021.
- LOKAU, J. & GARBERS, C. 2019. Activating mutations of the gp130/JAK/STAT pathway in human diseases. *Adv Protein Chem Struct Biol*, 116, 283-309.
- LOKAU, J., GARBERS, Y., GRÖTZINGER, J. & GARBERS, C. 2021. A single aromatic residue in sgp130Fc/olamkicept allows the discrimination between interleukin-6 and interleukin-11 trans-signaling. *iScience*, 24, 103309.
- LOKAU, J., NITZ, R., AGTHE, M., MONHASERY, N., APARICIO-SIEGMUND, S., SCHUMACHER, N., WOLF, J., MOLLER-HACKBARTH, K., WAETZIG, G. H., GROTZINGER, J., MULLER-NEWEN, G., ROSE-JOHN, S., SCHELLER, J. & GARBERS, C. 2016b. Proteolytic Cleavage Governs Interleukin-11 Trans-signaling. *Cell Rep*, 14, 1761-1773.
- LOKAU, J., WANDEL, M. & GARBERS, C. 2017. Enhancing Interleukin-6 and Interleukin-11 receptor cleavage. *Int J Biochem Cell Biol*, 85, 6-14.
- LUST, J. A., DONOVAN, K. A., KLINE, M. P., GREIPP, P. R., KYLE, R. A. & MAIHLE, N. J. 1992. Isolation of an mRNA encoding a soluble form of the human interleukin-6 receptor. *Cytokine*, 4, 96-100.

- MENDEL, I., KATZ, A., KOZAK, N., BEN-NUN, A. & REVEL, M. 1998. Interleukin-6 functions in autoimmune encephalomyelitis: a study in gene-targeted mice. *Eur J Immunol*, 28, 1727-37.
- MIHARA, M., NISHIMOTO, N. & OHSUGI, Y. 2005. The therapy of autoimmune diseases by anti-interleukin-6 receptor antibody. *Expert Opin Biol Ther*, 5, 683-90.
- MINHU CHEN, D., FIRST AFFILIATED HOSPITAL, SUN YAT-SEN UNIVERSITY 2018 - 2020. A Phase II, Randomized, Double-blind, Placebo-controlled Study to Evaluate the Safety and Efficacy of TJ301 (FE 999301) Administered Intravenously in Patients With Active Ulcerative Colitis. ClinicalTrials.gov Identifier: NCT03235752: I-Mab Biopharma HongKong Limited.
- MITSUYAMA, K., SASAKI, E., TOYONAGA, A., IKEDA, H., TSURUTA, O., IRIE, A., ARIMA, N., ORIISHI, T., HARADA, K., FUJISAKI, K. & ET AL. 1991. Colonic mucosal interleukin-6 in inflammatory bowel disease. *Digestion*, 50, 104-11.
- MOLL, J. M., WEHMÖLLER, M., FRANK, N. C., HOMEY, L., BARAN, P., GARBERS, C., LAMERTZ, L., AXELROD, J. H., GALUN, E., MOOTZ, H. D. & SCHELLER, J. 2017. Split(2) Protein-Ligation Generates Active IL-6-Type Hyper-Cytokines from Inactive Precursors. *ACS Synth Biol*, 6, 2260-2272.
- MONEGAL, A., AMI, D., MARTINELLI, C., HUANG, H., ALIPRANDI, M., CAPASSO, P., FRANCAVILLA, C., OSSOLENGO, G. & DE MARCO, A. 2009. Immunological applications of single-domain llama recombinant antibodies isolated from a naive library. *Protein Eng Des Sel*, 22, 273-80.
- MÜLLBERG, J., SCHOOLTINK, H., STOYAN, T., GÜNTHER, M., GRAEVE, L., BUSE, G., MACKIEWICZ, A., HEINRICH, P. C. & ROSE-JOHN, S. 1993. The soluble interleukin-6 receptor is generated by shedding. *Eur J Immunol*, 23, 473-80.
- MURAKAMI, M., HIBI, M., NAKAGAWA, N., NAKAGAWA, T., YASUKAWA, K., YAMANISHI, K., TAGA, T. & KISHIMOTO, T. 1993. IL-6-induced homodimerization of gp130 and associated activation of a tyrosine kinase. *Science*, 260, 1808-10.

- MUSASHI, M., YANG, Y. C., PAUL, S. R., CLARK, S. C., SUDO, T. & OGAWA, M. 1991. Direct and synergistic effects of interleukin 11 on murine hemopoiesis in culture. *Proc Natl Acad Sci USA*, 88, 765-9.
- MUYLDERMANS, S. 2021. Applications of Nanobodies. *Annu Rev Anim Biosci*, 9, 401-421.
- NG, B., COOK, S. A. & SCHAFER, S. 2020. Interleukin-11 signaling underlies fibrosis, parenchymal dysfunction, and chronic inflammation of the airway. *Exp Mol Med*, 52, 1871-1878.
- NIEMINEN, P., MORGAN, N. V., FENWICK, A. L., PARMANEN, S., VEISTINEN, L., MIKKOLA, M. L., VAN DER SPEK, P. J., GIRAUD, A., JUDD, L., ARTE, S., BRUETON, L. A., WALL, S. A., MATHIJSEN, I. M., MAHER, E. R., WILKIE, A. O., KREIBORG, S. & THESLEFF, I. 2011. Inactivation of IL11 signaling causes craniosynostosis, delayed tooth eruption, and supernumerary teeth. *Am J Hum Genet*, 89, 67-81.
- NISHIMOTO, N., HASHIMOTO, J., MIYASAKA, N., YAMAMOTO, K., KAWAI, S., TAKEUCHI, T., MURATA, N., VAN DER HEIJDE, D. & KISHIMOTO, T. 2007. Study of active controlled monotherapy used for rheumatoid arthritis, an IL-6 inhibitor (SAMURAI): evidence of clinical and radiographic benefit from an x ray reader-blinded randomised controlled trial of tocilizumab. *Ann Rheum Dis*, 66, 1162-7.
- NISHIMOTO, N., MIYASAKA, N., YAMAMOTO, K., KAWAI, S., TAKEUCHI, T. & AZUMA, J. 2009a. Long-term safety and efficacy of tocilizumab, an anti-IL-6 receptor monoclonal antibody, in monotherapy, in patients with rheumatoid arthritis (the STREAM study): evidence of safety and efficacy in a 5-year extension study. *Ann Rheum Dis*, 68, 1580-4.
- NISHIMOTO, N., MIYASAKA, N., YAMAMOTO, K., KAWAI, S., TAKEUCHI, T., AZUMA, J. & KISHIMOTO, T. 2009b. Study of active controlled tocilizumab monotherapy for rheumatoid arthritis patients with an inadequate response to methotrexate (SATORI): significant reduction in disease activity and serum vascular endothelial growth factor by IL-6 receptor inhibition therapy. *Mod Rheumatol*, 19, 12-9.

