

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

**Inhibition des IL-6 *Trans Signaling*
durch *Nanobody*-Fusionsproteine**

Dissertation

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

vorgelegt von

Christine Anna Dambietz

2022

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Univ.-Prof. Dr. Jürgen Scheller

Zweitgutachterin: Prof. Dr. med. Julia Hauer“

Für meinen Vater,
mit dem ich die unstillbare Wissbegierde teile
und dem ich so viel verdanke

,Nicht alles dem man ins Auge blickt lässt sich verändern.

Aber nichts kann verändert werden, solange man ihm nicht ins Auge blickt. ‘

- ‘Remember this house’ von James A. Baldwin

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	14
1.1	Zytokine	14
1.1.1	Interleukin 6	16
1.1.2	Klassische IL-6 Signaltransduktion und IL-6 Trans Signaling	18
1.1.3	Hyper-IL-6.....	22
1.1.4	Interleukin 11	23
1.2	Klassische Antikörper und Schwere-Kette-Antikörper.....	24
1.2.1	Klassische Antikörper: Immunglobuline.....	24
1.2.2	Schwere-Kette-Antikörper und Einzeldomänenantikörper	25
1.3	Inhibitoren der IL-6 Signaltransduktion.....	26
1.3.1	Anti-IL-6R-Antikörper: Tocilizumab.....	26
1.3.2	Lösliches Glykoprotein 130 und rekombinantes sgp130Fc	27
1.4	Interleukin-6 Muteine.....	28
1.5	Zielsetzung der Arbeit	30
2	Material & Methoden.....	31
2.1	Material	31
2.1.1	Antibiotika.....	31
2.1.2	Antikörper	31
2.1.3	Chemikalien.....	32
2.1.4	Enzyme.....	34
2.1.5	Gerätschaften.....	34
2.1.6	Kits	35
2.1.7	Oligonukleotide	36
2.1.8	Plasmide	36
2.1.9	Puffer und Lösungen	37
2.1.10	Rekombinante Proteine	39

2.1.11	Verbrauchsmaterial	40
2.1.12	Zellkulturmedien	41
2.1.13	Zelllinien	41
2.2	Methoden.....	42
2.2.1	Molekularbiologische Arbeiten.....	42
2.2.2	Proteinbiochemische Methoden	49
2.2.3	Methoden in der Zellkultur.....	52
3	Ergebnisse.....	58
3.1	Inhibition des IL-6 Trans Signaling durch cs-130Fc Varianten.....	61
3.1.1	Synthese von cs-130Fc Varianten	61
3.1.2	Proteinreinigung der dimeren cs-130Fc Varianten	62
3.1.3	Reinigung des Monomers cs-130 durch Größenausschlusschromatographie.....	64
3.1.4	cs-130Fc hat eine höhere Affinität zu Hyper IL-6 im Vergleich zu sgp130Fc....	68
3.1.5	IL-6 Trans Signaling wird durch cs-130Fc und cs-130 gehemmt.....	69
3.1.6	cs-130Fc zeigt keinen hemmenden Einfluss auf klassisches IL-6 Signaling.....	73
3.1.7	cs-130Fc hat eine hohe Spezifität für IL-6 Signaling.....	74
3.1.8	Keine Inhibition des IL-11 Trans Signaling durch cs-130Fc und cs-130	76
3.2	Inhibition des IL-6 Trans Signaling durch IL-6-Mutein-Nanobody Fusionsproteine 78	
3.2.1	Klonierung der e-IL-6 ^{mt} Fc Varianten.....	79
3.2.2	Expression und Produktion des e-(RR)Fc	85
3.2.3	e-(RR)Fc bindet an den löslichen IL-6-Rezeptor	86
3.2.4	e-(RR)Fc inhibiert IL-6 Trans Signaling in hoher Konzentration.....	88
4	Diskussion.....	89
5	Zusammenfassung.....	96
6	Summary	97

Abkürzungen und Fachbegriffe

ADAM	A Disintegrin and Metalloproteinase
ARDS	<i>Acute respiratory distress syndrome</i>
AS	Aminosäure(n)
Bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
°C	Grad Celsius
CDR	<i>Complementarity determining regions</i>
C _H	Konstante schwere Kette (<i>constant heavy chain</i>)
C _L	Konstante leichte Kette (<i>constant light chain</i>)
CLC	<i>Cardiotropin like cytokine</i>
CNTF	<i>Ciliary neurotropic factor</i>
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
COVID-19	<i>Corona virus disease 19</i>
CT-1	<i>Cardiotropin 1</i>
Da	Dalton
dH ₂ O	Destilliertes Wasser
DMEM	Dulbecco's <i>Modified Eagle Medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EBI3	<i>Ebstein-Barr virus induced gene 3</i>
EC ₅₀	Effektive Konzentration 50% (<i>effective concentration 50%</i>)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
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	Green fluorescent protein
GFP-VHH	<i>Green fluorescent protein-variable heavy chain</i>
gp130	Glykoprotein 130
GPI	Glycosyl-Phosphatidylinositol
hcAB	Schwere-Kette-Antikörper (<i>heavy chain antibody</i>)
HDL	<i>High density lipoprotein</i>
HepG2	Humane Hepatom Zelllinie
HIV	Humanes Immundefizienz Virus (<i>human immunodeficiency virus</i>)
IC ₅₀	Inhibitorische Konzentration 50% (<i>inhibitory concentration 50%</i>)
IFN γ	Interferon gamma
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IL-R	Interleukin-Rezeptor
JAK	Januskinase
JIA	Juvenile idiopathische Arthritis
K _D	Dissoziationskonstante
kDa	Kilodalton
k _{on}	Assoziationsrate
k _{off}	Dissoziationsrate
l	Liter
LIF	<i>Leukemia inhibitory factor</i>
M	mol
MAPK	<i>Mitogen activated protein kinase</i>
mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minute
ml	Milliliter

mRNA	<i>messenger</i> Ribonukleinsäure
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NP	Neuropoetin
OSM	<i>Oncostatin M</i>
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCR	Polymerase Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
pg	Pikogramm
pH	Potential Hydrogenii
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Phosphat-Kinase
POD	Peroxidase
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RA	Rheumatoide Arthritis
RLU	<i>Relative light units</i>
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Rotationen pro Minute (<i>rounds per minute</i>)
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde(n)
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>
TGFβ	<i>Transforming growth factor beta</i>
TMD	Transmembrandomäne
U	Units
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
V	Volt
V _H oder VHH	Variable schwere Kette (<i>variable heavy chain</i>)
V _L	Variable leichte Kette (<i>variable light chain</i>)
WSX-1	WSXWS type I cytokine receptor
ZBM	Zytokinbindemodul
ZNS	Zentrales Nervensystem

Abbildungsverzeichnis

<i>Abbildung 1.1 Zytokine und Rezeptorkomplexe der IL-6 Familie</i>	<i>15</i>
<i>Abbildung 1.2 Schematische Darstellung des IL-6Rα und des Glykoproteins gp130</i>	<i>19</i>
<i>Abbildung 1.3 Schematische Darstellung des klassischen und des IL-6 Trans Signalwegs</i>	<i>20</i>
<i>Abbildung 1.4 Schematische Darstellung unterschiedlicher Antikörper</i>	<i>24</i>
<i>Abbildung 3.1 Schematische Darstellung sämtlicher cs-130Fc Varianten</i>	<i>60</i>
<i>Abbildung 3.2 Nachweis der kontinuierlichen Expression der cs-130Fc Varianten</i>	<i>62</i>
<i>Abbildung 3.3 Proteinanalyse der gereinigten dimeren cs-130Fc Varianten</i>	<i>63</i>
<i>Abbildung 3.4 Größenausschlusschromatographie (SEC) zur Reinigung der monomeren cs-130 Variante</i>	<i>64</i>
<i>Abbildung 3.5 Analyse der Fraktionen nach SEC</i>	<i>65</i>
<i>Abbildung 3.6 Nachweis der Fc-Tag-Elimination aus cs-130Fc durch TEV-Prozessierung</i>	<i>66</i>
<i>Abbildung 3.7 Analyse und Vergleich der gereinigten cs-130Fc Varianten und sgp130Fc</i>	<i>67</i>
<i>Abbildung 3.8 Affinitätsmessung der Inhibitoren zu Hyper IL-6</i>	<i>68</i>
<i>Abbildung 3.9 Inhibition des IL-6 Trans Signaling im Proliferationassay</i>	<i>70</i>
<i>Abbildung 3.10 Inhibition des IL-6 Trans Signaling im Stimulationsassay</i>	<i>72</i>
<i>Abbildung 3.11 Ausschluss inhibitorischer Effekte auf IL-6 Classic Signaling</i>	<i>73</i>
<i>Abbildung 3.12 Affinitätsmessung der Inhibitoren zu Hyper IL-11Fc</i>	<i>75</i>
<i>Abbildung 3.13 Ermittlung der effektiven sIL-11R-Konzentration für Zellproliferation</i>	<i>76</i>
<i>Abbildung 3.14 Inhibition des IL-11 Trans Signaling</i>	<i>77</i>
<i>Abbildung 3.15 Schematische Übersicht der Fusionsproteine der IL-6 Muteine</i>	<i>79</i>
<i>Abbildung 3.16 Klonierungsschema der IL-6 Muteine in enhanced IL-6</i>	<i>80</i>
<i>Abbildung 3.17 BamHI-Testspaltung der Variante e-(RR)Fc</i>	<i>81</i>
<i>Abbildung 3.18 Expression der e-IL-6mtFc Varianten</i>	<i>82</i>
<i>Abbildung 3.19 Schematische Darstellung der Klonierung der IL-6-Mutein-Kontrollvarianten</i>	<i>83</i>
<i>Abbildung 3.20 Keine Inhibition des IL-6 Trans Signaling durch e-(RR)Fc aus Zellkulturüberstand</i>	<i>84</i>
<i>Abbildung 3.21 Stabile CHO-K1-Zellklone mit integriertem e-IL-6W157R/D160RFc Plasmid</i>	<i>85</i>
<i>Abbildung 3.22 Analyse des gereinigten e-(RR)Fc</i>	<i>86</i>
<i>Abbildung 3.23 Schematische Darstellung der Immunopräzipitation</i>	<i>87</i>
<i>Abbildung 3.24 Immunpräzipitation zum Nachweis der e-(RR)Fc-Bindung an den löslichen IL-6-Rezeptor</i>	<i>87</i>
<i>Abbildung 3.25 Inhibition des IL-6 Trans Signaling durch e-(RR)Fc in hohen Konzentrationen</i>	<i>88</i>

Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1 Liste der verwendeten Oligonukleotide</i>	<i>36</i>
<i>Tabelle 2 Molekulare Masse der Inhibitoren und der Kontrollvarianten</i>	<i>67</i>
<i>Tabelle 3 Kinetische Parameter für die Affinität der Inhibitoren zu Hyper-IL-6</i>	<i>69</i>
<i>Tabelle 4 Inhibitorische Aktivität von sgp130Fc und der cs-130Fc-Varianten im Vergleich</i>	<i>71</i>
<i>Tabelle 5 Affinität der Inhibitoren sgp130Fc und cs-130Fc zu Hyper-IL-11-Fc im Vergleich</i>	<i>75</i>
<i>Tabelle 6 Inhibitorischer Einfluss auf IL-11 Signaling durch sgp130Fc und cs-130Fc-Varianten</i>	<i>77</i>

1 Einleitung

1.1 Zytokine

Zytokine sind Mediatoren des Immunsystems. Dabei handelt es sich um Proteine mit einer Größe zwischen 15 - 25 kDa, die von unterschiedlichen Zellen produziert und sezerniert werden. Zytokine vermitteln zwischen angeborener und adaptiver Immunität. Sie wirken meist para- oder autokrin, in einigen Fällen aber auch systemisch. Neben Interleukinen zählen Interferone, Chemokine und die Tumor-Nekrose-Faktoren zu der Gruppe der Zytokine. Diese Mediatoren binden und induzieren Signale über mediatorspezifische α -Rezeptoren, die in membrangebundener Form auf bestimmten Zelltypen oder als löslicher Rezeptor im Blutserum vorliegen. Die Induktion intrazellulärer Signale bestimmt das Expressionsmuster bestimmter Zielgene. Des Weiteren können Zielzellen zu Proliferation, Differenzierung, Migration oder auch zum apoptotischen Zelluntergang angeregt werden. Zytokine wirken auf diverse Zelltypen und können Effekte unterschiedlicher Art hervorzurufen. Daneben sind Zytokine auch pleiotrop, d.h. das unterschiedliche Zytokine gleiche Auswirkungen auf eine spezifische Zellgruppe haben, da sie über gemeinsame Rezeptoruntereinheiten Signale induzieren. Die Regulation des Immunsystems unterliegt einem stetigen Zusammenspiel der agonistischen, synergistischen und antagonistischen Wirkungen der Zytokine. Eine Dysregulation dieser Mechanismen ist assoziiert mit autoimmunen, chronisch entzündlichen sowie malignen Erkrankungen. Im Immunsystem des Menschen spielen die Zytokine der Interleukin-6 Familie eine zentrale Rolle. Eine schematische Übersicht der IL-6 Familie ist in Abb. 1.1 dargestellt. Neben Interleukin 6 (IL-6) zählen Interleukin 11 (IL-11), Interleukin 27 (IL-27), Interleukin 31 (IL-31), Cardiotrophin 1 (CT-1), *cardiotrophin-like cytokine* (CLC), *ciliar neurotrophic factor* (CNTF), *leukemia inhibitory factor* (LIF), *oncostatin M* (OSM) und Neuropoetin (NP) dazu. Die Zytokine der IL-6 Familie haben eine charakteristische 4-Helixbündelstruktur und weisen Gemeinsamkeiten in ihrer genetischen Sequenz sowie ihrer tertiären Struktur auf (Bazan 1990). Auch die Vermittlung von Signalen auf zellulärer Ebene ist vergleichbar. Im ersten Schritt der Signaltransduktion bindet IL-6 an seinen Liganden-spezifischen α -Rezeptor. Der Komplex aus Zytokin und α -Rezeptor rekrutiert und dimerisiert zwei β -Rezeptoreinheiten. Bei Zytokinen der IL-6 Familie fungiert immer mindestens ein Glykoprotein 130 (gp130) als β -Rezeptoruntereinheit, mit Ausnahme von IL-31. Im Fall von Interleukin 6 und Interleukin 11 wird durch die Dimerisierung zweier gp130-Untereinheiten Signaltransduktion induziert. Die anderen Zytokine der IL-6 Familie bilden ein Heterodimer aus gp130 und einem anderen β -Rezeptor. Beispielsweise nutzen LIF und

CT-1 das Heteromer aus gp130/LIF-R zur Signaltransduktion, CNTF bindet an das CNTF-R/LIF-R/gp130-Heteromer und Oncostatin M an OSM-R β . (Davis et al. 1993; Gearing et al. 1992).

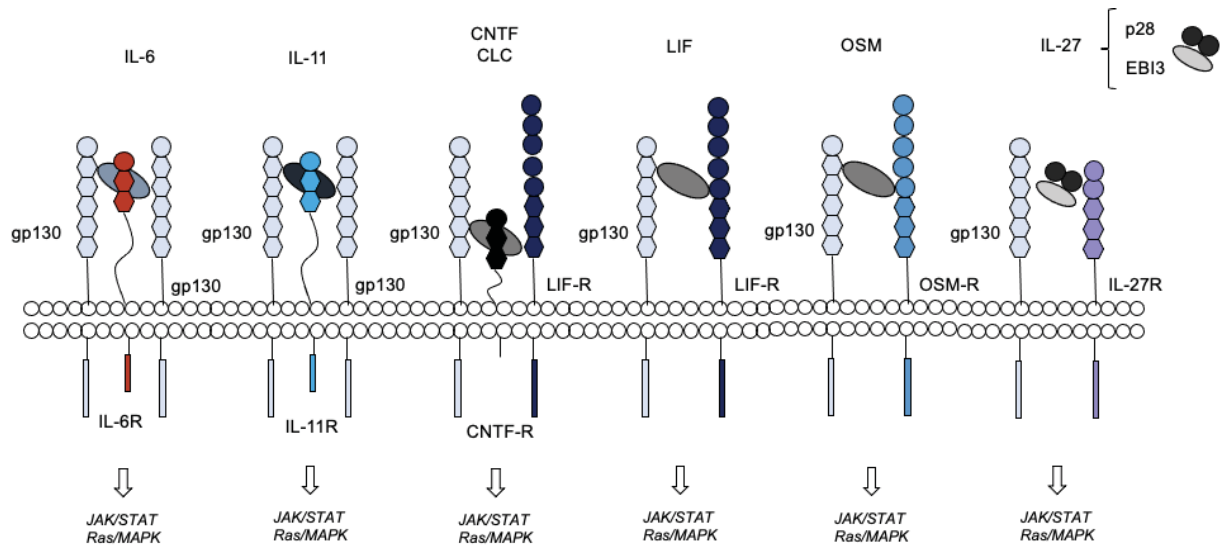


Abbildung 1.1 Zytokine und Rezeptorkomplexe der IL-6 Familie

Schematische Übersicht über die IL-6 Familie adaptiert nach Gabers (Garbers et al. 2012). IL-6 und IL-11 nutzen zwei gp130-Moleküle (Homodimerisierung) für die Signaltransduktion. Alle anderen Zytokine der Familie vermitteln Signale durch Heteromere aus gp130 und einem weiteren spezifischen Rezeptor.

Neben membranverankerten Rezeptoren gibt es lösliche Rezeptoren für Zytokine. Die Signalgebung eines Zytokins über seinen löslichen Rezeptor hat in den meisten Fällen antagonistische oder auch inhibitorische Effekte zur Folge. Die löslichen Rezeptoren des Interleukin 6 und 11 (sIL-6R und sIL-11R) stellen eine Ausnahme dar und induzieren über das ubiquitär exprimierte Glykoprotein 130 (gp130) dieselbe Signalkaskade wie über die membranverankerte Variante (Scheller et al. 2011).

1.1.1 Interleukin 6

Im menschlichen Organismus ist das Interleukin-6-Gen auf Chromosom 7p21 lokalisiert (Bowcock et al. 1988; Sehgal et al. 1986). Es besteht aus vier Introns sowie fünf Exons (Zilberstein et al. 1986) und umfasst eine Sequenz aus 184 Aminosäuren. Nahe des N-Terminus befindet sich die Sequenz für ein Signalpeptid aus 24 – 28 Aminosäuren, welches jedoch post-translational abgespalten wird. Interleukin-6 hat in Abhängigkeit seiner Glykolysierung und Phosphorylierung ein Molekulargewicht von 22 - 26 Kilodalton (kDa) (May et al. 1988; May et al. 1989). Die Synthese und Sekretion erfolgt durch Fibroblasten (Weissenbach et al. 1980), Endothelzellen, Makrophagen und Monozyten, Mastzellen sowie durch dendritische Zellen des Nervensystems (Van Snick 1990; Kang et al. 2019).

Interleukin 6 wurde als erstes Zytokin der IL-6-Familie in den 1980er Jahren unter verschiedenen Namen, darunter als Interferon- β 2 (Zilberstein et al. 1986), *26K factor* (Content et al. 1982), *hybridoma growth factor* (Van Snick et al. 1988; Brakenhoff et al. 1987), *B cell stimulating factor 2* (Hirano et al. 1986), *plasmacytoma growth factor* (Nordan, Pumphrey, and Rudikoff 1987), *hepatocyte stimulatory factor* (Gauldie et al. 1987), und *cytotoxic T cell differentiation factor* (Takai et al. 1988) beschrieben. Die diverse Namensgebung deutet bereits auf das weite Spektrum seiner Funktionen hin und hebt die zentrale Rolle in der immunologischen und hämatopoetischen Regulation hervor. IL-6 ist sowohl in die angeborene als auch in die adaptive Immunabwehr involviert. Die Invasion von Pathogenen, beispielsweise Bakterien, wird von *toll like* Rezeptoren (TLR) erkannt und resultiert in der raschen Synthese des Interleukin 6 (Takai et al. 1988; Uyttenhove, Coulie, and Van Snick 1988; Okada et al. 1988; Helle, Boeije, and Aarden 1989). Neben der Aktivierung von Makrophagen, Monozyten, peripheren T-Lymphozyten und Thymozyten ist das Zytokin essentiell für die Progression der T-Lymphozyten aus der G₀- in die G₁-Phase des Zellzyklus. IL-6 induziert die Differenzierung zu zytotoxischen T-Zellen und T-Helferzellen und fördert das Wachstum sowie die Proteinsynthese dieser Zellen (Houssiau, Coulie, and Van Snick 1989). Neben T-Zellreihen werden auch B-Lymphozyten aktiviert. IL-6 ist entscheidend für die finale Differenzierung der B-Lymphozyten zu Plasmazellen und induziert in ausgereiften Plasmazellen die Antikörperproduktion und -sekretion (Hirano et al. 1988; Beagley et al. 1989; Emilie et al. 1988). Neben der Differenzierung myeloischer und lymphatischer Zellen spielt IL-6 eine wichtige Rolle in Zellen des zentralen Nervensystems. Das Zytokin induziert die Ausschüttung des *nerve growth factor* aus Astrozyten. Es unterstützt die Differenzierung neuraler Zellen und die Geweberegeneration nach viralen In-

fektionen (Frei et al. 1989). Außerdem ist das Interleukin-6 bedeutsam für die Hepatozytenproliferation sowie die Regeneration nach Schädigung des Leberparenchyms (Cressman et al. 1996). Gemeinsam mit $\text{TNF-}\alpha$, Interferon- γ und Zytokinen der IL-6-Familie induziert Interleukin-6 die Produktion der Akute-Phase Proteine in der Leber (Andus et al. 1987; Geiger et al. 1988; Castell et al. 1989; Gauldie et al. 1987; Gauldie, Lamontagne, and Stadnyk 1985; Andus et al. 1988). Als funktionelles Pyrogen induziert IL-6 Fieber und die Freisetzung des Adrenocorticotropen Hormons (ACTH) aus der Hypophyse (Helle et al. 1988; Marinkovic et al. 1989).

Interleukin-6 reguliert wichtige pro- und anti-inflammatorische Prozesse in der Immunabwehr. Aus diesem Grund wird es bei Bedarf im menschlichen Organismus vermehrt synthetisiert. Im Rahmen viraler und bakterieller Infektionen, schwerer Verbrennungen und Sepsis steigt die IL-6 Konzentration im Blutserum auf ein Vielfaches an (Coulie et al. 1987; Waage et al. 1989; Nijsten et al. 1987). Bei akuten Entzündungen des zentralen Nervensystems steigt die IL-6-Konzentration auch im zerebrospinalen Liquor an (Houssiau et al. 1988; Frei et al. 1988; Frei et al. 1989). Häufig zeigt sich eine Korrelation zwischen erhöhter IL-6-Konzentration und der klinischen Manifestation. Die proportionale Zunahme der IL-6-Konzentration findet sich insbesondere in bakteriellen Infektionen (Helfgott et al. 1989), HIV-Infektionen (Breen et al. 1990) und der Sepsis, aber auch in Autoimmunerkrankungen, darunter in der rheumatoiden Arthritis (Hirano et al. 1988; Houssiau et al. 1988), der juvenilen idiopathischen Arthritis (De Benedetti et al. 1994), in der mesangioproliferativen Glomerulonephritis (Horii et al. 1989) und Morbus Castleman (Yoshizaki et al. 1989). Darüber hinaus ist IL-6 mit der Entstehung und Progression maligner Erkrankungen assoziiert. Erhöhte IL-6 Konzentrationen fanden sich im Ovarialzellkarzinom, im kolorektalen Karzinom und im multiplen Myelom. In Myelomen und Plasmozytomen verstärkt IL-6 das Wachstum von B-Lymphozyten (Nordan and Potter 1986; Nordan, Pumphrey, and Rudikoff 1987; Van Snick et al. 1987). Bei Patienten mit Infektionen durch das neuartige SARS-COV-2-Virus und klinischer Manifestation im Sinne einer Pneumonie bis hin zum *Acute Respiratory Distress Syndrome* (ARDS) wurden erhöhte IL-6- und sIL-6-R-Konzentrationen im Blutserum nachgewiesen. Der IL-6-Serumspiegel korreliert mit der Krankheitsaktivität der *corona virus disease 19* (COVID-19) und kann in Abhängigkeit des Verlaufs als prognostischer Marker und Indikator für die Notwendigkeit zur Beatmung herangezogen werden (Herold et al. 2020; Liu et al. 2020). Darüber hinaus konnte durch Inhibition der IL-6-Signaltransduktion mit Tocilizumab bei COVID-19-Patienten eine höhere Überlebensrate erzielt werden (Ghosn et al. 2021).

1.1.2 Klassische IL-6 Signaltransduktion und IL-6 Trans Signaling

IL-6 kann Signale auf drei unterschiedlichen Wegen induzieren. Grundlage für die Signaltransduktion ist die Bindung an einen spezifitätsvermittelnden α -Rezeptor und einen signaltransduzierenden β -Rezeptor. Der klassische IL-6 Signalweg ist limitiert für Zellen mit membranständigem IL-6-Rezeptor (IL-6R α). Hierzu gehören Makrophagen, Monozyten, neutrophile Granulozyten, B-Lymphozyten und Hepatozyten (Oberg et al. 2006, Scheller und Rose-John 2006, Chalaris et al. 2011). Bei dem membranösen IL-6R handelt es sich um einen Typ I-Transmembranrezeptor mit einem Molekulargewicht von 80 kDa bestehend aus drei Extrazellulärdomänen, einer *Stalk* Region, einer transmembranösen und einer intrazellulären Domäne (siehe Abb. 1.2A). Die extrazellulären Rezeptoreinheiten bestehen aus einer N-terminalen IgG-ähnlichen Domäne (D1_{IL-6R}) sowie zwei Typ III Fibronektin Domänen (D2_{IL-6R}, D3_{IL-6R}), die als Zytokinbindemodul (ZBM) zusammengefasst werden. Die *Stalk* Region hat eine Länge von 83 Å (entsprechend 22 AS) und ist flexibel, um die Formation aus α - und β -Rezeptor zu ermöglichen. Die intrazelluläre Domäne des IL-6R α ist vergleichsweise kurz (82 AS) und trägt keine intrinsische katalytische Einheit (Yamasaki et al. 1988). Intrazelluläre Signale werden nur in Anwesenheit und in Interaktion mit der β -Rezeptoreinheit, dem Glykoprotein 130, induziert.

Das Glykoprotein 130 ist ein Transmembranrezeptor mit einer Extrazellulärregion aus einer IgG-ähnlichen Domäne (D1_{gp130}), einer ZBM bestehend aus zwei Fibronektin Typ III Domänen (D2_{gp130}, D3_{gp130}) sowie drei weiteren Fibronektin Typ III Domänen (D4_{gp130}, D5_{gp130}, D6_{gp130}), einer Transmembrandomäne und einer intrazellulären Region (siehe Abb. 1.2B). Die juxtamembranöse Rezeptorregion des Glykoprotein 130 besitzt keine intrinsische katalytische Domäne, allerdings trägt sie zwei Box-Motive (Box-1, Box-2) mit Tyrosinresten und assoziierten Januskinasen.

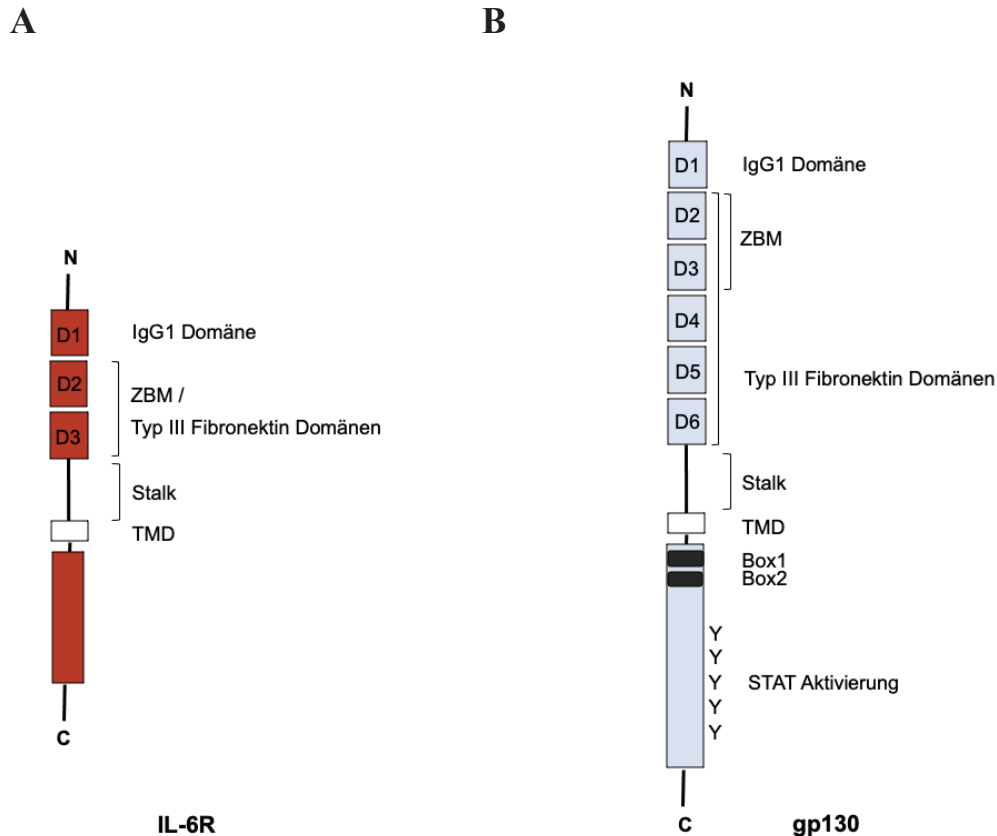


Abbildung 1.2 Schematische Darstellung des IL-6R α und des Glykoproteins gp130

(A) Die cDNA des humanen IL-6R α codiert für ein Protein bestehend aus 468 Aminosäuren, mit einem extrazellulären Anteil aus 339 AS einem Signalpeptid aus 19 AS, einer Transmembrandomäne aus 28 AS und einer intrazellulären Domäne aus 82 AS (Yamasaki et al. 1988). Durch posttranslationale Glykolysierung erhält das 50 kDa-Vorläuferprotein ein Molekulargewicht von 80 kDa. Die N-terminale Extrazellulärregion besteht aus einer IgG-Domäne (D1_{IL-6R}) und zwei Fibronectin Typ III-ähnlichen Domänen (D2_{IL-6R}, D3_{IL-6R}), die die Zytokinbindedomänen (ZBD) bilden. Die ZBM enthält vier konservierte Cysteine, die Disulfidbrücken im Rahmen der Komplexstabilisierung ausbilden. Am C-Terminus befindet sich ein konserviertes „WSXWS“-Motiv. Die ZBM ist für die Interaktion zwischen dem IL-6R α und gp130 von zentraler Bedeutung. Die *Stalk* Region ist der Angriffspunkt für die proteolytische Spaltung und Freisetzung eines löslichen IL-6R (sIL-6R) durch die Metalloproteasen ADAM10 und ADAM17 (Scheller, Garbers, and Rose-John 2014). (B) Die cDNA des humanen Glykoproteins 130 (gp130) codiert für ein Protein aus 918 Aminosäuren, darunter für ein Signalpeptid aus 22 AS, einer Extrazellulärdomäne aus 597 AS, einer Transmembrandomäne aus 22 AS und einer intrazellulären Domäne aus 277 AS (Hibi et al. 1990). Auch das gp130-Vorläuferprotein (100 kDa) wird durch Glykolysierung zu einem Glykoprotein mit einem Molekulargewicht aus 130 kDa. Die Extrazellulärregion des gp130 besteht aus einer N-terminalen IgG-Domäne (D1_{gp130}), der ZBD aus zwei Fibronectin Typ III Domänen (D2_{gp130}, D3_{gp130}) und drei weiteren Fibronectin Typ III Domänen (D4_{gp130}, D5_{gp130}, D6_{gp130}).

Für die Interaktion zwischen dem Zytokin und den Rezeptoren besitzt IL-6 drei Bindeepitope. Zuerst bindet *Site I* an den IL-6R α . *Site II* trägt die Bindestelle für die Zytokinbindedomäne des Glykoprotein 130 (D2_{gp130} und D3_{gp130}). Im Anschluss interagiert *Site III* mit der D1_{gp130}-Domäne und vollendet so die Komplexbildung aus IL-6, IL-6R und gp130 (Boulanger et al. 2003) (siehe Abb. 1.3). IL-6 bindet mit einer relativ niedrigen Affinität (~ 8 nM) an den IL-6R α . Darauf folgt die Bindung des IL-6/IL-6R-Komplexes an das Glykoprotein 130 mit hoher Affinität (10- 100 pM) (Yamasaki et al. 1988) und die Dimerisierung zweier unmittelbar benachbarter gp130-Moleküle, die so eine signaltransduzierende Einheit bilden (siehe Abb. 1.3A). Durch

gp130-Homodimerisierung werden die Tyrosinkinasereste der intrazellulären gp130-Domäne aktiviert. Daraufhin werden die Transphosphorylierung und Autophosphorylierung der Januskinasen in der juxtamembranösen Region initiiert (Lutticken et al. 1991; Stahl et al. 1994). Die aktivierten Januskinasen phosphorylieren die Transkriptionsfaktoren *Signal transducer and activator of transcription 3* (STAT3), welche wiederum homodimerisieren und in dieser Form in den Zellkern transloziert werden (Stahl et al. 1995; Hibi, Nakajima, and Hirano 1996). Durch Bindung an *enhancer*-Regionen spezifischer Gene regulieren die STAT3-Homodimere die Expression und Synthese weiterer Proteine und Mediatoren, welche in immunregulatorische Prozesse involviert sind. Neben dem JAK/STAT3-Weg werden auch der MAPK *mitogen activated protein kinase* und PI3K *phosphatidyl-Inositol-3-kinase* Signalweg induziert (Heinrich et al. 1998; Simpson et al. 1997; Garbers and Scheller 2013).

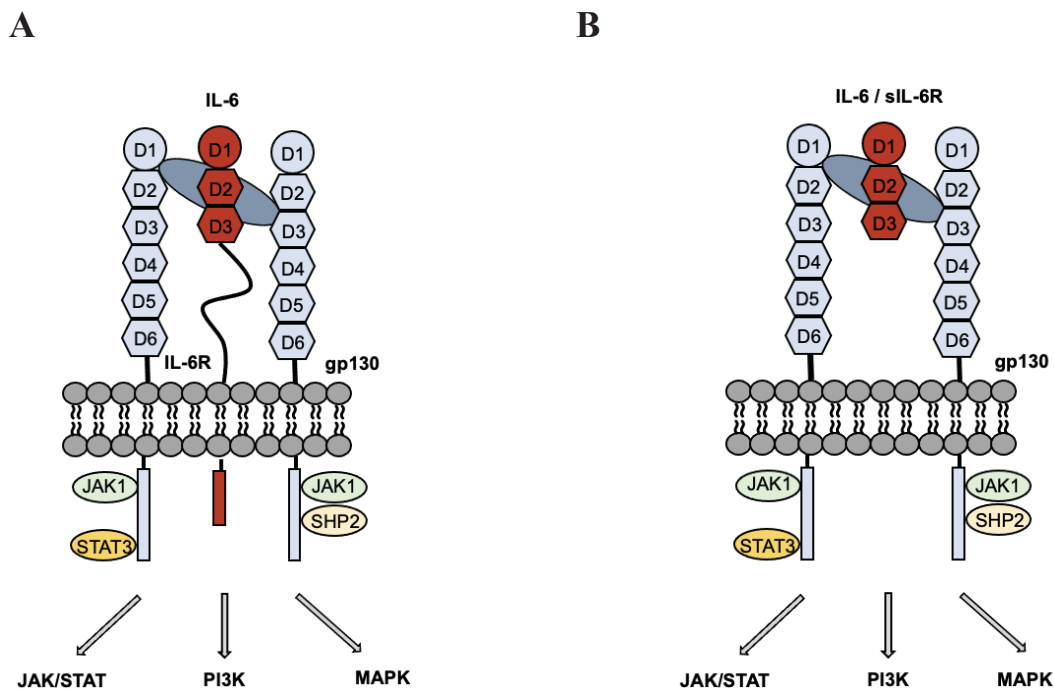


Abbildung 1.3 Schematische Darstellung des klassischen und des IL-6 *Trans* Signalwegs

(A) Der membranständige IL-6Rα befindet sich nur auf wenigen Zelltypen und beschränkt so die Zellen, die durch IL-6 *Classic Signaling* aktiviert werden können. Durch die Bindung an den IL-6Rα dimerisieren zwei benachbarte Glykoproteine 130. Die Homodimerisierung resultiert in einer intrazellulären Signalkaskade mit Phosphorylierung der gp130-Tyrosinreste und Januskinasen. Die darauffolgende Aktivierung des JAK/STAT und MAPK-Kaskade ist in die Genexpressionsregulation involviert. (B) Der Komplex aus IL-6 und seinem löslichen Rezeptor ist in der Lage, sämtliche Glykoprotein 130-tragende Zellen zu aktivieren. Infolge der IL-6/sIL-6R Bindung dimerisieren zwei gp130-Einheiten und initiieren eine intrazelluläre Signalkaskade mit Aktivierung der gp130-assoziierten Tyrosinreste und Januskinasen. Aufgrund der uneingeschränkten Aktivität des IL-6/sIL-6R-Komplexes wird der *Trans* Signalweg häufig mit übermäßiger Inflammation und entzündlichen sowie autoimmunen Prozessen assoziiert.

Neben der klassischen Signaltransduktion über den membranständigen IL-6R besteht eine weitere Option des *Signaling* durch den Komplex aus Interleukin 6 und seinem löslichen Rezeptor (sIL-6R, p80, CD80) (siehe Abb. 1.3B). Die lösliche Rezeptorvariante wird zu einem Großteil

durch *ectodomain shedding* generiert (Mullberg et al. 1993). Die Metallmatrixproteasen *A Disintegrin and Metalloproteinase* ADAM10 und ADAM17 katalysieren die proteolytische Spaltung an der *Stalk* Region des membranösen IL-6-Rezeptors und setzen so die im Serum löslichen Extrazellulardomänen (D1_{IL-6R} - D3_{IL-6R}) frei. Ein geringerer Anteil (10%) der löslichen IL-6-Rezeptorvariante wird durch alternatives Spleißen der mRNA generiert. Die Transkription der mRNA wird vorzeitig, vor Ablesen des TMD-Exons, abgebrochen, so dass eine verkürzte Variante mit einem Molekulargewicht von 50 - 55 kDa generiert wird (Lust et al. 1992). Im menschlichen Organismus wurde der sIL-6R sowohl in Blutserum (Narazaki et al. 1993) als auch im Urin nachgewiesen (Novick et al. 1989). Die Signaltransduktion über den löslichen Rezeptor wird als IL-6 *Trans Signaling* bezeichnet (Rose-John and Heinrich 1994). Durch Bindung des IL-6/sIL-6R-Komplexes an das Glykoprotein 130 kommt es zur Homodimerisierung zweier benachbarter β -Rezeptoren und zur Induktion einer intrazellulären Signalkaskade. Da gp130 ubiquitär auf Zelloberflächen exprimiert wird, können theoretisch sämtliche Zelltypen durch IL-6 aktiviert werden (Hibi et al. 1990). Die intrazelluläre Signaltransduktion ähnelt der des klassischen *Signaling* mit Aktivierung des JAK/STAT-, MAPK- und PI3K-Signalwegs.

