

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

# Herstellung eines IL-6R und TNF spezifischen Inhibitors der ADAM17 Protease

## Dissertation

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

vorgelegt von  
Matthias Krusche

2023

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. Jürgen Scheller

Zweitgutachter: Prof. Dr. Walter Däubener

Für Petra, Armin, Christina und Corinna

# 1. Zusammenfassung (deutsch)

Die *A Disintegrin And Metalloproteasen* (ADAM) ADAM10 und ADAM17 sind an vielen biologischen Prozessen wie Entwicklung, Geweberegeneration und der Immunantwort beteiligt. ADAM17 wurde im Zusammenhang mit der proteolytischen Abspaltung von Tumornekrosefaktor (TNF) von der Zellmembran entdeckt. Zusätzlich ist ADAM17 verantwortlich für das *ectodomain shedding* des Interleukin 6 Rezeptors (IL-6R), was zur Bildung von löslichem IL-6R führt und IL-6 *trans-signaling* ermöglicht. IL-6 *classic signaling* über membranständigen IL-6R dient hauptsächlich regenerativen Zwecken, während IL-6 *trans-signaling* über löslichen IL-6R hauptsächlich mit einem chronisch inflammatorischen Phänotyp korreliert. Eine Dysregulation von ADAM17 findet sich in einer Vielzahl von inflammatorischen Störungen, wie rheumatoider Arthritis, chronisch-entzündlichen Darmerkrankungen und malignen Tumoren. Eine Globale Inhibition der Aktivität dieser Enzyme mit Antikörpern oder niedermolekularen Substanzen führte jedoch zu erheblichen Nebenwirkungen, wahrscheinlich aufgrund der großen Anzahl von Substraten dieser Proteasen.

Ziel dieser Arbeit war es, zu untersuchen, ob es durch den Einsatz von substratspezifischen ADAM17 Inhibitoren, möglich ist die Freisetzung von Zytokinen und Rezeptoren durch ADAM vermitteltes *ectodomain shedding* spezifisch für ausgewählte Substrate zu blockieren. Es wurden Fusionsproteine erstellt, die spezifische Bindestrukturen wie Peptide oder Einzeldomänenantikörper mit natürlichen Proteaseinhibitoren aus der Familie der *Tissue inhibitors of metalloproteinases* (TIMP) verbinden. Aus Gründen der Aufreinigung, Avidität und Löslichkeit befindet sich am C-Terminus der Fusionsproteine der Fc-Teil eines IgG Antikörpers.

Es wurden mehrere Fusionsproteine *designed*, hergestellt und charakterisiert, die TIMP1 oder TIMP3 in Kombination mit verschiedenen Einzeldomänenantikörpern oder Bindepeptiden enthielten. Zur Herstellung dieser Fusionsproteine wurden stabile Zelllinien erstellt und die Proteine aus dem Überstand dieser gereinigt und charakterisiert. Es konnte gezeigt werden, dass mit Fusionsproteinen aus TIMP1 und TIMP3 Varianten in Kombination mit einem IL-6R spezifischen Einzeldomänenantikörper selektiv das *ectodomain shedding* des IL-6R blockiert werden konnte, während andere ADAM17 Substrate wie z.B. TNF nicht beeinflusst wurden. Zusätzlich konnte durch die Verwendung eines anti-TNF Einzeldomänenantikörpers ein TNF selektiver ADAM17 Inhibitor hergestellt werden, der spezifisch das Shedding von TNF blockierte.

## 2. Zusammenfassung (englisch)

The A Disintegrin And Metalloproteinases (ADAM) including ADAM10 and ADAM17 are involved in a plethora of biological functions including development, tissue regeneration and immune responses. ADAM17 was initially identified as a tumor necrosis factor (TNF) cleaving enzyme. In addition, ADAM17 is also responsible for ectodomain shedding of the interleukin 6 receptor (IL-6R), a process that generates soluble IL-6R and is a key requirement for IL-6 trans-signaling. IL-6 signaling via the membrane bound IL-6R is involved in mainly regenerative processes while IL-6 trans-signaling via a soluble form of the IL-6R is attributed with a chronic inflammatory phenotype. Consequently, it is not surprising that dysregulation of ADAM17 is found in many inflammatory disorders including rheumatoid arthritis, inflammatory bowel disease and cancer. Hence, it is not surprising that ADAM10 and ADAM17 are considered as promising drug targets. However, global targeting of both enzymes with antibodies or small molecule drugs resulted in extensive side effects most likely due to the multitude of substrates of the proteases.