- NISHIMOTO, N., YOSHIZAKI, K., MIYASAKA, N., YAMAMOTO, K., KAWAI, S., TAKEUCHI, T., HASHIMOTO, J., AZUMA, J. & KISHIMOTO, T. 2004. Treatment of rheumatoid arthritis with humanized anti-interleukin-6 receptor antibody: a multicenter, double-blind, placebo-controlled trial. *Arthritis Rheum*, 50, 1761-9.
- NOWELL, M. A., RICHARDS, P. J., HORIUCHI, S., YAMAMOTO, N., ROSE-JOHN, S., TOPLEY, N., WILLIAMS, A. S. & JONES, S. A. 2003. Soluble IL-6 receptor governs IL-6 activity in experimental arthritis: blockade of arthritis severity by soluble glycoprotein 130. *J Immunol*, 171, 3202-9.
- NOWELL, M. A., WILLIAMS, A. S., CARTY, S. A., SCHELLER, J., HAYES, A. J., JONES, G. W., RICHARDS, P. J., SLINN, S., ERNST, M., JENKINS, B. J., TOPLEY, N., ROSE-JOHN, S. & JONES, S. A. 2009. Therapeutic targeting of IL-6 trans signaling counteracts STAT3 control of experimental inflammatory arthritis. *J Immunol*, 182, 613-22.
- OHSHIMA, S., SAEKI, Y., MIMA, T., SASAI, M., NISHIOKA, K., NOMURA, S., KOPF, M., KATADA, Y., TANAKA, T., SUEMURA, M. & KISHIMOTO, T. 1998. Interleukin 6 plays a key role in the development of antigen-induced arthritis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 95, 8222-6.
- PAGLIA, D., ORAN, A., LU, C., KERBEL, R. S., SAUDER, D. N. & MCKENZIE, R. C. 1995. Expression of leukemia inhibitory factor and interleukin-11 by human melanoma cell lines: LIF, IL-6, and IL-11 are not coregulated. *J Interferon Cytokine Res*, 15, 455-60.
- PARKS, T. D., LEUTHER, K. K., HOWARD, E. D., JOHNSTON, S. A. & DOUGHERTY, W. G. 1994. Release of proteins and peptides from fusion proteins using a recombinant plant virus proteinase. *Anal Biochem*, 216, 413-7.
- PAUL, S. R., BENNETT, F., CALVETTI, J. A., KELLEHER, K., WOOD, C. R., O'HARA, R. M., JR., LEARY, A. C., SIBLEY, B., CLARK, S. C., WILLIAMS, D. A. & ET AL. 1990. Molecular cloning of a cDNA encoding interleukin 11, a stromal cell-derived lymphopoietic and hematopoietic cytokine. *Proc Natl Acad Sci USA*, 87, 7512-6.

- PUTOCZKI, T. & ERNST, M. 2010. More than a sidekick: the IL-6 family cytokine IL-11 links inflammation to cancer. *J Leukoc Biol*, 88, 1109-17.
- QUESNIAUX, V. F., CLARK, S. C., TURNER, K. & FAGG, B. 1992. Interleukin-11 stimulates multiple phases of erythropoiesis in vitro. *Blood*, 80, 1218-23.
- RARAN-KURUSSI, S., CHERRY, S., ZHANG, D. & WAUGH, D. S. 2017. Removal of Affinity Tags with TEV Protease. *Methods Mol Biol*, 1586, 221-230.
- REN, L., WANG, X., DONG, Z., LIU, J. & ZHANG, S. 2013. Bone metastasis from breast cancer involves elevated IL-11 expression and the gp130/STAT3 pathway. *Med Oncol*, 30, 634.
- RICHARDS, P. J., NOWELL, M. A., HORIUCHI, S., MCLOUGHLIN, R. M., FIELDING, C. A., GRAU, S., YAMAMOTO, N., EHRMANN, M., ROSE-JOHN, S., WILLIAMS, A. S., TOPLEY, N. & JONES, S. A. 2006. Functional characterization of a soluble gp130 isoform and its therapeutic capacity in an experimental model of inflammatory arthritis. *Arthritis Rheum*, 54, 1662-72.
- RIETHMUELLER, S., SOMASUNDARAM, P., EHLERS, J. C., HUNG, C. W., FLYNN, C. M., LOKAU, J., AGTHE, M., DÜSTERHÖFT, S., ZHU, Y., GRÖTZINGER, J., LORENZEN, I., KOUDELKA, T., YAMAMOTO, K., PICKHINKE, U., WICHERT, R., BECKER-PAULY, C., RÄDISCH, M., ALBRECHT, A., HESSEFORT, M., STAHNKE, D., UNVERZAGT, C., ROSE-JOHN, S., THOLEY, A. & GARBERS, C. 2017. Proteolytic Origin of the Soluble Human IL-6R In Vivo and a Decisive Role of N-Glycosylation. *PLoS Biol*, 15, e2000080.
- ROBB, L., LI, R., HARTLEY, L., NANDURKAR, H. H., KOENTGEN, F. & BEGLEY, C. G. 1998. Infertility in female mice lacking the receptor for interleukin 11 is due to a defective uterine response to implantation. *Nat Med*, 4, 303-8.
- 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, 1237-47.