Man geht davon aus, dass in Abhängigkeit der IL-6-Konzentration entweder ein tetramerer oder ein hexamerer Komplex gebildet wird. Eine niedrige IL-6-Konzentration resultiert in der Bildung eines Tetramers aus einem IL-6-Molekül, einem sIL-6R und zwei gp130-Proteinen (Grotzinger et al. 1997). Bei hoher IL-6 Konzentration bilden sich Hexamere, bestehend aus zwei IL-6-Molekülen, zwei löslichen IL-6-Rezeptoren und zwei gp130-Molekülen. (Paonessa et al. 1995; Simpson et al. 1997; Boulanger et al. 2003). Unter physiologischen Bedingungen sind IL-6 und der lösliche IL-6-Rezeptor in niedrigen Konzentrationen nachweisbar (IL-6: 1 - 5 pg/ml; sIL-6R: 40 - 75 ng/ml) (Scheller, Garbers, and Rose-John 2014). Die Zell- und Immunregulation erfolgt hauptsächlich durch den klassischen Signalweg, allerdings erfüllt IL-6 auch über seinen löslichen Rezeptor wichtige Funktionen. Der lösliche Rezeptor erhöht die Sensitivität der Zellen mit membrangebundenem Rezeptor gegenüber Interleukin-6 (Peters et al. 1996) und dient als wichtiger Puffer für IL-6 im Blut (Rose-John 2012). Des Weiteren spielt er eine wichtige Rolle in der Aktivierung von Endothelzellen (Romano et al. 1997), neuronalen Zellen im zentralen Nervensystem (Marz et al. 1997), glatten Muskelzellen (Klouche et al. 1999) und hämatopoetischen Vorläuferzellen (Sui et al. 1995; Peters, Muller, and Rose-John 1998). In der Spätphase akuter Entzündungen wird die Granulozyten- und Makrophageninfiltration in das geschädigte Gewebe durch IL-6 *Trans Signaling* angetrieben (Rabe et al. 2008). Auch die adaptive Immunantwort wird durch IL-6 *Trans Signaling* kontrolliert. Der lösliche IL-6-Rezeptor ist verantwortlich für die Rekrutierung, Differenzierung und Apoptose von T-Zellen. IL-

IL-6 *Trans Signaling* kann die Differenzierung von TH17-Zellen enorm steigern und die Migration dieser Zellen in entzündete Gewebe begünstigen, z.B. im Falle einer Peritonitis (Wilke et al. 2011; Jones et al. 2010). Neben den genannten Funktionen sind allerdings auch pathologische Prozesse primär mit IL-6 *Trans Signaling* assoziiert. Der erhöhten Aktivität inflammatorischer Prozesse liegen oftmals erhöhte sIL-6R-Serumspiegel zugrunde (Kallen 2002). In rheumatoider Arthritis (RA) sowie in der juvenilen idiopathischen Arthritis (JIA) ließen sich bis zu dreifach erhöhte sIL-6R-Serumspiegel nachweisen (De Benedetti et al. 1994; Desgeorges et al. 1997; Nowell et al. 2003). Die Krankheitsaktivität und -progression in RA zeigte einen Zusammenhang mit der Höhe des löslichen IL-6-Rezeptors im Blut. Erhöhte sIL-6R Konzentrationen fanden sich auch in der Darmschleimhaut bei chronisch entzündlichen Darmerkrankungen wie Morbus Crohn und Colitis ulcerosa (Hosokawa et al. 1999). In einigen hämatologischen Erkrankungen, darunter in chronisch lymphatischer Leukämie, B-Zell-Non-Hodgkin-Lymphom und monoklonaler Gammopathie ließen sich sIL-6R-Serumspiegel nachweisen, die im Vergleich zu den normalen Spiegeln um das Doppelte erhöht waren (Lavabre-Bertrand et al. 1995). Bei Patienten mit HIV-Infektion oder mit einem Multiplem Myelom sowie auch in der Sepsis konnten sIL-6R Konzentrationen von bis zu 200 ng/ml im Blut nachgewiesen werden (Honda et al. 1992; Gaillard et al. 1993). Hohe sIL-6R Titer in diesen Erkrankungen wurden mit schlechter Prognose und hoher Mortalität in Verbindung gebracht. Erhöhte IL-6 *Trans Signaling*-Aktivität wurde auch in einigen soliden Tumoren nachgewiesen. Im Ovarialzellkarzinom förderte dieser Signalweg die vaskuläre Infiltration und Metastasierung des Tumors (Lo et al. 2011).

1.1.3 Hyper-IL-6

Nach der Entdeckung des IL-6 *Trans Signaling* wurde ein Designerzytokin namens Hyper-Interleukin-6 (H-IL-6) etabliert. Dabei handelt es sich um ein Fusionsprotein aus Interleukin 6 und dem Zytokinbindemodul (D2-D3_{IL-6R}) des löslichen IL-6-Rezeptors. Im natürlichen IL-6/sIL-6R-Komplex liegt zwischen dem N-Terminus des Interleukins und dem C-Terminus des Rezeptors eine Distanz von 40 Å. In dem Designerzytokin wurden die beiden Elemente durch einen flexiblen Polypeptid-Linker aus 29 AS verbunden. Das Hyperzytokin erwies sich als biologisch aktiv. In *in vitro* Experimenten zeigte es - verglichen mit einfacher Stimulation durch den IL-6/sIL-6R-Komplex- bereits in 100 bis 1000-fach geringerer Konzentration hohe Effizienz hinsichtlich der Induktion von Akute-Phase Proteinen, Zellproliferation sowie Expansion und Differenzierung CD34⁺ myeloischer Vorläuferzellen (Fischer et al. 1997).

1.1.4 Interleukin 11

Interleukin 11 ist ein Zytokin der IL-6 Familie mit hämatopoetischen, thrombopoetischen und vorwiegend anti-inflammatorischen Eigenschaften. Es besteht aus 178 AS und hat ein molekulares Gewicht von ~ 19 kDa. IL-11 und IL-6 haben eine Sequenzhomologie von 22%. IL-11 wird von zahlreichen Zelltypen, darunter pulmonalen und gastrointestinalen Epithelzellen und Fibroblasten sezerniert. Ein Ungleichgewicht in der IL-11 Signaltransduktion wird mit Asthma bronchiale, Fibrose und der Genese gastrointestinaler Epithelkarzinomen assoziiert (Lokau et al. 2016). Aufgrund der Analogie in ihren Signalwegen haben IL-6 und IL-11 häufig redundante Effekte. IL-11 bindet an einen spezifischen α -Rezeptor und infolgedessen an die signaltransduzierende β -Rezeptoreinheit. Auf intrazellulärer Ebene initiiert IL-11 den JAK/STAT- und Ras/MAPK-Signalweg und reguliert die Genexpression pro- und anti-inflammatorischer Proteine. Der membrangebundene IL-11R α kommt auf Kardiomyozyten, kardialen Fibroblasten und in vielen anderen Organen, z.B. in Knochenmark, Lunge, Milz, Darm und im Uterus vor (Garbers and Scheller 2013). Daneben wurde auch eine lösliche Form des Rezeptors (sIL-11R) im menschlichen Blutserum in Konzentrationen von 20 pg/ml – 4 ng/ml nachgewiesen (Kimura et al. 2007; Lokau et al. 2016). Analog zum IL-6 *Trans Signaling* kann auch IL-11 über seinen löslichen Rezeptor *Trans Signaling* induzieren (Lokau et al. 2016). Die funktionelle Bedeutung dieses Signalwegs wurde bisher nicht näher definiert, allerdings wurden agonistische Effekte in der sIL-11R Signalinduktion durch das Designerzytokin Hyper-IL-11 beobachtet. Bei Hyper-IL-11 handelt es sich um ein Fusionsprotein, in dem Interleukin 11 und der lösliche IL-11R durch einen 67 AS langen Linker zwischen dem N-Terminus des Interleukins und dem C-Terminus des Rezeptors auf natürliche Weise verbunden sind. Dieses Hyperzytokin potenzierte die IL-11-Effekte in *in vitro* und *in vivo* Experimenten (Dams-Kozłowska et al. 2012; Pflanz et al. 1999). In dieser Arbeit wurden Hyper-IL-11 und der Komplex aus IL-11/sIL-11R verwendet, um den Einfluss auf IL-11 *Signaling* durch sgp130Fc und die neuen Inhibitoren zu evaluieren.

1.2 Klassische Antikörper und Schwere-Kette-Antikörper

1.2.1 Klassische Antikörper: Immunglobuline

Immunglobuline werden als lösliche Antikörper von reifen Plasmazellen produziert und sezerniert. Sie erkennen und binden spezifische Antigene. Durch die Bindung werden Antigene direkt neutralisiert oder durch Opsonierung für das unspezifische Immunsystem markiert. Klassische Antikörper sind Y-förmige Proteine, bestehend aus zwei L-Ketten (*light chains*, 25 kDa) und zwei H-Ketten (*heavy chains*, 53 – 75 kDa) (siehe Abb. 1.4A). Die beiden schweren Ketten sind in einer flexiblen *Hinge* Region über Disulfidbrücken miteinander verbunden. L- und H-Ketten bestehen aus mehreren konstanten und einer variablen Domäne. Die variablen Regionen der leichten und schweren Kette bilden gemeinsam das *antigen binding* Fragment (Fab). Das *crystallizable* Fragment (Fc) wird von den konstanten Domänen der schweren Kette gebildet und bindet an Immunzellen, z.B. Makrophagen. Die große Vielfalt der Antikörper ergibt sich aus den verschiedenen Immunglobulinklassen (IgA, IgD, IgE, IgG, IgM), die durch die konstanten Domänen der schweren Kette bestimmt werden. Hypervariable Regionen in den variablen Domänen der schweren und leichten Kette erweitern die Antikörpervielfalt.

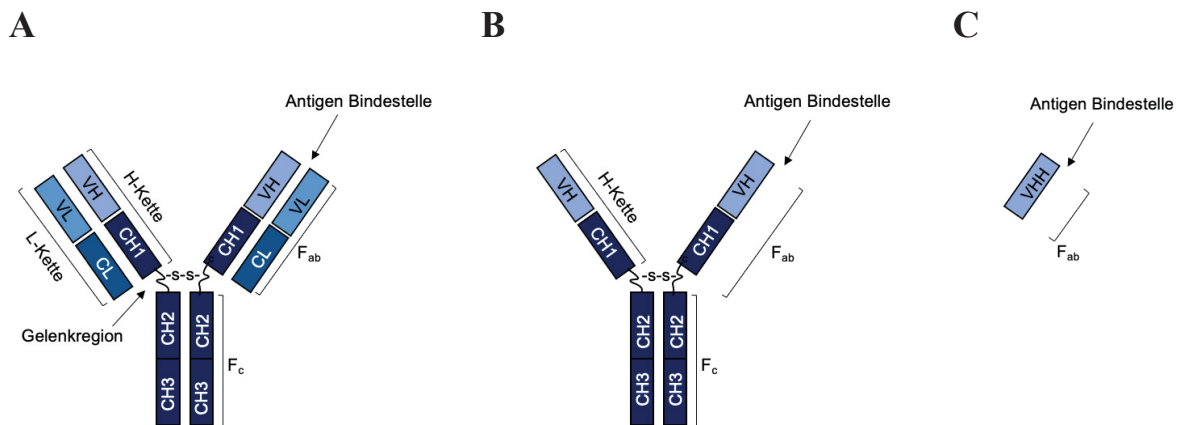


Abbildung 1.4 Schematische Darstellung unterschiedlicher Antikörper

(A) Klassischer Antikörper mit einem Molekulargewicht von 150 - 200 kDa. Dieser besteht aus zwei schweren Ketten mit konstanten Domänen (C_{H1}, C_{H2}, C_{H3}) und einer variablen Region (V_H) sowie einer leichten Kette mit konstanter (C_L) und variabler Domäne (V_L). Das Fab-Fragment erkennt und bindet spezifische Antigene, während das Fc-Fragment mit Immunzellen interagiert. Die Klasse der Antikörper wird durch die konstanten Domänen der schweren Kette determiniert (c: α = IgA, c: δ = IgD, c: ε = IgE, c: γ = IgG, c: μ = IgM). (B) Schwere-Kette-Antikörper mit einem Molekulargewicht von etwa 100 kDa. Diese bestehen aus zwei schweren Ketten mit konstanten (C_{H1}, C_{H2}, C_{H3}) und einer variablen Domäne (V_H). Obwohl die leichte Kette und somit eine V_L-Domäne im Fab-Fragment fehlt, können Antigene erkannt und gebunden werden. (C) Einzel-domänenantikörper bestehen lediglich aus einer variablen Domäne der schweren Kette (V_H, auch VHH). Sie haben ein Molekulargewicht von etwa 15 kDa und werden aus Schwere-Kette-Antikörpern isoliert. Trotz ihrer geringen Größe ist ihre Antigenbindefähigkeit ebenso effizient wie die der klassischen Immunglobuline und der Schwere-Kette-Antikörper.

1.2.2 Schwere-Kette-Antikörper und Einzeldomänenantikörper

Im Blutserum verschiedener Tierarten wie beispielsweise Kamelen und Knorpelfischen wurden Antikörper nachgewiesen, die ausschließlich aus schweren Ketten (*heavy chain antibodies*, HCAb) bestehen. Sie enthalten drei konstante und eine variable Domäne (siehe Abb. 1.4B). Das Fab-Fragment besteht lediglich aus der V_H- und C_{H1}-Domäne. Die variable schwere Kette (V_H oder auch *variable heavy chain* VHH) kann isoliert werden und stellt funktionell einen monomeren Einzeldomänenantikörper dar (siehe Abb. 1.4C). Mit einem Molekulargewicht von etwa 15 kDa handelt es sich um ein sehr kleines Protein. Aufgrund seiner geringen molekularen Größe wird der Einzeldomänenantikörper (*single domain antibodies*, sdAB) auch als *Nanobody* bezeichnet. Als monomere antigenbindende Einheit ist er in der Lage, auch ohne eine variable leichte Kette spezifisch Antigene und neuartige Epitope, die durch Protein-Protein-Interaktionen entstehen, zu erkennen und zu binden (Muyldermans et al. 2009). Die Bindung eines Einzeldomänenantikörpers an sein Zielantigen erfolgt mit hoher Affinität und gleicher Spezifität wie die der klassischen Antikörpervariante. Im Vergleich zu klassischen Antikörpern zeigen sich zahlreiche Vorteile. Der Gewinn der *Nanobodies* gestaltet sich vergleichsweise einfach. Die Einzeldomänenantikörper werden nach Immunisierung aus dem Blutserum von Kamelen, Lamas und Haien gewonnen und in mikrobiellen Systemen, z.B. Bakterien oder Hefen, kloniert und exprimiert. Ihre biochemischen Eigenschaften weisen eine gute Löslichkeit, hohe Umweltstabilität sowie hochaffine und hochspezifische Antigenbindungen auf (Dumoulin et al. 2002). Ihr geringes Molekulargewicht erleichtert die Gewebepenetration. Ihre Funktionalität als Monomer zeigt eine hohe Effizienz als wissenschaftliches Werkzeug und erwies sich als diagnostisches und therapeutisches Tool in zahlreichen Forschungsarbeiten (Cortez-Retamozo et al. 2004; Baral et al. 2006; Rothbauer et al. 2006).

Verschiedene *Nanobodies* besitzen die Fähigkeit, den IL-6/sIL-6R-Komplex und in einigen Fällen auch IL-6 und sIL-6R separat zu binden. Darunter wurde ein Einzeldomänenantikörper namens VHH6 charakterisiert, der den Komplex aus IL-6/sIL-6R stabilisiert. Durch die IL-6/sIL-6R-Formation bildet sich ein neues Epitop, welches der VHH6 erkennt und bindet, jedoch nicht die einzelnen Komponenten allein. Durch die Bindung des VHH6 wird die Dissoziationsrate K_D des IL-6/sIL-6R-Komplexes um den Faktor 225 herabgesetzt. Die strukturelle Dynamik zwischen IL-6 und dem löslichen Rezeptor ist deutlich reduziert, während die Bindung und Kinetik zu gp130 nicht beeinflusst wird. Das Ausmaß dieser Effekte gleicht der Verstärkung des IL-6 *Trans Signaling* durch das Fusionsprotein Hyper-IL-6 (Adams et al. 2017; Baran P 2018 Mar 20).

1.3 Inhibitoren der IL-6 Signaltransduktion

Entzündliche Prozesse und Infektionen mit bakteriellen oder viralen Erregern stellen einen wichtigen Anreiz für die Zytokinproduktion und -sekretion dar. Steigen die IL-6 Serumlevel im menschlichen Organismus, so werden immunregulatorische Ressourcen ausgereizt, um die Entzündung oder die Infektionserreger zu lokalisieren, zu begrenzen und vor einer systemischen Ausbreitung - einer sogenannten Sepsis - zu schützen. Zudem versucht der Organismus durch die Induktion einer Inflammation eingedrungene Infektionserreger lokal zu vernichten und zu beseitigen. Seit einigen Dekaden beschäftigt sich die Forschung mit der Entwicklung neuer Wege zur Supprimierung des IL-6 *Signaling*, um Interleukin-6-assoziierte Erkrankung zu kontrollieren. Nach dem aktuellen Stand der Forschung ist insbesondere das IL-6 *Trans Signaling* über den löslichen IL-6-Rezeptor mit pathologischen Prozessen assoziiert, weshalb sich der Fokus nun immer weiter auf die spezifische Inhibition dieses Signalwegs richtet.

1.3.1 *Anti-IL-6R-Antikörper: Tocilizumab*

Klinisch bereits etabliert ist der monoklonale anti-IL-6-Rezeptor-Antikörper (anti-IL-6R-AK) Tocilizumab. Durch die Konnektion an den Rezeptor wird die Bindestelle für IL-6 besetzt und somit die gp130-Dimerisierung sowie die intrazelluläre Signaltransduktion verhindert. Sowohl der membranständige als auch der lösliche IL-6-Rezeptor werden durch Tocilizumab besetzt, so dass IL-6 *Classic Signaling* und *Trans Signaling* gleichermaßen gehemmt werden (Nishimoto et al. 2008). Tocilizumab zeigte in diversen Erkrankungen Symptomlinderung sowie Krankheitsregression. Der monoklonale Antikörper ist heutzutage in diversen Ländern für ein breites Spektrum von Erkrankungen zugelassen, darunter für die rheumatoide Arthritis, die systemische juvenile idiopathische Arthritis, Morbus Castleman, Takayasu Arteritis, für das *cytokine release syndrome* im Rahmen einer CAR-T-Zelltherapie, die Riesenzellarteriitis und die Neuromyelitis optica (Kang et al. 2019). Zu den weiteren anti-IL-6R-AK gehören Sarilumab und NI-1201. Etabliert und erforscht wurden auch anti-IL-6-Antikörper, die an verschiedene Epitope des Interleukins binden und so die Interaktion mit seinem α - oder β -Rezeptor verhindern. Siltuximab, ein chimärer anti-IL-6-AK, ist für Morbus Castleman klinisch zugelassen (Kang et al. 2019).

Durch die immunsuppressive Therapie mit anti-IL-6- und anti-IL-6R-Antikörpern werden auch wichtige immunologische Funktionen gehemmt oder eingeschränkt. Bakterielle und virale Infektionen treten unter den Nebenwirkungen am häufigsten auf (Kang et al. 2019; Yokota et al.

2014). Unter der Therapie mit Tocilizumab in der rheumatoiden Arthritis wurden obere Atemwegsinfekte, Zunahme der Blutfettwerte (Triglyceride, Gesamtcholesterol und *high density lipoprotein* HDL), transiente Neutropenie sowie Leberfunktionsstörungen beobachtet (Nishimoto et al. 2004).

1.3.2 Lösliches Glykoprotein 130 und rekombinantes sgp130Fc

Der natürliche Inhibitor des IL-6 *Trans Signalings* ist der lösliche gp130-Rezeptor (sgp130). Er wird durch alternatives Spleißen der mRNA generiert und in niedrigen Konzentrationen (100-300 ng/ml) in humanem Blutplasma nachgewiesen (Diamant et al. 1997; Narazaki et al. 1993). Das rekombinante sgp130Fc ist ein dimeres Fusionsprotein aus dem löslichen Rezeptor und dem *crystallizable* Fragment (Fc) einer schweren Kette des humanen IgG1. Sgp130Fc bindet an den Komplex aus IL-6/sIL-6R, jedoch nicht an IL-6 oder sIL-6R allein. Während das IL-6 *Trans Signaling* durch die Bindung des IL-6/sIL-6R-Komplexes gehemmt wird, bleibt das klassische IL-6 *Signaling* über den membranständigen IL-6R unbeeinflusst. Die spezifische Inhibition des IL-6 *Trans Signaling* wurde in *in vitro* Experimenten sowie in Krankheits-assoziierten Modellen rekonstruiert und bestätigt. Interleukin 11 transduziert – gleich dem Interleukin 6 - Signale durch gp130-Homodimerisierung. Aus diesem Grund weist sgp130Fc eine vergleichbare inhibitorische Aktivität auf IL-11 *Trans Signaling* auf. sgp130Fc beeinflusst neben IL-11 auch in sehr geringerem Ausmaß Signalwege des *oncostatin M* und *leukemia inhibitory factor*. OSM und LIF binden an ein singuläres Glykoprotein 130 und den LIF-Rezeptor bzw. den OSM-Rezeptor und bilden so eine heteromere signaltransduzierende β -Rezeptoreinheit. Die Hemmung des OSM- und LIF- Signalweges durch sgp130Fc zeigt sich allerdings erst in höheren Konzentrationen des Inhibitors (sgp130Fc > 1 μ g/ml) (Jostock et al. 2001).

Sgp130Fc ist mit 260 kDa ein relativ großes Protein. Da der IL-6/sIL-6R-Komplex physiologisch an zwei gp130-Moleküle bindet, zeigte sich das dimere sgp130Fc dem monomeren sgp130his (90 kDa) in seiner inhibitorischen Effizienz deutlich überlegen. Sgp130Fc wird in der Forschung als Werkzeug zur Diskriminierung zwischen klassischem und IL-6 *Trans Signaling* genutzt. Außerdem soll sgp130Fc in Zukunft als therapeutischer Inhibitor für IL-6 *Trans Signaling* assoziierte Erkrankungen, wie z.B. der rheumatoiden Arthritis oder chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, eingesetzt werden. Eine klinische Studie in Phase IIa zu sgp130Fc (Olamkizept) für den Einsatz in Colitis ulcera und Morbus Crohn wurde bereits erfolgreich abgeschlossen und zeigte klinische Remission sowie adaptierte Genexpression mit reduzierter Aktivierung proinflammatorischer Prozesse in der Darmschleimhaut betroffener Patienten (Kang et al. 2019; Schreiber et al. 2021).

1.4 Interleukin-6 Muteine

In den 1990er Jahre erprobten Paonessa und Savoni bereits diverse Muteinvarianten, in denen Aminosäuren in IL-6-Epitopen, die mit dem Glykoprotein 130 interagieren, ausgetauscht wurden. Savoni generierte zunächst eine *Site II_{IL-6}* Mutante (Y31D/G35F) in deren Aminosäuresequenz an Position 31 ein Tyrosin (ungeladene, hydrophile, aromatische AS mit einer alkoholischen Seitengruppe) gegen Aspartat (saure, negativ geladene, hydrophile AS) und an Position 35 ein Glycin (ungeladene, hydrophobe AS) gegen ein Phenylalanin (ungeladene, hydrophobe, aromatische AS mit einer Phenylgruppe) ausgetauscht wurde. Durch diese *Site II_{IL-6}* Mutationen in der A-Helix wurde die Interaktion mit dem Glykoprotein 130 beeinträchtigt, während die Bindung an den IL-6R α unbeeinflusst blieb. Funktionell stellt Y31D/G35F einen partiellen IL-6R α -Antagonisten dar (Savino, Lahm, et al. 1994). In einer anderen Arbeit von Savoni wurden *Site II_{IL-6}* Mutationen in der C-Helix generiert. Hier wurde in der Aminosäuresequenz an Position 118 ein Serin (ungeladene, hydrophile AS mit einer alkoholischen Seitengruppe) gegen Arginin (basische, positiv geladene, hydrophile AS) ausgetauscht. An Position 121 wurde Valin (ungeladene, hydrophobe, verzweigt-kettige AS) durch Aspartat (saure, negativ geladene, hydrophile AS) ersetzt. S118R/V121D zeigte eine vergleichbare inhibitorische Aktivität auf IL-6 *Signaling* wie die Y31D/G35F-Mutante. Als potentester Inhibitor des IL-6 *Signaling* erwies sich die Kombination der Mutationen, benannt als DFRD-Mutein. In sämtlichen Mutationsvarianten blieb die Bindung an den IL-6R α intakt, während die Assoziation an das Glykoprotein 130 unterbunden wurde. In humanen Zelllinien (Hep3G, HepG2), in A375-Melanomzellen und in Myelomzellen imponierte die DFRD-Mutante mit hoher Spezifität für IL-6 *Signaling* und vollständiger Inhibition der IL-6 Signaltransduktion. Die inhibitorische Potenz konnte durch Integration einer *Site I_{IL-6}* Mutation weiter gesteigert werden. Durch den Austausch eines Serins an Position 176 gegen Arginin (S176R) wurde die Affinität von IL-6 an den IL-6R α um das 3-fache gesteigert (Savino et al. 1993). Durch zwei weitere Mutationen – den Austausch von Glutamin (ungeladene, hydrophile AS mit einer Säureamidgruppe) gegen Isoleucin (ungeladene, hydrophobe, verzweigt-kettige AS) an Position 175 (Q175I) sowie den Austausch von Glutamin gegen Alanin (ungeladene, hydrophobe AS) an Position 183 (Q183A) – konnte die Affinität von IL-6 zu dem IL-6R α insgesamt um Faktor 4 gesteigert werden. Die kombinierte DFRD-Mutation und RIA-Mutation wurden als „Superantagonist“ (Sa_{nt}) eingesetzt. Im Vergleich zu der DFRD-Mutante war eine 8- bis 10-fach geringere Konzentration (Sa_{nt} < 1 µg/ml) erforderlich, um die IL-6 Signaltransduktion in den humanen Zelllinien, A375-Melanomzellen und XG-1 Myelomzellen zu inhibieren (Savino, Ciapponi, et al. 1994).

Einleitung

Paonessa etablierte *Site III_{IL-6}* Mutanten in der D-Helix. In der Aminosäuresequenz der W157R/D160R-Mutante wurde an Position 157 Tryptophan (ungeladene, hydrophobe, aromatische AS) gegen Arginin (basische, positiv geladene, hydrophile AS) ausgetauscht. Zusätzlich wurde an Position 160 Aspartat (saure, negativ geladene, hydrophile AS) durch Arginin ersetzt. Ebenso wie in den *Site II_{IL-6}* Mutationsvarianten blieb die Bindefähigkeit für dem IL-6R α erhalten. Die Bindung und Homodimerisierung zweier gp130-Moleküle wurde durch die W157R/D160R-Mutation deutlich reduziert. Während *Site II_{IL-6}* Mutationsvarianten das IL-6 *Signaling* vollständig supprimieren, ist die biologische Aktivität der *Site III_{IL-6}* Mutanten auf etwa 1% reduziert. In Kombination erweisen sich die *Site II_{IL-6}* und *Site III_{IL-6}* Mutationsvarianten als vollständige IL-6R α -Antagonisten (Paonessa et al. 1995). Beide Mutationen resultieren in partiellem IL-6R α -Antagonismus mit Reduktion der halb maximalen effektiven Konzentration (EC₅₀) und der Unfähigkeit zur Maximalstimulation (Savino, Ciapponi, et al. 1994).

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Interleukin 6 ist das prominenteste unter den Zytokinen der IL-6 Familie und in zahlreiche pro- und anti-inflammatorische Abläufe involviert. Da insbesondere IL-6 *Trans Signaling* mit pathologischen Prozessen in Verbindung steht, beschäftigt sich die Forschung seit Jahrzehnten damit, den Signalweg über den löslichen IL-6-Rezeptor zu beeinflussen. Ziel dieser Arbeit ist es, inhibitorische Proteine zu generieren, die sich spezifisch gegen IL-6 *Trans Signaling* richten.

In einem ersten Projekt sollen Fusionsvarianten aus den D1_{gp130} - D3_{gp130}-Domänen und einem IL-6/sIL-6R-spezifischen *Nanobody* im Milligramm-Maßstab produziert und gereinigt werden. Anschließend sollen sie biologisch sowie biophysikalisch charakterisiert und mit bereits etablierten Inhibitoren verglichen werden. Die neuartigen Inhibitoren zielen darauf ab, den Komplex aus IL-6/sIL-6R zu binden und ihn für den weiteren IL-6 *Trans* Signalweg abzufangen. Da sämtliche Mitglieder der IL-6 Familie gp130 als Rezeptoruntereinheit nutzen, soll am Beispiel neuartiger Zytokine überprüft werden, ob die neuartigen Inhibitoren die Signalinduktion dieser Zytokine beeinflussen. Analog zu Interleukin 6 induziert IL-11 gp130-Homodimerisierung, um Signaltransduktion zu betreiben.

In einem zweiten Projekt sollen Fusionsproteine aus IL-6-Muteinen und einem *Nanobody* generiert und mit einem Fc-Protein-Tag verbunden werden. Durch Mutation der *Site III*_{IL-6} wird die Bindefähigkeit des Interleukin-6 zu dem Glykoprotein 130 reduziert. In Kombination mit *Site II*_{IL-6} Mutationen soll die Interaktion mit gp130 weiter abgeschwächt werden. Da die *Site I* des IL-6 nicht verändert wird, bleibt die Fähigkeit, den löslichen IL-6-Rezeptor zu binden, erhalten. So kann der sIL-6R gebunden und ebenfalls für den weitere IL-6 *Trans*-Signalweg abgefangen werden. In erster Linie sollen die neuen IL-6^{mt} Varianten kloniert und anschließend produziert und gereinigt werden. Im Verlauf soll die Aktivität und inhibitorische Potenz dieser neuen Varianten für die IL-6 Signaltransduktion in Zellkulturexperimenten überprüft werden.

2 Material & Methoden

2.1 Material

2.1.1 Antibiotika

Ampicillin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe	100 µg/ml
Neomycin	G-418, Genomycin, Genaxxon, Ulm	1600 µg/ml
Penicillin / Streptomycin	Genaxxon Bioscience GmbH, Ullm	6 mg/l / 10 mg/ml

2.1.2 Antikörper

2.1.2.1 Primärantikörper

α -Phospho-STAT3 (Tyr705) (D3A7) XP®	Monoklonaler Antikörper aus dem Kaninchen Western Blot: 1:2000 Cell Signaling Technology Europe B.V.
α -STAT3 (124H6)	Monoklonaler Antikörper aus der Maus Western Blot 1:1000 Cell Signaling Technology Europe B.V.
α -human Fc	Polyklonaler Antikörper aus dem Kaninchen HRP-konjugiert, Western Blot 1:1000 Thermo Fischer Scientific Perbio Science, Bonn, Deutschland
α -human IL-6R (4/11)	Monoklonaler Antikörper aus der Maus Stammlösung: 1 µg/µl, Western Blot 1:1000
α -CD130 (BR-3 AK)	Monoklonaler Antikörper aus der Maus Stammlösung: 1 µg/ml, Western Blot 1:1000, Abcam Cambridge UK

2.1.2.2 Sekundärantikörper

α -mouse IgG POD

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

Stammlösung: 0,8 μ g/ μ l

Western Blot: 1:5000

Thermo Fischer Scientific

Perbio Science, Wltham, USA

α -rabbit IgG POD

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

Stammlösung: 0,8 mg/ μ l

Western Blot 1:5000

Thermo Fischer Scientific

Perbio Science, Waltham, USA

2.1.3 Chemikalien

Phusion buffer (HF Puffer) (5x)

Thermo Scientific, St. Leon-Rot

Standard Restriktionspuffer (10x)

Thermo Scientific, St. Leon-Rot

T4 DNA Ligase Puffer (10x)

Thermo Scientific, St. Leon-Rot

Orange Loading Dye (6x)

Thermo Scientific, Waltham, USA

Acrylamid, 30% (Rotiphorese®)

Carl roth GmbH, Karlsruhe

Agarose

Bio-Budget Technologies, Krefeld

Ammoniumpersulfat (APS)

Sigma-Aldrich, München

β -Mercaptoethanol

Sigma-Aldrich, München

Bovines Serumalbumin (BSA)

Biomol, Hamburg

Bromphenolblau

Roth, Karlsruhe

CellTiter Blue

Promega, Mannheim

Material & Methoden

<i>Complete Protease Inhibitor Tablets</i> (EDTA free)	Roche Diagnostics, Mannheim
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri USA
Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM)	Life Technologies, Darmstadt
dNTP (25nM)	Thermo Scieticific, St. Leon-Rot
Essigsäure	Roth, Karlsruhe
Ethanol	Merck KGaA, Darmstadt
Ethanyldiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Fetales Kälberserum (FBS)	Gibco®, Thermo Scientific, St. Leon-Rot
<i>GeneRuler Express DNA Ladder</i>	Thermo Scientific, Waltham, USA
Isopropanol	AppliChem GmbH, Darmstadt
Kaliumacetat	Merck KGaA, Darmstadt
LB Agarpulver	AppliChem GmbH, Darmstadt
Magermilchpulver	Roth, Karlsruhe
Methanol	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl)	AppliChem GmbH, Darmstadt
Natriumorthovanadate (Na ₃ VO ₄)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Natriumhydroxid (NaOH)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Nonident P-40	Sigma-Aldrich, Steinheim
<i>Page Ruler Prestained</i>	Thermo Scientific, Waltham, USA
<i>Safer green</i>	Intas, Göttingen
Tetramethylethylendiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Tris	Bethesda Research Laboratories Bethesda, USA
Triton X-100	Merck KGaA, Darmstadt
Trypanblau 0,4%	BioRad, München
Turbofect™ Transfektionsreagenz	Thermo Scientific, St. Leon-Rot

Tween 20

Sigma-Aldrich, Steinheim

2.1.4 Enzyme

Alle in dieser Arbeit verwendeten Enzyme wurden von der Firma Thermo Fischer Scientific aus Waltham, in den USA erworben.

2.1.5 Gerätschaften

Autoklav	SHp Steriltechnik AG, Detzel, Schloss/Satuelle
ÄKTA TM start	VWR International, Darmstadt
Biacore X100 Plus	GE Healthcare Life Sciences, Chalfont, UK
<i>Cell counter</i> TC10	BioRad, München
Cellroll	INTEGRA Biosciences GmbH, Fernwald, Deutschland
CO ₂ -Inkubator 150 (E2) Brutschrank	Binder GmbH, Tuttlingen
Fluoreszenzmikroskop	KEYENCE, Neu-Isenburg
Heizbad Julabo sw21	Julabo GmbH, Seelbach
HERAcell Inkubator	UNO BV, Zevenaar, Niederlande
HERAcell 150 250i CO ₂ Inkubator	Thermo Scientific, Waltham USA
INTAS <i>ChemoCam Imager</i>	Intas, Göttingen
INTAS Gel iX <i>Imager</i>	Intas, Göttingen
Kühlzentrifuge 5417 R	Eppendorf, Hamburg
Kühlzentrifuge 5810	Eppendorf, Hamburg
Mini PROTEAN Tetra System	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
NanoDrop 2000	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
pH-Meter	WTW, Mannheim
Pipetten	Eppendorf GmbH, Hamburg

Material & Methoden

Pipetus®-Akku	Hirschmann, Eberstadt
PeqStar 2x <i>Twin Block Thermal Cycler</i>	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Schüttler DRS-12	NeoLab, Heidelberg
Thermoschüttler	Universal Labortechnik, Leipzig
Sterilbank SAFE 2020	Thermo Scientific, Waltham, USA
Superdex 200 10/300 GL	GE Healthcare Life Sciences, Chalfont, UK
Tecan Infinite M200 PRO Reader	Tecan, Maennedorf, Schweiz
Thermoblock	BIBBY Stuart Scientific, Stafford, UK
TransBlot Turbo TM Transfersystem	BioRad, München
Vortexer	VortexGenie2 Scientific Ind., Bohemia, USA
Waage EW 4000	Kern & Sohn GmbH, Balingen
Wasserbad	Lauda, Lauda-Königshofen

2.1.6 Kits

Bestimmung der Proteinkonzentration	BCA <i>Protein Assay Kit</i> , Thermo Scientific, Waltham, USA
Detektion von Chemolumineszenz	ECL <i>Prime Western Blotting Detection Reagent</i> , GE Healthcare, München
DNA Gelextraktion	NucleoSpin Gel and PCR clean up, Machery-Nagel GmbH & Co. KG, Düren
Midi-Präparation von Plasmid-DNA	NucleoBond Xtra Midi, Machery-Nagel GmbH & Co. KG, Düren
Mini-Präparation von Plasmid-DNA	Gene Jet Plasmid Miniprep Kit, Thermo Scientific, Waltham, USA
Proliferationsassay	CellTiter Blue Cell Viability Assay, Promega GmbH, Mannheim

2.1.7 Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma eurofins Genomics erworben und sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Tabelle 1 Liste der verwendeten Oligonukleotide

<i>Primer</i>	<i>Nukleotidsequenz 5' → 3'</i>
IL-6 ^{W157R/D160R} <i>forward</i>	GGCCCAGAATCAGAGGCTGCAGCGCATGACAACCCAC
IL-6 ^{W157R/D160R} <i>reverse</i>	GTGGGTTGTCATGCGCTGCAGCCTCTGATTCTGGGCC
IL-6 ^{S118D/V121D} <i>forward</i>	GCCGTGCAGATGAGGACCAAAGACCTGATCCAGTTCC
IL-6 ^{S118D/V121D} <i>reverse</i>	GGAAGTGGATCAGCTCTTTGGTCCTCATCTGCACGGC
IL-6 ^{Y31D} <i>forward</i>	GCAGATCCGGGACATCCTGGATGGCATCAGC
IL-6 ^{Y31D} <i>reverse</i>	GCTGATGCCATCCAGGATGTCCCGGATCTGC
pcDNA3.1 <i>forward</i>	AAATTAATACGACTCACTATAGG
pcDNA3.1 <i>reverse</i>	AGGCACAGTCGAGGCTG
VHH6 Bam <i>forward</i>	GGATCCGACGTGCA GTTCGTG
VHH6 Kpn <i>reverse</i>	GGTACCTCCGCTGCTCACGGTCACCTG

2.1.8 Plasmide

Im Folgenden sind die Ausgangsplasmide für die Klonierungen in dieser Arbeit aufgelistet.

Die Klonierungsstrategien sind im Ergebnisteil illustriert.

pcDNA3.1(+)	Expressionsvektor für transiente und stabile Proteinexpression in Säugetierzellen Invitrogen, Carlsbad, Californien, USA
pET23a	Low copy Plasmid. Expressionsvektor für transiente und stabile Proteinexpression in Säugetierzellen.