Our aim was to develop a strategy to selectively prevent the release of active cytokines or receptors by ADAM mediated ectodomain shedding. Therefore, we employed fusion proteins combining substrate specific binding structures like peptides or single domain antibodies with naturally occurring tissue inhibitors of metalloproteinases. For purification, avidity and solubility purposes the Fc part of an IgG antibody was included at the C-terminus of the fusion proteins.

We designed, generated and characterized different fusion proteins containing TIMP1 and TIMP3 combined with various single domain antibodies or binding peptides. Stably transfected cell lines were generated, the proteins were purified from the cell's supernatant and characterized. These fusion proteins composed of TIMP1 or TIMP3 with an IL-6R specific single domain antibody selectively inhibit ectodomain shedding of IL-6R, while not affecting the shedding of other substrates like TNF. Furthermore, we established a fusion protein containing an anti-TNF single domain antibody, which selectively targeted tumor necrosis factor ectodomain shedding.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>Zusammenfassung (deutsch) .....</b>	<b>I</b>
<b>2.</b>	<b>Zusammenfassung (englisch).....</b>	<b>II</b>
<b>3.</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>XI</b>
<b>3.1.</b>	<b>Liste der verwendeten Abkürzungen .....</b>	<b>XI</b>
<b>3.2.</b>	<b>Drei- und Einbuchstabencodes der Aminosäuren .....</b>	<b>XVII</b>
<b>3.3.</b>	<b>Verwendete Abkürzungen für die im Rahmen dieser Arbeit erstellten Fusionsproteine.....</b>	<b>XVIII</b>
<b>4.</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>1</b>
<b>4.1.</b>	<b>Wichtige Entzündungsmediatoren .....</b>	<b>1</b>
4.1.1.	Tumornekrosefaktor .....	1
4.1.2.	Interleukin 6 .....	4
<b>4.2.</b>	<b><i>A Disintegrin And Metalloproteinase 17</i>.....</b>	<b>6</b>
4.2.1.	ADAM17 - vielfältige Funktionen <i>in vivo</i> .....	8
4.2.1.1.	<i>Ectodomain shedding</i> .....	8
4.2.1.2.	<i>Regulated intramembrane proteolysis (RIP)</i> .....	9
4.2.2.	Regulation von ADAMs .....	9
4.2.3.	Die Rolle von ADAM17 in physiologischen Prozessen .....	10
4.2.4.	ADAM17 Pathologien .....	11
4.2.4.1.	Kardiovaskuläre Erkrankungen .....	11
4.2.4.2.	Inflammatorische Prozesse .....	11

4.2.4.3.	Tumorentstehung, -progression und -migration .....	12
4.3.	<i>Tissue inhibitors of metalloproteinases</i> .....	13
4.4.	<b>Einzeldomänenantikörper und Peptide</b> .....	14
4.5.	<b>Klinische und präklinische Entzündungshemmung in der Praxis ...</b>	16
5.	<b>Ziel der Arbeit</b> .....	20
6.	<b>Material und Methoden</b> .....	21
6.1.	<b>Antibiotika</b> .....	21
6.2.	<b>Antikörper</b> .....	21
6.3.	<b>Chemikalien</b> .....	22
6.4.	<b>Enzyme</b> .....	26
6.5.	<b>Plasmide</b> .....	26
6.6.	<b>Oligonukleotide</b> .....	29
6.7.	<b>Aminosäuresequenzen der verwendeten IL-6R bindenden Peptide</b>	32
6.8.	<b>Medien und Lösungen</b> .....	33
6.8.1.	Medien zur Kultivierung von Bakterien .....	33
6.8.2.	Medien zur Kultivierung von eukaryotischen Zellen.....	33
6.9.	<b>Geräte</b> .....	34
6.10.	<b>Kits</b> .....	36
6.11.	<b>Größenstandards</b> .....	36
6.12.	<b>Puffer und Lösungen</b> .....	37
6.13.	<b>Rekombinante Proteine</b> .....	41