- ROSE-JOHN, S. 2017. The Soluble Interleukin 6 Receptor: Advanced Therapeutic Options in Inflammation. *Clin Pharmacol Ther*, 102, 591-598.
- ROSE-JOHN, S. 2020. Interleukin-6 signalling in health and disease. *F1000Res*, 9.
- SAMMEL, M., PETERS, F., LOKAU, J., SCHARFENBERG, F., WERNY, L., LINDER, S., GARBERS, C., ROSE-JOHN, S. & BECKER-PAULY, C. 2019. Differences in Shedding of the Interleukin-11 Receptor by the Proteases ADAM9, ADAM10, ADAM17, Meprin alpha, Meprin beta and MT1-MMP. *Int J Mol Sci*, 20.
- SAMSON, M., AUDIA, S., JANIKASHVILI, N., CIUDAD, M., TRAD, M., FRASZCZAK, J., ORNETTI, P., MAILLEFERT, J. F., MIOSSEC, P. & BONNOTTE, B. 2012. Brief report: inhibition of interleukin-6 function corrects Th17/Treg cell imbalance in patients with rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 64, 2499-503.
- SCHAFER, S., VISWANATHAN, S., WIDJAJA, A. A., LIM, W. W., MORENO-MORAL, A., DELAUGHTER, D. M., NG, B., PATONE, G., CHOW, K., KHIN, E., TAN, J., CHOTHANI, S. P., YE, L., RACKHAM, O. J. L., KO, N. S. J., SAHIB, N. E., PUA, C. J., ZHEN, N. T. G., XIE, C., WANG, M., MAATZ, H., LIM, S., SAAR, K., BLACHUT, S., PETRETTO, E., SCHMIDT, S., PUTOCZKI, T., GUIMARAES-CAMBOA, N., WAKIMOTO, H., VAN HEESCH, S., SIGMUNDSSON, K., LIM, S. L., SOON, J. L., CHAO, V. T. T., CHUA, Y. L., TAN, T. E., EVANS, S. M., LOH, Y. J., JAMAL, M. H., ONG, K. K., CHUA, K. C., ONG, B. H., CHAKARAMAKKIL, M. J., SEIDMAN, J. G., SEIDMAN, C. E., HUBNER, N., SIN, K. Y. K. & COOK, S. A. 2017. IL-11 is a crucial determinant of cardiovascular fibrosis. *Nature*, 552, 110-115.
- SCHETT, G., ELEWAUT, D., MCINNES, I. B., DAYER, J. M. & NEURATH, M. F. 2013. How cytokine networks fuel inflammation: Toward a cytokine-based disease taxonomy. *Nat Med*, 19, 822-4.

- SCHREIBER, S., ADEN, K., BERNARDES, J. P., CONRAD, C., TRAN, F., HÖPER, H., VOLK, V., MISHRA, N., BLASE, J. I., NIKOLAUS, S., BETHGE, J., KÜHBACHER, T., RÖCKEN, C., CHEN, M., COTTINGHAM, I., PETRI, N., RASMUSSEN, B. B., LOKAU, J., LENK, L., GARBERS, C., FEUERHAKE, F., ROSE-JOHN, S., WAETZIG, G. H. & ROSENSTIEL, P. 2021. Therapeutic Interleukin-6 Trans-signaling Inhibition by Olamkicept (sgp130Fc) in Patients With Active Inflammatory Bowel Disease. *Gastroenterology*, 160, 2354-2366.e11.
- SERADA, S., FUJIMOTO, M., MIHARA, M., KOIKE, N., OHSUGI, Y., NOMURA, S., YOSHIDA, H., NISHIKAWA, T., TERABE, F., OHKAWARA, T., TAKAHASHI, T., RIPLEY, B., KIMURA, A., KISHIMOTO, T. & NAKA, T. 2008. IL-6 blockade inhibits the induction of myelin antigen-specific Th17 cells and Th1 cells in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 105, 9041-6.
- SHEPPARD, M., LASKOU, F., STAPLETON, P. P., HADAVI, S. & DASGUPTA, B. 2017. Tocilizumab (Actemra). *Hum Vaccin Immunother*, 13, 1972-1988.
- SIMS, N. A., JENKINS, B. J., NAKAMURA, A., QUINN, J. M., LI, R., GILLESPIE, M. T., ERNST, M., ROBB, L. & MARTIN, T. J. 2005. Interleukin-11 receptor signaling is required for normal bone remodeling. *J Bone Miner Res*, 20, 1093-102.
- SOLIMANI, F., HILKE, F. J. & GHORESCHI, K. 2019. Pharmacology of Janus kinase inhibitors. *Hautarzt*, 70, 934-941.
- SOMMER, J., GARBERS, C., WOLF, J., TRAD, A., MOLL, J. M., SACK, M., FISCHER, R., GRÖTZINGER, J., WAETZIG, G. H., FLOSS, D. M. & SCHELLER, J. 2014. Alternative intronic polyadenylation generates the interleukin-6 trans-signaling inhibitor sgp130-E10. *J Biol Chem*, 289, 22140-50.
- SPECKER, C., ALBERDING, A., ARINGER, M., BURMESTER, G. R., FLACKE, J. P., HOFMANN, M. W., KÄSTNER, P., KELLNER, H., MOOSIG, F., SIEBURG, M., TONY, H. P. & FLIEDNER, G. 2021. ICHIBAN, a non-interventional study evaluating tocilizumab long-term effectiveness and safety in patients with active rheumatoid arthritis. *Clin Exp Rheumatol*, 39, 319-328.