2.1.9 Puffer und Lösungen

<i>Blocking</i> Puffer (Western Blot)	5% Milchpulver in TBS-T
Citrat Puffer (pH 3,25)	70% 0,1 M Citrat Monohydrat 30% 0,1 M Trisodium Citrat Dihydrat
Citrat Puffer (pH 5,5)	30% 0,1 M Citrat Monohydrat 70% 0,1 M Trisodium Citrat Dihydrat
<i>Coomassie Brilliant Blue</i>	4% <i>Coomassie Brilliant Blue R250</i> 80% Methanol 20% Essigsäure
JAK Lyse Puffer	10 mM Tris HCl 150 mM NaCl 5 mM EDTA 0,5% Nonident-P40 1 mM Na ₃ VO ₄ 10 mM MgCl ₂ Proteininhibitor (Tablette gelöst in dH ₂ O)
Laemmli Puffer (5x)	10% SDS 5% Mercaptoethanol 50% Glycerol 125 mM Tris-HCl (pH 6,8) 1 Spatelspitze Bromphenolblau
PBS (<i>Phosphate Buffered Saline</i>)	150 mM NaCl 8 mM Na ₂ HPO ₄ (pH 7,4) 1,7 mM NaH ₂ PO ₄ (pH 7,4)
PBS-T	0,05% Tween-20 in PBS
Sammelgelpuffer	0,5 M Tris HCl (pH 6,8) 0,4% SDS
<i>SDS Destaining Buffer</i>	80% Methanol 20% Essigsäure

Material & Methoden

SDS-Laufpuffer	25 mM Tris-HCl (pH 8,3) 192 mM Glycin 0,1% SDS
Solution 1 / S1 Puffer	25 mM Tris-Hcl (pH 8,0) 10 mM EDTA 50 mM Glucose 100 µg/ml RNase
Solution 2 / S2 Puffer	200 mM NaOH 1% SDS
Solution 3 / S3 Puffer	2,8 mM Kaliumacetat (pH 5,1)
<i>Stripping</i> Puffer	62,5 mM Tris-HCl (pH 6,8) 2% SDS 0,1% β-Mercaptoethanol
TAE Puffer	40 mM Tris-HCl (pH 8,0) 0,1% Essigsäure 10 mM EDTA
Transferpuffer	20 mM Tris-HCl (pH 8,5) 192 Glycin 20% Methanol 0,001% SDS
Trenngelpuffer	1,5 mM Tris-HCl (pH 8,8) 0,4% SDS
TBS	10 mM Tris-HCl (pH 8,0) 150 mM NaCl
TBS-T	0,05% Tween-20 in TBS

2.1.10 Rekombinante Proteine

Interleukin 6 (IL-6)	Institut für Molekularbiologie und Biochemie II (Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf) / Conaris <i>Research Institute</i> AG, Kiel
Interleukin 11 (IL-11)	Institut für Molekularbiologie und Biochemie II (Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf)
Interleukin 27 (IL-27)	Zytokin aus CHO-K1 Zellkulturüberstand (1%). Institut für Molekularbiologie und Biochemie II (Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf)
Hyper-IL-6 (10 µg/ml)	Fusionsprotein aus humanem Interleukin 6 und dem humanen löslichen Interleukin-6-Rezeptor. Institut für Molekularbiologie und Biochemie II (Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf)
sIL-6R	Löslicher IL-6-Rezeptor Conaris <i>Research Institute</i> AG, Kiel
sIL-11R	Löslicher IL-11-Rezeptor. R&D Systems, Minneapolis
sgp130Fc	Dimer aus zwei löslichen Glykoprotein 130-Mo- lekülen, verbunden durch einen Fc-Tag. Institut für Molekularbiologie und Biochemie II (Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf)
VHH6	<i>Nanobody</i> aus dem Lama. Stabilisator des Kom- plexes aus IL-6 und gp80 (sIL-6R). Herstellung im Institut für Molekularbiologie und Biochemie II der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf.
GFP-VHH	<i>Nanobody</i> , welcher <i>Green fluorescent protein</i> . Herstellung im Institut für Molekularbiologie und Biochemie II der Heinrich-Heine-Universität Düs- seldorf.

2.1.11 Verbrauchsmaterial

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	Greiner bio-one, Solingen
10 cm-Schale, beschichtet	TPP, Trasadingen, Schweiz
Amicon Ultra, 15 cm Zentrifugalfilter	Merck, Darmstadt
Bottletop Filter, 0,45 µm	Thermo Scientific, Waltham, USA
Einmalspritzen	Braun, Melsungen
Falcon Reaktionsgefäße, 15 ml und 50 ml	Greiner bio-one, Solingen
Filter, 0,45 µm, Polyvenyldenfluorid	Roth, Karlsruhe
Kryoröhrchen	VWR, Randor, USA
Mikrotubes 1,5 ml und 2,0 ml	Sarstedt, Nürnbrecht
NAP Säule	GE Healthcare, München
Nitrilhandschuhe	Ansell, München
Sterilpipetten Costra Stripette	Coming Incorporated, Coming, USA
PCR Kappen Gr. 125	StarLab, Ahrensburg
PCR Tubes 0,2 ml	StarLab, Ahrensburg
Pipettenspitzen	StarLab, Ahrensburg
PVDF Transmembran	Roth, Karlsruhe
TC10 System counting Slides	BioRad Laboratories GmbH, München
Whatman Filterpapier	VWR International GmbH, Langenfeld

2.1.12 Zellkulturmedien

DMEM ^{-/-}	Dulbecco's <i>Modified Eagle Medium</i> , High Glucose (4,5 g/l), Life Technologies, Darmstadt
DMEM ^{+/+}	DMEM ^{-/-} mit 10% FCS + 1% Penicillin (60 mg/l)/Streptomycin (100 mg/l)
FCS	Fetales Kälberserum, Life Technologies, Darmstadt
Trypsin/EDTA	Life Technologies, Darmstadt
Turbofect Transfection Reagent	Thermo Scientific, Waltham, USA

2.1.13 Zelllinien

Ba/F3- gp130	Murine prä-B-Zelllinie. Suspensionszellen, die stabil mit der cDNA für humanes Glykoprotein 130 sind. Ihr Wachstum ist abhängig von Hyper-IL-6 bzw. IL-6 und dem sIL-6R.
Ba/F3-gp130 IL-6R	BaF/3-gp130 Zellen, die stabil mit der cDNA für humanen IL-6-Rezeptor transfiziert wurden. Sie wachsen in Abhängigkeit von IL-6.
CHO-K1	Immortalisierte chinesische Hamster Ovarialzellen aus einem adulten Hamsterweibchen. Die adhären-ten Zellen zur transienten und stabilen Transfektion der cDNA von Proteinen. Ihr Wachstum ist abhängig von Hyper-IL-6. DMSZ, Braunschweig.

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Arbeiten

2.2.1.1 Messung von DNA- und Proteinkonzentrationen

Bestimmt wurde die Konzentration einer Probe durch Spektrometrie am NanoDrop 2000. Dabei wurde 1 µl Suspension aufgetragen und die Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm und 280 nm gemessen. Die Reinheit der DNA-Probe wurde durch das Absorptionsverhältnis A260/A280 determiniert. Die Konzentration einer Proteinprobe wurde durch die Absorption bei einer Wellenlänge von 280 nm (A280) bestimmt.

2.2.1.2 Agarose Gelelektrophorese

Die Trennung von DNA und Proteinen in einzelne Fragmente erfolgte mittels Gelelektrophorese. Die Elektrophorese basiert auf der Migration der Teilchen in einem elektrischen Feld. Die negativ geladene DNA wandert zur positiv geladenen Anode, wobei kleine DNA-Fragmente schneller migrieren als die größeren. Daraus ergibt sich ein Bandenmuster. Die Größe der einzelnen Fragmente wurde mittels einer Standardleiter– *GeneRuler Express DNA Ladder* oder *Page Ruler Prestained* für Proteine bis zu einer Größe von 130 kDa bestimmt. Zur Herstellung der Gele wurde 1% bzw. 2% Agarose in 1% Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE) gekocht und mit *Safe Green* versetzt. *Safe Green* ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der sich zwischen den Basen einlagert und die DNA unter UV-Licht visualisiert. Die flüssige Agarose wurde in Kammern gegossen, mit einem Kamm belegt und erhärtete bei Raumtemperatur. Im Anschluss wurde der Kamm entfernt, das Gel in eine Kammer mit einprozentigem TAE-Puffer gelegt und die Taschen mit den Proben beladen. Unter einer elektrischen Spannung von 100 Volt wurden die DNA-Proben prozessiert und abschließend im INTAS iX Imager abgelichtet.

2.2.1.3 DNA Extraktion aus Agarosegelen

Zum Gewinn eines DNA-Fragments wurde das Agarosegel unter einem UV-Tisch mit Licht einer Wellenlänge von 365 nm bestrahlt. Die Banden wurden auf diese Weise sichtbar und die Fragmente gewünschter Größe mit einem Skalpell reseziert. Anschließend erfolgte die Extraktion der DNA aus dem Gel mithilfe des *NucleoSpin Gel and PCR clean up* Kit entsprechend den Angaben des Herstellers (Machery-Nagel GmbH & Co KG, Düren). Final wurde die Konzentration der gewonnenen DNA im NanoDrop 2000 gemessen.

2.2.1.4 Restriktion von DNA

Die enzymatische Spaltung der DNA dient der Generierung bestimmter DNA-Fragmente sowie auch der Kontrolle klonierter Plasmide und PCR-Produkte. Hierbei werden Endonukleasen eingesetzt, die an spezifischen Stellen in der Basensequenz der doppelsträngigen DNA schneiden. Zur Präparation der DNA für weitere Klonierung wurden 10 µg Plasmid-DNA eingesetzt. Nach Zugabe von 10 U Restriktionsenzym und 10% Puffer wurde die DNA in einem Gesamtvolumen von 50 µl bei 37°C inkubiert und geschnitten. Der Puffer richtet sich nach der optimalen Aktivität des Restriktionsenzym und wurde nach den Angaben des Herstellers gewählt. Für die analytische Spaltung einer Plasmid-DNA, z.B. nach *site directed mutagenesis*-PCR oder Mini-Präparation wurde lediglich 1 µg Plasmid in einem Gesamtvolumen von 20 µl eingesetzt und anschließend auf einem Agarosegel analysiert. Für die Restriktion mit zwei verschiedenen Enzymen fiel die Wahl des Puffers entsprechend der optimalen Aktivität beider Enzyme und richtete sich ebenfalls nach der Empfehlung des Herstellers.

2.2.1.5 Dephosphorylierung von Plasmid DNA

Um die Religierung eines geschnittenen Plasmids zu verhindern, müssen das 3' und 5' Ende der DNA dephosphoryliert werden. Nach der Inkubationszeit der enzymatischen Prozessierung wurde 1 U *Fast Alkaline Phosphatase* zum Restriktionsansatz gegeben und eine weitere Stunde bei 37°C inkubiert. Die Dephosphorylierungsreaktion wurde durch Gelelektrophorese beendet.

2.2.1.6 Ligation von DNA-Fragmenten

Bei der *sticky end* Ligation werden zwei DNA-Doppelstränge mit überhängenden Enden zusammengeführt. Bei der *blunt end* Ligation werden zwei DNA-Doppelstränge mit glatten Enden verbunden. Nach der Restriktion von Insert und Vektor erfolgte die Ligation in einem Verhältnis 3:1. Insert und Vektor wurden in einer Suspension mit 2 µl Ligase, 2 µl Ligasepuffer und dH₂O bei 4°C über Nacht inkubiert. Ein Lösungsansatz ohne Insert diente in der anschließenden Analyse als Kontrolle.

2.2.1.7 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion ist ein Verfahren, das zur Vervielfältigung von spezifischen DNA-Abschnitten angewandt wird. Für die Amplifikation genügen kleine Mengen Ausgangsmaterial. In aufeinanderfolgenden Amplifikationszyklen (30) wurde der doppelsträngige DNA-Abschnitt zunächst denaturiert. Durch Erhitzung auf 95°C wurde der DNA-Doppelstrang in zwei Einzelstränge gespalten. Für die Hybridisierung wurde die Temperatur auf 50 - 60°C heruntergekühlt. Zwei zur DNA komplementäre Primer banden an die gewünschte Sequenz eines Einzelstrangs und markierten diese, so dass sie im Anschluss von einer thermostabilen DNA-Polymerase elongiert und vielfach synthetisiert werden konnte. Für die Elongation wurde die *Phusion* Polymerase gewählt, da sie über eine Korrekturlesefunktion verfügt und gleichzeitig Werkzeug der DNA-Reparatur ist. Der *Pfu*-Polymerase Puffer (HF-Puffer) wurde vor Benutzung mit MgSO₄ (20 nM) versetzt und aktiviert.

Für die Amplifizierung wurde ein Reaktionsansatz erstellt:

DNA <i>Template</i>	100 - 500 ng Plasmid
5' Primer	10 µM
3' Primer	10 µM
Desoxyribonukleotide	10 mM
HF Puffer (10x)	5 µl
<i>Phusion</i> Polymerase	1 U
dH ₂ O	Σ 50 µl

Die Polymerasekettenreaktion verlief in einem programmierten Zyklus:

Denaturierung	95°C	2 s	} 30 Zyklen
Denaturierung	95°C	30 s	
Annealing	55°C	30 s	
Elongation	72°C	70 s	
Elongation	72°C	10 min	
Lagerung	4°C	∞	

Durch diese Reaktion wurden 10⁶ – 10¹² Kopien eines definierten DNA-Abschnitts generiert.

2.2.1.8 Zielgerichtete Mutagenese-Polymerasekettenreaktion

Die zielgerichtete Mutagenese-PCR (*site directed mutagenesis polymerase chain reaction*) dient der Generierung und Amplifizierung eines DNA-Abschnitts mit einer gewünschten Mutation. Zunächst wurden zwei Reaktionsansätze à 50 µl erstellt:

	DNA Template	100 - 500 ng Plasmid
	5' Primer	100 pM
<u>oder</u>	3' Primer	100 pM
	Desoxyribonukleotide	10 mM
	HF Puffer (10x)	5 µl
	<i>Phusion</i> Polymerase	1 U
	dH ₂ O	Σ 50 µl

Der erste Reaktionsansatz enthielt den 5' Primer. Der zweite Ansatz beinhaltete den 3' Primer. Die gewünschte Mutation war in den Oligonukleotiden komplementär codiert. In einem ersten Durchlauf verlief die Polymerasekettenreaktion der beiden Ansätze separat:

Denaturierung	98°C	4 min	} 30 Zyklen
Denaturierung	98°C	1 min	
Annealing	55°C	1 min	
Elongation	72°C	4 min	
Elongation	72°C	12 min	
Lagerung	4°C	∞	

In dem zweiten Durchlauf wurden die beiden Reaktionsansätze gemischt, jeweils 50 µl auf ein PCR-Tube verteilt und mit je 1 µl *Phusion* Polymerase versetzt. Anschließend wurde das gleiche PCR-Programm nochmals durchlaufen. Für die Analyse wurde das PCR-Produkt mithilfe des *NucleoSpin Gel and PCR clean up* Kit nach Angaben des Herstellers gereinigt. Danach erfolgte die enzymatische Restriktion mit *DpnI* über Nacht. Die enzymatische Spaltung erfolgte in folgendem Reaktionsansatz bei 37°C über zwölf Stunden.

PCR Produkt	28 µl
<i>DpnI</i>	3 µl
Tango Puffer (10x)	4 µl
dH ₂ O	5 µl

Das Enzym wurde am Folgetag im Thermoschüttler bei 80°C über 20 Minuten inaktiviert. Im Anschluss wurde das PCR Produkt in einen Bakterienstamm transfiziert (siehe 2.2.1.12).

2.2.1.9 Colony Polymerasekettenreaktion

Für die Erfolgskontrolle nach Klonierung eines neuen Plasmids wurde dieses in einen Bakterienstamm transfiziert. In dieser Arbeit wurden *Escherichia coli XL-1 blue* verwendet. Nach dem Wachstum zahlreicher Klone wurden positive Klone mittels enzymatischer Spaltung oder Colony PCR selektiert.

Die Colony PCR ist ein einfaches Verfahren, das unter direkter Verwendung der Bakterienklone die transfizierte Plasmid-DNA vervielfältigt. Ein Bakterienklon wird mit einer Pipettenspitze angepickt, in ein PCR Tube mit 20 µl dH₂O überführt und über 5 min bei 95°C inkubiert. Die Pipettenspitze wurde in einem Eppi Tube mit 1 ml LB Medium (mit Ampicillin) bei 37°C über Nacht inkubiert, um positive Klone zu einem späteren Zeitpunkt zu vervielfältigen. Für die Colony PCR wurde zunächst ein Reaktionsansatz hergestellt. Als Negativkontrolle diente ein Ansatz ohne Bakterienklon. Die Mengenangaben multiplizierten sich mit der Zahl der Proben:

Bakterienklon	1
5' Primer	100 pM
3' Primer	100 pM
<i>Dream Tag</i>	5 U/µl
<i>Dream Tag</i> Puffer	5 µl
dNTPs	10 mM
MgCl ₂	25 mM
dH ₂ O	Σ 30 µl

Die Polymerasekettenreaktion wurde in folgendem Programm durchlaufen:

Denaturierung	95°C	5 min	} 30 Zyklen
Denaturierung	95°C	1 min	
Annealing	60°C	1 min	
Elongation	72°C	1 min	
Elongation	72°C	5 min	
Lagerung	4°C	∞	

Abschließend wurden die PCR-Proben auf einem 1%igem Agarosegel aufgetragen und positive Klone entsprechend ihres Bandenmusters nach der Gelelektrophorese ausgewählt.

2.2.1.10 Sequenzierung

Die Sequenzierung neu generierter DNA-Plasmide wurde von der Firma SeqLab Sequence Laboratories Göttingen GmbH durchgeführt. Unter Verwendung der Oligonukleotide T7, BGH *reverse* oder einem ausgewählten Primer aus Tabelle 1 wurden die versandten Plasmide mittels DNA-Sequenzierung nach Sanger sequenziert.

2.2.1.11 Bakterienkultivierung

Bei den in dieser Arbeit verwendeten Bakterien handelt es sich um *Escherichia coli* XL-1 blue. Dieser Stamm trägt ein Resistenzgen für Ampicillin, so dass dieses Antibiotikum in einem Verhältnis 1:500 in LB Medium bzw. LB Agar zur Selektion eingesetzt wird. Flüssigkulturen wurden im Thermoshaker bei 900 rpm und 37°C inkubiert. Die Kultivierung von LB Agarplatten erfolgte im HERAcell Inkubator bei 37°C.

2.2.1.12 Transformation von Plasmid-DNA in E.coli mittels Hitzeschock

Zuerst wurden die Bakterien kurz zentrifugiert (2.000 g, 3 s, RT) und im Anschluss 5 µg des Plasmids auf die Bakterienkultur pipettiert. Nach Inkubation auf Eis (5 min) wurde die Kultur im Thermomixer (850 rpm, 1 min, 42°C) geschüttelt. Dadurch wurde die Membran des Mikroorganismus aufgebrochen und die DNA in das bakterielle Plasmid integriert. Erneut wurden die Bakterien über 5 min auf Eis inkubiert. Nach der Zugabe von 500 µl LB-Medium wurden die Bakterien bei 850 rpm und 37°C im Thermomixer geschüttelt. Nach einer Stunde wurde die gesamte Bakteriensuspension auf einer LB Agarplatte ausgestrichen und über Nacht bei 37°C im HERAcell Inkubator kultiviert. Für die Retransformation von *E.coli* wurden nur 30 µl der Bakteriensuspension auf der Agarplatte ausgestrichen.

2.2.1.13 Plasmid-DNA-Mini-Präparation

Für den Gewinn und die Analyse kleiner Mengen Plasmid-DNA aus Bakterien wurden Einzelklone in 1 ml LB-Medium mit Ampicillin bei 37°C und 1000 rpm im Thermoschüttler über Nacht inkubiert. Am Folgetag wurden die Bakterien zentrifugiert (13.000 g, 5 min, RT), der Überstand verworfen und das Zellpellet in 100 µl kaltem S1-Puffer resuspendiert. Die Lyse der Zellen erfolgte unter Zugabe von 200 µl eiskaltem S2-Puffer und mehrfachem Invertieren des Tubes. Dadurch wurden die Zellmembranen aufgebrochen und die DNA-Plasmid freigesetzt. Die Neutralisation in 150 µl S3-Puffer beendete die Zelllyse. Nach Inkubation auf Eis (10 min) wurde die Suspension zentrifugiert (13.000 g, 15 min, 4°C) und der Überstand in ein neues

Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von 900 µl eiskaltem 100%igem Ethanol wurde der Überstand erneut 10 min auf Eis gekühlt und zentrifugiert (13.000 g, 15 min, 4°C). Dann wurde der Überstand verworfen, das Zellpellet in 500 µl 70%igen Ethanols gewaschen und abschließend zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abpipettiert, das Zellpellet luftgetrocknet und in 30 µl dH₂O resuspendiert. Die DNA-Konzentration wurde mittels NanoDrop 2000 bestimmt (siehe 2.2.1.1). Das DNA-Plasmid wurde bei -20°C gelagert.

2.2.1.14 Plasmid-DNA-Midi-Präparation

Zur Isolation größerer Mengen DNA wurden *E. coli XLI-blue* mit dem positiv sequenzierten Klon retransformiert. Ein Einzelklon wurde in 100 ml LB Medium mit dem entsprechenden Resistenzantibiotikum angeimpft und über Nacht im Schüttler inkubiert (140 rpm, 37°C). Am Folgetag wurde die angewachsene Kultur zentrifugiert (4.000 g, 15 min, RT) und der Überstand verworfen. Für die Midi-Präparation wurde das Thermofisher DNA-Midiprep Kit genutzt. Das Zellpellet wurde in 8 ml *Resuspension* Puffer resuspendiert. Es wurden 8 ml *Lysis* Puffer hinzugegeben und das Tube mehrmals invertiert. Die Lyse erfolgte nicht länger als fünf Minuten. Währenddessen wurde die *NucleoBond* Säule mit 12 ml *Equilibration* Puffer gewaschen. Die Lyse wurde durch Zugabe von 8 ml *Neutralisation* Puffer beendet und im Anschluss auf die equilibrierte Säule gegeben. Nach vollständigem Durchtropfen der Suspension wurden nochmals 5 ml *Equilibration* Puffer auf die Säule gegeben. Dann wurde der Filter entfernt und die Säule zwei Mal mit 8 ml *Wash* Puffer gewaschen. Abschließend wurden 5 ml Elutionspuffer auf die Säule gegeben und das Plasmid in einem 10 ml-Falcon aufgefangen. Die Suspension wurde auf 2 ml-Reaktionsgefäße verteilt. Je 1 ml eluiertes Plasmid wurde mit 700 µl Isopropanol versetzt. Nach Zentrifugation (13.000 g, 30 min, 4°C) wurde der Überstand abgegossen und 400 µl 70%iger Ethanol auf das Pellet gegeben. Nach wiederholtem Zentrifugieren (15 min) wurde Ethanol abpipettiert. Das Zellpellet wurde nach Lufttrocknen im Thermoschüttler (1200 rpm, 10 min, 37°C) in 30 µl dH₂O resuspendiert. Abschließend wurde das Plasmid aus den fünf Reaktionsgefäßen zusammengeführt und die DNA-Konzentration im NanoDrop 2000 bestimmt (siehe 2.2.1.). Das DNA-Plasmid wurde bei -20°C gelagert.

2.2.2 Proteinbiochemische Methoden

2.2.2.1 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Für die Aufspaltung von Proteinen und Stoffgemischen wurde das Prinzip der SDS-PAGE (*sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gelelectroph*) angewandt. Die einzelnen Bestandteile durchwandern ein elektrisches Feld und werden entsprechend ihres Molekulargewichts voneinander getrennt. Proteinproben gleicher Konzentration wurden in 5-fach Laemmli Puffer über 10 min bei 95°C im Thermoschüttler gekocht. 50 µl Zellüberstand wurden in 10 µl Laemmli Puffer gekocht, von den Zelllysaten aus der Zellkultur wurden je 25 µl in 5 µl Laemmli Puffer gekocht. Die SDS-Gele wurden in Elektrophoresekammern gesetzt und diese mit 1x *Stripping* Puffer bis zum Eichstrich aufgefüllt. Die Proben und eine Standardleiter für die Fragmentgrößen, *PageRuler Prestige*, wurden auf die SDS-Gele aufgetragen und durchliefen anschließend ein elektrisches Feld mit einer Spannung von 90 - 100 Volt und konstanter Stromstärke. Das Natrium-Dodecylsulfat lagerte sich an die Proteine an und schuf - unabhängig von ihrem isoelektrischen Punkt - eine universelle Ladung aller Proteine und ihrer Bestandteile. Dies hatte zur Folge, dass die Proteine nicht nach ihrer Ladung, sondern nach ihrer molaren Masse voneinander getrennt wurden.

2.2.2.2 Western Blot

Im Anschluss an die Gelelektrophorese wurden die Proteine auf eine Membran aus Polyvinylidenfluorid (PVDF) übertragen. Die PVDF-Membran und das *Whatman* Filterpapier, ein spezielles Papier aus reiner Zellulose, wurden zurechtgeschnitten. Während das *Whatman* Papier in Transferpuffer getränkt wurden, wurde die PVDF-Membran zuerst für 2 min in Methanol, dann 1 min in dH₂O und abschließend ebenfalls in Transferpuffer gelegt. Die Gele wurden aus den Kammern herausgenommen und aus den Glasplatten gelöst. Von unten nach oben wurden vier Lagen *Whatman* Papier, die PVDF-Membran, das Gel und dann weitere vier Blätter *Whatman* Papier in einen Kasten des Trans-Blot Turbo TM Transfersystems geschichtet und glattgestrichen. Der Kasten wurde verschlossen und das Transferprogramm (60 min) gestartet. Bei dem Transfer werden die Proteine durch Elektrophorese in einem Spannungsfeld mit 25 V und konstanter Stromstärke von dem Gel auf die Membran übertragen. Nach Beenden des Programms wurde die Membran herausgenommen und in einem 50 ml-Falcon mit 15 ml Milch (5%) eine Stunde bei Raumtemperatur unter Rollen geblockt. Nach dem Blocken wurde die PVDF-Membran drei Mal in TBS-Tween und anschließend einmal in TBS gewaschen. Im Anschluss erfolgte die Inkubation im Primärantikörper über 24 h. Je nach Suspension, in die der

primäre oder der sekundäre Antikörper gelöst wurden, wurde die Membran im Zwischenschritt erneut drei Mal in TBS gewaschen. Die Inkubation der PVDF-Membran im Sekundärantikörper erfolgte zwei bis vier Stunden. Abschließend wurde die PVDF-Membran drei Mal mit 10 ml TBS-Tween und dann einmal mit 10 ml TBS gewaschen. Dann wurde die Membran auf eine Folie ausgelegt und mit einer Suspension aus 200 µl HRP *Substrat Peroxide Solution* und 200 µl HRP *Substrat Luminol Reagent* benetzt. Die Folie wurde in den INTAS *ChemoCam Imager* eingelegt und abgelichtet, um die Proteinbanden zu detektieren.

2.2.2.3 Entfernung der Antikörper von der PVDF-Membran: *Stripping*

Zum Nachweis weiterer Signalpeptide mittels anderer Antikörper wurden die Primärantikörper von der Nitrozellulosemembran entfernt. Die Membran wurde in 50 ml *Stripping* Puffer mit 50 µl β-Mercaptoethanol im Wasserbad bei 60°C über 30 min inkubiert. Durch das β-Mercaptoethanol wird die Bindung zwischen dem Primärantikörper und dem auf der Membran transferierten Protein gelöst. Anschließend wurde die Membran drei Mal in TBS-Tween gewaschen und zwei Stunden bei Raumtemperatur im *Blocking* Puffer inkubiert bevor die Proteine von einem neuen Primärantikörper gebunden werden konnten.

2.2.2.4 Immunopräzipitation

Der Nachweis von Protein-Protein-Interaktionen kann mittels Immunpräzipitation (IP) erfolgen. In dieser Arbeit wurde das Verfahren zum Bindungsnachweis einer IL-6 Mutationsvariante an den sIL-6R angewandt. Das Mutein wurde durch transient transfizierte chinesische Hamstero-varialzellen (CHO-K1) exprimiert. Es wurden 1 µg des zu bindenden Rezeptors und 1 ml Zellkulturüberstand des zu untersuchenden Proteins in einem Reaktionsgefäß zusammengeführt. Zur Kontrolle wurde 1 µg sIL-6R in 1ml DMEM^{-/-} suspendiert. Zu Beginn wurden je 50 µl aller Proben als *Input* Fraktion abgenommen und bei 4°C gelagert. Der Rest wurde unter Rotation über Nacht bei 4°C inkubiert. Am Folgetag wurden je 50 µl Protein-A Agarose Beads entsprechend der Anzahl der Proben auf Reaktionsgefäße verteilt und zentrifugiert (10.000 g, 30 s, RT). Anschließend wurde der Überstand abpipettiert und die Protein-A Agarose Beads drei Mal in je 1 ml PBS gewaschen. Abschließend wurden die Beads in 100 µl PBS resuspendiert. Dann wurden die gewaschenen Protein-A Agarose Beads auf die Zellkulturüberstände verteilt und über weitere drei Stunden bei 4°C rotiert. Nach der Inkubationszeit wurden die Proben zentrifugiert (10.000 g, 30 sek) und 50 µl des Überstands als *Non bound* Probe abgenommen. Danach wurde der Zellkulturüberstand abgenommen. Für die *Bound* Probe wurde das zentrifugierte Zellpellet drei Mal in 1 ml PBS gewaschen und abschließend in 50 µl Laemmli Puffer (5x)

resuspendiert. Zu der *Input* und *Non-bound* Fraktion wurden je 15 µl Laemmli Puffer hinzugegeben. Die Proben wurden bei 95°C bei 300 rpm im Thermomixer gekocht und anschließend auf SDS-Gele aufgetragen. Die Detektion der Protein-Protein-Interaktion erfolgte nach Western Blot im INTAS Chemo Cam Imager.

2.2.2.5 Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie

Um die Interaktion zweier Biomoleküle hinsichtlich Kinetik und Gleichgewicht zu visualisieren und in Echtzeit zu analysieren, wurde Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie (*surface plasmon resonance*, SPR) angewandt. Ein Sensor misst die Masseänderung auf einer Oberfläche während der Interaktion zwischen dem immobilisierten und mobilisierten Molekül. Zunächst wurde eines der Biomoleküle, der Ligand, auf einem goldbeschichteten CM5-Chip mit carboxymethylierter Dextranschicht kovalent gebunden. Das zweite Biomolekül, der Analyt, wurde in HBS-s⁺ Puffer resuspendiert und in aufsteigender Konzentration sequentiell mit einer Flussrate von 30 µl/min injiziert. Die Interaktion zwischen Liganden und Analyten erfolgte bei 25°C und wurde über 60 s vom Biacore X100 Plus System registriert. Zusätzlich wurde die globale Dissoziation in 600s-Intervallen nach der finalen Probeninjektion gemessen. Nach jeder Probe wurde die Interaktionsfläche mit HBS-s⁺ Puffer regeneriert, bevor die erneute Injektion einer Probe mit höherer Proteinkonzentration erfolgte. Der CM5-Chip wurde mit polarisiertem Licht bestrahlt. Die Assoziation und Dissoziation des Analyten und dem auf dem Chip immobilisierten Liganden wurden durch Winkeländerung des reflektierten Lichts durch einen Sensor registriert. Das Signal, gemessen in Resonanz-Einheiten (RU), ist proportional zu der Masseänderung auf dem Chip und wurde von dem Biacore X100 Plus System aufgezeichnet. Die Kinetik der Interaktionspartner wurden vom Biacore X100 Plus System als Assoziations- (k_{on}) und Dissoziationsgeschwindigkeit (k_{off}) ermittelt. Aus diesen Werten wurde die Dissoziationskonstante (K_d) errechnet.

$$K_d = \frac{[A] \times [B]}{[AB]} = \frac{k_{off}}{k_{on}}$$

2.2.3 Methoden in der Zellkultur

2.2.3.1 Kultivierung eukaryotischer Zellen

Sämtliche Zellen (siehe 2.1.14) wurden auf 10 cm-Petrischalen in 10 ml DMEM *High Glucose* (4,5 g/l) + 10% fetales Kälberserum (FCS) + 1% Penicillin/Streptomycin im HERAccl VIOS 250i CO₂ Inkubator bei 37°C, 5% CO₂ und gesättigter Wasserdampf-atmosphäre kultiviert. Die Schalen für die adhären-ten CHO-K1 Zellen waren entsprechend beschichtet. In Abhängigkeit der Zelllinie wuchsen die Zellen unter Zugabe eines Stimulans. Ba/F3- gp130 und Ba/F3-gp130 IL-12β IL-27R Zellen proliferierten durch Zugabe von 10 µl Hyper IL-6 in Zellkulturüberstand). Ba/F3-gp130 mit membranständigem IL-6R wuchsen mit 10 ng/ml IL-6. Die Zellen wurden zweimal wöchentlich gesplittet. Adhären- te Zellen wurden nach Absaugen des Mediums in 10 ml PBS gewaschen, mit 2 ml Trypsin/EDTA abgelöst und anschließend pelletiert (1.500 g, 5 min, RT). Zur Neutralisierung des Trypsins wurden die Zellen in 2 ml DMEM^{+/+} resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde das Zellpellet in 1 ml DMEM^{+/+} aufgenommen und in einem Verhältnis 1:100 auf eine 10 cm-Schale mit 10 ml frischem Medium (DMEM^{+/+}) transferiert. Die Suspensionszellen (Ba/F3-Zellen) wurden in einem Verhältnis 1:1000 auf eine neue 10 cm-Petrischale mit 10 ml frischem DMEM^{+/+} überführt.

2.2.3.2 Bestimmung der Zellzahl

Um die Zellzahl in einem bestimmten Volumen zu erfassen, wurden 6 µl Zellsuspension mit 6 µl *Trypan Blue Dye* vermischt und 10 µl des Gemischs in eine Kammer (TC10 System *Counting Clide Dual Chamber*) pipettiert. Die Kammer wurde in den TC10 *Automated Cell Counter* gelegt und in diesem die Zellzahl bestimmt.

2.2.3.3 Transiente Transfektion adhären-ter Zellen und Mediumabnahme

Zur Veranschaulichung des Expressionsmusters eines gewünschten Proteins wurde die codierende Plasmid-DNA in adhären- te Zellen transfiziert. Am Vortag wurden 2 x 10⁶ CHO-K1 auf einer beschichteten 10 cm-Petrischale ausgesät. Über Nacht wuchsen die Zellen bei 37°C im HERAccl VIOS 250i CO₂ Inkubator heran. Für die Transfektion wurden 5 µg Plasmid-DNA in 1 ml DMEM^{-/-} und 10 µl Transfektionsreagenz (TurboFect) bei 37°C für 20 min im HERAccl IVOS 250i CO₂-Inkubator inkubiert. Die DMEM^{-/-} Suspension wurde auf die Petrischale gegeben und diese kurz geschwenkt, um die Plasmid-DNA gleichmäßig zu verteilen. Die Zellen wurden für weitere fünf Stunden bei 37°C inkubiert, dann erfolgte Mediumswechsel. Das Medium wurde durch eine sterile Glaspipette abgesaugt und frisches DMEM^{+/+} Medium

auf die 10 cm-Schale gegeben. Die Zellkultivierung wurde für weitere 48 h bei 37°C fortgesetzt. Nach den ersten 24 Stunden wurde das Medium (10 ml DMEM^{+/+}) gewechselt. Nach weiteren 24 Stunden Inkubation wurde der Zellkulturüberstand durch Einmalspritzen und 0,45 µl-Polyvinylidenfluorid-Filter abgenommen. Die Zellen wurde mittels *Cell Scraper* in 1 ml autoklaviertem PBS abgelöst. Sie wurden zentrifugiert (1.000 g, 5 min, 4°C) und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde anschließend lysiert oder bei -80°C eingefroren und zu einem späteren Zeitpunkt verwendet.

2.2.3.4 Stabile Transfektion adhärenter Zellen

Die stabile Transfektion dient der permanenten Expression der cDNA und somit der kontinuierlichen Produktion eines Proteins. Für stabile Transfektionen wurden in dieser Arbeit CHO-K1 Zellen verwendet. Als Transfektionsreagenz wurde Turbofect gewählt. Am Vortag wurden 2 Millionen CHO-K1 Zellen auf einer Zellkulturschale für adhärenente Zellen ausgesät und in 10 ml DMEM^{+/+} im HERAccl IVOS 250i CO₂-Inkubator (37°C, 5% CO₂, gesättigte Wasserdampf-atmosphäre) kultiviert. Am nächsten Tag wurden 5 µg eines gewünschten Plasmids in 1 ml DMEM^{-/-} inkubiert (37°C, 5% CO₂, 30 min). Im Anschluss wurde das Plasmid auf die Zellen gegeben. 10 µl TurboFect wurden punktuell auf die CHO-K1 Zellen pipettiert und durch Schwenken der Schale verteilt. Nach fünfstündiger Inkubation im CO₂-Inkubator wurde das Medium gewechselt, da das Turbofect langfristig toxisch auf die Zellen wirkt. Nach zwei Tagen waren die Zellen auf der Platte herangewachsen und wurden in einem Verhältnis von 1:100 auf eine neue Schale mit 10 ml DMEM^{+/+} transferiert. Zusätzlich wurden 225 µl Neomycin (G-418) als Selektionsantibiotikum hinzugefügt. Fortlaufend wurden die Zellen im HERAccl Inkubator kultiviert. Das Medium wurde alle zwei Tage durch 10 ml DMEM^{+/+} mit 225 µl G418 ausgetauscht. Die meisten Zellen starben langfristig ab. Durch das Selektionsantibiotikum überlebten die Zellen, die das Plasmid stabil in ihre Plasmid-DNA integriert hatten, und wuchsen als singuläre Klone auf der 10 cm-Schale an. Nach etwa drei Wochen war die 10 cm-Schale erneut voll bewachsen. Zu diesem Zeitpunkt wurde der Überstand und eine Probe zur Prüfung der Proteinexpression abgenommen. Die CHO-K1 Klone wurden in 10 ml PBS gewaschen und dann mittels 2 ml Trypsin/EDTA abgelöst. Die Zellen wurden zentrifugiert (4.000 g, 5 min, RT), der Überstand abgesaugt und das Zellpellet in 2 ml DMEM^{+/+} resuspendiert. Nach erneuter Pelletierung wurden die Zellen in 10 ml DMEM^{+/+} resuspendiert. Je 1 ml des Zellgemischs wurde auf eine beschichtete 10 cm-Petrischale gegeben und mit 225 µl Neomycin versetzt. Die Selektion wurde fortgeführt, bis eine volle Schale stabil transfizierter Klone herangewachsen war. Nach Ablösen, Waschen und Resuspension der Zellen in 10 ml DMEM^{+/+} wurden 0,5

Zellen pro Milliliter errechnet und eine Suspension mit einem Gesamtvolumen von 10 ml DMEM^{+/+} + 225 µl G-418 erstellt. Dann wurde eine 96 *Well* Platte mit je 100 µl pro *Well* befüllt. Diese verblieb bei 37°C im HERAccl Inkubator, bis Einzelklone in den *Wells* heranwuchsen. War ein *Well* vollständig mit Zellen bedeckt, wurde der Einzelklon von der 96 *Well* Platte auf eine 6 *Well* Platte überführt. Der Überstand wurde abgenommen und als Probe bei -20°C aufbewahrt. Die Zellen auf der Platte wurden mit 100 µl PBS gewaschen, mit 20 µl Trypsin/EDTA abgelöst und in 2 ml DMEM^{+/+} + 45 µl G-418-Sulfat wiederaufgenommen. Weiterhin wurden sie bei 37°C im CO₂-Inkubator in Kultur gehalten. Waren die Einzelklone auf der 6 *Well* Platte herangewachsen, so wurden sie mit 1 ml PBS gewaschen, mit 200 µl Trypsin/EDTA abgelöst und in 10 ml DMEM^{+/+} auf eine beschichtete 10 cm-Schale transferiert. Das Selektionsantibiotikum wurde alle zwei Wochen bei Mediumswechsel hinzugefügt, um den Selektionsdruck zu erhalten. Die Proteinexpression wurde in den verschiedenen Stadien mittels SDS-PAGE und Western Blot überprüft. Bei Nachweis der Expression konnte ein Einzelklon in das *Rollerbottle* System zur Proteinproduktion in größerem Maßstab übertragen werden.