<b>6.14.</b>	<b>Verbrauchsmaterial .....</b>	<b>41</b>
<b>6.15.</b>	<b>Zelllinien.....</b>	<b>43</b>
<b>6.16.</b>	<b>Molekularbiologische Methoden.....</b>	<b>44</b>
6.16.1.	Anzucht von <i>Escherichia coli</i> .....	44
6.16.2.	Polymerasekettenreaktion .....	44
6.16.3.	Agarosegelelektrophorese .....	46
6.16.4.	<i>PCR Cleanup</i> .....	47
6.16.5.	Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	47
6.16.6.	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren .....	47
6.16.7.	Klonierung.....	48
6.16.8.	Ligation von DNA-Fragmenten .....	48
6.16.9.	Hitzeschock-Transformation von <i>E.coli</i> XL-1 Blue .....	48
6.16.10.	Plasmid „Mini“-Präparation.....	49
6.16.11.	Plasmid „Midi“-Präparation.....	49
6.16.12.	Sequenzierung von DNA-Fragmenten .....	50
6.16.13.	Restriktion .....	50
6.16.14.	Phosphorylierung von Plasmid-DNA .....	50
6.16.15.	Dephosphorylierung von Plasmid-DNA .....	51
6.16.16.	Gerichtete Mutagenese.....	51
6.16.17.	<i>Colony-PCR</i> .....	52
<b>6.17.</b>	<b>Proteinbiochemische Methoden.....</b>	<b>54</b>

6.17.1.	hIL-6R ELISA.....	54
6.17.2.	hTNF ELISA .....	55
6.17.3.	Zellaufschluss.....	55
6.17.4.	SDS-PAGE.....	55
6.17.5.	Western Blot.....	56
6.17.6.	Immunodetektion .....	57
6.17.7.	<i>Stripping</i> von Western Blot Membranen .....	57
6.17.8.	Coomassie-Brillant-Blau Färbung von SDS-PAGE Gelen.....	58
6.17.9.	Immunopräzipitation .....	58
6.17.10.	Affinitätsreinigung von Proteinen aus Zellkulturüberständen .....	59
<b>6.18.</b>	<b>Zellkultur Methoden.....</b>	<b>60</b>
6.18.1.	Kultivierung adhärenter Zellen .....	60
6.18.2.	Kultivierung adhärenter Zellen in <i>Rollerbottles</i> .....	60
6.18.3.	Zellzahlbestimmung .....	61
6.18.4.	Transiente Transfektion von HEK293-Zellen.....	61
6.18.5.	Transiente Transfektion von CHO-K1-Zellen .....	61
6.18.5.1.	Stabile Transfektion von CHO-K1-Zellen.....	62
6.18.5.2.	Antibiotikadosiswirkungskurve .....	62
6.18.5.3.	Einzelklonselektion nach stabiler Transfektion .....	62
6.18.6.	<i>ADAM17 mediated shedding assay</i> .....	63
<b>6.19.</b>	<b>Normierung und statistische Analysen.....</b>	<b>64</b>

<b>7.</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>65</b>
<b>7.1.</b>	<b>Peptidvermittelte Substratspezifität für selektives Proteasetaargeting .....</b>	<b>65</b>
7.1.1.	Klonierung von IL-6R spezifischen ADAM17 Inhibitoren unter Nutzung von IL-6R bindenden Peptiden .....	67
7.1.2.	Expressionsanalyse der peptidbasierten Inhibitoren .....	68
7.1.3.	Fusionsproteine aus IL-6R bindenden Proteinen und TIMP3 haben keinen inhibitorischen Effekt auf das IL-6R <i>shedding</i> .....	69
<b>7.2.</b>	<b>Verwendung eines IL-6R sdAb zur Vermittlung von Substratspezifität.....</b>	<b>70</b>
7.2.1.	Das TIMP3(1-121)-Linker-IL-6R sdAb-Fc Fusionsprotein wird exprimiert und sekretiert .....	71
7.2.2.	Nachweis der Bindung von sIL-6R durch T3I(121) .....	72
7.2.3.	T3I(121) ist in der Lage, ADAM17 vermitteltes IL-6R <i>shedding</i> zu inhibieren.....	74
7.2.4.	T3I(121) wirkt spezifisch auf das <i>shedding</i> von IL-6R .....	75
7.2.5.	Affinitätsreinigung von T3I(121) aus Zellkulturüberständen stabil transfizierter Zelllinien.....	76
7.2.6.	Quantifizierung der biologischen Aktivität des gereinigten T3I(121) ....	79
7.2.7.	Klonierung einer Cys(121)-freien T3I Variante.....	80
7.2.8.	Generierung von T3I(120) enthaltenden Zellkultur-überständen .....	81
7.2.9.	T3I(120) bindet den IL-6R.....	82
7.2.10.	T3I(120) verhindert die proteolytische Spaltung von IL-6R durch ADAM17.....	83