- STRANGFELD, A., RICHTER, A., SIEGMUND, B., HERZER, P., ROCKWITZ, K., DEMARY, W., ARINGER, M., MEIBNER, Y., ZINK, A. & LISTING, J. 2017. Risk for lower intestinal perforations in patients with rheumatoid arthritis treated with tocilizumab in comparison to treatment with other biologic or conventional synthetic DMARDs. *Ann Rheum Dis*, 76, 504-510.
- SUZUKI, Y., SAITO, H., KASANUKI, J., KISHIMOTO, T., TAMURA, Y. & YOSHIDA, S. 1990. Significant increase of interleukin 6 production in blood mononuclear leukocytes obtained from patients with active inflammatory bowel disease. *Life Sci*, 47, 2193-7.
- TACKEN, I., DAHMEN, H., BOISTEAU, O., MINVIELLE, S., JACQUES, Y., GROTZINGER, J., KUSTER, A., HORSTEN, U., BLANC, C., MONTERO-JULIAN, F. A., HEINRICH, P. C. & MULLER-NEWEN, G. 1999. Definition of receptor binding sites on human interleukin-11 by molecular modeling-guided mutagenesis. *Eur J Biochem*, 265, 645-55.
- TAGA, T., HIBI, M., HIRATA, Y., YAMASAKI, K., YASUKAWA, K., MATSUDA, T., HIRANO, T. & KISHIMOTO, T. 1989. Interleukin-6 triggers the association of its receptor with a possible signal transducer, gp130. *Cell*, 58, 573-81.
- TAGA, T. & KISHIMOTO, T. 1997. Gp130 and the interleukin-6 family of cytokines. *Annu Rev Immunol*, 15, 797-819.
- TAKEUCHI, Y., WATANABE, S., ISHII, G., TAKEDA, S., NAKAYAMA, K., FUKUMOTO, S., KANETA, Y., INOUE, D., MATSUMOTO, T., HARIGAYA, K. & FUJITA, T. 2002. Interleukin-11 as a stimulatory factor for bone formation prevents bone loss with advancing age in mice. *J Biol Chem*, 277, 49011-8.
- TANAKA, M., KISHIMURA, M., OZAKI, S., OSAKADA, F., HASHIMOTO, H., OKUBO, M., MURAKAMI, M. & NAKAO, K. 2000. Cloning of novel soluble gp130 and detection of its neutralizing autoantibodies in rheumatoid arthritis. *J Clin Invest*, 106, 137-44.
- TANAKA, T., NARAZAKI, M. & KISHIMOTO, T. 2018. Interleukin (IL-6) Immunotherapy. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 10.

- TANIGUCHI, K., WU, L. W., GRIVENNIKOV, S. I., DE JONG, P. R., LIAN, I., YU, F. X., WANG, K., HO, S. B., BOLAND, B. S., CHANG, J. T., SANDBORN, W. J., HARDIMAN, G., RAZ, E., MAEHARA, Y., YOSHIMURA, A., ZUCMAN-ROSSI, J., GUAN, K. L. & KARIN, M. 2015. A gp130-Src-YAP module links inflammation to epithelial regeneration. *Nature*, 519, 57-62.
- TENHUMBERG, S., WAETZIG, G. H., CHALARIS, A., RABE, B., SEEGERT, D., SCHELLER, J., ROSE-JOHN, S. & GROTZINGER, J. 2008. Structure-guided optimization of the interleukin-6 trans-signaling antagonist sgp130. *J Biol Chem*, 283, 27200-7.
- TERAMURA, M., KOBAYASHI, S., HOSHINO, S., OSHIMI, K. & MIZOGUCHI, H. 1992. Interleukin-11 enhances human megakaryocytopoiesis in vitro. *Blood*, 79, 327-31.
- TORISU-ITAKURA, H., LEE, J. H., SCHERI, R. P., HUYNH, Y., YE, X., ESSNER, R. & MORTON, D. L. 2007. Molecular characterization of inflammatory genes in sentinel and nonsentinel nodes in melanoma. *Clin Cancer Res*, 13, 3125-32.
- UCIECHOWSKI, P. & DEMPKE, W. C. M. 2020. Interleukin-6: A Masterplayer in the Cytokine Network. *Oncology*, 98, 131-137.
- VAN DAMME, J., OPDENAKKER, G., SIMPSON, R. J., RUBIRA, M. R., CAYPHAS, S., VINK, A., BILLIAU, A. & VAN SNICK, J. 1987. Identification of the human 26-kD protein, interferon beta 2 (IFN-beta 2), as a B cell hybridoma/plasmacytoma growth factor induced by interleukin 1 and tumor necrosis factor. *J Exp Med*, 165, 914-9.
- VAN DER LINDEN, R. H., FRENKEN, L. G., DE GEUS, B., HARMSSEN, M. M., RUULS, R. C., STOK, W., DE RON, L., WILSON, S., DAVIS, P. & VERRIPS, C. T. 1999. Comparison of physical chemical properties of llama VHH antibody fragments and mouse monoclonal antibodies. *Biochim Biophys Acta*, 1431, 37-46.
- VENKITESHWARAN, A. 2009. Tocilizumab. *MAbs*, 1, 432-8.