2.2.3.5 Proteinproduktion im großen Maßstab: Das *Rollerbottle* System

Das *Rollerbottle* System bietet die Möglichkeit, eine größere Population stabil transfizierter Zellen heranwachsen zu lassen und große Proteinmengen in kurzer Zeit herzustellen. Nach erfolgreicher stabiler Transfektion in CHO-K1 Zellen wurde ein Einzelklon auf vierzehn beschichtete 15 cm-Schalen transferiert, um eine hohe Zellzahl zu generieren. Nach etwa vier Tagen waren die 15 cm-Schalen vollständig bewachsen. Das Medium wurde abgesaugt und die Zellen mit 2 ml Trypsin/EDTA abgelöst. Nach Zentrifugation (1.500 g, 5 min, RT) wurde das Zellpellet in 10 ml DMEM^{+/+} resuspendiert und die Zellsuspension in eine *Rollerbottle* mit 400 ml DMEM^{+/+} gegeben. Bis zum ersten Mediumswechsel wurde die *Rollerbottle* bei 37°C im HERAccl CO₂-Inkubator unter Rotation inkubiert. Nach 3 Tagen wurde die erste Ration verworfen und das Medium mit 400 ml DMEM^{+/+} + 1,3 ml G-418-Sulfat gewechselt. Weitere Mediumswechsel erfolgten zweimal wöchentlich. Das Medium aus der *Rollerbottle* wurde abpipettiert, durch einen 45 µm Spritzenfilter filtriert und bei -80°C eingefroren und gelagert. Pro Woche wurden pro Proteinvariante 800 ml Zellkulturüberstand abgenommen.

2.2.3.6 Proteinreinigung über das ÄKTA™ start System

Zur Reinigung der cs-130Fc Varianten wurde das System ÄKTA™ start genutzt. Dieses kann Proteine durch Affinitätschromatographie, Ionen- oder Pufferaustausch, Entsalzung oder auch Gelfiltration reinigen. Vor der Reinigung wurden 1,2 l bis 1,6 l CHO-K1 Zellkulturüberstand

(gelagert bei -80°C) aufgetaut, durch einen $0,45\ \mu\text{m}$ *Bottletop*-Filter filtriert und im Anschluss eine *Input* Probe abpipettiert. Eine Protein-A Säule wurde an das ÄKTATM start System angeschlossen. Der Zellkulturüberstand wurde auf die Protein-A Säule geladen und durchlief diese mit einer Flussrate von $1\ \text{ml/min}$. Die Reinigung erfolgte durch Pufferaustausch unter dem Einsatz von 70%igem Citrat Puffer ($\text{pH } 3,25$) und 30%igem Citrat Puffer ($\text{pH } 5,5$). Die gesammelten Fraktionen wurden entsprechend dem aufgezeichneten Absorptionsspektrum im Computersystem zugeordnet. Nach der Konzentrationsmessung im NanoDrop 2000 folgte die Konzentrierung des gereinigten Proteins. Ein Amicon Zentrifugalfilter wurde zunächst mit $15\ \text{ml}$ PBS aufgefüllt und zentrifugiert ($4.000\ \text{g}$, $10\ \text{min}$, RT). Anschließend wurde die Fraktion des gereinigten Proteins auf den Filter gegeben und solange zentrifugiert, bis die gewünschte Suspensionsmenge erreicht wurde. Um das Protein längerfristig zu lagern, war ein Pufferaustausch erforderlich, da das Citrat durch seine sauren Eigenschaften das Protein destruiert. Der Pufferaustausch erfolgte über eine NAP-Säule. Die Flüssigkeit, in der die NAP-Säule gelagert war, wurde zunächst abgetropft. Dann wurde die Säule drei Mal in $2,5\ \text{ml}$ PBS gewaschen. Die NAP-Säule wurde im Anschluss mit maximal $2,5\ \text{ml}$ Protein pro Durchgang beladen. Nachdem die Proteinfraktion durchgetropft war, wurden $3,5\ \text{ml}$ PBS zur Elution auf die Säule gegeben und das Protein in einem Falcon aufgefangen. Nach dem Pufferaustausch wurde die NAP-Säule drei Mal in $2,5\ \text{ml}$ PBS sowie einmal in $2,5\ \text{ml}$ 20%igem Ethanol gewaschen. Die Protein-PBS-Suspension wurde in einem zweiten Durchlauf über einen Amicon Zentrifugalfilter konzentriert und abschließend aliquotiert. Die Proteinproben wurden in Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert.

2.2.3.7 Größenausschlusschromatographie

Für die Generierung der monomeren Variante (cs-130) wurden $500\ \mu\text{l}$ des gereinigten dimeren Proteins (cs-130Fc) mit der TEV-Protease in einem Verhältnis $1:500$ über Nacht bei 4°C inkubiert und so der Fc-Protein-Tag proteolytisch abgespalten. Am darauffolgenden Tag erfolgte die Größenausschlusschromatographie zur Trennung der Fragmente und zur Isolation des Monomers aus dem Gemisch mit nicht geschnittener dimerer Variante und dem Fc-Fragment. Die Größenausschlusschromatographie (*size exclusion chromatography*, SEC) ist ein Verfahren, in dem Biomoleküle proportional zu ihrer Größe getrennt werden. Dabei wird eine Suspension mit Teilchen unterschiedlicher Größe auf eine poröse Matrix geladen. In der stationären Phase diffundieren diese Teilchen in Abhängigkeit ihrer Größe in die Poren. Kleinere Moleküle dringen tiefer ein und verbleiben länger in den Poren. In der mobilen Phase werden die Moleküle aus der Matrix gereinigt. Große Partikel, welche nicht in die Poren eingedrungen sind, werden

zuerst eluiert. Darauf folgen proportional zu ihrer Größe immer kleinere Moleküle. Die kleinsten Teilchen verbleiben am längsten in den Poren der Matrix und werden als letzte Fraktion herausgewaschen. In dieser Arbeit kam die Gelfiltrationssäule Superdex 200 10/300 GL der Firma GE Life Sciences für die Reinigung der monomeren cs-130 Variante zum Einsatz. Ihre Matrix besteht aus vernetzter Agarose und Dextran und ihre Poren fasst globuläre Proteine mit einem Molekulargewicht zwischen 10 – 600 kDa. Die neuartigen Inhibitoren cs130-Fc (157 kDa) und cs-130 (52 kDa) liegen in diesem Spektrum, so dass wir uns für den Einsatz dieser Säule entschieden. Für die Elution wird eine Lösung benötigt, in der die voneinander getrennten Biomoleküle vollständig löslich sind. Da ionische Wechselwirkungen auftreten können, wurde eine Lösung mit konstanter Ionenstärke gewählt. Wir setzen PBS mit einem pH-Wert von 7,4 ein. Die Aufreinigung der Biomoleküle erfolgte mit einer konstanten Flussrate (0,5 ml/min). Während der Auswaschung wurde die Lichtabsorption der eluierten Fraktionen bei einer Wellenlänge von 280 nm gemessen und eine Absorptionskurve erstellt, um die einzelnen Fraktionen einer Gruppe gemeinsamer Teilchen zuzuordnen.

2.2.3.8 BCA-Assay

Um zu bestimmen, in welcher Konzentration die verschiedenen Fusionsproteine einen Signalweg inhibieren, wurde die Proteinkonzentration der zu untersuchenden Varianten standardisiert. Zunächst wurde der Gehalt der gereinigten Proteinaliquots bestimmt, um anschließend Proben mit einheitlicher Proteinmenge herzustellen. Im ersten Schritt wurden die Zellpellets (gelagert bei -80°C) zwei Stunden in JAK Lyse Puffer bei 4°C unter Rollen inkubiert. Nach Zentrifugation (1,500 g, 5 min, 4°C) wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und durch Pipettieren gut vermischt. Anschließend wurden die Proben in einer 1:20 Verdünnung (3 µl Lysat auf 57 µl dH₂O) auf eine 96 *Well* Platte verteilt (2 *Wells* pro Bedingung à 25 µl). Die *Working Reaction (WR)* Lösung wurde durch 5 ml *Clear WR* und 100 µl *Blue WR* generiert und davon je 200 µl pro *Well* mithilfe einer Multikanalpipette hinzugefügt. Die 96 *Well* Platte wurde 30 min bei 37°C im HERAccl IVOS 250i CO₂ Inkubator inkubiert und anschließend der Proteingehalt am Tecan Infinite 200M PRO Reader gemessen. Für die anti-Phospho-STAT3- und anti-STAT3-Assays wurden je 2,5 µg Protein in Laemmli Puffer (5x) bei 95°C über 10 min im Thermoschüttler gekocht und im Anschluss auf ein SDS-Gel aufgetragen.

2.2.3.9 Proliferationsassay

Die inhibitorische Aktivität der neuartigen Fusionsproteine wurden im Proliferationsassay ermittelt und mit sgp130Fc verglichen. Zuerst wurden 50.000 Zellen pro Milliliter in einem Gesamtvolumen von 10 ml DMEM^{+/+} aufgenommen und zum Wachstum stimuliert. Für die Simulation des IL-6 *Trans Signaling* wurden Ba/F3-gp130 Zellen mit 10 ng/ml IL-6 und 70 ng/ml sIL-6R stimuliert. Das IL-6 *Classic Signaling* wurde mithilfe von Ba/F3-gp130 IL-6R Zellen und einer Stimulation aus 10 ng/ml IL-6 imitiert. Für die Analyse des IL-11 *Trans Signaling* wurden Ba/F3-gp130 Zellen mit 10 ng/ml IL-11 und 100 ng/ml sIL-11R zur Proliferation angeregt. Für die Negativkontrolle wurde eine nicht stimulierte Probe abgenommen. Zu den stimulierten Zellproben wurden anschließend die Fusionsproteine in absteigenden Konzentrationen hinzugegeben. Pro Bedingung wurden drei Proben à 100 µl auf *Wells* einer 96 *Well* Platte pipettiert. Nach 72-stündiger Inkubation im HERAccl IVOS 250i CO₂ Inkubator (37°C, 5% CO₂, in Wasserdampf-gesättigter Atmosphäre) erfolgte die Auswertung mittels CellTiter Blue Cell Viability Assay. Jedes *Well* wurde mit 20 µl CellTiter Blue versetzt und zum Zeitpunkt t_0 bis t_{120} in zwanzigminütigen Intervallen im Tecan Infinite M200 PRO Reader gemessen.

2.2.3.10 Stimulationsassay

Um die effektive Konzentration der neuen Inhibitoren zu ermitteln, wurden Stimulationsassays durchgeführt. Für diesen Assay wurde im Voraus eine hohe Zahl an Zellen herangezüchtet. 10⁶ Ba/F3-Zellen-gp130 wurden in 50 ml-Falcons überführt, zentrifugiert (1.500 g, 5 min, RT) und drei Mal in 10 ml PBS gewaschen. Abschließend wurde das Zellpellet in DMEM^{-/-} resuspendiert. Je 1 ml pro Bedingung wurde auf eine 12 *Well* Platte gegeben und für 5 Stunden im HERAccl IVOS 250i CO₂ Inkubator (37°C, 5% CO₂, in Wasserdampf-gesättigter Atmosphäre) inkubiert. Durch das nährstoffarme Medium und den fehlenden Wachstumsstimulus wurden die Zellen unter minimalen Bedingungen lebend erhalten. Nach 4½ Stunden wurden Stimulans und Inhibitor in 40 µl PBS aufgenommen und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurden diese Proben den Ba/F3-gp130 Zellen hinzugeführt und durch Schwenken der Platte verteilt. Die Stimulation erfolgte über 30 min bei 37°C im Inkubator. Im Anschluss wurde das Medium in Reaktionsgefäße überführt und zentrifugiert (1.500 g, 5 min, 4°C). Der Zellkulturüberstand wurde abpipettiert und das Zellpellet in Stickstoff bei -80°C eingefroren.

3 Ergebnisse

Interleukin 6 ist als Mediator in der immunologischen Abwehr involviert und reguliert pro- und anti-inflammatorische Prozesse. Das Zytokin kann Signale auf zwei unterschiedlichen Wegen induzieren. Der klassische Signalweg über den membranständigen IL-6 Rezeptor ist limitiert für Zellen, die diesen Rezeptor tragen. Durch die Bindung des IL-6 wird eine Signalkaskade in Gang gesetzt, die in der Expression bestimmter Gene resultiert. Die Genprodukte werden auf diese Weise nach Bedarf produziert und sezerniert, beispielsweise werden im Falle einer Infektion Akute-Phase-Proteine in Hepatozyten vermehrt synthetisiert. Das IL-6 *Trans Signaling* erfolgt durch Bindung des IL-6 an den löslichen IL-6-Rezeptor. Dieser IL-6/sIL-6R-Komplex kann an das ubiquitär exprimierte Glykoprotein 130 binden und so auch Zellen ohne den membranständigen IL-6-Rezeptor aktivieren. Die intrazelluläre Signalkaskade gleicht der des klassischen Signalwegs. In Folge Jak/STAT- und MAPK-Aktivierung kommt es zur Genexpression (Scheller et al. 2011). Eine übermäßige Produktion des Interleukin 6 führt häufig zur überschießenden und prolongierten Aktivierung des IL-6 *Trans* Signalwegs und infolgedessen zur Synthese pro-inflammatorischer Faktoren. Diese rekrutieren weitere Immunzellen und andere Entzündungsmediatoren, die eine inadäquate oder übermäßige Inflammation außerhalb eines regulären Reizes hervorrufen. Während der klassische IL-6 Signalweg an physiologischen Prozessen wie der Zelldifferenzierung und der Regulation regenerativer Prozesse beteiligt ist, wird IL-6 *Trans Signaling* mit entzündlichen, autoimmunen und malignen Erkrankungen assoziiert. Diese Pathologien treten mit erhöhten IL-6 und sIL-6R-Serumspiegeln auf (Hunter and Jones 2015)). Um nicht nur die laborchemischen Parameter, sondern auch die Krankheitslast zu minimieren und den Krankheitsprogress hinauszuzögern, beschäftigt sich die Forschung seit Jahren damit, potente Inhibitoren zu entwickeln, die die pathologische IL-6-Aktivität supprimieren. Ein etablierter Inhibitor der sich spezifisch gegen IL-6 *Trans Signaling* richtet ist das sgp130Fc, ein Dimer aus zwei löslichen Glykoprotein 130 Untereinheiten, die durch ein IgG1-Fc-Fragment verbunden sind. Zuletzt wurde sgp130Fc, klinisch unter dem Namen Olamkizept bekannt, in einer Phase IIa Studie getestet und zeigte eine effektive Inhibition der IL-6 *Trans* Signalinduktion und eine potente Suppression der Krankheitsaktivität chronisch entzündlicher Darmerkrankungen (Schreiber et al. 2021).

In dieser Arbeit wurden neuartige Inhibitoren etabliert, die sich spezifisch gegen IL-6 *Trans Signaling* richten. Eine schematische Übersicht ist in Abb. 3.1. dargestellt. Um optimale Löslichkeit und Gewebepenetration zu erreichen, wurde das Molekulargewicht der Inhibitoren minimiert. Außerdem sollte die Spezifität für Interleukin 6 möglichst hoch sein und hemmende Einflüsse auf die Signalwege der IL-6-verwandten Zytokine, z.B. Interleukin 11, minimiert werden. In dem erstrangigen Projekt wurden cs-130Fc Varianten generiert. Die Klonierung erfolgte in einer vorangegangenen medizinischen Doktorarbeit durch Selina Hansen. Das neue inhibitorische Protein wurde als Dimer (cs-130Fc) und als monomere Variante (cs-130) produziert und analysiert. Für die Bindung des IL-6 an das Glykoprotein 130 sind lediglich die Domänen D1_{gp130}, D2_{gp130} und D3_{gp130} essentiell (Chow et al. 2001). Sie wurden mit VHH6, einem spezifischen IL-6/sIL-6R Komplex-stabilisierenden Einzeldomänenantikörper, über einen 100 Å langen, flexiblen Linker miteinander verbunden. Des Weiteren wurde VHH6 mit dem Fc-Fragment eines Immunglobulin G1 verbunden. In diese Verbindung wurde eine TEV *Site* Protease Erkennungssequenz integriert, so dass nach Proteinreinigung und Prozessierung durch die TEV-Protease der Fc-Teil abgespalten werden konnte. Auf diese Weise wurde die monomere Variante generiert und eine weitere Größenreduktion erreicht. Um die Funktionalität und Bedeutsamkeit der einzelnen Proteinelemente zu analysieren, wurden zudem Kontrollproteine konstruiert. Zum einen wurde der VHH6 durch einen GFP *Nanobody* ersetzt, welcher hinsichtlich IL-6 *Signaling* keinen Einfluss ausübt. Das cGFPs-130Fc hat das gleiche Molekulargewicht wie cs-130Fc. In einem weiteren Kontrollprotein wurde die D2-Domäne mutiert. Durch eine Y190K/F191E-Mutation verliert die D2_{gp130}-Domäne die Bindefähigkeit für IL-6. Dieses Kontrollprotein kann den Komplex aus IL-6/sIL-6R lediglich durch den VHH6 *Nanobody* stabilisieren, jedoch wird die Bindung nicht durch die gp130-Domänen unterstützt.

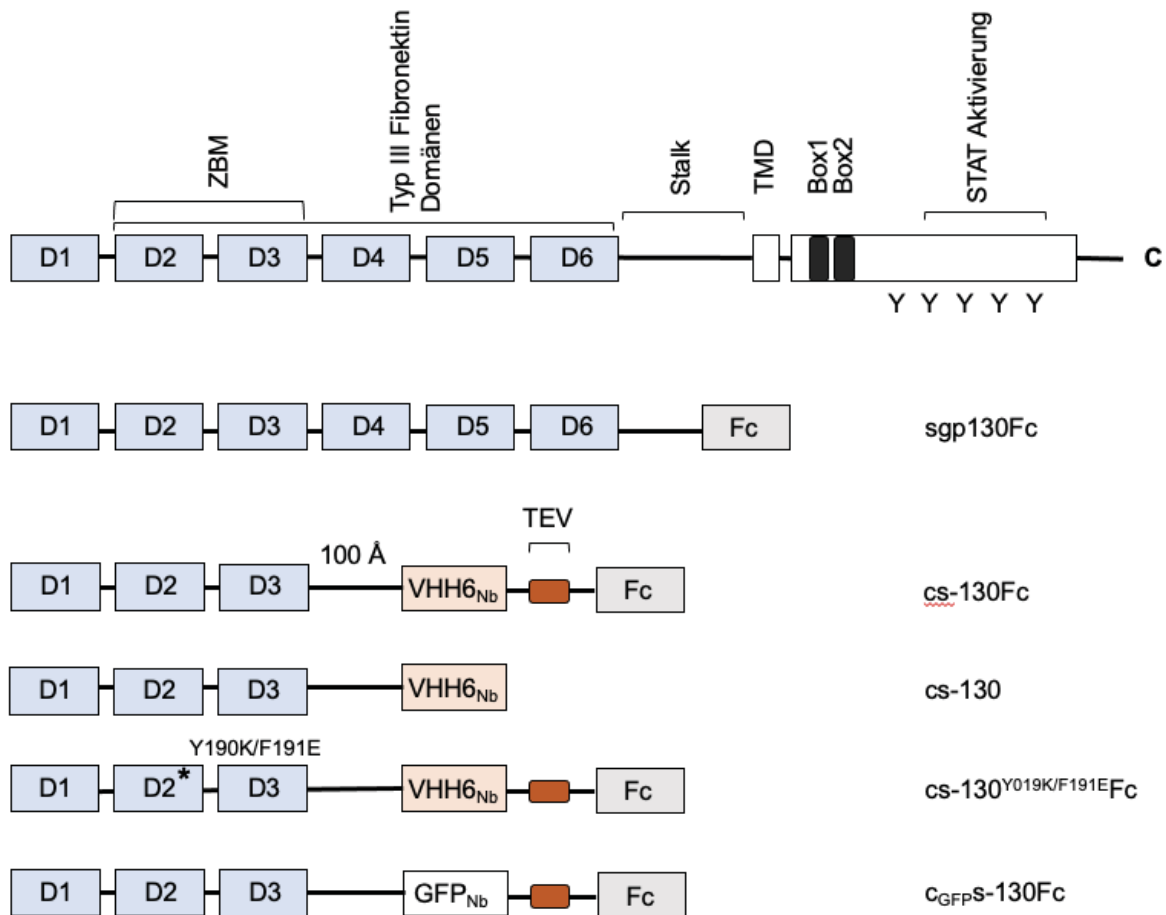


Abbildung 3.1 Schematische Darstellung sämtlicher cs-130Fc Varianten

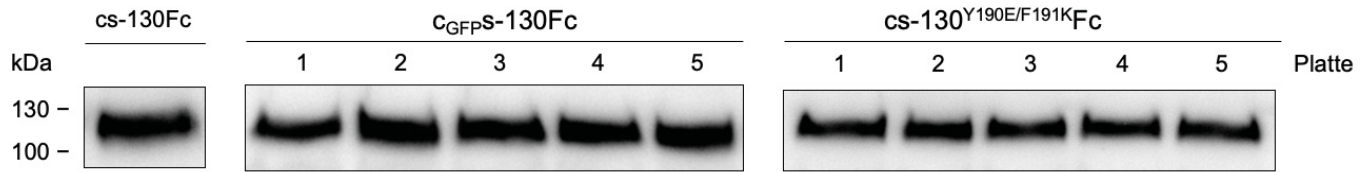
Als Vergleichsinhibitor diente sgp130Fc. Für die Bindung des IL-6/sIL-6R-Komplexes sind lediglich die D1_{gp130} – D3_{gp130} Domänen essentiell, so dass diese als Komplex-bindendes Element für die neuen Inhibitoren ausgewählt wurde. In einer Kontrollvariante (cs-130^{Y190K/191E}Fc) wurde die D2-Domäne mutiert und so die Bindefähigkeit an IL-6/sIL-6R eliminiert. Die dimeren cs-130Fc-Inhibitoren haben ein bedeutsam geringeres Molekulargewicht als sgp130Fc. Die TEV Site zwischen Nano-body und Fc-Tag ermöglicht die Monomerisierung und weitere Größenreduktion der Varianten.

3.1 Inhibition des IL-6 Trans Signaling durch cs-130Fc Varianten

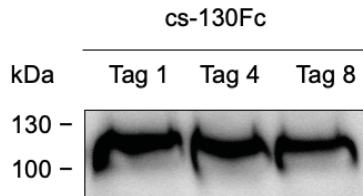
3.1.1 Synthese von cs-130Fc Varianten

Um die neuartigen Fusionsproteine zu charakterisieren, wurden die cs-130Fc Varianten in einer vorherigen medizinischen Doktorarbeit in unserem Institut von Selina Hansen kloniert. Für die biophysikalische und zellbiologische Charakterisierung der Inhibitoren wurden Proteinmengen im Milligrammbereich benötigt. Um die cs-130Fc Fusionsproteine in größerem Maßstab zu produzieren, wurden adhärente CHO-K1 Zellen stabil transfiziert. So konnte eine kontinuierliche Produktion der Proteine gewährleistet werden. Zur Überprüfung der Selektion wurden zu mehreren Zeitpunkten Proben des Zellkulturüberstands abgenommen und mittels SDS-PAGE und Western Blot nachgewiesen. Nach erfolgreicher stabiler Transfektion wurde ein CHO-K1-Klon in das *Rollerbottle* System überführt. Jeden dritten Tag wurden 400 ml Zellkulturüberstand abgenommen und das Medium mit 400 ml DMEM^{+/+} + 1,3 ml G-418 gewechselt, so dass ein wöchentlicher Ertrag von 800 ml Zellkulturüberstand je Proteinvariante gewonnen wurde. Der gewonnene Überstand wurde zentrifugiert (1.000 g, 30 min, RT) und anschließend bei -80°C gelagert. Mit jeder Ernte aus dem *Rollerbottle* wurde eine Probe zur Prüfung der kontinuierlichen Proteinexpression genommen. Die Reinigung der Proteine erfolgte nach etwa vier Wochen mit einer Ansammlung von 1,6 l Zellkulturüberstand.

A



B



C

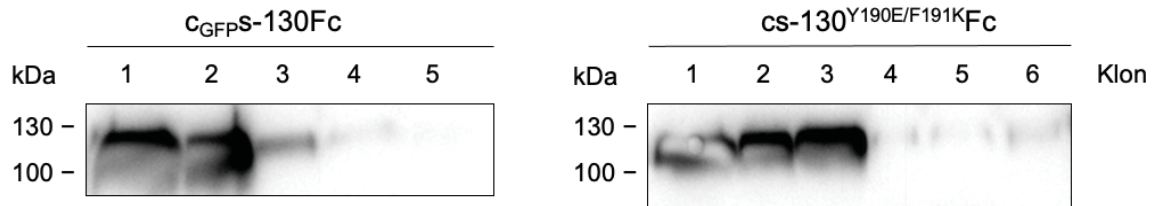


Abbildung 3.2 Nachweis der kontinuierlichen Expression der cs-130Fc Varianten

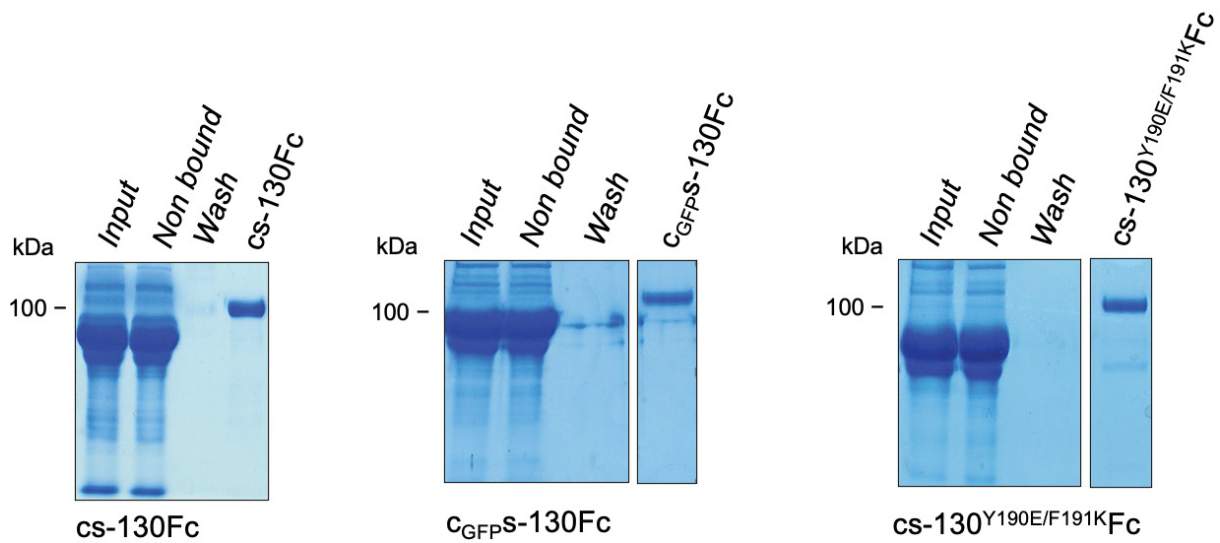
In regelmäßigen Intervallen wurden Proben des CHO-K1 Zellkulturüberstands abgenommen. Die Detektion erfolgte nach SDS-PAGE und Western Blot mittels α -human Fc-Antikörper und α -mouse IgG POD. **(A) cs-130Fc und Kontrollvarianten.** Überprüfung der Proteinproduktion in Zellkulturüberstand nach transienter Transfektion in CHO-K1-Zellen. Die Kontrollvarianten wurden mehrfach transfiziert (Platten 1-5), um eine große Menge Zellkulturüberstand zu generieren, aus dem die Kontrollvarianten für weitere Analysen gereinigt wurden. **(B) Kontinuierliche Proteinproduktion des cs-130Fc im *Rollerbottle* System.** Ein stabil transfizierter Klon der cs-130Fc Variante wurde ausgewählt und in das *Rollerbottle* System transferiert. Die kontinuierliche Produktion in Zellkulturüberstand aus dem *Rollerbottle* wurde an den Tagen 1, 4 und 8 nachgewiesen. **(C) Screening stabil transfizierter CHO-K1 mit c_{GFP}S-130Fc und cs-130^{Y190E/F191K}Fc.** Parallel zur Generierung größerer Proteinmengen aus transient transfizierten CHO-K1 wurden stabile Klone für die Kontrollvarianten generiert. Die erfolgreiche stabile Transfektion zeigte die Proteinproduktion in Zellkulturüberstand der stabil transfizierten CHO-K1. Klon #1 des c_{GFP}S-130Fc und Klon #2 des cs-130^{Y190E/F191K}Fc wurden nach dem Screening in *Rollerbottle* transferiert.

3.1.2 Proteinreinigung der dimeren cs-130Fc Varianten

Die Fc-Variante cs-130Fc wurde mittels Affinitätschromatographie gereinigt. Die Elution erfolgte durch Citrat Puffer. Im Anschluss erfolgte Pufferwechsel vom Citrat Puffer in PBS über eine NAP-Säule, da die langfristige Lagerung in Citrat Puffer mit saurem pH die Proteine zerstört. Abschließend wurden die Proteinproben erneut zentrifugiert und auf ein Gesamtvolumen von 500 μ l konzentriert und die Proteinkonzentration durch Absorptionsmessung bei einer

Wellenlänge von 280 nm (A280) bestimmt. Für die Analyse der Proteinreinigung erfolgte zunächst Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese. Die Reinheit und das molekulare Gewicht der jeweiligen cs-130Fc Variante wurde mittels Coomassie Blaufärbung analysiert. Zusätzlich wurde der Nachweis der cs-130Fc Varianten mittels anti-*human* Fc-Antikörper bestätigt. Sämtlich Proteinvarianten wurden in großer Reinheit produziert (siehe Abb. 3.3A). Die Identität der Proteine wurde zusätzlich durch Western Blotting bestätigt (siehe Abb. 3.3B)

A



B

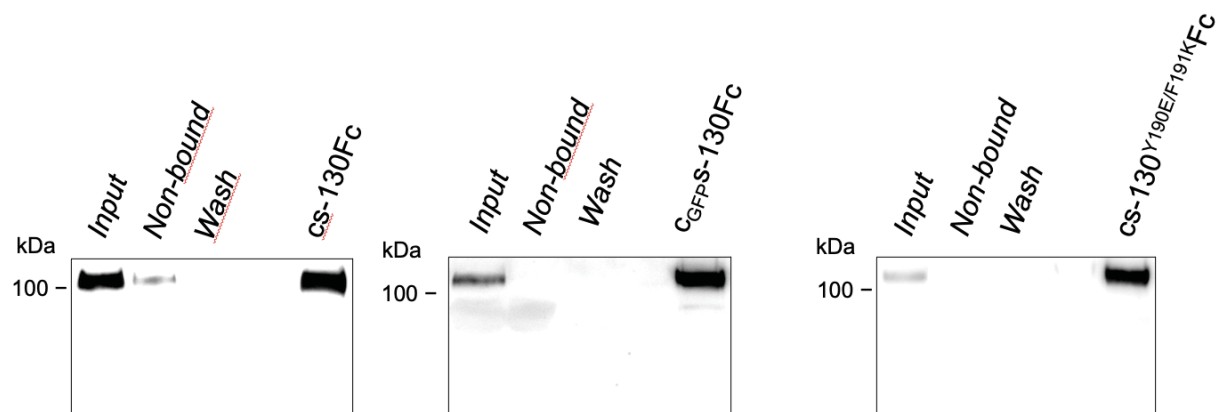


Abbildung 3.3 Proteinanalyse der gereinigten dimeren cs-130Fc Varianten

(A) Coomassie Blaufärbung. Nach SDS-PAGE wurde das Gel mit *Coomassie Brilliant Blue* gefärbt und anschließend mit *SDS Destaining Buffer* entfärbt. Dargestellt sind die Fraktionen während der Proteinreinigung: *Input*: Unverarbeiteter CHO-K1 Zellkulturüberstand nach Lagerung bei -80°C, angeschlossen an das ÄKTA start System. *Non-bound*: Zellkulturüberstand (ohne Protein) nach Durchlaufen des ÄKTA start Systems. *Wash*: Waschfraktion. *Protein Fraction*: Gereinigte cs-130Fc Variante. (B) Die Detektion der dimeren cs-130Fc Variante erfolgte mittels α -*human* Fc-Antikörper. Die Fraktionen sind wie in (A) benannt.

3.1.3 Reinigung des Monomers cs-130 durch Größenausschlusschromatographie

Für die Aufreinigung der monomeren Variante cs-130 wurde das Verfahren der Größenausschlusschromatographie (*size exclusion chromatography*, SEC) gewählt. Bei der SEC werden Biomoleküle in einer Suspension proportional zu ihrer Größe voneinander getrennt (siehe 2.2.3.7).



Um cs-130 zu gewinnen, wurde zunächst cs-130Fc mit der hochspezifischen TEV-Protease (*Tobacco Etch Virus nuclear-inclusion-a endopeptidase*) in einem Verhältnis von 1:500 über Nacht bei 4°C inkubiert. Durch die TEV Site zwischen dem VHH6 Nanobody und dem Fc-Protein-Tag wurde letzterer abgespalten und aus dem Dimer eine monomere Variante generiert. Das Gemisch aus dem geschnittenen cs-130, dem abgespaltenen Fc-Tag und dem nicht geschnittenen cs-130Fc wurde auf einer Superdex 200 10/300 GL getrennt.

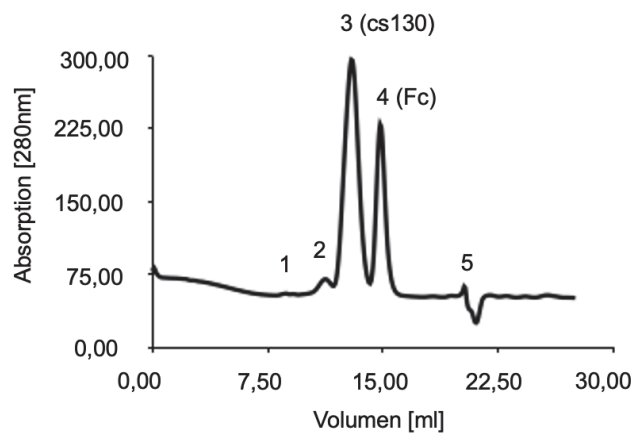


Abbildung 3.4 Größenausschlusschromatographie (SEC) zur Reinigung der monomeren cs-130 Variante

Die Filtration erfolgte unter Einsatz der Chromatographiesäule Superdex 200 10/300 GL. Die Elution der geladenen Proteine erfolgte mit PBS bei einem pH von 7,4 und einer Durchflussgeschwindigkeit $F = 0.5$ ml/min. Zur Fraktionierung wurde die Lichtabsorption der gereinigten Proteine bei einer Wellenlänge von 280 nm gemessen. Zuerst wurden Proteine mit hohem Molekulargewicht eluiert (Proteinaggregate (1), cs-130Fc (2)), darauf folgten fortlaufend kleinere Moleküle (die monomere Variante cs-130 (3), der Fc-Protein-Tag (4) und die TEV-Protease (5)).

Die Elution der Proteine aus der Gelmatrix erfolgte mithilfe eines Puffers mit konstanter Ionenstärke. Dafür wählten wir *Phosphate buffered saline* (PBS) mit einem pH von 7,4 aus. Die einzelnen Bestandteile durchliefen die Säule in unterschiedlicher Geschwindigkeit und wurden auf diese Weise fraktioniert (siehe Abb. 3.4). Große Moleküle passierten die Säule schneller,

während kleinere Moleküle länger in den Poren hafteten und verzögert eluiert wurden. Abschließend wurde die Konzentration des gereinigten Monomers durch Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 280 nm (A₂₈₀) bestimmt. Für die weitere Analyse wurden die gereinigten Proben mittels Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese voneinander getrennt. Die Blaufärbung mittels *Coomassie Brilliant Blue* diente dem Nachweis der exakten Fraktionierung und der Reinheit der Proteine (siehe Abb. 3.5A). Nach Western Blot wurde mittels anti-*human* Fc-Antikörper die korrekte Restriktion durch die TEV-Protease und die Elimination des Fc-Tags in der cs-130-Fraktion bestätigt (siehe Abb. 3.5B). Das Fc-Fragment ließ sich lediglich in der Fraktion des dimeren cs-130Fc und des proteolytisch abgespaltenen Fc-Protein-Tags detektieren.

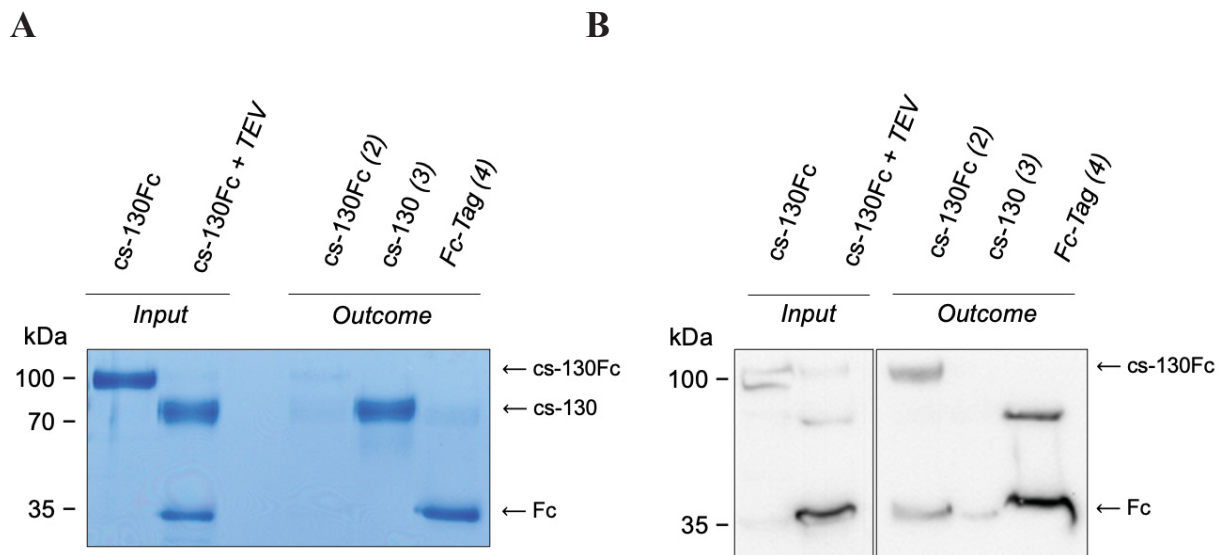


Abbildung 3.5 Analyse der Fraktionen nach SEC

Die Reinigung des monomeren Inhibitors cs-130 erfolgte nach proteolytischer Spaltung des dimeren cs-130Fc mittels Größenausschlusschromatographie (SEC). **(A)** Nach gelelektrophoretischer Trennung (SDS-PAGE) wurden die Proteinfragmente mit *Coomassie Brilliant Blue* angefärbt. Die *Input* Fraktion zeigt die cs-130Fc Probe vor und nach TEV-Verdau. Letztere wurde auf die Chromatographiesäule Superdex 200 10/300 GL geladen. Die *Output* Fraktionen zeigen, dass es sich bei dem Großteil des gereinigten Proteins um das monomere cs-130 handelt. Der Fc-Protein-Tag wurde abgespalten und in einer eigenen Fraktion von der Säule eluiert. **(B)** Western Blot mit anschließender α -human Fc-Antikörperdetektion. Die humane IgG-Fc-Domäne wurde in der Fraktion des dimeren Inhibitors cs-130Fc sowie in einer eigenen Fraktionen nach SEC detektiert. Das gereinigte cs-130 konnte nicht mittels α -human Fc Antikörper dargestellt werden, so dass wir davon ausgehen, dass der Fc-Teil vollständig abgespalten wurde und dass die cs-130 Fraktion keine Fc-Fragmente enthält.