- WAAGE, A., BRANDTZAEG, P., HALSTENSEN, A., KIERULF, P. & ESPEVIK, T. 1989. The complex pattern of cytokines in serum from patients with meningococcal septic shock. Association between interleukin 6, interleukin 1, and fatal outcome. *J Exp Med*, 169, 333-8.
- WIDJAJA, A. A., SINGH, B. K., ADAMI, E., VISWANATHAN, S., DONG, J., D'AGOSTINO, G. A., NG, B., LIM, W. W., TAN, J., PALEJA, B. S., TRIPATHI, M., LIM, S. Y., SHEKERAN, S. G., CHOTHANI, S. P., RABES, A., SOMBETZKI, M., BRUINSTROOP, E., MIN, L. P., SINHA, R. A., ALBANI, S., YEN, P. M., SCHAFFER, S. & COOK, S. A. 2019. Inhibiting Interleukin 11 Signaling Reduces Hepatocyte Death and Liver Fibrosis, Inflammation, and Steatosis in Mouse Models of Nonalcoholic Steatohepatitis. *Gastroenterology*, 157, 777-792 e14.
- WILKINSON, A. N., GARTLAN, K. H., KELLY, G., SAMSON, L. D., OLVER, S. D., AVERY, J., ZOMERDIJK, N., TEY, S. K., LEE, J. S., VUCKOVIC, S. & HILL, G. R. 2018. Granulocytes Are Unresponsive to IL-6 Due to an Absence of gp130. *J Immunol*, 200, 3547-3555.
- WOLF, J., WAETZIG, G. H., REINHEIMER, T. M., SCHELLER, J., ROSE-JOHN, S. & GARBERS, C. 2016. A soluble form of the interleukin-6 family signal transducer gp130 is dimerized via a C-terminal disulfide bridge resulting from alternative mRNA splicing. *Biochem Biophys Res Commun*, 470, 870-6.
- XU, Y., KERSHAW, N. J., LUO, C. S., SOO, P., POCOCK, M. J., CZABOTAR, P. E., HILTON, D. J., NICOLA, N. A., GARRETT, T. P. & ZHANG, J. G. 2010. Crystal structure of the entire ectodomain of gp130: insights into the molecular assembly of the tall cytokine receptor complexes. *J Biol Chem*, 285, 21214-8.
- YAMASAKI, K., TAGA, T., HIRATA, Y., YAWATA, H., KAWANISHI, Y., SEED, B., TANIGUCHI, T., HIRANO, T. & KISHIMOTO, T. 1988. Cloning and expression of the human interleukin-6 (BSF-2/IFN beta 2) receptor. *Science*, 241, 825-8.
- YANG, Y. C. & YIN, T. 1992. Interleukin-11 and its receptor. *Biofactors*, 4, 15-21.

- YASUDA, K., TAKEUCHI, Y. & HIROTA, K. 2019. The pathogenicity of Th17 cells in autoimmune diseases. *Semin Immunopathol*, 41, 283-297.
- YIN, T., MIYAZAWA, K. & YANG, Y. C. 1992. Characterization of interleukin-11 receptor and protein tyrosine phosphorylation induced by interleukin-11 in mouse 3T3-L1 cells. *J Biol Chem*, 267, 8347-51.
- YIN, T., TAGA, T., TSANG, M. L., YASUKAWA, K., KISHIMOTO, T. & YANG, Y. C. 1993. Involvement of IL-6 signal transducer gp130 in IL-11-mediated signal transduction. *J Immunol*, 151, 2555-61.
- YOSHIDA, H., HASHIZUME, M. & MIHARA, M. 2011. IL-6 blockade preferentially inhibits Th17 differentiation in collagen-induced arthritis. *Rheumatol Int*, 31, 127-31.
- YOSHIZAKI, K., MATSUDA, T., NISHIMOTO, N., KURITANI, T., TAEHO, L., AOZASA, K., NAKAHATA, T., KAWAI, H., TAGOH, H., KOMORI, T. & ET AL. 1989. Pathogenic significance of interleukin-6 (IL-6/BSF-2) in Castleman's disease. *Blood*, 74, 1360-7.
- YOSHIZAKI, K., MURAYAMA, S., ITO, H. & KOGA, T. 2018. The Role of Interleukin-6 in Castleman Disease. *Hematol Oncol Clin North Am*, 32, 23-36.
- ZHANG, Y., FUJITA, N., OH-HARA, T., MORINAGA, Y., NAKAGAWA, T., YAMADA, M. & TSURUO, T. 1998. Production of interleukin-11 in bone-derived endothelial cells and its role in the formation of osteolytic bone metastasis. *Oncogene*, 16, 693-703.
- ZUNKE, F. & ROSE-JOHN, S. 2017. The shedding protease ADAM17: Physiology and pathophysiology. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, 1864, 2059-2070.

## 7 ANHANG

**Tabelle 20: Vergleich der inhibitorischen Effektivität diverser sgp130-Varianten auf das IL-6 *Trans-Signaling***

Dargestellt sind bisher untersuchte IL-6 *Trans-Signaling* Inhibitoren im Vergleich mit sgp130Fc. Es wird unterschieden, ob eine Proliferation mit den Einzelkomponenten IL-6 und sIL-6R oder Hyper-IL-6 durchgeführt wurde. Eine Berechnung der inhibitorischen halbmaximalen Kapazität ( $IC_{50}$ ) wurde jeweils für die Stimulation durch IL-6/sIL-6R oder Hyper-IL-6 angegeben. Ebenfalls wurde eine Zusammenstellung der  $K_D$ -Werte erstellt, die mittels SPR-Analyse für jeden Inhibitor mit immobilisiertem Hyper-IL-6 durchgeführt wurde. Es wurden für alle Inhibitoren gleichermaßen Ba/F3-gp130 Zellen zur Untersuchung der Zellproliferation verwendet. Abkürzungen sind wie folgt zu deuten: k. A.: keine Angabe der Konzentration

Inhibitor	Stimulation		$IC_{50}$		SPR-Analyse $K_D$ Hyper-IL-6 [nM]	Quellen
	IL-6/ sIL-6R [ng/ml]	Hyper- IL-6 [ng/ml]	IL-6/ sIL-6R	Hyper- IL-6 [nM]		
sgp130Fc	10/200 <sup>3</sup> 50/100 <sup>5,6</sup>	10 <sup>2,3</sup> k.A. <sup>4</sup>	<b>0,003 nM<sup>3</sup></b> <b>0,45 nM<sup>5</sup></b> <b>0,87 nM<sup>6</sup></b>	<b>0,067<sup>3</sup></b>	<b>4<sup>1</sup></b> <b>0,6<sup>2</sup></b> <b>0,009<sup>4</sup></b> <b>0,15<sup>5</sup></b>	Jostock et al. (2001) <sup>1</sup> Tenhumberg et al. (2008) <sup>2</sup> Garbers et al. (2011) <sup>3</sup> Sommer et al. (2014) <sup>4</sup> Berg et al. (2021) <sup>5</sup> Heise et al. (2021) <sup>6</sup>
sgp130His	10/200	-	<b>50,13 ng/ml</b>	-	-	Garbers et al. (2011)
gp130-RAPS	-	-	-	-	<b>6,9</b>	Richards et al. (2006)
sgp130-E10Fc	-	k. A.	-	<b>67</b>	<b>0,071</b>	Sommer et al. (2014)
sgp130-E10myc-his	-	-	-	-	-	Sommer et al. (2014)
mini-gp130-ELP	-	-	-	-	-	Lin et al. (2006)

**Tabelle 21: Inhibitorische Effektivität der cs130-Varianten auf das IL-6 *Trans-Signaling*, modifiziert nach Heise et al. (2021)**

Dargestellt sind in dieser Arbeit untersuchte IL-6 *Trans-Signaling* Inhibitoren im Vergleich mit sgp130Fc. IC<sub>50</sub>-Werte wurden für die Stimulation durch IL-6/sIL-6R angegeben. Die K<sub>D</sub>-Werte wurden als K<sub>off</sub>-Werte angegeben, die mit immobilisiertem Hyper-IL-6 erfolgten (Heise et al., 2021). Es wurden für alle Inhibitoren gleichermaßen Ba/F3-gp130 Zellen zur Untersuchung der Zellproliferation herangezogen. Angaben mit (-) weisen darauf hin, dass entweder keine Angabe der Autoren erfolgte oder Experimente in diesem Bezug nicht stattgefunden haben.<sup>1</sup>IC<sub>50</sub>-Werte wurden in der Publikation Heise et al. (2021) für jeden Inhibitor für n=3 Experimente berechnet. <sup>2</sup>IC<sub>50</sub>-Werte wurden in dieser Arbeit für sgp130Fc für n=9 Experimente berechnet, während n=6 Experimente für cs-130Fc, cs-130 und cs-130<sup>T102Y/Q113F/N114L</sup>Fc berechnet wurden.

Inhibitor	Stimulation	IC <sub>50</sub>	SPR-Analyse	Quellen
	IL-6/ sIL-6R [ng/ml]	IL-6/ sIL-6R [nM]	K <sub>off</sub> <sup>Hyper-IL-6</sup> [1/s]	
sgp130Fc	50/100	<b>0,87 ± 0,68<sup>1</sup></b> <b>0,97 ± 0,62<sup>2</sup></b>	<b>7,2E<sup>-5</sup></b>	Heise et al. (2021) <sup>1</sup> , diese Arbeit <sup>2</sup>
cs-130Fc	50/100	<b>0,46 ± 0,39<sup>1</sup></b> <b>0,33 ± 0,18<sup>2</sup></b>	<b>3,6E<sup>-3</sup></b>	Heise et al. (2021) <sup>1</sup> , diese Arbeit <sup>2</sup>
cs-130	50/100	<b>1,46 ± 1,46<sup>1</sup></b> <b>1,13 ± 0,62<sup>2</sup></b>	-	Heise et al. (2021) <sup>1</sup> , diese Arbeit <sup>2</sup>
c <sub>GFPS</sub> -130Fc	50/100	<b>6,54 ± 5,04</b>	-	Heise et al. (2021), diese Arbeit
cs-130 <sup>Y190K/F191E</sup> Fc	50/100	<b>7,55 ± 6,07</b>	-	Heise et al. (2021), diese Arbeit
cs-130 <sup>D1TEVD2D3</sup> Fc	50/100	<b>0,78 ± 0,30</b>	-	Diese Arbeit
sgp130 <sup>FLY</sup> Fc	50/100	<b>0,27 ± 0,18</b>	-	Heise et al. (2021), diese Arbeit
cs-130 <sup>FLY</sup> Fc	50/100	<b>0,36 ± 0,16<sup>1</sup></b> <b>0,46 ± 0,14<sup>2</sup></b>	-	Heise et al. (2021) <sup>1</sup> , diese Arbeit <sup>2</sup>
cs-130 <sup>FLY</sup>	50/100	<b>0,48 ± 0,08</b>	-	Heise et al. (2021), diese Arbeit

**Tabelle 22: Vergleich der inhibitorischen Effektivität diverser sgp130-Mutanten mit sgp130Fc in Bezug auf der Hemmung des IL-6 *Trans-Signalings***

Dargestellt sind bisher untersuchte IL-6 *Trans-Signaling* sgp130-Mutanten im Vergleich mit sgp130Fc. Es wurde unterschieden, ob eine Proliferation mit den Einzelkomponenten IL-6 und sIL-6R oder mit Hyper-IL-6 erfolgte. Eine Berechnung der IC<sub>50</sub>-Werte wurde jeweils für die Stimulation durch IL-6/sIL-6R angegeben. Ergebnisse aus SPR-Analysen wurden als K<sub>D</sub>-Werte angegeben, die mit immobilisiertem Hyper-IL-6 durchgeführt wurden. Es wurden für alle Inhibitoren gleichermaßen Ba/F3-gp130 Zellen zur Untersuchung der Zellproliferation verwendet. Angaben mit (-) weisen darauf hin, dass entweder keine Angabe der Autoren erfolgte oder Experimente in diesem Bezug nicht stattgefunden haben.