Ergebnisse

Zur Bestätigung der Elimination des Fc-Protein-Tags in der monomeren Variante wurden die Inhibitoren sgp130Fc, cs-130Fc und cs-130 unter reduzierenden und nicht-reduzierenden Bedingungen verglichen. Für die Denaturierung wurden die Proteinproben in Laemmli Puffer unter Zugabe von 1 μ l β -Mercaptoethanol bei 95°C im Thermoschüttler gekocht, so dass die Disulfidbrücken zu freien Thiolgruppen reduziert wurden. Die nicht-reduzierten Proben wurden in Laemmli Puffer β -Mercaptoethanol resuspendiert und ohne Erhitzung auf das SDS-Gel geladen. Nach der elektrophoretischen Trennung der Proteine erfolgte der Vergleich mit Hilfe der Coomassie Blaufärbung (siehe Abb. 3.6). In den Proben der Fc-fusionierten dimeren Inhibitoren wurde Größenreduktion in der reduzierten Probe sichtbar. Aufgrund des Verlustes ihres Fc-Fragments wurden die Proteine um etwa 40 kDa kleiner (sgp130Fc: 170 kDa $\rightarrow$ sgp130: 130 kDa und cs-130Fc: 150 kDa $\rightarrow$ 110 kDa). Das Monomer cs-130 wies unter reduzierenden sowie nicht-reduzierenden Bedingung eine konstante molekulare Größe von 70 kDa auf. Wir bestätigten, dass der Fc-Protein-Tag des cs-130Fc-Inhibitors durch TEV-Restriktion abgespalten wurde.

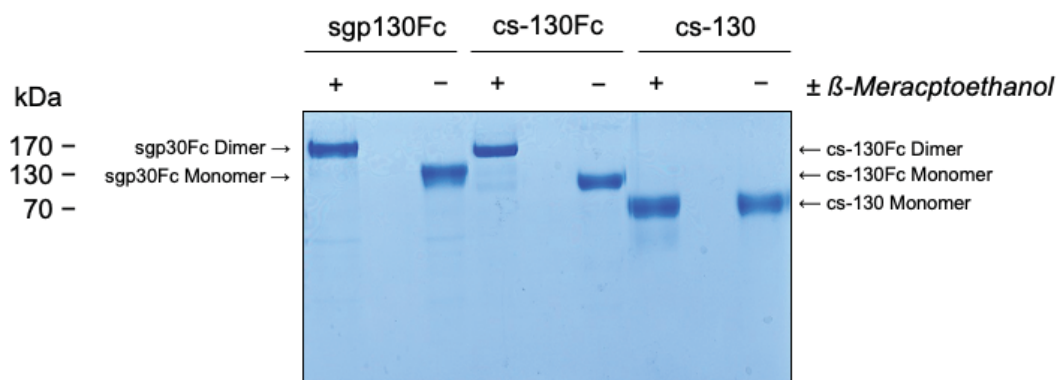


Abbildung 3.6 Nachweis der Fc-Tag-Elimination aus cs-130Fc durch TEV-Prozessierung

Die Inhibitoren sgp130Fc, cs-130Fc und cs-130 wurden unter und nicht-reduzierenden Bedingungen inkubiert, mittels SDS-PAGE elektrophoretisch getrennt und durch Coomassie Blaufärbung dargestellt.

Abschließend wurden alle Inhibitoren in ihrer Größe verglichen und auf reine Beschaffenheit der Proben analysiert. Dazu wurden jeweils 5 μ g der Proben per SDS PAGE analysiert. Die Analyse erfolgte anhand Coomassie Blaufärbung und mittels Western Blot (siehe Abb. 3.7). Für die Detektion der cs-130Fc Varianten und des sgp130Fc wurde der anti-gp130-Antikörper (BR-3) verwendet. Dieser Antikörper bindet an die IL-6-Bindestelle des gp130 und ist in der Lage, sämtliche cs-130Fc Varianten nachzuweisen. Eine Übersicht der molekularen Masse sämtlicher Inhibitoren ist in Tabelle 2 dargestellt.

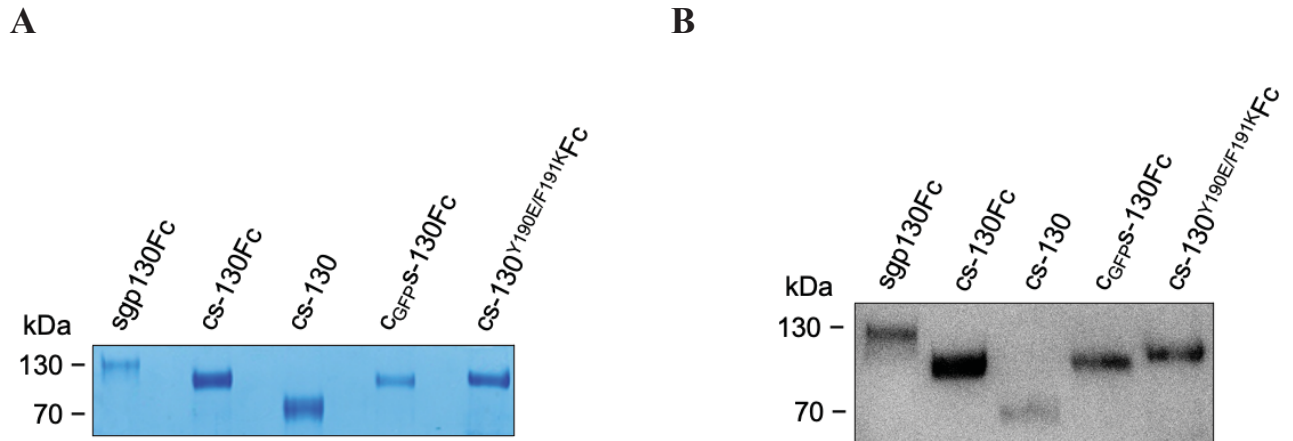


Abbildung 3.7 Analyse und Vergleich der gereinigten cs-130Fc Varianten und sgp130Fc

Um sämtliche cs-130Fc Varianten hinsichtlich ihrer Reinheit und molekularen Größe zu vergleichen wurden Proteinproben via SDS-PAGE analysiert. **(A)** *Coomassie Brilliant Blue* Färbung des SDS-Gels diente der Darstellung der reinen Beschaffenheit aller Inhibitoren und Kontrollproteine. Zudem ließ sich so der Größenunterschied der einzelnen Proteine visualisieren. **(B)** Anhand eines Western Blot des SDS-Gels und Detektion mittels anti-gp130-Antikörper bestätigte sich, dass es sich bei den gereinigten Proteinen um die cs-130Fc Varianten handelt.

Tabelle 2 Molekulare Masse der Inhibitoren und der Kontrollvarianten

<i>Proteinvariante</i>	<i>MW (kDa) SEC-MALS</i>	<i>MW (kDa) Western Blot</i>
sgp130Fc	240	130
cs-130Fc	157	100
cs-130	52	70
cGFPS-130Fc	153	100
cs-130 ^{Y190E/F191K} Fc	157	100

3.1.4 cs-130Fc hat eine höhere Affinität zu Hyper IL-6 im Vergleich zu sgp130Fc

Die Interaktion zweier Biomoleküle kann in Bezug auf Gleichgewicht und Kinetik mittels Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie (*surface plasmon resonance*, SPR) in Echtzeit analysiert werden. In Kooperation mit Mohammad Akbarzadeh aus dem Institut für molekulare Biologie und Biochemie II wurde die Affinität von cs-130Fc zu Hyper IL-6 gemessen und mit der Affinität von sgp130Fc zu Hyper IL-6 verglichen. Hyper IL-6 ist ein Designerzytokin, in dem IL-6 und das Zytokinbindemodul des sIL-6R durch einen Polypeptid-Linker verbunden sind. Dieser stabile IL-6/sIL-6R Komplex repräsentiert den Signalwegs über den löslichen Rezeptor. Zunächst wurde Hyper IL-6 auf einem goldbeschichteten CM5-Chip immobilisiert. Die Inhibitoren cs-130Fc und sgp130Fc wurden dann in aufsteigenden Konzentrationen [5 nM – 80 nM] injiziert. Die Assoziation und Dissoziation des Analyten und dem auf dem Chip immobilisierten Liganden wurden durch Winkeländerung des reflektierten Lichts registriert und von dem Biacore X100 Plus System aufgezeichnet (siehe Abb. 3.8). Die Kinetik der Interaktionspartner wurde als Assoziations- (k_{on}) und Dissoziationsrate (k_{off}) ermittelt. Aus diesen Werten wurde die Dissoziationskonstante (K_D) errechnet (siehe Tabelle 3).

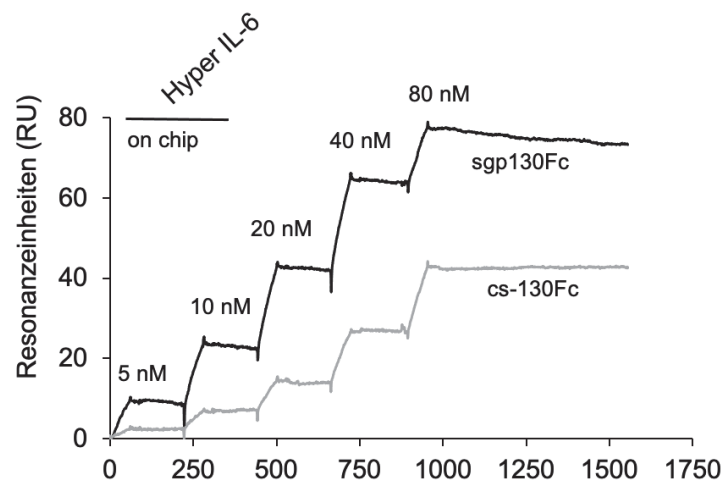


Abbildung 3.8 Affinitätsmessung der Inhibitoren zu Hyper IL-6

Die Interaktionsanalyse zwischen sgp130Fc und Hyper IL-6 sowie zwischen cs-130Fc und Hyper IL-6 erfolgte anhand Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie. Hyper IL-6 wurde auf einem Sensorchip (CM5) immobilisiert und Proben mit aufsteigenden Konzentrationen der Liganden [5 nM - 80 nM] injiziert. Die Interaktion wurde in 60 s-Intervallen und die globale Dissoziation in 600 s-Intervallen nach Injektion registriert. Anschließend wurden Assoziations- (k_{on}) und Dissoziationsgeschwindigkeit (k_{off}) ermittelt und die Dissoziationskonstante K_D bestimmt.

Während die Assoziationsrate annähernd gleich war, unterschieden sich die beiden Inhibitoren signifikant in ihrer Dissoziationsrate (sgp130 k_{off} $7,2E-5$ vs. cs-130Fc k_{off} $3,6E-8$). Die Gleichgewichtsdissoziation K_D für sgp130Fc liegt bei $1,9 \times 10^{-10}$ M. Die K_D für cs-130Fc beträgt $2,8$

$\times 10^{-13}$ M. Die Interaktionsmessung von cs-130Fc und Hyper IL-6 weist eine um Faktor 2 niedrigere Dissoziationsrate auf, d.h. diese beiden Biomoleküle liegen – verglichen mit sgp130Fc und Hyper IL-6 - häufiger in komplexierter Form vor.

Tabelle 3 Kinetische Parameter für die Affinität der Inhibitoren zu Hyper-IL-6

<i>Hyper IL-6 immobilisiert</i>	$k_{on} (1/M.s)$	$T (k_{on})$	$k_{off} (1/s)$	$T (k_{off})$	$K_D (M)$
sgp130-Fc	3,7E+5	6,7E+2	7,2E-5	44	1,9E-10
cs-130Fc	1,3E+5	1,6E+2	3,6E-5	0,21	2,8E-13

3.1.5 IL-6 Trans Signaling wird durch cs-130Fc und cs-130 gehemmt

Wie bereits beschrieben ist das IL-6 *Trans Signaling* in zahlreichen pathologischen Prozessen in verstärktem Maße aktiviert. Das rekombinante Protein sgp130Fc wurde bereits in Phase II (Schreiber et al. 2021) klinischer Studien als spezifischer Inhibitor des IL-6 *Trans* Signalwegs getestet. Die in dieser Arbeit generierten Fusionsproteine wurden hinsichtlich ihrer inhibitorischen Aktivität in Proliferationsassays und Stimulationsassays erprobt und mit sgp130Fc als Referenzinhibitor verglichen. Um die inhibitorischen Effekte auf IL-6 *Trans Signaling* zu analysieren, wurden Ba/F3-gp130 Zellen verwendet. Dabei handelt es sich um eine mit Glykoprotein 130 stabil transfizierte murine Pro-B-Zelllinie, die in Abhängigkeit von Hyper IL-6 wächst.

Ergebnisse

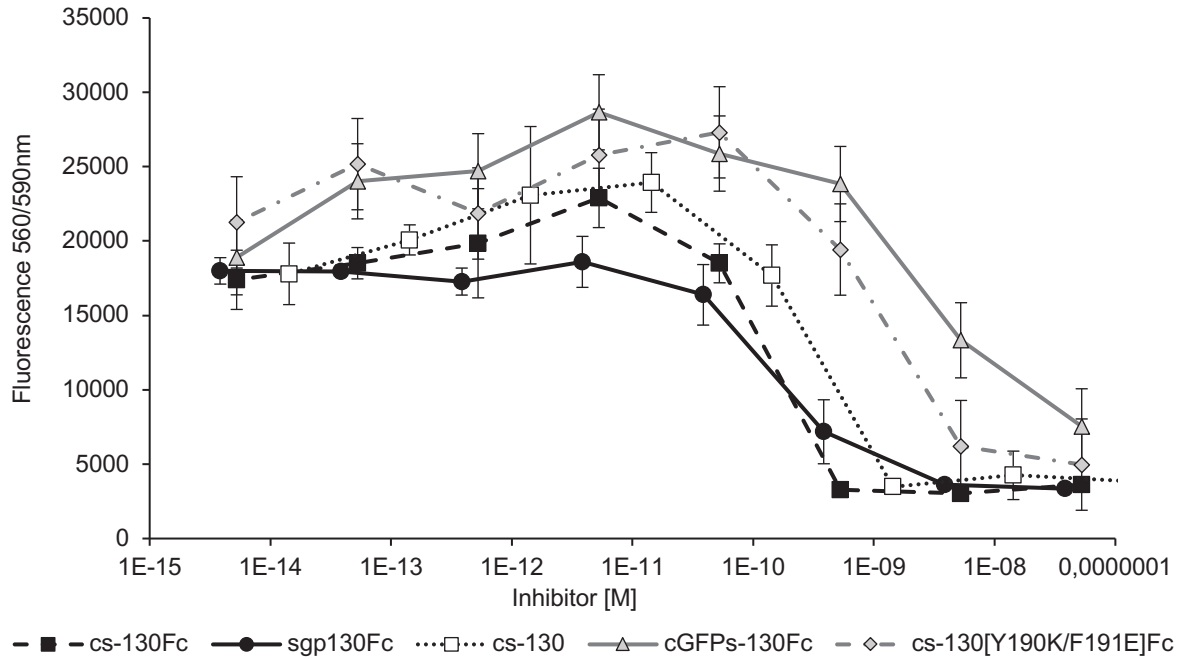


Abbildung 3.9 Inhibition des IL-6 *Trans Signaling* im Proliferationsassay

Ba/F3-gp130 Zellen wurden mit 10 ng/ml IL-6 und 70 ng/ml sIL-6R zum Wachstum stimuliert. Die cs-130Fc Varianten und sgp130Fc wurden in absteigender Konzentration [10 µg/ml - 0,001 ng/ml] hinzugegeben. Nach 72-stündiger Inkubation (37°C, 5% CO₂) wurden die Proben in CellTiter Blue aufgenommen, anschließend erfolgte die Messung und Auswertung der Zellproliferation. Jedes inhibitorische Protein wurde drei Mal in gleicher Konzentration getestet und der Mittelwert des Zellwachstums bestimmt.

Die Ba/F3-gp130 Zellen wurden mit 10 ng/ml IL-6 und 70 ng/ml sIL-6R zum Wachstum stimuliert. sgp130Fc sowie sämtlich cs-130Fc Varianten wurden in absteigenden Konzentrationen [10 µg/ml – 0,01 ng/ml] auf je 100 µl der stimulierten Zellproben pipettiert und anschließend über 72 h kultiviert. Am dritten Tag erfolgte die Auswertung anhand eines CellTiter-Blue Cell Viability Assays. Zum Vergleich der inhibitorischen Aktivität der Proteine wurde die halbmaximale inhibitorische Konzentration (IC₅₀) herangezogen. Eine Übersicht der IC₅₀-Werte ist in Tabelle 4 dargestellt. Die Proliferation der BaF/3-gp130 Zellen wurde von sgp130Fc in einer Konzentration von 10 nM vollständig gehemmt. Die IC₅₀ von sgp130Fc zur Inhibition des IL-6 *Trans Signaling* lag bei 0,87 nM. cs-130Fc inhibierte Ba/F3-gp130 Zellproliferation vollständig bei einer Konzentration von 1 nM. Die IC₅₀ von cs-130Fc lag bei 0,07 nM. Im direkten Vergleich dieser beiden dimeren Inhibitoren wurde IL-6 *Trans Signaling* in einer 10-fach geringeren Konzentrationen durch cs-130Fc gehemmt. Das Monomer cs-130 zeigte eine schwächere Hemmung des Ba/F3-gp130 Zellwachstums als die dimere Variante und war mit einer IC₅₀ von 0,16 nM und vollständiger Inhibition bei einer Konzentration von 10 nM funktionell dem sgp130Fc gleichzusetzten. Die Kontrollproteine cGFPs-130Fc und cs-130^{Y190K/F191E}Fc inhi-

bierten die Proliferation der Ba/F3-gp130 erst in wesentlich höheren Konzentrationen. Die Defizite in den einzelnen Elementen der Kontrollproteine und die daraus resultierende Reduktion der inhibitorischen Potenz verdeutlichen die Bedeutsamkeit der D1-D3_{gp130}-Domänen für die Interaktion mit IL-6 sowie die Komplexstabilisierung durch den VHH6 *Nanobodys*.

Tabelle 4 Inhibitorische Aktivität von sgp130Fc und der cs-130Fc Varianten im Vergleich

<i>Inhibitor</i>	<i>IC₅₀ [ng/ml]</i>	<i>IC₅₀ [nM]</i>
sgp130Fc	55,2	0,23 ±0,04
cs-130Fc	10,99	0,07 ±0,02
cs-130	8,32	0,16 ±0,02
c _{GFPS} -130Fc	2,43x10 ⁻⁹	1,59x10 ¹¹ ±2,44x10 ¹¹
cs-130 ^{Y190K/F191E} Fc	214	1,36 ±0,42

Die Bindung von IL-6/sIL-6R an das Glykoprotein 130 mit folgender gp130-Homodimerisierung löst die JAK/STAT-Signalkaskade mit Phosphorylierung und Aktivierung intrazellulärer STAT3 Proteine aus. Um die Inhibition auf IL-6 *Trans Signaling* durch cs-130Fc Varianten hinsichtlich der effektiven Konzentration genauer zu bestimmen, wurden Stimulationsassays durchgeführt. Nach 5-stündigem *Starven* wurden Ba/F3-gp130 Zellen mit 10 ng/ml Hyper IL-6 stimuliert. Das Wachstum wurde durch die sgp130Fc und die cs-130Fc Varianten in absteigenden Konzentrationen [cs-130Fc und cs-130^{Y190K/F191E}Fc: 6,37 nM; 0,64 nM; 0,06 nM; c_{GFPS}-130Fc: 6,54 nM; 0,65 nM; 0,07 nM; cs-130: 19,2 nM; 0,19 nM; 0,02 nM; sgp130Fc: 4,17 nM; 0,42 nM; 0,04 nM] gehemmt. Nach fünfstündigem *Starven* und 15-minütiger Stimulation mit einer Kombination aus Hyperzytokin und Inhibitor wurden die Proben abgenommen und pelletiert. Nach Lyse der Zellen erfolgte die Bestimmung der Proteinkonzentration mittels BCA-Assay. Im Anschluss wurden die Proben in Laemmli Puffer gekocht (95°C, 10 min) und in die Taschen eines SDS-Gels geladen. Die Gelelektrophorese zur Trennung der Proteine erfolgte bei 100 Volt über 90 min. Die im Gel voneinander getrennten Proteine wurden dann mithilfe des Trans-Blot Turbo TM Transfersystems (60 min) auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Nach dem Western Blot wurde die STAT3-Aktivierung mittels anti-Phospho-STAT3-Antikörper dargestellt (siehe Abb. 3.10). Die Ladung gleicher Proteinkonzentrationen wurde nach *Stripping* der PVDF-Membran (siehe 2.2.2.5) mit dem äquivalenten anti-STAT3 Antikörper dargestellt.

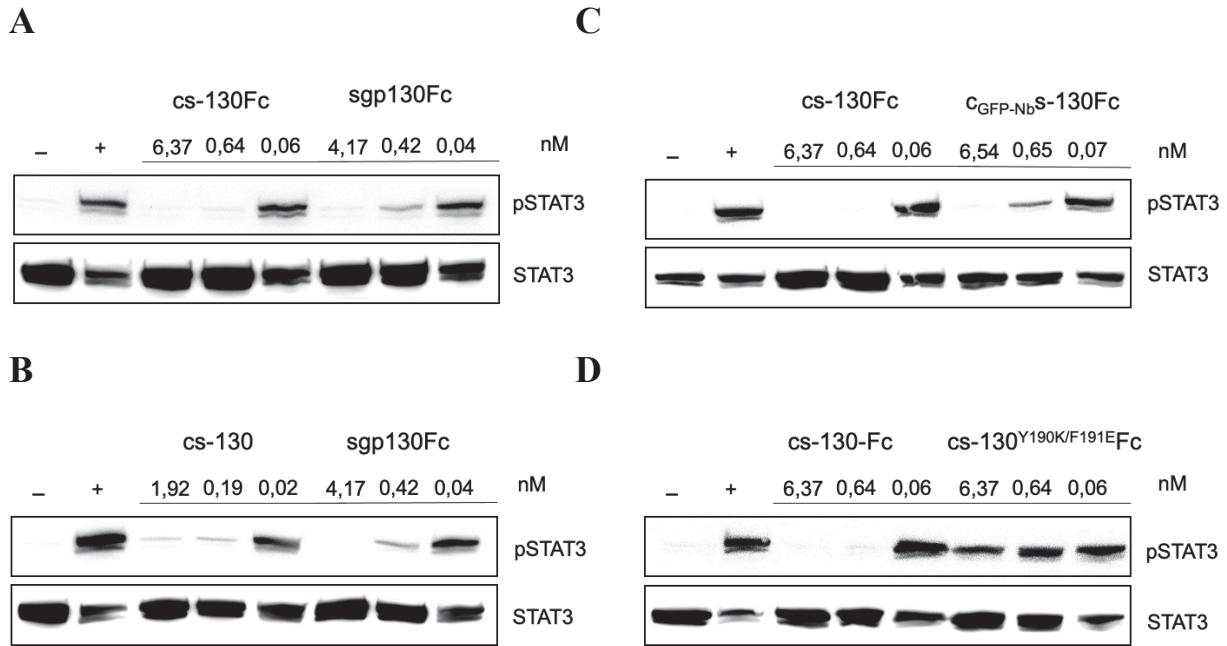


Abbildung 3.10 Inhibition des IL-6 *Trans Signaling* im Stimulationsassay

Für den Assay wurden Ba/F3-gp130 Zellen mit 10 ng/ml Hyper IL-6 stimuliert. sgp130Fc und die cs-130Fc Varianten wurden in absteigender Konzentration (nM) hinzugegeben. Die Detektion erfolgte mittels α -Phospho-STAT3 Antikörper oder α -STAT3. Folgende Inhibitoren stehen im direkten Vergleich: **(A)** cs-130Fc vs. sgp130Fc **(B)** cs-130 vs. sgp130Fc **(C)** cs-130Fc vs. c_{GFP}S-130Fc **(D)** cs-130Fc vs. cs-130^{Y190K/F191E}Fc.

cs-130Fc inhibierte das Phospho-STAT3-Signal bereits bei einer Konzentration von 0,1 μ g/ml (0,64 nM). sgp130Fc wies bei einer Konzentration von 0,1 μ g/ml (0,42 nM) eine wesentlich schwächere Phospho-STAT3-Aktivierung auf als bei einer Konzentration von 0,01 μ g/ml (0,04 nM), doch vollständige Hemmung wurde erst bei einer Proteinkonzentration von 1 μ g/ml (4,17 nM) erreicht (siehe Abb. 3.10A). Das monomere cs-130 zeigte im direkten Vergleich zu sgp130Fc eine vergleichbare inhibitorische Aktivität (siehe Abb. 3.10B). In einer Konzentration von 0,1 μ g/ml (0,19 nM) wurde die STAT3-Phosphorylierung deutlich vermindert, die komplette Hemmung des Phospho-STAT3-Signals wurde bei einer Proteinkonzentration von 1 μ g/ml (1,92 nM) erreicht. Die inhibitorischen Effekte des Kontrollprotein c_{GFP}S-130Fc waren vergleichbar mit sgp130-Fc (siehe Abb. 3.10C). Bei einer Proteinkonzentration von 0,1 μ g/ml (0,65 nM) wies die Variante eine leichtgradige Hemmung des IL-6 *Trans Signaling* auf und bei einer Konzentration von 1 μ g/ml (6,54 nM) war das Phosph-STAT3-Signal nicht mehr zu detektieren. Die Variante cs-130^{Y190K/F191E}Fc zeigte im Stimulationsassay keine Inhibition des IL-6 *Trans Signaling* (siehe Abb. 3.10D). Selbst bei einer Proteinkonzentration von 1 μ g/ml (6,37 nM) wurde kein hemmender Effekt auf das Phospho-STAT3-Signal erzielt.

3.1.6 cs-130Fc zeigt keinen hemmenden Einfluss auf klassisches IL-6 Signaling

Über den klassischen Signalweg erfüllt IL-6 zahlreiche physiologische Funktionen. Dabei werden Zellen aktiviert, die einen IL-6-Rezeptor auf ihrer Membranoberfläche tragen. Nachdem die Inhibition auf IL-6 *Trans Signaling* durch die neuen cs-130Fc Varianten untersucht wurde, stellte sich uns die Frage, ob auch der klassische Signalweg über den membrangebundenen IL-6-Rezeptor beeinflusst wird. Es wurde ein Proliferationsassay mit Ba/F3-gp130-IL-6R Zellen durchgeführt (siehe Abb. 3.11). Diese Zellen sind stabil mit gp130 transfiziert, tragen einen membranständigen IL-6-Rezeptor und wachsen in Abhängigkeit von IL-6.

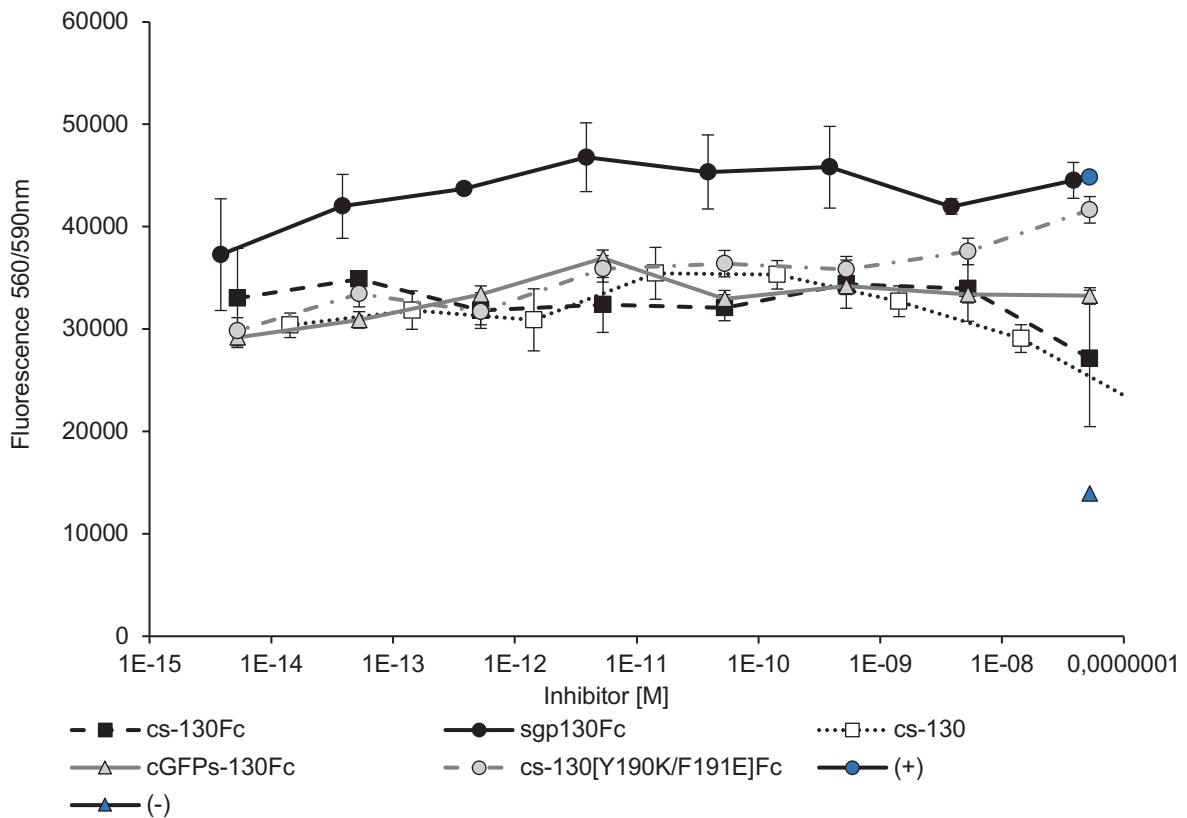


Abbildung 3.11 Ausschluss inhibitorischer Effekte auf IL-6 *Classic Signaling*

Ba/F3-gp130-IL-6R Zellen wurden mit 10 ng/ml IL-6 zum Wachstum stimuliert. Die cs-130Fc Varianten und sgp130Fc wurden in absteigender Konzentration [10 µg/ml - 0,001 ng/ml] in dreifacher Ausführung getestet. Eine Probe stimulierter Zellen ohne Inhibitor wurde als Positivkontrolle eingesetzt. Eine Probe nicht stimulierter Zellen diente als Negativkontrolle. Nach 72-stündiger Inkubation erfolgte die Auswertung anhand eines CellTiter Blue Cell Viability Assays.

Weder sgp130Fc noch eine der dimeren cs-130 Varianten wiesen einen hemmenden Einfluss auf IL-6 *Classic Signaling* auf. Die cs-130 Varianten wie auch sgp130Fc sind also spezifisch für den IL-6 *Trans* Signalweg über den löslichen IL-6-Rezeptor.

3.1.7 cs-130Fc hat eine hohe Spezifität für IL-6 Signaling

Neben Interleukin 6 nutzen auch die anderen Zytokine der IL-6 Familie das Glykoprotein 130 als signaltransduzierende Rezeptoreinheit. Vergleichbar mit IL-6 nutzt das Interleukin 11 gp130 Homodimere als signaltransduzierende β -Rezeptoreinheit. *Cardiotrophin-1*, *cardiotrophin like cytokine*, *ciliary neurotrophic factor*, *oncostatin M*, *leukemia inhibitory factor* und Interleukin 27 vermitteln Signale durch Heterodimerisierung des gp130 und einem anderen β -Rezeptor. Interleukin 11 kann – wie IL-6 – auf zwei Wegen Signale transduzieren. Der IL-11R α liegt im menschlichen Organismus sowohl in membrangebundener als auch in löslicher Form vor (Lokau et al. 2016). Nach Bindung von IL-11 an seinen α -Rezeptor rekrutiert der Komplex zwei gp130-Moleküle und induziert durch Homodimerisierung den JAK/STAT- und MAPK-Signalweg. Lokau et al. zeigte, dass nicht nur IL-6 *Trans Signaling*, sondern auch IL-11 *Trans Signaling* durch das sgp130Fc inhibiert wird. Ba/F3-gp130 Zellproliferation, die durch den IL-11/sIL-11R-Komplex induziert wurde, konnte durch das rekombinante Protein inhibiert werden. Aus diesem Grund stellte sich uns die Frage, ob die neuen cs-130Fc Varianten ebenfalls hemmende Einflüsse auf die Signaltransduktion der anderen IL-6 Zytokine, insbesondere auf IL-11 *Signaling*, ausüben.

Zunächst wurde die Affinität von cs-130Fc zu Hyper IL-11Fc ermittelt und mit der Affinität von sgp130Fc zu Hyper IL-11Fc verglichen. Auch hier wurde das Prinzip der Oberflächenplasmonenresonanz im Biacore X100 Plus System angewandt. Die Analyse erfolgte ebenfalls in Kooperation mit Mohammad Akbarzadeh aus dem Institut für molekulare Biologie und Biochemie II. Hyper IL-11Fc wurde auf einem goldbeschichteten CM5-Chip immobilisiert und Proben in aufsteigenden Konzentrationen der Analyten sgp130Fc und cs-130Fc [6,25 M bis 180 M] injiziert (siehe Abb. 3.12). Nach jeder Probeninjektion erfolgte die Oberflächenregeneration mit HBS-s⁺ Puffer, bevor das System erneut beladen wurde. Zum Vergleich der beiden Inhibitoren wurde die Dissoziationskonstante, berechnet aus der Assoziationsrate (k_{on}) und der Dissoziationsrate (k_{off}), herangezogen.

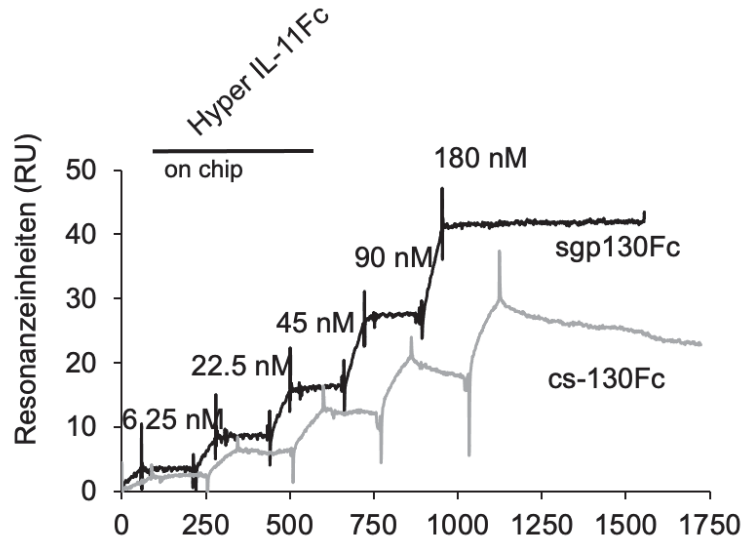


Abbildung 3.12 Affinitätsmessung der Inhibitoren zu Hyper IL-11Fc

Die Affinität der Inhibitoren sgp130Fc und cs-130Fc zu Hyper IL-11Fc wurde durch Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie ermittelt. Hyper IL-11Fc wurde auf einem goldbeschichteten Sensorchip (CM5) immobilisiert und Proben mit aufsteigenden Inhibitor-Konzentrationen [5 nM - 80 nM] injiziert. Die Interaktion wurde über 60 s aufgezeichnet und die globale Dissoziation 600 s nach der letzten Injektion registriert. Anschließend wurden Assoziations- (k_{on}) und Dissoziationsgeschwindigkeit (k_{off}) ermittelt und die Dissoziationskonstante K_D bestimmt.

Eine Übersicht aller kinetischen Parameter findet sich in Tabelle 5. Die Assoziationsrate des sgp130Fc ist wesentlich höher als die des neuartigen cs-130Fc (sgp130 k_{on} 8,6E+5 vs. cs-130Fc k_{on} 4,6E+4), während die Dissoziationsrate deutlich niedriger ist (sgp130Fc k_{off} 2,7E-6 vs cs-130Fc k_{off} 3,9E-4). Die Dissoziationskonstante von sgp130Fc (K_D 0,3 nM) ist um Faktor 28 niedriger als die des cs-130Fc (K_D 8,6 nM).

Tabelle 5 Affinität der Inhibitoren sgp130Fc und cs-130Fc zu Hyper IL-11Fc im Vergleich

<i>Hyper IL-11 immobilisiert</i>	$k_{on} (1/M.s)$	$T (k_{on})$	$k_{off} (1/s)$	$T (k_{off})$	$K_D (M)$
sgp130Fc	8,6E+5	1,1E+2	2,7E-6	2,4	3,1E-11
cs-130Fc	4,6E+4	4,3E+2	3,9E-4	7,7E-6	8,6E-9

3.1.8 Keine Inhibition des IL-11 Trans Signaling durch cs-130Fc und cs-130

Um die inhibitorische Aktivität auf die IL-11 Signaltransduktion *in vitro* zu analysieren, induzierten wir IL-11 *Trans Signaling* in Proliferationsassays. Die effektive Rezeptorkonzentration wurde mit einem Proliferationsassay mit Ba/F3-gp130 Zellen erhoben. Die Zellen wurden mit 10 ng/ml IL-11 und aufsteigender Rezeptorkonzentration (sIL-11RFc) zum Wachstum stimuliert (siehe Abb. 3.13). Die Auswertung erfolgte nach 72 h mit Hilfe eines CellTiter Blue Cell Viability Assays. Für die folgenden Experimente in dieser Arbeit wurde der sIL-11RFc in einer Konzentration von 100 ng/ml eingesetzt.

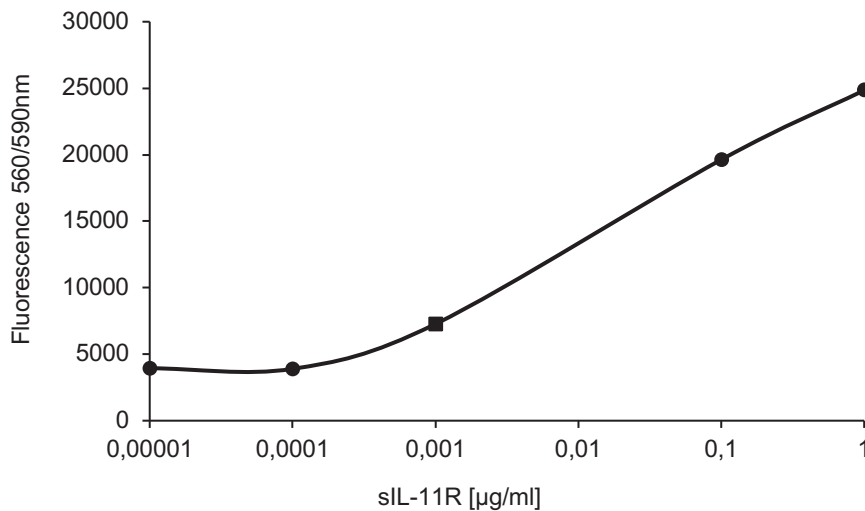


Abbildung 3.13 Ermittlung der effektiven sIL-11R-Konzentration für Zellproliferation

Ba/F3-gp130 Zellen wurden mit 10 ng/ml IL-11 und aufsteigender Rezeptorkonzentration zum Wachstum stimuliert. Nach 72-stündiger Inkubation (37°C, 5% CO₂) wurde das Zellwachstum mittels CellTiter Blue Assay ausgewertet.

Interleukin 11 vermittelt - analog zu IL-6 – Signale sowohl über einen membranständigen als auch über einen löslichen Rezeptor. Analog zum IL-6 *Trans Signaling* simulierten wir den IL-11-Signalweg über den löslichen Rezeptor, um hemmende Effekte durch unsere cs-130(Fc) Varianten auszuschließen. Für die Simulation wurden Proliferationsassays mit Ba/F3-gp130 Zellen durchgeführt (siehe Abb. 3.14). 50.000 Zellen/ml wurden mit 10 ng/ml IL-11 und 100 ng/ml sIL-11R zum Wachstum angeregt. Je 100 µl Zellsuspension wurden auf einer 96 *Well* Platte verteilt. Die cs-130Fc Variante und der Kontrollinhibitor sgp130Fc wurden in absteigenden Konzentrationen [10 µg/ml; 0,001 ng/ml] zu den Proben hinzugefügt. Jede Konzentration wurde in dreifacher Ausführung getestet. Als Positivkontrolle dienten stimulierte Ba/F3-gp130 Zellen ohne Zusatz eines Inhibitors. Als Negativkontrolle wurden Zellen ohne Zytokinstimulation verwendet. Die Auswertung erfolgte anhand eines CellTiter Blue Cell Viability Assay und der Messung am Tecan Infinite M200 PRO Reader.

Ergebnisse

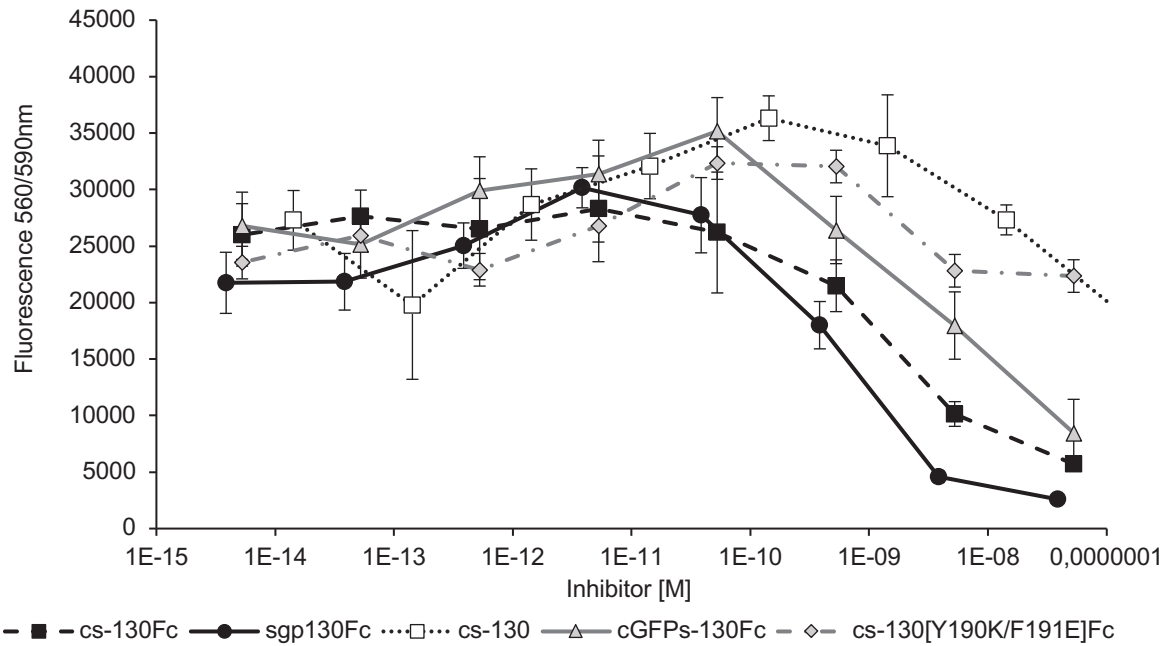


Abbildung 3.14 Inhibition des IL-11 *Trans Signaling*

Ba/F3-gp130 Zellen wurden mit 10 ng/ml IL-11 und 100 ng/ml sIL-11R_{FC} stimuliert und nach Zugabe der Inhibitoren in absteigenden Konzentrationen [10 µg/ml; 0,001 ng/ml] 72 h kultiviert. Jede Kondition wurde dreifach getestet und der Mittelwert errechnet. In der Positivkontrolle wurden Ba/F3-gp130 mit Zytokinstimulation nicht inhibiert. Als Negativkontrolle dienten Ba/F3-gp130 Zellen ohne Wachstumsstimulans. Darstellung eines repräsentativen Experiments von drei unabhängigen Proliferationsassays (n=3).

Wie erwartet wies sgp130Fc einen hemmenden Effekt auf die IL-11-Signaltransduktion auf (siehe Tabelle 6). Die IC₅₀ lag bei $1,03 \pm 0,63$ nM. Das rekombinante Referenzprotein erwies sich in dieser Arbeit als stärkster Inhibitor des IL-11 *Trans Signaling*. Die cGFPS-130Fc-Variante hemmte ebenfalls die Ba/F3-gp130 Zellproliferation, allerdings erst bei höherer Konzentration (IC₅₀ von $4,2 \pm 0,98$ nM). Der neuartige dimere Inhibitor cs-130Fc zeigte einen hemmenden Effekt auf IL-11 *Trans Signaling* mit einer IC₅₀ $2,87 \pm 1,87$ nM. Das monomere cs-130 sowie auch cs-130^{Y190K/F191E}Fc hatten keinen Einfluss auf das Wachstum der Ba/F3-gp130 Zellen, so dass wir inhibitorische Aktivität auf IL-11 *Trans Signaling* für diese Varianten vollständig ausschlossen.

Tabelle 6 Inhibitorischer Einfluss auf IL-11 *Signaling* durch sgp130Fc und cs-130Fc Varianten

<i>Inhibitor</i>	<i>IC</i> ₅₀ [ng/ml]	<i>IC</i> ₅₀ [nM]
sgp130Fc	247,2	$1,03 \pm 0,63$
cs-130Fc	450,59	$2,87 \pm 1,87$
cs-130	439,4	$8,45 \pm 1,87$
cGFPS-130Fc	642,6	$4,2 \pm 0,98$
cs-130 ^{Y190K/F191E} Fc	keine Inhibition	keine Inhibition

3.2 Inhibition des IL-6 Trans Signaling durch IL-6-Mutein-Nanobody Fusionsproteine

Ein weiterer Ansatz zur Inhibition des IL-6 *Signaling* erfolgte durch Fusionsproteine aus IL-6 Muteinen und *Nanobodies*. Diese Inhibitoren sollten in der Lage sein, an den löslichen IL-6R α zu binden, ohne dadurch eine intrazelluläre Signalkaskade zu initiieren.

Orientiert an den IL-6 Mutationen, die in den Arbeiten von Paonessa und Savoni etabliert wurden, wurden in dieser Arbeit neue Inhibitoren generiert, die sich gegen IL-6 *Trans Signaling* richten. Wie der Superantagonist Sa^{mt} zeigt, kann durch erhöhte Affinität zwischen IL-6 und IL-6R α die inhibitorische Effizienz gesteigert werden. In einer vorangegangenen Arbeit im Institut für Molekularbiologie und Biochemie II wurden durch Selina Hansen neuartige IL-6-Mutein-VHH6 Varianten etabliert. Die Klonierung basierte auf einem Fusionsprotein aus IL-6 und dem VHH6 *Nanobody*, dem sogenannten *enhanced* IL-6. Das *enhanced* IL-6 ist durch einen flexiblen Linker mit dem Fc-Fragment eines humanen IgG1 verbunden und liegt als Dimer vor (*e*-IL-6Fc). Die *Site I*_{IL-6} verblieb intakt, so dass weiterhin die Bindung an den IL-6R α gewährleistet wurde, während durch *Site II*_{IL-6} und *Site III*_{IL-6} Mutationen die Bindefähigkeit für das Glykoprotein 130 eliminiert wurde. Folglich waren die mutierten IL-6-VHH6-Fusionsproteine in der Lage, an den sIL-6R zu binden, ohne die gp130-Homodimersierung hervorzurufen. Diese neuen *e*-IL-6^{mt}Fc Varianten haben ein geringeres Molekulargewicht als die bisher etablierten IL-6 Inhibitoren. *e*IL-6Fc und die mutierten dimeren Varianten haben ein molekulares Gewicht von 89 kDa. Die effektive Produktion und Reinigung der Varianten wurden durch den Fc-Protein-Tag gewährleistet. In dem Linker zwischen dem *Nanobody* und dem Fc-Teil ist eine TEV *Site* integriert. Durch proteolytische Spaltung mithilfe der TEV-Protease kann nach Reinigung der dimeren Varianten das Fc-Fragment abgespalten werden, so dass monomere Varianten generiert werden können. Des Weiteren wurden Kontrollproteine kloniert. Zum einen wurde der VHH6 durch einen funktionslosen GFP *Nanobody* ersetzt. Dieses Protein hat dieselbe molekulare Masse wie *e*-IL-6^{mt}Fc, es fehlt jedoch die IL-6/sIL-6R-Komplex-stabilisierende Komponente. Zum anderen wurde IL-6Fc ohne einen Einzeldomänenantikörper mutiert, so dass dieses Protein um etwa 15 kDa leichter ist. Eine schematische Darstellung aller IL-6-Mutein-Varianten ist in Abb. 3.16 dargestellt.

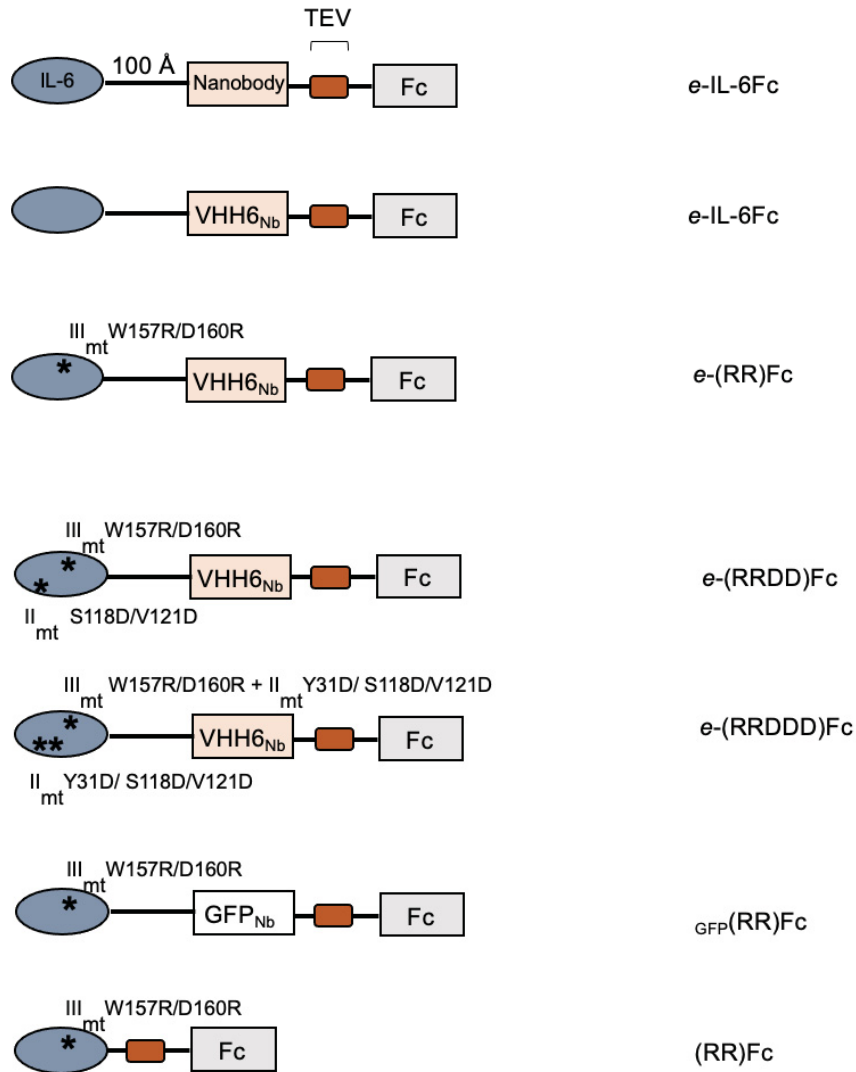


Abbildung 3.15 Schematische Übersicht der Fusionsproteine der IL-6 Muteine

Als Ausgangsprotein diente das *enhanced* IL-6, ein Fusionsprotein aus IL-6 und VHH6, einem IL-6/sIL-6R-stabilisierenden Einzeldomänenantikörper, und einem zusätzlichen Fc-Tag. Durch zielgerichtete Mutagenese-PCR erfolgte die Mutation der *Site III* und *Site II* des IL-6. In den Kontrollvarianten wurde der VHH6 gegen einen funktionslosen GFP *Nanobody* ausgetauscht. Für weitere Analysen wurde IL-6-Fc mutiert und stellt so ein Kontrollprotein ohne Einzeldomänenantikörper dar. Die TEV *Site* zwischen dem *Nanobody* und dem Fc-Tag ermöglichte die Monomerisierung und weitere Größenreduktion der Varianten.

3.2.1 Klonierung der *e-IL-6^{mt}Fc* Varianten

Basierend auf dem Fusionsprotein aus Interleukin 6 und dem IL-6/sIL-6R-stabilisierenden Einzeldomänenantikörper wurden inhibitorische Proteine etabliert. Zuerst wurde *Site III_{IL-6}* in dem *enhanced* IL-6 (*e-IL-6Fc*) mutiert. Später wurde in dieser Variante zusätzlich die *Site II_{IL-6}* verändert (siehe Abb. 3.17). Die Mutationen des *e-IL-6Fc* erfolgten durch zielgerichtete Mutagenese-PCR (siehe 2.2.1.8). Als Primer wurden die Oligonukleotide aus Tabelle 1 verwendet. Die erste Mutation W157R/D160R (*Site III_{IL-6}*) verhindert die Bindung des Interleukin 6 an die D1-Domäne des gp130. An Position 157 wurde Aspartat durch Arginin ersetzt und so die negative Ladung zu einer positiven Ladung verändert. An Position 160 wurde Tryptophan durch

Arginin ersetzt. Dadurch wurde dem Protein eine weitere positive Ladung verliehen. Zudem ist Arginin im Gegensatz zu Tryptophan hydrophil, was wiederum die Bindung durch van-der-Waals-Kräfte beeinflusst. Nach der zielgerichteten Mutagenese-PCR erfolgte die Transfektion des PCR-Produkts in den Bakterienstamm *Escherichia coli XL1 blue* und ein Testverdau oder alternativ eine *Colony* PCR. Positive Klone wurden selektiert und anschließend durch die Firma SeqLab Sequence Laboratories Göttingen GmbH sequenziert. Nach *Site III* Mutation erfolgte eine Testspaltung mit *Bam*HI. Die erwarteten Basenpaare dieser enzymatischen Restriktion lagen bei etwa 5000 und 1000 bp. Im Anschluss wurden die Klone zusätzlich sequenziert. Der Erfolg der Mutagenese-PCR wurde durch positive Sequenzierung der Klone 2, 3 und 4 bestätigt. Die *Site III*_{IL-6}-mutierte *e*-IL-6^{mt}Fc Variante wurde als *e*-(W157R/D160R)Fc, kurz *e*-(RR)Fc, benannt.

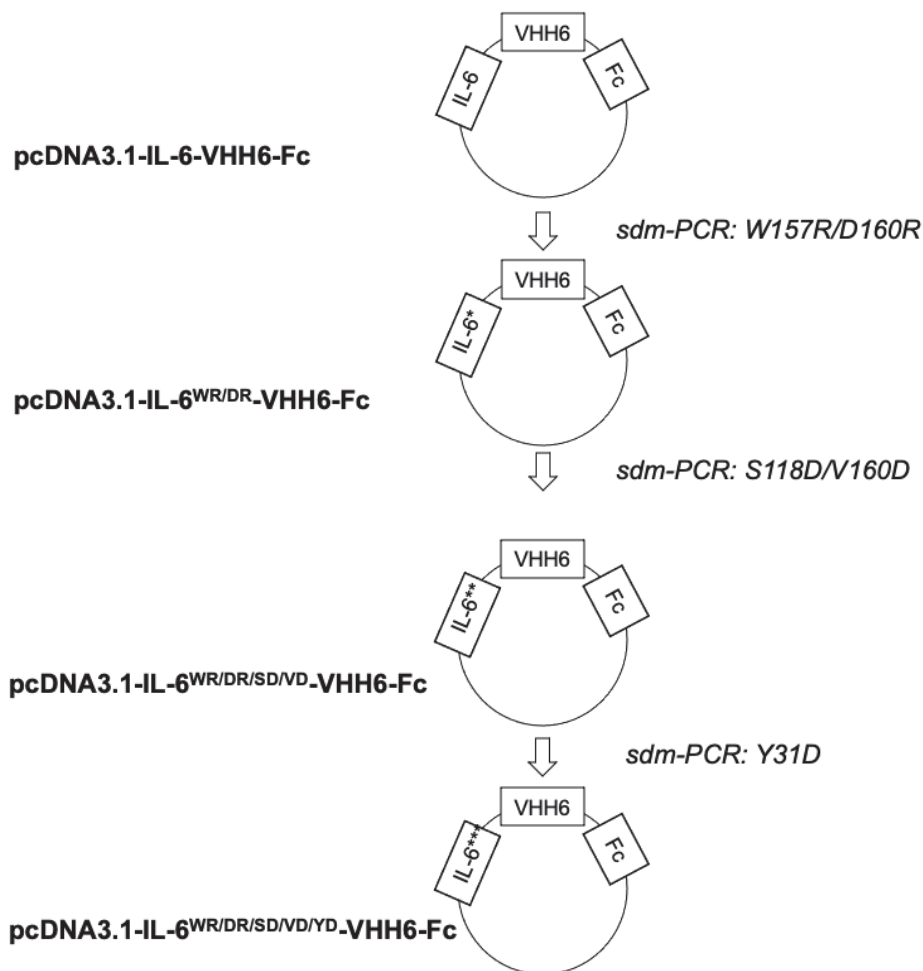


Abbildung 3.16 Klonierungsschema der IL-6 Muteine in *enhanced* IL-6

Die Mutationen wurden mittels zielgerichteter Mutagenese-PCR in das Ausgangsplasmid pcDNA3.1-IL-6-VHH6-Fc integriert. In einem ersten Durchlauf wurden die Tochterstränge mittels *forward* und *reverse* Primer separat generiert. In einem zweiten PCR-Durchlauf wurden beide Ansätze kombiniert und die komplementären Stränge mit der Zielmutation vereinigt. Die Sequenzen der entsprechenden Oligonukleotide sind in Tabelle 1 aufgelistet. (A) W157R/D160R Mutation in *Site III* (B) S118D/V121D Mutation in *Site II* (C) Y31D Mutation in *Site II*.

Ergebnisse

Zusätzlich wurde auch *Site II* mutiert, dazu wurde eine S118D/V121D-Mutation in *Site II*_{IL-6} eingebracht. Dies resultierte in einer positiven Ladung an Position 118 und einer negativen Ladung an Position 121. Durch eine dritte Mutation Y31D erhält das Protein eine weitere negative Ladung an Position 31. Auch nach der zweiten und dritten Mutagenese-PCR erfolgte die Transformation in Bakterien, eine Testspaltung mit *DpnI* und die Sequenzierung positiver Klone. Durch die Ladungsänderungen wird die Interaktion mit gp130 abgeschwächt. In Kombination der *Site III* und *Site II* Variationen verliert das neue IL-6-Mutein-Fusionsprotein vollständig die Interaktionsfähigkeit mit gp130. Entsprechend der ersten Mutationsvariante wurden die neuen Fusionsproteine (*enhanced muteins*, *e-IL-6^{mt}Fc*) wie folgt bezeichnet:

- *e*-(W157R/D160R)Fc = *e*-(RR)Fc
- *e*-(W157R/D160R/S118D/V121D)Fc = *e*-(RRDD)Fc
- *e*-(W157R/D160R/S118D/V121D/Y31D)Fc = *e*-(RRDDD)Fc

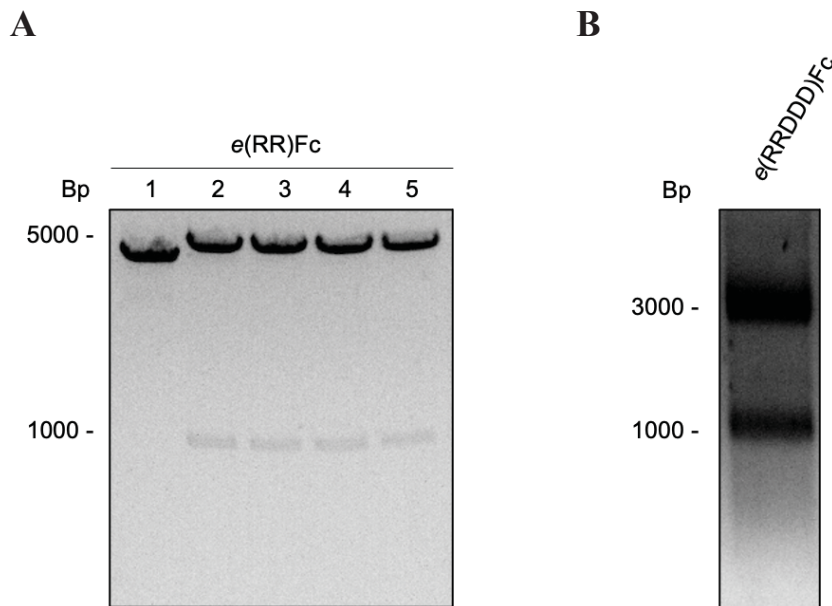


Abbildung 3.17 *Bam*HI-Testspaltung der Variante *e*-(RR)Fc

(A) Nach *site directed mutagenesis*-PCR mit *Site I* Mutation des *enhanced* IL-6-Fc erfolgte eine Testspaltung mit dem Enzym *Bam*HI. Die Klone 2, 3 und 4 wurden anschließend positiv sequenziert. (B) Nach *Site II* Mutation (S118D/V121D und Y31D) erfolgte eine Testspaltung mit dem Enzym *DpnI* und anschließend Sequenzierung selektierter Klone.

Um die Funktionalität und die einzelnen Elemente der IL-6-Mutein-Nanobody-Fusionsproteine zu analysieren, wurden Proteine generiert, die dieselben Mutationen tragen wie die oben beschriebenen *e-IL-6^{mt}Fc* Varianten. In der ersten Kontrollvariante wurde der VHH6 *Nanobody* durch einen funktionslosen Einzeldomänenantikörper (GFP-VHH) ersetzt und so die IL-6/sIL-6R-Komplex-stabilisierende Komponente eliminiert. Als Ausgangsplasmid diente das Plasmid des *enhanced* IL-6 (pcDNA3.1-IL-6-VHH6-Fc). Durch enzymatische Spaltung mit *Hind*III und

NotI wurde der Vektor eröffnet und VHH6 herausgeschnitten. Analog wurde ein Vektor mit integriertem GFP *Nanobody* (pET23a-IL-6-GFP-VHH-Fc) gespalten, so dass IL-6-GFP-VHH aus dem pET23a-Vektor entfernt wurde. Durch die enzymatische Prozessierung mit *HindIII* und *NotI* entstanden linearisierte Vektoren mit *sticky ends*. Um die Religation dieser zu verhindern, erfolgte nach der enzymatischen Restriktion Dephosphorylierung des 5'- und 3'-Ende durch Zugabe von 1 µl FAST-AP (Alkalische Phosphatase) und Inkubation bei 37°C über eine Stunde. Im Anschluss wurde IL-6-GFP-VHH durch *sticky end* Ligation (4°C, über Nacht) in den pcDNA3.1-Vektor hineinkloniert (siehe 2.2.1.6). Es entstand das Plasmid pcDNA3.1-IL-6-GFP-VHH-Fc. Durch zielgerichtete Mutagenese-PCR wurde das Interleukin 6 im pcDNA3.1-IL-6-GFP-VHH-Fc-Plasmid mutiert (siehe Abb. 3.20A). Klone wurden mittels *Colony* PCR selektiert und anschließend sequenziert. Zuerst wurde die *Site III_{IL-6}* (W157R/D160R) und anschließend *Site II_{IL-6}* (S118D/V121D). Die beiden neuen Kontrollproteine wurden folgendermaßen benannt:

- GFP-(W157R/D160R)-Fc = GFP-(RR)-Fc
- GFP-(W157R/D160R/S118D/V121D)-Fc = GFP-(RRDD)-Fc

Das dritte Kontrollprotein basierte auf pcDNA3.1-IL-6-Fc. Durch zielgerichtete Mutagenese-PCR wurde *Site III_{IL-6}* (W157R/D160R) mutiert (siehe Abb. 3.20B). Diese Kontrollvariante, benannt als (RR)Fc (74 kDa), enthält keinen Einzeldomänenantikörper und ist somit um etwa 15 kDa leichter als *e*-(RR)Fc (89 kDa). Für die Expression der *e*-IL-6^{mt}Fc Varianten wurden positiv sequenzierte Plasmide in adhärente CHO-K1 Zellen transfiziert und mit dem Zellkulturüberstand gewonnen (siehe Abb. 3.19).

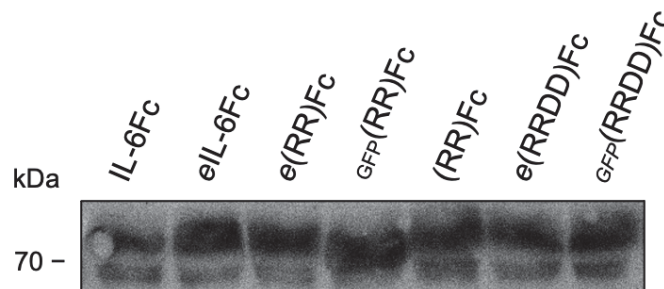


Abbildung 3.18 Expression der *e*-IL-6mtFc Varianten

Die Synthese und Sekretion der *e*-IL-6-Muteinvarianten erfolgte in transient transfizierten CHO-K1 Zellen. Nach SDS-PAGE und Western erfolgte die Expression der mutierten Varianten mittels anti-*human* Fc-Antikörper.

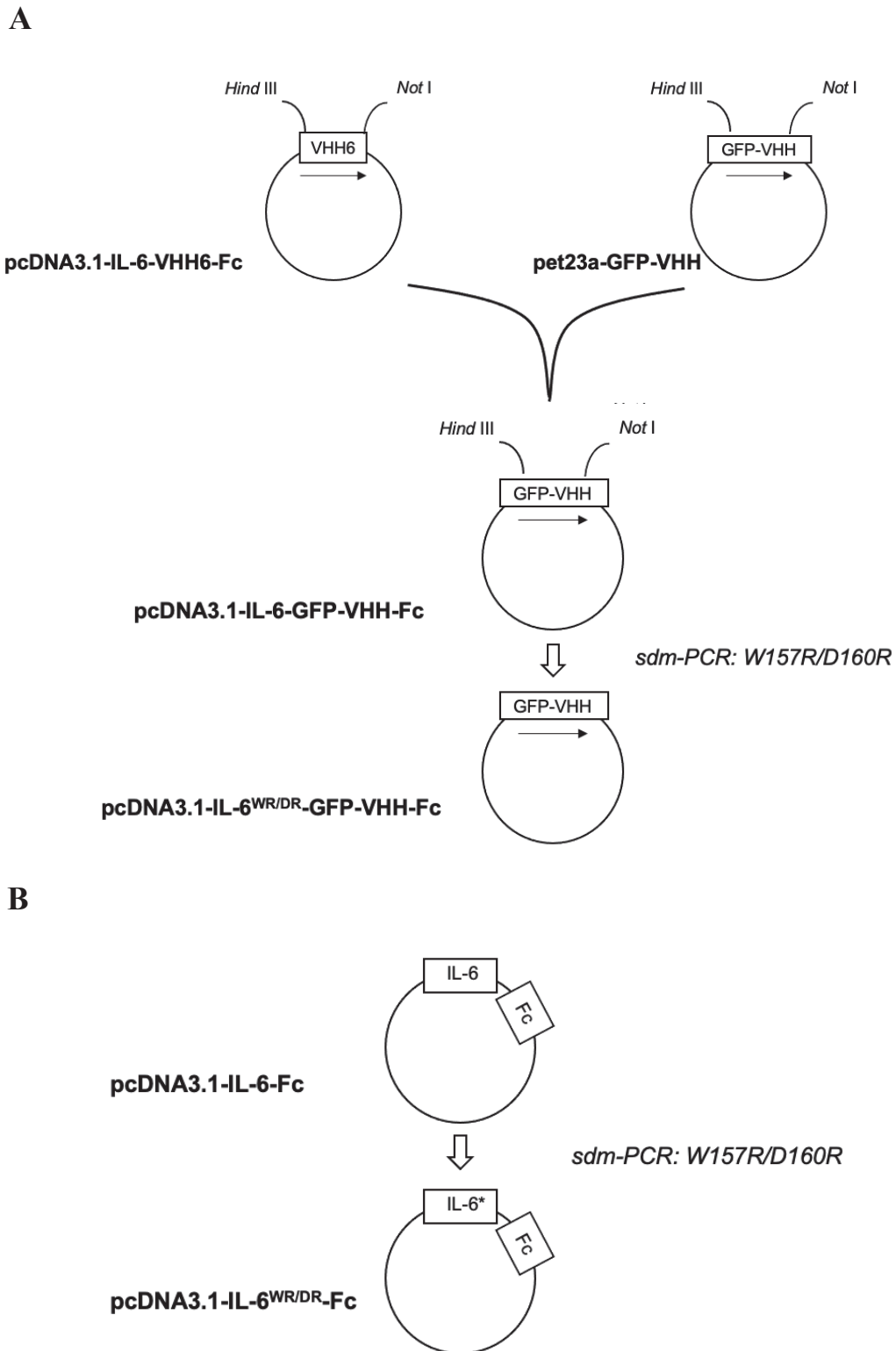


Abbildung 3.19 Schematische Darstellung der Klonierung der IL-6-Mutein-Kontrollvarianten

(A) GFP(RR)Fc. Zunächst wurde IL-6-VHH6 durch *HindIII*-*NotI*- Restriktion aus pcDNA3.1-IL-6-VHH6-Fc herausgeschnitten. Parallel wurde IL-6-GFP-VHH aus pet23a-IL-6-GFP-VHH-Fc durch *NotI* / *HindIII* eliminiert. Durch *sticky end* Ligation wurde IL-6-GFP-VHH in den pcDNA3.1-Vektor ligiert. Im Anschluss wurde das Interleukin 6 in pcDNA3.1-IL-6-GFP-VHH-Fc durch zielgerichtete Mutagenese-PCR (*sdm*-PCR) mutiert. Zuerst wurde Site III_{IL-6} durch die W157R/D160R-Mutation verändert. In einer zweiten *sdm*-PCR wurde Site III_{IL-6} S118D/V121D mutiert. (B) (RR)Fc Die Kontrollvariante ohne Einzeldomänenantikörper (IL-6Fc) wurde ebenfalls in Site III_{IL-6} (W157R/D160R) mutiert.

Anschließend wurde die *e*-(RR)Fc Variante in einem ersten IL-6 *Trans Signaling* Proliferationsassay getestet. Zunächst wurde ein positiv sequenzierter *e*-(RR)Fc Klon (#4) transient in CHO-K1-Zellen transfiziert und aus Zellkulturüberstand gewonnen. In dem Proliferationsassay wurden BaF/3-gp130 Zellen mit IL-6/sIL-6R-Komplex stimuliert und *e*-(RR)Fc sowie cs130Fc (aus CHO-K1-Zellkulturüberstand) und sgp130Fc (1 µg/ml) eingesetzt. Während sgp130Fc und cs-130Fc als Referenzinhibitoren das Wachstum der Ba/F3-gp130 Zellen effektiv supprimierte, zeigte *e*-(RR)Fc zunächst keine inhibitorische Aktivität auf die Zellproliferation (siehe Abb. 3.21). Allerdings konnte die Konzentration des Proteins im CHO-K1-Zellkulturüberstand nicht genau determiniert werden und war mutmaßlich zu niedrig. Aus diesem Grund wurden stabile Klone etabliert und eine größere Menge der *e*-(RR)Fc Variante gereinigt und erneut in Proliferationsassays analysiert.

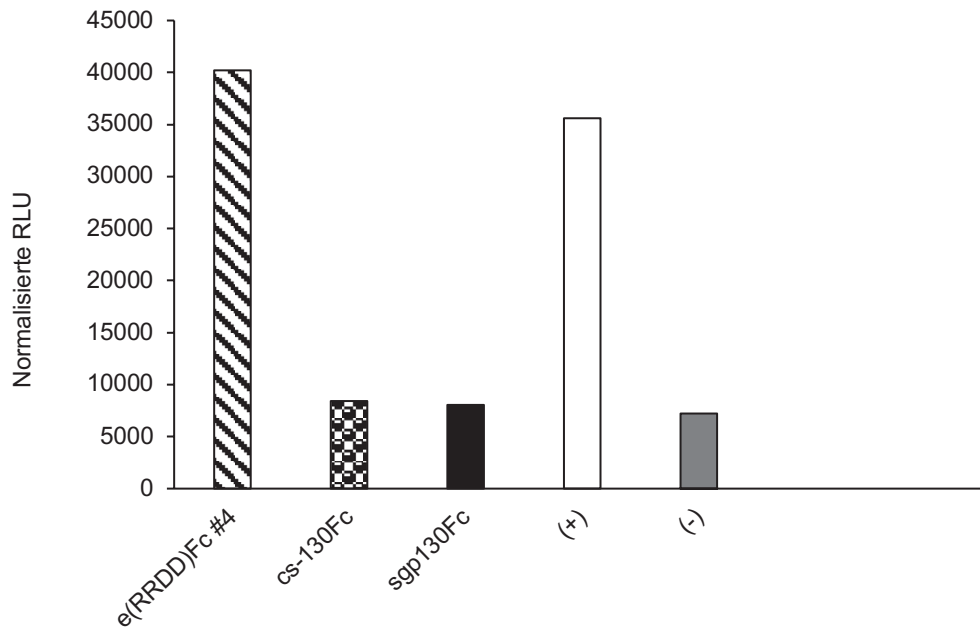


Abbildung 3.20 Keine Inhibition des IL-6 *Trans Signaling* durch *e*-(RR)Fc aus Zellkulturüberstand

Ba/F3-gp130 Zellen wurden mit 10 ng/ml IL-6 und 70 ng/ml sIL-6R stimuliert. *e*-(RR)Fc sowie cs-130Fc, gereinigt aus CHO-K1 Zellkulturüberstand, wurden als neue Inhibitoren für IL-6 *Trans Signaling* in einem ersten Proliferationsassay getestet. Als Referenzinhibitor wurde sgp130Fc (1 µg/ml) eingesetzt. Als Positivkontrolle dienten stimulierte Ba/F3-gp130 Zellen ohne Inhibitor. In der Negativkontrolle blieben die Zellen unstimuliert.

3.2.2 Expression und Produktion des *e*-(RR)Fc

Die *Site III*-mutierte Variante *e*-(RR)Fc wurde stabil in CHO-K1 transfiziert. Die Selektion stabiler CHO-K1-Klone wurde durch das Selektionsantibiotikum Neomycin (G-418) gewährleistet. Die Kontinuität der Proteinexpression wurde in Zellkulturproben nachgewiesen. In regelmäßigen Intervallen wurde eine Probe des CHO-K1 Zellkulturüberstand abpipettiert und bei -20°C gelagert. Nach einigen Wochen wurden die Proben mittels SDS-PAGE elektrophoretisch getrennt und nach Western Blot mittels anti-*human* Fc-Antikörper detektiert (siehe Abb. 3.22). Drei der stabil transfizierten CHO-K1 Zellen zeigten eine Produktion der *e*-(RR)Fc Variante (Klone C4, C10 und E1) in Zellkulturüberstand und in den Zelllysaten. Der stabile CHO-K1 Klon C10 zeigte die höchste Proteinkonzentration im Zellkulturüberstand und wurde deshalb für die Herstellung im größeren Maßstab und die weitere Analyse der *e*-(RR)Fc Variante ausgewählt.

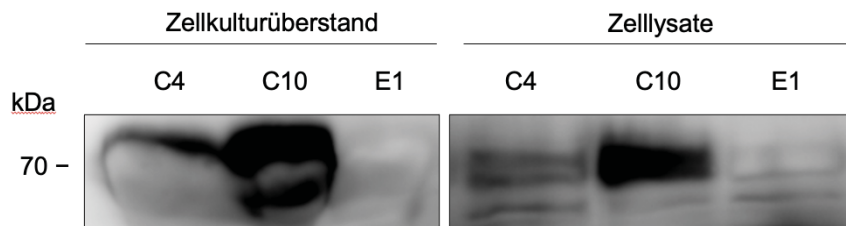


Abbildung 3.21 Stabile CHO-K1-Zellklone mit integriertem *e*-IL-6W157R/D160RFc Plasmid

Zellkulturüberstand und Zelllysate von CHO-K1 Zellen mit stabil transfiziertem Plasmid der *Site III* mutierten Varianten *e*-IL-6^{W157R/D160R}Fc (Klone C4, C10, E1).

Die Reinigung der *Site III*_{IL-6}-mutierten Variante *e*-(RR)Fc erfolgte über eine Protein-A Säule und das ÄKTA™ start System. Das Protein A ist in der Lage, das Fc-Fragment (C_H2/C_H3) eines IgG-Antikörpers zu binden. Da das IL-6 Mutein mit einem Fc-Tag versehen ist, kann es ebenso an Protein A binden. Im Voraus wurden stabil transfizierte CHO-K1 auf 15 cm-Schalen in Low IgG Medium herangezüchtet. Ein Gesamtvolumen von 150 ml Zellkulturüberstand wurde auf die Protein-A Säule im ÄKTA start System geladen. Die Reinigung erfolgte mit einer Flussrate von 1 ml/min. Nach Elution wurde die gereinigte Fraktion in PBS Puffer überführt. Dafür kam eine NAP25-Säule zum Einsatz. Das gereinigte IL-6-Mutein wurde aliquotiert, die Konzentration durch Absorptionsmessung (A₂₈₀) bestimmt und die Proben in Stickstoff eingefroren und bei -80°C gelagert. Wie Abbildung 3.23 zeigt, konnte die *e*-(RR)Fc Variante erfolgreich gereinigt werden.