Inhibitor	Stimulation			IC <sub>50</sub>	SPR-Analyse K <sub>D</sub> <sup>Hyper-IL-6</sup>	Quellen
	IL-6/ sIL-6R	Hyper- IL-6				
	[nM]	[ng/ml]	[ng/ml]	[nM]		
sgp130Fc	-	-	10	-	<b>0,6</b>	Tenhumberg et al. (2008)
	-	50/100	-	<b>0,45</b>	<b>0,15</b>	Berg et al. (2021)
	0,5/5	-	-	-	-	Lokau et al. (2021)
	-	50/100	-	<b>0,87</b>	-	Heise et al. (2021), diese Arbeit
sgp130 <sup>FLY</sup> Fc	-	-	10	-	<b>0,12</b>	Tenhumberg et al. (2008)
	-	50/100	-	<b>0,18</b>	-	Berg et al. (2021)
	0,5/5	-	-	-	-	Lokau et al. (2021)
	-	50/100	-	<b>0,27</b>	-	Heise et al. (2021), diese Arbeit
sgp130 <sup>R281Q</sup> Fc	-	50/100	-	<b>0,78</b>	<b>0,09</b>	Berg et al. (2021)
sgp130 <sup>FlyR</sup> Fc	-	50/100	-	<b>1,66</b>	<b>0,04</b>	Berg et al. (2021)
sgp130 <sup>T102Y</sup> Fc	0,5/5	-	-	-	-	Lokau et al. (2021)
sgp130 <sup>Q113F</sup> Fc	0,5/5	-	-	-	-	Lokau et al. (2021)
sgp130 <sup>T102Y/Q113F</sup> Fc	0,5/5	-	-	-	-	Lokau et al. (2021)
cs-130 <sup>FLY</sup> Fc	-	50/100	-	<b>0,36</b>	-	Heise et al. (2021), diese Arbeit
cs-130 <sup>FLY</sup>	-	50/100	-	<b>0,48</b>	-	Heise et al. (2021), diese Arbeit

**Tabelle 23: Inhibitorische Effektivität der cs130-Varianten auf das IL-11 *Trans-Signaling*, modifiziert nach Heise et al. (2021)**

Dargestellt sind in dieser Arbeit untersuchte IL-11 *Trans-Signaling* Inhibitoren im Vergleich mit sgp130Fc. Eine Berechnung der IC<sub>50</sub>-Werte wurde jeweils für die Stimulation mit den Einzelkomponenten IL-11 und sIL-11R angegeben. Die Ergebnisse der SPR-Analysen wurden entsprechend den Publikationsdaten aus Heise et al. (2021) als K<sub>D</sub>-Werte angegeben, die mit immobilisiertem Hyper-IL-11 erfolgten. Es wurden für alle Inhibitoren gleichermaßen Ba/F3-gp130 Zellen zur Untersuchung der Zellproliferation herangezogen. <sup>1</sup>IC<sub>50</sub>-Werte wurden in der Publikation Heise et al. (2021) für jeden Inhibitor für n=3 Experimente berechnet. <sup>2</sup>IC<sub>50</sub>-Werte wurden in dieser Arbeit für sgp130Fc für n=9 und cs-130Fc für n=8 Experimente berechnet. Angaben mit (-) weisen darauf hin, dass entweder keine Angabe der Autoren erfolgte oder Experimente in diesem Bezug nicht stattgefunden haben.

Inhibitor	Stimulation	IC <sub>50</sub>	SPR-Analyse	Quellen
	IL-11/ sIL-11R [ng/ml]	IL-11/ sIL-11R [nM]	K <sub>D</sub> <sup>Hyper-IL-11</sup> [nM]	
sgp130Fc	10/100	<b>0,22 ± 0,02<sup>1</sup></b> <b>0,62 ± 0,41<sup>2</sup></b>	<b>0,031<sup>1</sup></b>	Heise et al. (2021) <sup>1</sup> , diese Arbeit <sup>2</sup>
cs-130Fc	10/100	<b>7,14 ± 3,77<sup>1</sup></b> <b>6,68 ± 2,74<sup>2</sup></b>	<b>8,6<sup>1</sup></b>	Heise et al. (2021) <sup>1</sup> , diese Arbeit <sup>2</sup>
cs-130	10/100	-	-	Heise et al. (2021), diese Arbeit
c <sub>GFPS</sub> -130Fc	10/100	<b>16,54 ± 14,92</b>	-	Heise et al. (2021), diese Arbeit
cs-130 <sup>Y190K/F191E</sup> Fc	10/100	<b>Keine Inhibition</b>	-	Heise et al. (2021), diese Arbeit
cs-130 <sup>D1TEVD2D3</sup> Fc	10/100	<b>Keine Inhibition</b>	-	Heise et al. (2021), diese Arbeit
sgp130 <sup>FLY</sup> Fc	10/100	<b>Keine Inhibition</b>	-	Heise et al. (2021), diese Arbeit
cs-130 <sup>FLY</sup> Fc	10/100	<b>Keine Inhibition</b>	-	Heise et al. (2021), diese Arbeit
cs-130 <sup>FLY</sup>	10/ 100	<b>Keine Inhibition</b>	-	Heise et al. (2021), diese Arbeit

**Tabelle 24: Vergleich der inhibitorischen Effektivität diverser sgp130-Mutanten mit sgp130Fc im IL-11 *Trans-Signaling***