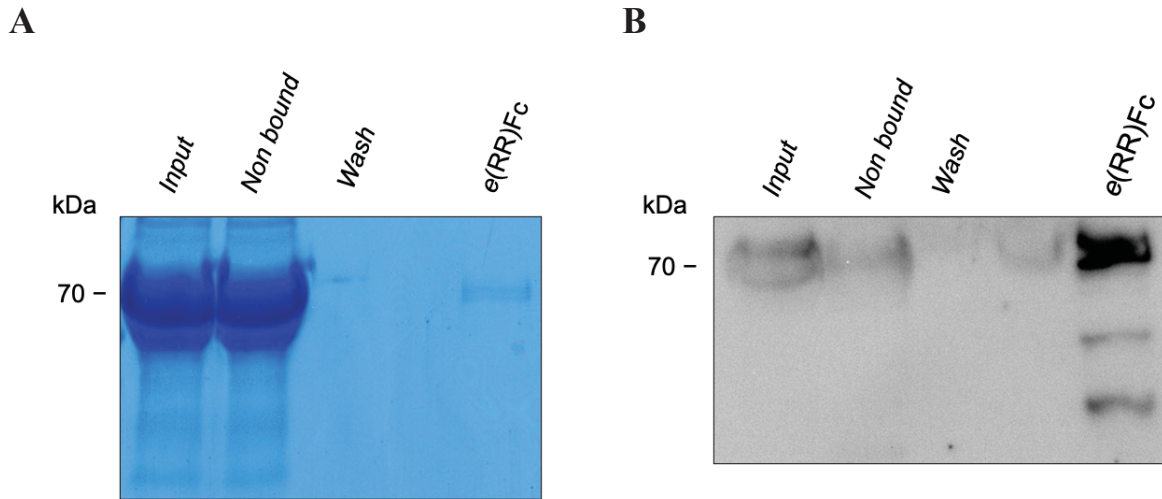


Abbildung 3.22 Analyse des gereinigten *e-(RR)Fc*

(A) Nach elektrophoretischer Trennung mittels SDS-PAGE wurden die Fraktionen der Proteinreinigung durch *Coomassie Brilliant Blue* Färbung visualisiert. *Input*: Zellkulturüberstand stabil transfizierter CHO-K1 Zellen mit kontinuierlicher *e-(RR)Fc* Produktion. *Non-bound*: Zellkulturüberstand (ohne Protein) nach Durchlaufen des ÄKTA start Systems. *Wash*: Waschfraktion. *Protein Fraction*: Gereinigte *e-(RR)Fc* Variante. (B) Der Nachweis des gereinigten *e-(RR)Fc* erfolgte nach Western Blot mit dem α -human Fc-Antikörper.

3.2.3 *e-(RR)Fc* bindet an den löslichen IL-6-Rezeptor

Zum Nachweis der Bindung an den IL-6-Rezeptor wurde eine Immunopräzipitation durchgeführt. Die Proteine wurden durch transiente Transfektion der Plasmid-DNA in CHO-K1 Zellen produziert und im Zellkulturüberstand gewonnen. Zuerst wurden die Proteinproben mit dem löslichen IL-6R bei 4°C über Nacht inkubiert. Eine 50 μ l Probe wurde als *Input* Probe abgenommen. Am Folgetag wurden die Proteinproben zentrifugiert, in PBS gewaschen und jeder Proteinprobe Protein-A Agarose Beads hinzugegeben. In einer Negativkontrolle wurden zu dem löslichen IL-6R lediglich Protein-A Beads ohne eine Proteinvariante hinzugefügt. Es erfolgte eine weitere Inkubation der Proteinproben mit den Protein-A Beads (unter Rotation, 4°C, 4 h), anschließend wurde eine *Non bound* Probe abgenommen. Erneut wurden die Proben zentrifugiert (10.000 g, 30 sek, RT), gewaschen und abschließend in 50 μ l 1x Laemmli als *Bound* Probe resuspendiert. Der *Input* und *Non bound* Suspension wurden je 15 μ l Laemmli Puffer (5x) hinzugefügt.

Ergebnisse

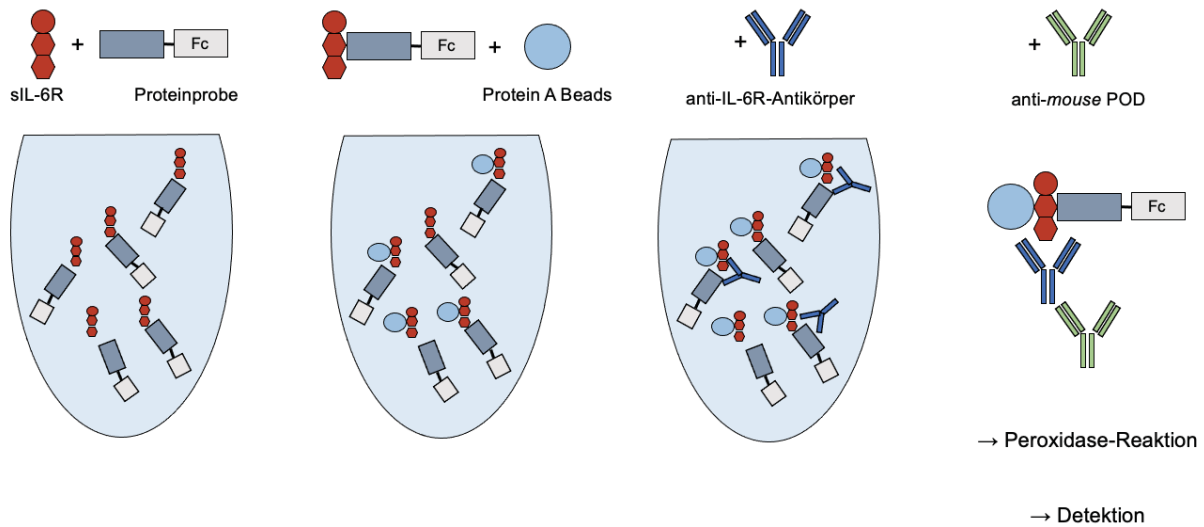
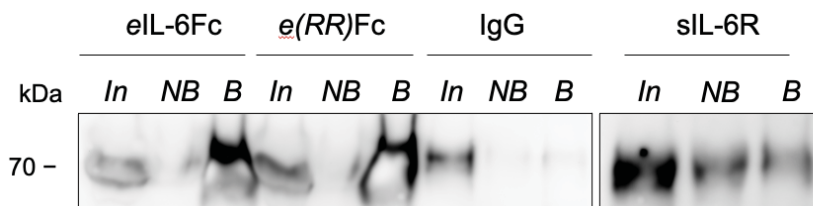


Abbildung 3.23 Schematische Darstellung der Immunopräzipitation

Zuerst wurden die Proteinproben (*e*-IL-6Fc, *e*-(RR)Fc, IgG, Negativkontrolle ohne Proteinprobe) mit dem löslichen IL-6-Rezeptor bei 4°C über Nacht inkubiert (*Input*). Anschließend wurde jeder Probe Protein-A Agarose Beads hinzugefügt und weitere vier Stunden inkubiert (*Non-Bound*). Nach Inkubation wurden die Protein-A Agarose Beads zentrifugiert, gewaschen und in Laemmli Puffer resuspendiert (*Bound*). Nach Western Blot erfolgte die Detektion mittels α -IL-6R-AK.

Sämtliche Proben wurden gekocht und dann auf ein 10%-SDS-Gel geladen. Nach SDS-PAGE und Western Blot erfolgte die Detektion mit dem anti-IL-6R-Antikörper (4/11). Sowohl *e*-IL-6Fc als auch *e*-(RR)Fc binden an den löslichen IL-6-Rezeptor (siehe Abb. 3.24). Eine IgG-Kontrolle band nicht an den sIL-6R, so dass wir unspezifische Interaktionen mit dem sIL-6R in diesem Experiment ausschlossen. Die Inhibitoren wurden mittels anti-Fc-Antikörper detektiert.

A



B

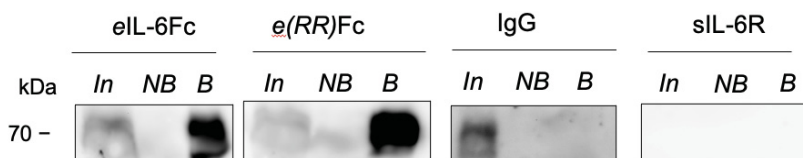


Abbildung 3.24 Immunopräzipitation zum Nachweis der *e*-(RR)Fc-Bindung an den löslichen IL-6-Rezeptor

Nach Verknüpfung des sIL-6R an Protein A Beads wurden vier Proben aus je 1 ml Zellkulturüberstand hinzugefügt und gemeinsam inkubiert (4°C, 4 h). Die Analyse hinsichtlich der Bindung an den löslichen IL-6-Rezeptor erfolgte nach SDS-PAGE und Western Blot mittels **1)** primärem α -IL-6R Antikörper und sekundärer α -mouse IgG POD und **2)** primärem α -human Fc Antikörper und sekundärer α -mouse IgG POD. **(A)** *e*-IL-6Fc **(B)** *e*-(RR)Fc **(C)** IgG **(D)** DMEM^{-/-} (Negativkontrolle).

3.2.4 *e*-(RR)Fc inhibiert IL-6 Trans Signaling in hoher Konzentration

Das gereinigte Protein wurde zur Analyse seiner inhibitorischen Eigenschaft für IL-6 *Trans Signaling* in einem Proliferationsassay getestet. Ba/F3-gp130 Zellen wurden mit 10 ng/ml IL-6 und 70 ng/ml sIL-6R stimuliert und *e*-(RR)Fc in absteigender Konzentration [30 µg - 1 µg] inkubiert. Nach 72-stündiger Inkubation im CO₂-Inkubator HERAcell 150 (37°C, 5% CO₂, gesättigte Wasserdampfatmosphäre) erfolgte die Auswertung mittels CellTiter Blue Cell Viability Assay im Tecan Infinite M200 PRO Reader. Auch in der niedrigsten Konzentration von 1 µg/ml wurde das Zellwachstum vollständig durch *e*-(RR)Fc inhibiert.

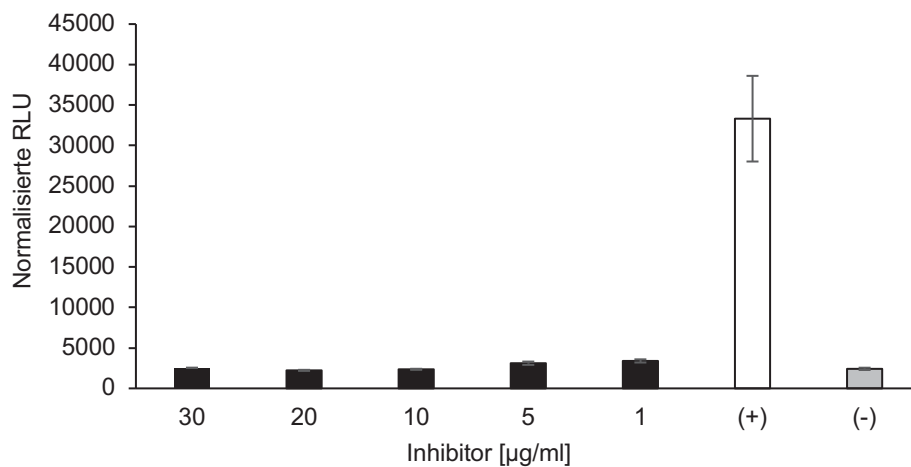


Abbildung 3.25 Inhibition des IL-6 *Trans Signaling* durch *e*-(RR)Fc in hohen Konzentrationen

Ba/F3-gp130 Zellen wurden mit 10 ng/ml und 70 ng/ml sIL-6R stimuliert. Der Inhibitor wurde in absteigender Konzentration [30 µg/ml; 1 µg/µl] hinzugefügt. Als Positivkontrolle dienten stimulierte Ba/F3-gp130 Zellen ohne Inhibitor. In der Negativkontrolle blieben die Zellen unstimuliert. Darstellung eines repräsentativen Experiments von zwei unabhängigen Proliferationsassays (n=2).

Die IC₅₀ und die minimale effektive Konzentration zur Inhibition des IL-6 *Trans Signaling* soll zukünftig durch weitere Proliferations- und Stimulationsassays ermittelt werden.

4 Diskussion

Interleukin 6 ist ein Zytokin, das in zahlreiche immunologische Prozesse eingebunden ist. Während der klassische Signalweg wichtige physiologische Funktionen, wie die Produktion von Akute-Phase-Proteinen und Antiapoptose übernimmt, ist der alternative Signalweg über den löslichen IL-6-Rezeptor häufiger mit pathologischen Prozessen und entzündlichen Erkrankungen assoziiert. Eine Suppression IL-6-induzierter Prozesse kann bei Erkrankungen mit erhöhter IL-6 Aktivität, wie beispielsweise rheumatoide Arthritis, systemische juvenile idiopathische Arthritis oder Morbus Castleman möglicherweise neue und innovative therapeutische Interventionen bieten. Bereits klinisch etabliert ist Tocilizumab, ein humanisierter monoklonaler IL-6-Rezeptor-Antikörper. Durch Besetzung der IL-6-Bindestelle des IL-6-Rezeptors wird die Bindung von IL-6 an den Rezeptor verhindert. Da Tocilizumab sowohl den membrangebundenen IL-6R α als auch die lösliche Rezeptorform (sIL-6R) besetzt, gilt er als globaler Inhibitor des IL-6 *Signaling* (Hirata Y 1989; Nishimoto et al. 2008). Chronisch entzündliche, autoimmune und maligne Erkrankungen sind in erster Linie mit IL-6 *Trans Signaling* assoziiert (Rose-John 2012), so dass bereits seit vielen Jahren Modelle erforscht und etabliert wurden, die sich spezifisch gegen den alternativen IL-6 Signalweg richten. Der Inhibitor sgp130Fc zeigt eine Spezifität für den *Trans* Signalweg und wurde bereits in Phase II einer klinischen Studie getestet. Der lösliche gp130-Rezeptor (sgp130) wurde als natürlicher Inhibitor im Serum des menschlichen Organismus verifiziert. Das Fusionsprotein sgp130Fc besteht aus zwei löslichen gp130-Molekülen und einem IgG1-Fc-Fragment. Es bindet den Komplex aus IL-6 und dem sIL-6R mit etwa 100-fach höherer Affinität als das monomere sgp130 (Wolf et al. 2016). Während die Signalinduktion über ubiquitär exprimierte gp130-Moleküle reduziert wird (Jostock et al. 2001), bleiben die physiologischen Funktionen des Interleukin 6 - vermittelt durch den klassische Signalweg - erhalten. Mit einem Gewicht von 240 kDa (186 kDa plus Glykolysierung) stellt sgp130Fc jedoch ein sehr großes Molekül dar. Für Antikörper konnte bereits eine hohe Korrelation zwischen Molekulargewicht und Gewebepenetration gezeigt werden. Neben sgp130 (120 kDa) wurden weitere Varianten mit niedrigerem Molekulargewicht hinsichtlich ihrer inhibitorischen Aktivität untersucht. sgp130-RAPS (50 kDa), sgp130-ELP (100 kDa) und sgp130-E10 (70 kDa) weisen ein geringeres Molekulargewicht als der monomere gp130-Rezeptor auf, allerdings korreliert die Größe dieser Varianten invers mit ihrer inhibitorischen Potenz. Je kleiner die sgp130Fc Variante, desto schwächer wurde das IL-6 *Trans Signaling* gehemmt (Wolf et al. 2016). Aus diesem Grund konnte sich keine der bisher erprobten sgp130-Isoformen behaupten.

Die in dieser Arbeit etablierten neuartigen Inhibitoren zeigten in *in vitro* Experimenten vielversprechende Ergebnisse hinsichtlich effizienter und optimierter Inhibition des IL-6 *Trans Signaling*. Die cs-130Fc Varianten konnten im Milligrammmaßstab produziert und gereinigt werden. Die Analysen nach der Proteinreinigung zeigten eine hohe Ausbeute (1- 4 mg Protein pro Liter Zellkulturüberstand) und Reinheit der Proteinproben. cs-130Fc (157 kDa) und cs-130 (52 kDa) als neuartige Inhibitoren weisen ein geringeres Molekulargewicht als sgp130Fc auf. Im Vergleich zu den bekannten Inhibitoren sgp130Fc (240 kDa) und Tocilizumab (150 kDa) könnte die Gewebepenetration erhöht sein. Die Produktion des *e*-(RR)Fc erfolgte in einem kleineren Maßstab, die Ausbeute war jedoch vergleichbar hoch wie die der cs-130Fc Varianten. Das dimere IL-6-Mutein-Fusionsprotein mit einem Molekulargewicht von 89 kDa und ihrer monomere Variante (~ 64 kDa) sind wesentlich kleiner als sgp130-basierte Inhibitoren. Verglichen mit sgp130Fc (240 kDa) und cs-130Fc (157 kDa) gehen wir auch in diesem Fall von einer gesteigerten Gewebepenetration aus.

Um die Bindung der Inhibitoren an Zielmoleküle zu ermitteln, wählten wir für die cs-130Fc-Varianten das Prinzip der Oberflächenplasmonenresonanz (SPR) aus. Die Oberflächenplasmonenresonanzspektroskopie gilt als direktes Verfahren zum Nachweis von Wechselwirkungen mit sehr genauer Analyse der Kinetik und Affinität, da es die Interaktion zweier Moleküle in Echtzeit detektiert. Um die Bindung der Inhibitoren an den IL-6-*Trans-Signaling*-spezifischen Komplex zu imitieren, setzen wir das Designerzytokin Hyper IL-6 ein. Dieses Fusionsprotein besteht aus IL-6 und dem sIL-6R und garantiert so eine ebenmäßige Bindung beider Komplexelemente an den CM5-Chip des SPR-Systems. Der neue Inhibitor cs-130Fc zeigte im Vergleich zu sgp130Fc eine dreifach höhere Affinität für Hyper IL-6. Die Affinitätssteigerung lässt sich durch die Integration des Einzeldomänenantikörpers VHH6 im cs-130Fc-Fusionsprotein erklären und verdeutlicht die Komplex-stabilisierende Funktion des Einzeldomänenantikörpers. Die erhöhte Affinität für den IL-6/sIL-6R-Komplex durch VHH6 ist vereinbar mit der Arbeit von Adams et al. (2017). Wir gingen primär davon aus, dass der VHH6 die Spezifität für IL-6 *Trans Signaling* steigert. Diese Hypothese bestätigte sich in den weiteren Untersuchungen der cs-130Fc Varianten.

Das Bindeverhalten des *e*-(RR)Fc wurde mittels Immunpräzipitation analysiert. In erster Linie wurde überprüft, ob die Interaktionsfähigkeit mit dem löslichen IL-6-Rezeptor durch Mutation des IL-6 beeinträchtigt wird. Nach Immobilisierung des sIL-6R an Protein-A Agarose Beads konnte die Bindung des *e*-(RR)Fc an den löslichen Rezeptor bestätigt werden. Ob der VHH6 seine IL-6/sIL-6R-Komplex-stabilisierende Funktion auch im IL-6^{mt}-Fusionsprotein erfüllt,

konnte nicht mittels Immunpräzipitation visualisiert werden und soll in weiteren Affinitätsmessungen, z.B. durch Oberflächenplasmonresonanzspektroskopie im Biacore System, evaluiert werden.

Die inhibitorische Potenz der neuartigen cs-130Fc Varianten wurde anhand Proliferations- und Stimulationsassays ermittelt. Die dimere cs-130Fc Variante zeigte verglichen mit sgp130Fc eine effizientere Inhibition des IL-6 *Trans Signaling*. Die Simulation des IL-6 *Trans Signaling* erfolgte in einem Proliferationsassay mit Ba/F3-gp130 Zellen, die mit 10 ng/ml IL-6 und 70 ng/ml sIL-6R zum Wachstum angeregt wurden. Die Stimulation wurde so gewählt, dass die Serumkonzentrationen von Zytokin und Zytokinrezeptor jenen im menschlichen Organismus unter inflammatorischen Bedingungen imitiert (Kallen 2002; Scheller, Garbers, and Rose-John 2014). Unter diesen Konditionen zeigte sich cs-130Fc mit einer um den Faktor 10 effizienteren Inhibition des IL-6 *Trans* Signalwegs dem sgp130Fc überlegen. Die Dominanz des neuartigen cs-130Fc wurde mit Hilfe von Stimulationsassays bestätigt. In diesen Stimulationsassays wurden Ba/F3-gp130 Zellen mit Hyper IL-6 zum Wachstum angeregt. Fischer *et al.* (1997) beschrieb, dass das Hyperzytokin - verglichen mit der Stimulation mit IL-6/sIL-6R-Komplex - Zellproliferation bereits in 100 bis 10000-fach niedrigerer Konzentration induziert. Daraus folgten wir, dass die Suppression der Hyperzytokin-induzierten Zellproliferation eine vielfach höhere Inhibitorkonzentration erfordert, um das Wachstum der Ba/F3-gp130 Zellen adäquat zu supprimieren, verglichen mit der Inhibition des physiologischen *Trans Signaling*, welches durch ungebundenes IL-6 und den löslichen IL-6-Rezeptor induziert wird. Der Jak/STAT3-Weg ist die führende intrazelluläre Signalkaskade, die durch gp130-Homodimerisierung im Rahmen des IL-6 *Signaling* aktiviert wird (Kang et al. 2019). Die Auswertung der Stimulationsassays erfolgte deshalb mittels Detektion der STAT3-Phosphorylierung. Während cs-130Fc das Wachstum der Ba/F3-gp130 Zellen bereits in einer Konzentration von 0,1 µg/ml (0,64 nM) vollständig inhibierte, zeigte sgp130Fc in dieser Konzentration eine noch deutlich schwächere Hemmung des Phospho-STAT3-Signals und erreichte die endgültige Signalausaltung erst bei einer Konzentration von 1 µg/ml (4,17 nM). Das Monomer cs-130 ist hinsichtlich der Inhibition des IL-6 *Trans Signaling* in Proliferations- und Stimulationsassays der dimeren Variante cs-130Fc um den Faktor 10 unterlegen. Diese Differenz ist vereinbar mit der Elimination des Fc-Protein-Tags und dem damit verbundenen Affinitätsverlust des dimeren Proteins. Die Inhibitoren sgp130Fc und sgp130 zeigten einen vergleichbaren Unterschied: Das Dimer hat eine 10-100-fach höhere Affinität zu Hyper IL-6 und dominiert in der inhibitorischen Effizienz um Faktor 10. Begründen lässt sich die höhere Effizienz der dimeren Varianten durch die stabili-

sierende Eigenschaft des IgG-Fc-Fragments. Im Größenvergleich dominiert jedoch das monomere cs-130 (52 kDa). Mit einer Differenz der molekularen Masse von über 100 Kilodalton ist es signifikant kleiner und leichter als das dimere cs-130Fc (157 kDa).

Mit Hilfe eines Proliferationsassays mit Ba/F3-gp130-IL-6R-Zellen simulierten wir IL-6 *Classic Signaling* über den membranverankerten IL-6R α . Selbst in hohen Konzentrationen zeigten weder sgp130Fc, noch die cs-130Fc Varianten einen hemmenden Einfluss auf die Zellproliferation, weshalb wir die Interaktion mit dem membranösen IL-6R α ausschlossen und den neuen cs-130Fc Varianten eine hohe Spezifität für IL-6 *Trans Signaling* zusprachen.

Besonders interessant ist an dieser Stelle das IL-11 *Signaling*. Im menschlichen Organismus wurde sowohl ein membrangebundener IL-11-Rezeptor als auch eine lösliche Form (sIL-11R) nachgewiesen. Wie Interleukin 6 nutzt IL-11 gp130-Homodimerisierung als signaltransduzierende β -Rezeptoreinheit. Auch die intrazelluläre Kaskade mit STAT3-, MAPK- und IP3K-Aktivierung gleicht dem IL-6 *Signaling* (Garbers and Scheller 2013). Hier stellte sich uns die Frage, ob die neuartigen Inhibitoren Einfluss auf die IL-11 Signaltransduktion nehmen. Zudem stand in Frage, ob der Einzeldomänenantikörper VHH6 gegebenenfalls auch den Komplex aus IL-11 und seinem löslichen Rezeptor (sIL-11R) stabilisiert. Die Messung der Affinität und der kinetischen Parameter erfolgte wieder mittels Oberflächenplasmonenresonanz. Analog zum Hyper IL-6 wurde das Fusionsprotein Hyper IL-11Fc auf dem CM-5 Chip immobilisiert. In der Interaktionsmessung und -auswertung präsentierte sich der neue Inhibitor cs-130Fc mit einer 30-fach niedrigeren Affinität für Hyper IL-11 verglichen mit sgp130Fc. Dies wies darauf hin, dass VHH6 auch als integriertes Element in den Fusionsproteinen spezifisch an den Komplex aus IL-6 und sIL-6R bindet und diesen stabilisiert. Diese Ergebnisse wiesen auf eine erhöhte Spezifität der cs-130Fc Inhibitoren für Interleukin 6 hin.

Die inhibitorische Aktivität hinsichtlich IL-11 Signaltransduktion wurde mit Hilfe von Proliferationsassays dargestellt. Da in dieser Arbeit das *Trans Signaling* der Zytokine im Mittelpunkt stand, erfolgte zunächst die Produktion des löslichen IL-11-Rezeptors. Durch Fusionierung mit einem Fc-Protein-Tag konnte das Protein unter einfachen Umständen produziert werden. Die effektive Konzentration des sIL-11R wurde mit Hilfe eines Proliferationsassays ermittelt. Für die Stimulation von Ba/F3-gp130 Zellen wurde eine Kombination aus 10 ng/ml IL-11 und 100 ng/ml sIL-11R determiniert. In den Proliferationsassays zeigte sgp130Fc eine Inhibition des Zellwachstums in vergleichbaren Konzentrationen, in denen auch IL-6 *Trans Signaling* gehemmt wird (IL-6 *Signaling* $IC_{50} = 0,87$ nM vs. IL-11 *Signaling* $IC_{50} = 1,03$ nM). Im Gegensatz

zu sgp130Fc wurden im Einsatz der neuartigen cs-130Fc Varianten keine inhibitorischen Effekte auf IL-11 *Trans Signaling* registriert. Dies bestätigt die Ergebnisse der Affinitätsmessungen und zeigt, dass die cs-130 Varianten IL-6 *Trans Signaling* spezifisch sind.

Andere Zytokine der IL-6 Familie nutzen gp130-Heteromere als signaltransduzierende Rezeptoreinheit. In Proliferationsassays einer Arbeit von Jostock (Jostock et al. 2001) zeigte sgp130Fc in höheren Konzentrationen ($\geq 1 \mu\text{g/ml}$) hemmende Effekte auf das *Signaling* des *leukemia inhibitory factor* (LIF) und *oncostatin M* (OSM). Diese beiden Zytokine induzieren Signale durch die Heteromere LIF-R/gp130 bzw. OSM-R β /gp130. In Anbetracht dessen wäre der weitere Ausschluss inhibitorischer Aktivität der cs-130Fc Varianten auf LIF- und OSM-Signaltransduktion interessant.

In einem ersten Proliferationsassay wurde die inhibitorische Aktivität der *e*-(RR)Fc Variante hinsichtlich IL-6 *Trans Signaling* dargestellt. In einer Arbeit von Savino (Savino, Ciapponi, et al. 1994; Savino et al. 1993) erwiesen sich IL-6-Muteine als mäßige Inhibitoren für IL-6 Signaltransduktion. In *in vitro* Experimenten wurde die vollständige Zellproliferationshemmung bei Inhibitorkonzentrationen $\geq 1 \mu\text{g/ml}$ erreicht. Im Fusionsprotein *e*-(RR)Fc ist lediglich *Site III_{IL-6}* mutiert und somit die Interaktion zur D1_{gp130}-Domäne beeinträchtigt. In einer Arbeit von Paonessa (Paonessa et al. 1995) zeigte W157R/D160R eine Restaktivität von 1%, so dass wir uns für den Einsatz hoher *e*-(RR)Fc-Konzentrationen [30 $\mu\text{g/ml}$; 1 $\mu\text{g/ml}$] in der Aktivitätstestung entschieden. Im Proliferationsassay mit Ba/F3-gp130-Zellen unter einer Stimulation aus 10 ng/ml IL-6 und 70 ng/ml sIL-6R zeigte *e*-(RR)Fc eine effektive Hemmung des Zellwachstums in allen Konzentrationen bis einschließlich 1 $\mu\text{g/ml}$. Die gesteigerte inhibitorische Potenz der Variante von Paonessa ist womöglich auf die Integration des VHH6 zurückzuführen. Die inhibitorische Potenz soll in weiteren Proliferationsassays mit fortlaufend absteigenden Konzentrationen analysiert werden. Zusätzlich soll die Spezifität für IL-6 *Signaling* näher analysiert und mit bisher etablierten Inhibitoren verglichen werden. Angesichts seines niedrigen Molekulargewichts (89 kDa) und effektiver IL-6 *Trans Signaling* Inhibition in einer Konzentration von 1 $\mu\text{g/ml}$ erweist sich *e*-(RR)Fc unter den bisher etablierten Inhibitoren Tocilizumab und sgp130Fc als vielversprechend. Weitere Analysen umfassen beispielsweise Affinitätsmessung zu dem IL-6/sIL-6R-Komplex und den Ausschluss unspezifischer Inhibition für den klassischen IL-6 *Trans* Signalweg sowie für Signalwege anderer Zytokine der IL-6 Familie.

Entzündliche und autoimmune Prozesse spielen eine zentrale Rolle in den oben genannten Erkrankungen und sollen durch therapeutische Interventionen möglichst limitiert werden. Neben-

wirkungen werden vorwiegend durch Beeinträchtigung des klassischen IL-6 Signalwegs verursacht. In einer Fall-Kontroll-Studie zur rheumatoiden Arthritis durch Nishimoto (Nishimoto et al. 2004) wurden in der therapeutischen Anwendung des IL-6R-Antikörpers Tocilizumab Infektionen des oberen respiratorischen Trakts, Hautirritationen, Dyslipoproteinämie, Leberfunktionsstörungen, transiente Neutropenie und Reaktivierung einer Epstein-Barr-Virusinfektion beobachtet. Durch Spezifitätssteigerung für IL-6 *Trans Signaling* sollen diese unerwünschten Wirkungen begrenzt werden. Das Nebenwirkungsprofil des sgp130Fc in einer klinischen Studie (NCT03235752), deren Phase II bereits abgeschlossen wurde, umfasste Infektionen der oberen Atemwege, Herpes labialis-Reaktivierung und Hautirritationen (Schreiber et al. 2021). Immunsuppressive Effekte sollen in einer größeren Placebo-kontrollierten klinischen Studie näher analysiert werden. Die Anwendung therapeutischer IL-6-Modulatoren kann in Zukunft auf ein breites Spektrum entzündlicher Erkrankungen und Infektionen erweitert werden, denen erhöhte IL-6 Aktivität zugrunde liegt. Aktuell steht weltweit die pandemische Ausbreitung des Coronavirus Sars-CoV-II im Fokus. *Corona virus disease 19* – im Volksmund bekannt als COVID-19 – verursacht Hyperinflammation im menschlichen Organismus mit Multiorgan-Beteiligung. Insbesondere können schwere Pneumonien hervorgerufen werden und im *acute respiratory distress syndrom* (ARDS) resultieren. In einer klinischen Studie von Herold et al. wurde gezeigt, dass COVID-19 mit erhöhten IL-6 und CRP-Serumkonzentrationen einhergeht (Herold et al. 2020). Diese korrelieren mit der Krankheitsaktivität und der Notwendigkeit zur Intubation bei fortgeschrittenem ARDS. Aufgrund rascher globaler Ausbreitung, individuell sehr schweren Krankheitsverläufen und hoher Mortalität (Grasselli et al. 2020) wird weltweit nicht nur an der Optimierung der Impfstoffe gegen das Virus und seine neuartigen Varianten gearbeitet, sondern auch therapeutische Optionen zur Reduktion der Symptomlast erforscht. Der anti-IL-6R-Antikörper Tocilizumab wurde in mehreren multizentrischen randomisierten, teils Placebo-kontrollierten klinischen Studien eingesetzt und hinsichtlich Krankheitsverlauf, Mortalität, klinischen Krankheitsverlauf, laborchemischer Parameter und die Notwendigkeit intensivmedizinischer Maßnahmen (sowie andere primäre und sekundäre Endpunkte in einzelnen Studien) untersucht. Patienten, die Tocilizumab erhielten, zeigten eine höhere Überlebensrate im Vergleich zur Placebogruppe, insbesondere in der frühen Phase (28 Tage) nach Behandlung (Ghosh et al. 2021). Langzeitergebnisse zum Einsatz des IL-6 Antikörpers in COVID-19 werden weiterhin analysiert. Ein spezifischer IL-6 *Trans Signaling* Inhibitor, der das Interleukin für überschießende Inflammation und weitere pathologische Prozesse abfängt, scheint an dieser Stelle eine gute

therapeutische Möglichkeit zu bieten. Perspektivisch könnte durch Reduktion der IL-6-Konzentration in erkrankten Patienten die Krankheitsaktivität und -progression minimiert und fatale Verläufe bestenfalls verhindert werden.

In Zusammenschau der Ergebnisse dieser Arbeit stellen die cs-130Fc Varianten neuartige Inhibitoren des IL-6 *Trans Signaling* dar. Aufgrund ihrer geringen Molekülgröße haben sie einen Vorteil für weitreichende Gewebegängigkeit. Mittels etablierter Methoden gelang die Reinigung und Monomerisierung der cs-130Fc-Proteine. In Aktivitätsanalysen zeigten sie eine höhere inhibitorische Effizienz als der etablierte Inhibitor sgp130Fc. Zudem wurde die Spezifität für IL-6 *Trans Signaling* durch Integration des VHH6 optimiert. Unter der fortlaufenden Etablierung neuer Inhibitoren für die IL-6 Signaltransduktion präsentieren sich die cs-130Fc Varianten in *in vitro* Untersuchungen mit zahlreichen Vorteilen. Zu einem späteren Zeitpunkt wurde in einer medizinischen Doktorarbeit in unserem Institut die Testung der Inhibitoren in T_H17-Zellen fortgeführt. *In vivo* Experimente und Testungen an Krankheitsmodellen stellen den nächsten Schritt dar, um die Anwendung in der klinischen Praxis zu evaluieren.

5 Zusammenfassung

Interleukin 6 ist ein zentrales Zytokin im menschlichen Organismus und besitzt ein breites Spektrum immunologischer, hämatopoetischer und metabolischer Funktionen. IL-6 Signaltransduktion wird über einen spezifitätsvermittelnden α -Rezeptor (IL-6R α) und einen signaltransduzierenden β -Rezeptor, das ubiquitär exprimierte Glykoprotein 130, vermittelt. Der klassische IL-6 Signalweg ist auf die Zelltypen mit membranständigem IL-6R, z.B. Makrophagen und Hepatozyten, beschränkt. Neben dem membranösen IL-6R existiert auch eine lösliche Rezeptorform (sIL-6R). Der Signalweg über den löslichen Rezeptor wird als *Trans Signaling* bezeichnet und kann in sämtlichen gp130-tragenden Zellen Signalkaskaden induzieren. Interessanterweise unterscheiden sich die Phänotypen von IL-6 *Classic Signaling* und *Trans Signaling* grundlegend. Die Einleitung der Akute-Phase-Reaktion und regenerative Prozesse werden hauptsächlich mit dem klassischen IL-6 Signalweg verbunden, während autoimmune Prozesse, chronisch entzündliche oder auch maligne Erkrankungen häufiger mit IL-6 *Trans Signaling* assoziiert werden.

In dieser Arbeit wurden diverse IL-6 Inhibitoren etabliert. Die cs-130Fc Varianten, Fusionsproteine bestehend aus den D1-D3-Domänen des gp130 und einem *Nanobody*, wurden stabil in adhärenzte chinesische Hamster Ovarialzellen (CHO-K1) transfiziert und in großen Mengen produziert. Mittels Oberflächenplasmonenresonanz, Proliferations- sowie Stimulationsassays wurden die cs-130Fc Varianten funktionell charakterisiert. Cs-130Fc und cs-130 erwiesen sich als spezifische Inhibitoren des IL-6 *Trans Signaling*. Durch die Integration des VHH6 *Nanobodies* konnte die Spezifität für IL-6 gesteigert werden. Im direkten Vergleich zu dem bisher etablierten Inhibitor sgp130Fc zeigte das Dimer cs-130Fc in *in vitro* Experimenten eine höhere Spezifität und Effizienz der IL-6 *Trans Signaling* Inhibition. Des Weiteren wurden IL-6-Muteine zur spezifischen Inhibition der IL-6 Signaltransduktion generiert. Dabei handelt es sich um Fusionsproteine aus IL-6-Muteinen und einem *Nanobody*. Durch Mutationen in *Site III* und *Site II* des IL-6 wurde die Bindefähigkeit für das Glykoprotein 130 reduziert bzw. eliminiert, während die Interaktion zwischen *Site I* des IL-6 und seinem löslichen Rezeptor (sIL-6R) erhalten blieb. Auf diese Weise kann der sIL-6R gebunden werden, ohne eine intrazelluläre Signalkaskade in Gang zu setzen. In dieser Arbeit wurden verschiedene IL-6-Mutationsvarianten kloniert. Exemplarisch wurde das Fusionsprotein aus W157R/D160R (IL-6-Mutein) und dem VHH6 *Nanobody* stabil in CHO-K1 transfiziert, in größerem Maßstab produziert und gereinigt. Eine erste Testung der inhibitorischen Aktivität erfolgte im Proliferationsassay.

6 Summary

Interleukin 6 plays a central role as a cytokine in human, it covers a variety of immunologic, hematopoietic and metabolic functions. IL-6 signaling is induced by a specific α -receptor (IL-6R) and a signal-inducing β -receptor, the ubiquitously expressed glycoprotein 130 (gp130). *Classic* IL-6 Signaling is limited to cells with a membranous IL-6R, i.e. macrophages and hepatocytes. Besides, there is a soluble form of the IL-6 receptor (sIL-6R) that was found in human serum. IL-6 signaling taking place through the sIL-6R is called *trans signaling* and occurs potentially in all cells that carry gp130 on their cell membrane. The phenotype of the classic signaling pathway and *trans signaling* differ from each other. Whereas IL-6 *classic signaling* covers important physical functions as the production of acute phase proteins or tissue regeneration, IL-6 *trans signaling* is more often associated with pathological processes, i.e. chronic inflammation, autoimmune diseases or malignancies.