Dargestellt sind bisher untersuchte IL-11 *Trans-Signaling* sgp130-Mutanten im Vergleich mit sgp130Fc. Es wurde unterschieden, ob eine Proliferation mit den Einzelkomponenten IL-11 und sIL-11R oder mit Hyper-IL-11 erfolgte. Eine Berechnung der IC<sub>50</sub>-Werte wurde jeweils für die Stimulation durch IL-11/sIL-11R angegeben. Ergebnisse aus SPR-Analysen wurden als K<sub>D</sub>-Werte angegeben, die mit immobilisiertem Hyper-IL-11 durchgeführt wurden. Es wurden für alle Inhibitoren gleichermaßen Ba/F3-gp130 Zellen zur Untersuchung der Zellproliferation herangezogen. Angaben mit (-) weisen darauf hin, dass entweder keine Angabe der Autoren erfolgte oder Experimente in diesem Bezug nicht stattgefunden haben. Folgende Abkürzung ist wie folgt zu deuten: K.I.: Keine Inhibition der Zellproliferation

Inhibitor	Stimulation <sup>Prolif</sup>			IC <sub>50</sub>	SPR-Analyse K <sub>D</sub> <sup>Hyper-IL-11</sup>	Quellen
	IL-11/ sIL-11R	Hyper- IL-11				
	[nM]	[ng/ml]	[ng/ml]	[nM]	[nM]	
sgp130Fc	-	10/100	-	<b>0,29</b>	<b>0,07</b>	Berg et al. (2021)
	-	-	10	<b>0,12</b>		Berg et al. (2021)
	-	10/100	-	<b>0,22</b>		Heise et al. (2021), diese Arbeit
	0,5/5	-	-	-		Lokau et al. (2021)
sgp130 <sup>FLY</sup> Fc	-	10/100	-	<b>K. I.</b>	<b>0,67</b>	Berg et al. (2021)
	-	-	10	<b>40,68</b>		Berg et al. (2021)
	-	10/100	-	<b>K.I.</b>		Heise et al. (2021), diese Arbeit
sgp130 <sup>R281Q</sup> Fc	-	10/100	-	<b>K. I.</b>	<b>0,61</b>	Berg et al. (2021)
	-	-	10	<b>72,76</b>		Berg et al. (2021)
sgp130 <sup>FLY/R281Q</sup> Fc	-	10/100	-	<b>K. I.</b>	-	Berg et al. (2021)
	-	-	10	<b>K. I.</b>		Berg et al. (2021)
sgp130 <sup>T102Y</sup> Fc	0,5/5	-	-	-	-	Lokau et al. (2021)
sgp130 <sup>Q113F</sup> Fc	0,5/5	-	-	-	-	Lokau et al. (2021)
sgp130 <sup>T102Y/Q113F</sup> Fc	0,5/5	-	-	-	-	Lokau et al. (2021)
cs-130 <sup>FLY</sup> Fc	-	10/100	-	<b>K.I.</b>	-	Heise et al. (2021), diese Arbeit
cs-130 <sup>FLY</sup>	-	10/100	-	<b>K.I.</b>	-	Heise et al. (2021), diese Arbeit

## 8 DANKSAGUNG

Zunächst möchte ich mich bei meinem Doktorvater und Erstgutachter Herrn Prof. Dr. Jürgen Scheller für die für die Möglichkeit der Durchführung dieser Arbeit am Institut für Biochemie und Molekularbiologie II sowie für die Betreuung über diese Zeit hinweg bedanken.

Ebenso möchte ich Herrn Dr. Jens Moll als nächsten Betreuer und Kollegen für seine Hilfe, seine Zeit und sein außerordentliches Engagement danken. Nicht nur die anstrengenden Zeiten, sondern vor allem die witzigen Momente im Labor werde ich nicht vergessen. Auch wenn Experimente mal nicht so funktioniert haben, so konnten wir immer noch darüber lachen – Danke dafür!

Auch die anderen Mitarbeiter und Kollegen des Instituts für Biochemie und Molekularbiologie II haben mir beratend zu Seite gestanden und den Alltag im Labor mit ihrer positiven Art bereichert. Darunter Frau PD Dr. Doreen Floß, die mich schon von Beginn an mit ihrer souveränen Art zu Arbeiten gänzlich beeindruckt hat. Frau Dr. Nastaran Fazel Modares, Dr. Erika Engelowski, Laura Bergmann und Dr. Robin Polz, die nicht nur privat immer ein offenes Ohr hatten. Frau Petra Oprée-Jeremic, die als gute Seele und Sekretärin des Institutes stets eine Lösung für etwaige Probleme oder Anliegen hatte. Danke auch an all die anderen Kollegen, wie Dr. Marcel Bucholzer, Dr. Oliver Krumbach, Dr. Mohammad Akbarzadeh, die mit ihrer Expertise unkompliziert ausgeholfen und mich beraten haben.

Die gemeinsamen Mittagessen und das gemeinsame Kaffee trinken, sowie die immer netten Gespräche mit allen Kollegen wusste ich sehr zu schätzen. Auch das abendliche Beisammensitzen habe ich in der Zeit mit Euch allen sehr genossen.

Der gemeinsame Start in die Doktorarbeit und daraus entstandene Freundschaft zu Anna Masiarz möchte ich an dieser Stelle als besonders bereichernd erwähnen. Danke für die großartigen Gespräche, die gemeinsamen Höhen und Tiefen, das Vertrauen und die liebevolle Art. Ich freue mich, Dich durch die Arbeit im Labor kennengelernt zu haben.

Zuletzt möchte ich mich von tiefstem Herzen bei meinen Eltern und meinem Bruder bedanken. Ihr habt mich immer mit allen Möglichkeiten unterstützt und mir dabei selbstlos in jedem Abschnitt des Studiums und während dieser Doktorarbeit emotional zu Seite gestanden. Ich bin stolz darauf, mit Euch diesen Schritt gegangen zu sein und werde Euch für Eure Unterstützung immer dankbar sein.