In this dissertation we established diverse IL-6 inhibitors. cs-130Fc variants are fusion proteins made up of the D1-D3 domains of gp130 and a nanobody. They were stably transfected into Chinese hamster ovary cells (CHO-K1) and produced in a large scale (mg). These new inhibitors were characterized by using surface plasmon resonance spectroscopy, proliferation assays and stimulation assays. cs130Fc and cs130 proved to be specific inhibitors of IL-6 *trans signaling*. The specificity for IL-6 *trans signaling* was increased by integrating the VHH6 nanobody which binds to and stabilizes the IL-6/sIL-6R complex. In comparison to sgp130Fc, an IL-6 *trans signaling* inhibitor which was recently tested in phase II clinical studies, cs130Fc showed higher specificity and efficiency to inhibition of IL-6 *trans signaling* in *in vitro* experiments. In another project, IL-6 muteins were created for specific IL-6 *signaling* inhibition. Those variants are made up of an IL-6 mutein fused to a nanobody. Their binding capacity to gp130 was reduced or eliminated by *site III* and *site II* mutations of IL-6. *Site I* was not touched, so the interaction in between IL-6 and the sIL-6R was not disturbed and IL-6 could bind to the soluble receptor without inducing an intracellular signaling cascade. In this dissertation, a variety of IL-6 muteins was cloned. The fusion protein with W157R/D160R mutation was stably transfected into CHO-K1 cells and produced in a large scale. So far, the inhibitory activity of the W157R/D160R variant to IL-6 *trans signaling* was tested in proliferation assays.

Referenzen

- Adams, R., R. J. Burnley, C. R. Valenzano, O. Qureshi, C. Doyle, S. Lumb, M. Del Carmen Lopez, R. Griffin, D. McMillan, R. D. Taylor, C. Meier, P. Mori, L. M. Griffin, U. Wernery, J. Kinne, S. Rapecki, T. S. Baker, A. D. Lawson, M. Wright, and A. Ettore. 2017. 'Discovery of a junctional epitope antibody that stabilizes IL-6 and gp80 protein:protein interaction and modulates its downstream signaling', *Sci Rep*, 7: 37716.
- Andus, T., T. Geiger, T. Hirano, T. Kishimoto, T. A. Tran-Thi, K. Decker, and P. C. Heinrich. 1988. 'Regulation of synthesis and secretion of major rat acute-phase proteins by recombinant human interleukin-6 (BSF-2/IL-6) in hepatocyte primary cultures', *Eur J Biochem*, 173: 287-93.
- Andus, T., T. Geiger, T. Hirano, H. Northoff, U. Ganter, J. Bauer, T. Kishimoto, and P. C. Heinrich. 1987. 'Recombinant human B cell stimulatory factor 2 (BSF-2/IFN-beta 2) regulates beta-fibrinogen and albumin mRNA levels in Fao-9 cells', *FEBS Lett*, 221: 18-22.
- Baral, T. N., S. Magez, B. Stijlemans, K. Conrath, B. Vanhollebeke, E. Pays, S. Muyldermans, and P. De Baetselier. 2006. 'Experimental therapy of African trypanosomiasis with a nanobody-conjugated human trypanolytic factor', *Nat Med*, 12: 580-4.
- Baran P, Hansen S, Waetzig GH, Akbarzadeh M, Lamertz L, Huber HJ, Ahmadian MR, Moll JM, Scheller J. . 2018 Mar 20. 'The balance of interleukin (IL)-6, IL-6·soluble IL-6 receptor (sIL-6R), and IL-6·sIL-6R·sgp130 complexes allows simultaneous classic and trans-signaling.', *J Biol Chem*. 2018 May 4;293(18):6762-6775. doi: 10.1074/jbc.RA117.001163. Epub 2018 Mar 20. PMID: 29559558; PMCID: PMC5936821.
- Bazan, J. F. 1990. 'Structural design and molecular evolution of a cytokine receptor superfamily', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87: 6934-8.
- Beagley, K. W., J. H. Eldridge, F. Lee, H. Kiyono, M. P. Everson, W. J. Koopman, T. Hirano, T. Kishimoto, and J. R. McGhee. 1989. 'Interleukins and IgA synthesis. Human and murine interleukin 6 induce high rate IgA secretion in IgA-committed B cells', *J Exp Med*, 169: 2133-48.
- Boulanger, M. J., D. C. Chow, E. E. Brevnova, and K. C. Garcia. 2003. 'Hexameric structure and assembly of the interleukin-6/IL-6 alpha-receptor/gp130 complex', *Science*, 300: 2101-4.
- Bowcock, A. M., J. R. Kidd, G. M. Lathrop, L. Daneshvar, L. T. May, A. Ray, P. B. Sehgal, K. Kidd, and L. L. Cavalli-Sforza. 1988. 'The human "interferon-beta 2/hepatocyte stimulating factor/interleukin-6" gene: DNA polymorphism studies and localization to chromosome 7p21', *Genomics*, 3: 8-16.
- Brakenhoff, J. P., E. R. de Groot, R. F. Evers, H. Pannekoek, and L. A. Aarden. 1987. 'Molecular cloning and expression of hybridoma growth factor in Escherichia coli', *J Immunol*, 139: 4116-21.
- Breen, E. C., A. R. Rezai, K. Nakajima, G. N. Beall, R. T. Mitsuyasu, T. Hirano, T. Kishimoto, and O. Martinez-Maza. 1990. 'Infection with HIV is associated with elevated IL-6 levels and production', *J Immunol*, 144: 480-4.
- Castell, J. V., M. J. Gomez-Lechon, M. David, T. Andus, T. Geiger, R. Trullenque, R. Fabra, and P. C. Heinrich. 1989. 'Interleukin-6 is the major regulator of acute phase protein synthesis in adult human hepatocytes', *FEBS Lett*, 242: 237-9.
- Chow, D., X. He, A. L. Snow, S. Rose-John, and K. C. Garcia. 2001. 'Structure of an extracellular gp130 cytokine receptor signaling complex', *Science*, 291: 2150-5.
- Content, J., L. De Wit, D. Pierard, R. Derynck, E. De Clercq, and W. Fiers. 1982. 'Secretory proteins induced in human fibroblasts under conditions used for the production of interferon beta', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 79: 2768-72.

- Cortez-Retamozo, V., N. Backmann, P. D. Senter, U. Wernery, P. De Baetselier, S. Muyldermans, and H. Revets. 2004. 'Efficient cancer therapy with a nanobody-based conjugate', *Cancer Res*, 64: 2853-7.
- Coulie, P. G., S. Cayphas, A. Vink, C. Uyttenhove, and J. Van Snick. 1987. 'Interleukin-HP1-related hybridoma and plasmacytoma growth factors induced by lipopolysaccharide in vivo', *Eur J Immunol*, 17: 1217-20.
- Cressman, D. E., L. E. Greenbaum, R. A. DeAngelis, G. Ciliberto, E. E. Furth, V. Poli, and R. Taub. 1996. 'Liver failure and defective hepatocyte regeneration in interleukin-6-deficient mice', *Science*, 274: 1379-83.
- Dams-Kozłowska, H., K. Gryśka, E. Kwiatkowska-Borowczyk, D. Izycki, S. Rose-John, and A. Mackiewicz. 2012. 'A designer hyper interleukin 11 (H11) is a biologically active cytokine', *BMC Biotechnol*, 12: 8.
- Davis, S., T. H. Aldrich, N. Stahl, L. Pan, T. Taga, T. Kishimoto, N. Y. Ip, and G. D. Yancopoulos. 1993. 'LIFR beta and gp130 as heterodimerizing signal transducers of the tripartite CNTF receptor', *Science*, 260: 1805-8.
- De Benedetti, F., M. Massa, P. Pignatti, S. Albani, D. Novick, and A. Martini. 1994. 'Serum soluble interleukin 6 (IL-6) receptor and IL-6/soluble IL-6 receptor complex in systemic juvenile rheumatoid arthritis', *J Clin Invest*, 93: 2114-9.
- Desgeorges, A., C. Gabay, P. Silacci, D. Novick, P. Roux-Lombard, G. Grau, J. M. Dayer, T. Vischer, and P. A. Guerne. 1997. 'Concentrations and origins of soluble interleukin 6 receptor-alpha in serum and synovial fluid', *J Rheumatol*, 24: 1510-6.
- Diamant, M., K. Rieneck, N. Mechti, X. G. Zhang, M. Svenson, K. Bendtzen, and B. Klein. 1997. 'Cloning and expression of an alternatively spliced mRNA encoding a soluble form of the human interleukin-6 signal transducer gp130', *FEBS Lett*, 412: 379-84.
- Dumoulin, M., K. Conrath, A. Van Meirhaeghe, F. Meersman, K. Heremans, L. G. Frenken, S. Muyldermans, L. Wyns, and A. Matagne. 2002. 'Single-domain antibody fragments with high conformational stability', *Protein Sci*, 11: 500-15.
- Emilie, D., M. C. Crevon, M. T. Auffredou, and P. Galanaud. 1988. 'Glucocorticosteroid-dependent synergy between interleukin 1 and interleukin 6 for human B lymphocyte differentiation', *Eur J Immunol*, 18: 2043-7.
- Fischer, M., J. Goldschmitt, C. Peschel, J. P. Brakenhoff, K. J. Kallen, A. Wollmer, J. Grotzinger, and S. Rose-John. 1997. 'I. A bioactive designer cytokine for human hematopoietic progenitor cell expansion', *Nat Biotechnol*, 15: 142-5.
- Frei, K., T. P. Leist, A. Meager, P. Gallo, D. Leppert, R. M. Zinkernagel, and A. Fontana. 1988. 'Production of B cell stimulatory factor-2 and interferon gamma in the central nervous system during viral meningitis and encephalitis. Evaluation in a murine model infection and in patients', *J Exp Med*, 168: 449-53.
- Frei, K., U. V. Malipiero, T. P. Leist, R. M. Zinkernagel, M. E. Schwab, and A. Fontana. 1989. 'On the cellular source and function of interleukin 6 produced in the central nervous system in viral diseases', *Eur J Immunol*, 19: 689-94.
- Gaillard, J. P., R. Bataille, H. Brailly, C. Zuber, K. Yasukawa, M. Attal, N. Maruo, T. Taga, T. Kishimoto, and B. Klein. 1993. 'Increased and highly stable levels of functional soluble interleukin-6 receptor in sera of patients with monoclonal gammopathy', *Eur J Immunol*, 23: 820-4.
- Garbers, C., H. M. Hermanns, F. Schaper, G. Muller-Newen, J. Grotzinger, S. Rose-John, and J. Scheller. 2012. 'Plasticity and cross-talk of interleukin 6-type cytokines', *Cytokine Growth Factor Rev*, 23: 85-97.
- Garbers, C., and J. Scheller. 2013. 'Interleukin-6 and interleukin-11: same same but different', *Biol Chem*, 394: 1145-61.
- Gauldie, J., L. Lamontagne, and A. Stadnyk. 1985. 'Acute phase response in infectious disease', *Surv Synth Pathol Res*, 4: 126-51.

- Gauldie, J., C. Richards, D. Harnish, P. Lansdorp, and H. Baumann. 1987. 'Interferon beta 2/B-cell stimulatory factor type 2 shares identity with monocyte-derived hepatocyte-stimulating factor and regulates the major acute phase protein response in liver cells', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84: 7251-5.
- Gearing, D. P., M. R. Comeau, D. J. Friend, S. D. Gimpel, C. J. Thut, J. McGourty, K. K. Brasher, J. A. King, S. Gillis, B. Mosley, and et al. 1992. 'The IL-6 signal transducer, gp130: an oncostatin M receptor and affinity converter for the LIF receptor', *Science*, 255: 1434-7.
- Geiger, T., T. Andus, J. Klapproth, T. Hirano, T. Kishimoto, and P. C. Heinrich. 1988. 'Induction of rat acute-phase proteins by interleukin 6 in vivo', *Eur J Immunol*, 18: 717-21.
- Ghosn, L., A. Chaimani, T. Evrenoglou, M. Davidson, C. Grana, C. Schmucker, C. Bollig, N. Henschke, Y. Sguassero, C. H. Nejstgaard, S. Menon, T. V. Nguyen, G. Ferrand, P. Kapp, C. Riveros, C. Avila, D. Devane, J. J. Meerpohl, G. Rada, A. Hrobjartsson, G. Grasselli, D. Tovey, P. Ravaud, and I. Boutron. 2021. 'Interleukin-6 blocking agents for treating COVID-19: a living systematic review', *Cochrane Database Syst Rev*, 3: CD013881.
- Grasselli, G., A. Zangrillo, A. Zanella, M. Antonelli, L. Cabrini, A. Castelli, D. Cereda, A. Coluccello, G. Foti, R. Fumagalli, G. Iotti, N. Latronico, L. Lorini, S. Merler, G. Natalini, A. Piatti, M. V. Ranieri, A. M. Scandroglio, E. Storti, M. Cecconi, A. Pesenti, Covid- Lombardy ICU Network, A. Nailescu, A. Corona, A. Zangrillo, A. Protti, A. Albertin, A. Forastieri Molinari, A. Lombardo, A. Pezzi, A. Benini, A. M. Scandroglio, A. Malara, A. Castelli, A. Coluccello, A. Micucci, A. Pesenti, A. Sala, A. Alborghetti, B. Antonini, C. Capra, C. Troiano, C. Roscitano, D. Radrizzani, D. Chiumello, D. Coppini, D. Guzzon, E. Costantini, E. Malpetti, E. Zoia, E. Catena, E. Agosteo, E. Barbara, E. Beretta, E. Boselli, E. Storti, F. Harizay, F. Della Mura, F. L. Lorini, F. Donato Sigurta, F. Marino, F. Mojoli, F. Rasulo, G. Grasselli, G. Casella, G. De Filippi, G. Castelli, G. Aldegheri, G. Gallioli, G. Lotti, G. Albano, G. Landoni, G. Marino, G. Vitale, G. Battista Perego, G. Evasi, G. Citerio, G. Foti, G. Natalini, G. Merli, I. Sforzini, L. Bianciardi, L. Carnevale, L. Grazioli, L. Cabrini, L. Guatterri, L. Salvi, M. Dei Poli, M. Galletti, M. Gemma, M. Ranucci, M. Riccio, M. Borelli, M. Zambon, M. Subert, M. Cecconi, M. G. Mazzoni, M. Raimondi, M. Panigada, M. Belliato, N. Bronzini, N. Latronico, N. Petrucci, N. Belgiorio, P. Tagliabue, P. Cortellazzi, P. Gnesin, P. Grosso, P. Gritti, P. Perazzo, P. Severgnini, P. Ruggeri, P. Sebastiano, R. D. Covello, R. Fernandez-Olmos, R. Fumagalli, R. Keim, R. Rona, R. Valsecchi, S. Cattaneo, S. Colombo, S. Cirri, S. Bonazzi, S. Greco, S. Muttini, T. Langer, V. Alaimo, and U. Viola. 2020. 'Baseline Characteristics and Outcomes of 1591 Patients Infected With SARS-CoV-2 Admitted to ICUs of the Lombardy Region, Italy', *JAMA*.
- Grotzinger, J., G. Kurapkat, A. Wollmer, M. Kalai, and S. Rose-John. 1997. 'The family of the IL-6-type cytokines: specificity and promiscuity of the receptor complexes', *Proteins*, 27: 96-109.
- Heinrich, P. C., I. Behrmann, G. Muller-Newen, F. Schaper, and L. Graeve. 1998. 'Interleukin-6-type cytokine signalling through the gp130/Jak/STAT pathway', *Biochem J*, 334 (Pt 2): 297-314.
- Helfgott, D. C., S. B. Tatter, U. Santhanam, R. H. Clarick, N. Bhardwaj, L. T. May, and P. B. Sehgal. 1989. 'Multiple forms of IFN-beta 2/IL-6 in serum and body fluids during acute bacterial infection', *J Immunol*, 142: 948-53.
- Helle, M., L. Boeije, and L. A. Aarden. 1989. 'IL-6 is an intermediate in IL-1-induced thymocyte proliferation', *J Immunol*, 142: 4335-8.
- Helle, M., J. P. Brakenhoff, E. R. De Groot, and L. A. Aarden. 1988. 'Interleukin 6 is involved in interleukin 1-induced activities', *Eur J Immunol*, 18: 957-9.

- Herold, T., V. Jurinovic, C. Arnreich, B. J. Lipworth, J. C. Hellmuth, M. V. Bergwelt-Baildon, M. Klein, and T. Weinberger. 2020. 'Elevated levels of IL-6 and CRP predict the need for mechanical ventilation in COVID-19', *J Allergy Clin Immunol*.
- Hibi, M., M. Murakami, M. Saito, T. Hirano, T. Taga, and T. Kishimoto. 1990. 'Molecular cloning and expression of an IL-6 signal transducer, gp130', *Cell*, 63: 1149-57.
- Hibi, M., K. Nakajima, and T. Hirano. 1996. 'IL-6 cytokine family and signal transduction: a model of the cytokine system', *J Mol Med (Berl)*, 74: 1-12.
- Hirano, T., K. Yasukawa, H. Harada, T. Taga, Y. Watanabe, T. Matsuda, S. Kashiwamura, K. Nakajima, K. Koyama, A. Iwamatsu, and et al. 1986. 'Complementary DNA for a novel human interleukin (BSF-2) that induces B lymphocytes to produce immunoglobulin', *Nature*, 324: 73-6.
- Hirano, Toshio, Tadashi Matsuda, Martin Turner, Nobuyuki Miyasaka, Glenn Buchan, Bo Tang, Kazuto Sato, Masatoshi Shimi, Ravinder Maid, and Marc Feldmann. 1988. 'Excessive production of interleukin 6/B cell stimulatory factor - 2 in rheumatoid arthritis', *European journal of immunology*, 18: 1797-802.
- Hirata Y, Taga T, Hibi M, Nakano N, Hirano T, Kishimoto T. 1989. 'Characterization of IL-6 receptor expression by monoclonal and polyclonal antibodies', *J Immunol.*, 1989 Nov 1;143(9):2900-6. PMID: 2681418.
- Honda, M., S. Yamamoto, M. Cheng, K. Yasukawa, H. Suzuki, T. Saito, Y. Osugi, T. Tokunaga, and T. Kishimoto. 1992. 'Human soluble IL-6 receptor: its detection and enhanced release by HIV infection', *J Immunol*, 148: 2175-80.
- Horii, Y., A. Muraguchi, M. Iwano, T. Matsuda, T. Hirayama, H. Yamada, Y. Fujii, K. Dohi, H. Ishikawa, Y. Ohmoto, and et al. 1989. 'Involvement of IL-6 in mesangial proliferative glomerulonephritis', *J Immunol*, 143: 3949-55.
- Hosokawa, T., K. Kusugami, K. Ina, T. Ando, M. Shinoda, A. Imada, M. Ohsuga, T. Sakai, T. Matsuura, K. Ito, and K. Kaneshiro. 1999. 'Interleukin-6 and soluble interleukin-6 receptor in the colonic mucosa of inflammatory bowel disease', *J Gastroenterol Hepatol*, 14: 987-96.
- Houssiau, F. A., K. Bukasa, C. J. Sindic, J. Van Damme, and J. Van Snick. 1988. 'Elevated levels of the 26K human hybridoma growth factor (interleukin 6) in cerebrospinal fluid of patients with acute infection of the central nervous system', *Clin Exp Immunol*, 71: 320-3.
- Houssiau, F. A., P. G. Coulie, and J. Van Snick. 1989. 'Distinct roles of IL-1 and IL-6 in human T cell activation', *J Immunol*, 143: 2520-4.
- Hunter, C. A., and S. A. Jones. 2015. 'IL-6 as a keystone cytokine in health and disease', *Nat Immunol*, 16: 448-57.
- Jones, G. W., R. M. McLoughlin, V. J. Hammond, C. R. Parker, J. D. Williams, R. Malhotra, J. Scheller, A. S. Williams, S. Rose-John, N. Topley, and S. A. Jones. 2010. 'Loss of CD4+ T cell IL-6R expression during inflammation underlines a role for IL-6 trans signaling in the local maintenance of Th17 cells', *J Immunol*, 184: 2130-9.
- Jostock, T., J. Mullberg, S. Ozbek, R. Atreya, G. Blinn, N. Voltz, M. Fischer, M. F. Neurath, and S. Rose-John. 2001. 'Soluble gp130 is the natural inhibitor of soluble interleukin-6 receptor transsignaling responses', *Eur J Biochem*, 268: 160-7.
- Kallen, K. J. 2002. 'The role of transsignalling via the agonistic soluble IL-6 receptor in human diseases', *Biochim Biophys Acta*, 1592: 323-43.
- Kang, S., T. Tanaka, M. Narazaki, and T. Kishimoto. 2019. 'Targeting Interleukin-6 Signaling in Clinic', *Immunity*, 50: 1007-23.
- Kimura, R., M. Maeda, A. Arita, Y. Oshima, M. Obana, T. Ito, Y. Yamamoto, T. Mohri, T. Kishimoto, I. Kawase, Y. Fujio, and J. Azuma. 2007. 'Identification of cardiac myocytes as the target of interleukin 11, a cardioprotective cytokine', *Cytokine*, 38: 107-15.

- Klouché, M., S. Bhakdi, M. Hemmes, and S. Rose-John. 1999. 'Novel path to activation of vascular smooth muscle cells: up-regulation of gp130 creates an autocrine activation loop by IL-6 and its soluble receptor', *J Immunol*, 163: 4583-9.
- Lavabre-Bertrand, T., C. Exbrayat, J. Liautard, J. P. Gaillard, P. P. Baskevitch, N. Poujol, C. Duperray, P. Bourquard, and J. Brochier. 1995. 'Detection of membrane and soluble interleukin-6 receptor in lymphoid malignancies', *Br J Haematol*, 91: 871-7.
- Liu, F., L. Li, M. Xu, J. Wu, D. Luo, Y. Zhu, B. Li, X. Song, and X. Zhou. 2020. 'Prognostic value of interleukin-6, C-reactive protein, and procalcitonin in patients with COVID-19', *J Clin Virol*, 127: 104370.
- Lo, C. W., M. W. Chen, M. Hsiao, S. Wang, C. A. Chen, S. M. Hsiao, J. S. Chang, T. C. Lai, S. Rose-John, M. L. Kuo, and L. H. Wei. 2011. 'IL-6 trans-signaling in formation and progression of malignant ascites in ovarian cancer', *Cancer Res*, 71: 424-34.
- Lokau, J., R. Nitz, M. Agthe, N. Monhasery, S. Aparicio-Siegmund, N. Schumacher, J. Wolf, K. Moller-Hackbarth, G. H. Waetzig, J. Grotzinger, G. Muller-Newen, S. Rose-John, J. Scheller, and C. Garbers. 2016. 'Proteolytic Cleavage Governs Interleukin-11 Trans-signaling', *Cell Reports*, 14: 1761-73.
- Lust, J. A., K. A. Donovan, M. P. Kline, P. R. Greipp, R. A. Kyle, and N. J. Maihle. 1992. 'Isolation of an mRNA encoding a soluble form of the human interleukin-6 receptor', *Cytokine*, 4: 96-100.
- Lutticken, C., A. Kruttgen, C. Moller, P. C. Heinrich, and S. Rose-John. 1991. 'Evidence for the importance of a positive charge and an alpha-helical structure of the C-terminus for biological activity of human IL-6', *FEBS Lett*, 282: 265-7.
- Marinkovic, S., G. P. Jahreis, G. G. Wong, and H. Baumann. 1989. 'IL-6 modulates the synthesis of a specific set of acute phase plasma proteins in vivo', *J Immunol*, 142: 808-12.
- Marz, P., T. Herget, E. Lang, U. Otten, and S. Rose-John. 1997. 'Activation of gp130 by IL-6/soluble IL-6 receptor induces neuronal differentiation', *Eur J Neurosci*, 9: 2765-73.
- May, L. T., U. Santhanam, S. B. Tatter, N. Bhardwaj, J. Ghrayeb, and P. B. Sehgal. 1988. 'Phosphorylation of secreted forms of human beta 2-interferon/hepatocyte stimulating factor/interleukin-6', *Biochem Biophys Res Commun*, 152: 1144-50.
- May, L. T., U. Santhanam, S. B. Tatter, J. Ghrayeb, and P. B. Sehgal. 1989. 'Multiple forms of human interleukin-6. Phosphoglycoproteins secreted by many different tissues', *Ann N Y Acad Sci*, 557: 114-9; discussion 19-21.
- Mullberg, J., E. Dittrich, L. Graeve, C. Gerhartz, K. Yasukawa, T. Taga, T. Kishimoto, P. C. Heinrich, and S. Rose-John. 1993. 'Differential shedding of the two subunits of the interleukin-6 receptor', *FEBS Lett*, 332: 174-8.
- Muyldermans, S., T. N. Baral, V. C. Retamozzo, P. De Baetselier, E. De Genst, J. Kinne, H. Leonhardt, S. Magez, V. K. Nguyen, H. Revets, U. Rothbauer, B. Stijlemans, S. Tillib, U. Wernery, L. Wyns, G. Hassanzadeh-Ghassabeh, and D. Saerens. 2009. 'Camelid immunoglobulins and nanobody technology', *Vet Immunol Immunopathol*, 128: 178-83.
- Narazaki, M., K. Yasukawa, T. Saito, Y. Ohsugi, H. Fukui, Y. Koishihara, G. D. Yancopoulos, T. Taga, and T. Kishimoto. 1993. 'Soluble forms of the interleukin-6 signal-transducing receptor component gp130 in human serum possessing a potential to inhibit signals through membrane-anchored gp130', *Blood*, 82: 1120-6.
- Nijsten, M. W., E. R. de Groot, H. J. ten Duis, H. J. Klasen, C. E. Hack, and L. A. Aarden. 1987. 'Serum levels of interleukin-6 and acute phase responses', *Lancet*, 2: 921.
- Nishimoto, N., K. Terao, T. Mima, H. Nakahara, N. Takagi, and T. Kakehi. 2008. 'Mechanisms and pathologic significances in increase in serum interleukin-6 (IL-6) and soluble IL-6 receptor after administration of an anti-IL-6 receptor antibody, tocilizumab, in patients with rheumatoid arthritis and Castleman disease', *Blood*, 112: 3959-64.

- Nishimoto, N., K. Yoshizaki, N. Miyasaka, K. Yamamoto, S. Kawai, T. Takeuchi, J. Hashimoto, J. Azuma, and T. Kishimoto. 2004. 'Treatment of rheumatoid arthritis with humanized anti-interleukin-6 receptor antibody: a multicenter, double-blind, placebo-controlled trial', *Arthritis Rheum*, 50: 1761-9.
- Nordan, R. P., and M. Potter. 1986. 'A macrophage-derived factor required by plasmacytomas for survival and proliferation in vitro', *Science*, 233: 566-9.
- Nordan, R. P., J. G. Pumphrey, and S. Rudikoff. 1987. 'Purification and NH2-terminal sequence of a plasmacytoma growth factor derived from the murine macrophage cell line P388D1', *J Immunol*, 139: 813-7.
- Novick, D., H. Engelmann, D. Wallach, and M. Rubinstein. 1989. 'Soluble cytokine receptors are present in normal human urine', *J Exp Med*, 170: 1409-14.
- Nowell, M. A., P. J. Richards, S. Horiuchi, N. Yamamoto, S. Rose-John, N. Topley, A. S. Williams, and S. A. Jones. 2003. 'Soluble IL-6 receptor governs IL-6 activity in experimental arthritis: blockade of arthritis severity by soluble glycoprotein 130', *J Immunol*, 171: 3202-9.
- Okada, M., M. Kitahara, S. Kishimoto, T. Matsuda, T. Hirano, and T. Kishimoto. 1988. 'IL-6/BSF-2 functions as a killer helper factor in the in vitro induction of cytotoxic T cells', *J Immunol*, 141: 1543-9.
- Paonessa, G., R. Graziani, A. De Serio, R. Savino, L. Ciapponi, A. Lahm, A. L. Salvati, C. Toniatti, and G. Ciliberto. 1995. 'Two distinct and independent sites on IL-6 trigger gp 130 dimer formation and signalling', *EMBO J*, 14: 1942-51.
- Peters, M., S. Jacobs, M. Ehlers, P. Vollmer, J. Mullberg, E. Wolf, G. Brem, K. H. Meyer zum Buschenfelde, and S. Rose-John. 1996. 'The function of the soluble interleukin 6 (IL-6) receptor in vivo: sensitization of human soluble IL-6 receptor transgenic mice towards IL-6 and prolongation of the plasma half-life of IL-6', *J Exp Med*, 183: 1399-406.
- Peters, M., A. M. Muller, and S. Rose-John. 1998. 'Interleukin-6 and soluble interleukin-6 receptor: direct stimulation of gp130 and hematopoiesis', *Blood*, 92: 3495-504.
- Pflanz, S., I. Tacke, J. Grotzinger, Y. Jacques, S. Minvielle, H. Dahmen, P. C. Heinrich, and G. Muller-Newen. 1999. 'A fusion protein of interleukin-11 and soluble interleukin-11 receptor acts as a superagonist on cells expressing gp130', *FEBS Lett*, 450: 117-22.
- Rabe, B., A. Chalaris, U. May, G. H. Waetzig, D. Seegert, A. S. Williams, S. A. Jones, S. Rose-John, and J. Scheller. 2008. 'Transgenic blockade of interleukin 6 transsignaling abrogates inflammation', *Blood*, 111: 1021-8.
- Romano, M., M. Sironi, C. Toniatti, N. Polentarutti, P. Fruscella, P. Ghezzi, R. Faggioni, W. Luini, V. van Hinsbergh, S. Sozzani, F. Bussolino, V. Poli, G. Ciliberto, and A. Mantovani. 1997. 'Role of IL-6 and its soluble receptor in induction of chemokines and leukocyte recruitment', *Immunity*, 6: 315-25.
- 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., and P. C. Heinrich. 1994. 'Soluble receptors for cytokines and growth factors: generation and biological function', *Biochem J*, 300 (Pt 2): 281-90.
- Rothbauer, U., K. Zolghadr, S. Tillib, D. Nowak, L. Schermelleh, A. Gahl, N. Backmann, K. Conrath, S. Muyldermans, M. C. Cardoso, and H. Leonhardt. 2006. 'Targeting and tracing antigens in live cells with fluorescent nanobodies', *Nat Methods*, 3: 887-9.
- Savino, R., L. Ciapponi, A. Lahm, A. Demartis, A. Cabibbo, C. Toniatti, P. Delmastro, S. Altamura, and G. Ciliberto. 1994. 'Rational design of a receptor super-antagonist of human interleukin-6', *EMBO J*, 13: 5863-70.
- Savino, R., A. Lahm, M. Giorgio, A. Cabibbo, A. Tramontano, and G. Ciliberto. 1993. 'Saturation mutagenesis of the human interleukin 6 receptor-binding site: implications for its three-dimensional structure', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90: 4067-71.

- Savino, R., A. Lahm, A. L. Salvati, L. Ciapponi, E. Sporeno, S. Altamura, G. Paonessa, C. Toniatti, and G. Ciliberto. 1994. 'Generation of interleukin-6 receptor antagonists by molecular-modeling guided mutagenesis of residues important for gp130 activation', *EMBO J*, 13: 1357-67.
- Scheller, J., A. Chalaris, D. Schmidt-Arras, and S. Rose-John. 2011. 'The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6', *Biochim Biophys Acta*, 1813: 878-88.
- Scheller, J., C. Garbers, and S. Rose-John. 2014. 'Interleukin-6: from basic biology to selective blockade of pro-inflammatory activities', *Semin Immunol*, 26: 2-12.
- Schreiber, S., K. Aden, J. P. Bernardes, C. Conrad, F. Tran, H. Hoper, V. Volk, N. Mishra, J. I. Blase, S. Nikolaus, J. Bethge, T. Kuhbacher, C. Rocken, M. Chen, I. Cottingham, N. Petri, B. B. Rasmussen, J. Lokau, L. Lenk, C. Garbers, F. Feuerhake, S. Rose-John, G. H. Waetzig, and P. Rosenstiel. 2021. 'Therapeutic Interleukin-6 Trans-signaling Inhibition by Olamkicept (sgp130Fc) in Patients With Active Inflammatory Bowel Disease', *Gastroenterology*, 160: 2354-66 e11.
- Sehgal, P. B., A. Zilberstein, R. M. Ruggieri, L. T. May, A. Ferguson-Smith, D. L. Slate, M. Revel, and F. H. Ruddle. 1986. 'Human chromosome 7 carries the beta 2 interferon gene', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 83: 5219-22.
- Simpson, R. J., A. Hammacher, D. K. Smith, J. M. Matthews, and L. D. Ward. 1997. 'Interleukin-6: structure-function relationships', *Protein Sci*, 6: 929-55.
- Stahl, N., T. G. Boulton, T. Farruggella, N. Y. Ip, S. Davis, B. A. Witthuhn, F. W. Quelle, O. Silvennoinen, G. Barbieri, S. Pellegrini, and et al. 1994. 'Association and activation of Jak-Tyk kinases by CNTF-LIF-OSM-IL-6 beta receptor components', *Science*, 263: 92-5.
- Stahl, N., T. J. Farruggella, T. G. Boulton, Z. Zhong, J. E. Darnell, Jr., and G. D. Yancopoulos. 1995. 'Choice of STATs and other substrates specified by modular tyrosine-based motifs in cytokine receptors', *Science*, 267: 1349-53.
- Sui, X., K. Tsuji, R. Tanaka, S. Tajima, K. Muraoka, Y. Ebihara, K. Ikebuchi, K. Yasukawa, T. Taga, T. Kishimoto, and et al. 1995. 'gp130 and c-Kit signalings synergize for ex vivo expansion of human primitive hemopoietic progenitor cells', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92: 2859-63.
- Takai, Y., G. G. Wong, S. C. Clark, S. J. Burakoff, and S. H. Herrmann. 1988. 'B cell stimulatory factor-2 is involved in the differentiation of cytotoxic T lymphocytes', *J Immunol*, 140: 508-12.
- Uyttenhove, C., P. G. Coulie, and J. Van Snick. 1988. 'T cell growth and differentiation induced by interleukin-HP1/IL-6, the murine hybridoma/plasmacytoma growth factor', *J Exp Med*, 167: 1417-27.
- Van Snick, J. 1990. 'Interleukin-6: an overview', *Annu Rev Immunol*, 8: 253-78.
- Van Snick, J., S. Cayphas, J. P. Szikora, J. C. Renauld, E. Van Roost, T. Boon, and R. J. Simpson. 1988. 'cDNA cloning of murine interleukin-HP1: homology with human interleukin 6', *Eur J Immunol*, 18: 193-7.
- Van Snick, J., A. Vink, S. Cayphas, and C. Uyttenhove. 1987. 'Interleukin-HP1, a T cell-derived hybridoma growth factor that supports the in vitro growth of murine plasmacytomas', *J Exp Med*, 165: 641-9.
- Waage, A., P. Brandtzaeg, A. Halstensen, P. Kierulf, and T. Espevik. 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.
- Weissenbach, J., Y. Chernajovsky, M. Zeevi, L. Shulman, H. Soreq, U. Nir, D. Wallach, M. Perricaudet, P. Tiollais, and M. Revel. 1980. 'Two interferon mRNAs in human

- fibroblasts: in vitro translation and Escherichia coli cloning studies', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 77: 7152-6.
- Wilke, C. M., K. Bishop, D. Fox, and W. Zou. 2011. 'Deciphering the role of Th17 cells in human disease', *Trends Immunol*, 32: 603-11.
- Wolf, J., G. H. Waetzig, A. Chalaris, T. M. Reinheimer, H. Wege, S. Rose-John, and C. Garbers. 2016. 'Different Soluble Forms of the Interleukin-6 Family Signal Transducer gp130 Fine-tune the Blockade of Interleukin-6 Trans-signaling', *J Biol Chem*, 291: 16186-96.
- Yamasaki, K., T. Taga, Y. Hirata, H. Yawata, Y. Kawanishi, B. Seed, T. Taniguchi, T. Hirano, and T. Kishimoto. 1988. 'Cloning and expression of the human interleukin-6 (BSF-2/IFN beta 2) receptor', *Science*, 241: 825-8.
- Yokota, S., T. Imagawa, M. Mori, T. Miyamae, S. Takei, N. Iwata, H. Umebayashi, T. Murata, M. Miyoshi, M. Tomiita, N. Nishimoto, and T. Kishimoto. 2014. 'Longterm safety and effectiveness of the anti-interleukin 6 receptor monoclonal antibody tocilizumab in patients with systemic juvenile idiopathic arthritis in Japan', *J Rheumatol*, 41: 759-67.
- Yoshizaki, K., T. Matsuda, N. Nishimoto, T. Kuritani, L. Taeho, K. Aozasa, T. Nakahata, H. Kawai, H. Tagoh, T. Komori, and et al. 1989. 'Pathogenic significance of interleukin-6 (IL-6/BSF-2) in Castleman's disease', *Blood*, 74: 1360-7.
- Zilberstein, A., R. Ruggieri, J. H. Korn, and M. Revel. 1986. 'Structure and expression of cDNA and genes for human interferon-beta-2, a distinct species inducible by growth-stimulatory cytokines', *EMBO J*, 5: 2529-37.

Danksagung

Zunächst möchte ich meinem Doktorvater Prof. Dr. Jürgen Scheller dafür danken, dass ich meine Doktorarbeit in diesem Institut erarbeiten und verwirklichen konnte. Danke für die exzellente Betreuung, für zahlreiche Ratschläge und die Erstkorrektur dieser Arbeit. Ich bin außerordentlich dankbar für den Einblick in die Forschung sowie die fachliche Ausbildung. Ich habe weitaus mehr gelernt als nur die Laborarbeit und ich würde diese Erfahrung niemals missen wollen.

Ein großer Dank gilt auch Prof. Dr. Julia Hauer, für die Co-Betreuung meiner Doktorarbeit, auch aus der Ferne in Dresden.

Für die freundliche Betreuung und enge Zusammenarbeit danke ich meinem Betreuer und Mentor PD Dr. Jens Moll, mit dem ich alle Ideen, Pläne, Experimente und Details ausarbeiten konnte und der für jede meiner Fragen zur Verfügung stand.

Mein Dank gilt der ganzen AG Scheller – für die netten Gespräche, die Zusammenarbeit und alle Tipps. Ihr habt mir eine wunderbare Zeit im Institut und eine Menge Freude bei der Laborarbeit bereitet. Besonders danke ich Selina Hansen und Paul Baran für die Einführung in alle Experimente, Nastaran Fazel, meiner Laborgenossin und Erika Engelowski für die wertvollen Verbesserungsvorschläge für meine Western Blots. Mein herzlicher Dank gilt auch Petra Oprée Jeremi, für die Organisation im Labor, die mentale Unterstützung und der großartigen Menschlichkeit, mit der sie das Team zusammenhält und uns manch einmal aus dem Sturm der Laborarbeit holte.

Ein besonderer Dank gilt zum einen Mahyar (Mohammad Akbarzadeh) für die detaillierten Erklärungen, die Hilfe bei den Biacore Experimenten und all die aufheiternden Worte. Zum anderen gilt dieser MK Kuchen (Marcus Kuchner). Danke für deine Unterstützung und die Motivation, jedes einzelne Experiment zu Ende zu bringen, für die Stickstoffpartys an Freitagabenden - und danke, dass du geblieben bist.

Aus tiefstem Herzen danke ich meiner Familie. Danke für jede Möglichkeit, die ihr mir im Leben gegeben habt, für eure Unterstützung in meinem gesamten Studium und während dieser Arbeit. Danke für eure Hilfe in allen Lebenslagen und eure Liebe.