7.2.11.	T3I(120) zeigt keinen kreuzreaktiven Einfluss auf die Freisetzung von sTNF.....	84
7.2.12.	Isolierung von T3I(120) aus Zellkulturüberständen und Untersuchung auf Affinität und biologische Aktivität .....	85
7.2.13.	Implementierung einer TIMP1 Mutationsvariante an Stelle von TIMP3 zur Reduzierung der Multimerisierungstendenz .....	87
7.2.14.	T1I(fl M) wird von CHO-K1-Zellen exprimiert und sekretiert .....	90
7.2.15.	T1I(fl M) inhibiert die Freisetzung von sIL-6R durch ADAM17.....	91
7.2.16.	Die ADAM17-Inhibition durch T1I(fl M) ist substratspezifisch .....	92
<b>7.3.</b>	<b>Inhibition von TNF <i>shedding</i>.....</b>	<b>92</b>
7.3.1.	Klonierung eines Expressionsplasmids für T3T(120).....	93
7.3.2.	T3T(120) wird von transient transfizierten CHO-K1-Zellen exprimiert	94
7.3.3.	T3T(120) verhindert effektiv die proteolytische Freisetzung von sTNF durch ADAM17 .....	95
7.3.4.	T3T(120) hat keinen signifikanten Effekt auf das IL-6R <i>shedding</i> .....	96
7.3.5.	Klonierung einer TNF-spezifischen TIMP1 basierten Inhibitorvariante	97
7.3.6.	T1T(fl M) wird von CHO-K1-Zellen exprimiert .....	98
7.3.7.	T1T(fl M) senkt die Konzentration von freiem sTNF nach Induktion von ADAM17.....	99
7.3.8.	T1T(fl M) ist substratspezifisch für TNF.....	100
<b>8.</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>102</b>
<b>8.1.</b>	<b>Fazit .....</b>	<b>109</b>
<b>9.</b>	<b>Ausblick .....</b>	<b>110</b>

<b>10. Literaturverzeichnis .....</b>	<b>111</b>
<b>11. Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>130</b>
<b>12. Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>131</b>
<b>13. Anhang.....</b>	<b>134</b>
<b>13.1.    Plasmidkarten und vollständige Sequenzen aller Fusionsproteine</b>	<b>134</b>
13.1.1.  pcDNA3.1-TIMP3(1-121)-L-S1-Fc.....	135
13.1.2.  pcDNA3.1-TIMP3(1-121)-L-S2-Fc.....	136
13.1.3.  pcDNA3.1-TIMP3(1-121)-L-S3-Fc.....	137
13.1.4.  pcDNA3.1-TIMP3(1-121)-L-S4-Fc.....	138
13.1.5.  pcDNA3.1-TIMP3(1-121)-L-S7-Fc.....	139
13.1.6.  pcDNA3.1-TIMP3(1-121)-L-S <sub>x</sub> 1-Fc .....	140
13.1.7.  pcDNA3.1-TIMP3(1-121)-L- S <sub>x</sub> 2-Fc .....	141
13.1.8.  pcDNA3.1-TIMP3(1-121)-L-Fc .....	142
13.1.9.  pcDNA3.1-TIMP3(1-121)-L-IL-6R sdAb-Fc.....	143
13.1.10. pcDNA3.1-TIMP3(1-121)-L-TNF sdAb-Fc .....	144
13.1.11. pcDNA3.1-TIMP3(1-120)-L-Fc .....	145
13.1.12. pcDNA3.1-TIMP3(1-120)-L-IL-6R sdAb-Fc.....	146
13.1.13. pcDNA3.1-TIMP3(1-120)-L-TNF sdAb-Fc .....	147
13.1.14. pcDNA3.1-TIMP1(fl M)-L-Fc.....	148
13.1.15. pcDNA3.1-TIMP1(fl M)-L-IL-6R sdAb-Fc .....	149
13.1.16. pcDNA3.1-TIMP1(fl M)-L-TNF sdAb-Fc .....	150

**14. Danksagung..... 151**

## 3. Abkürzungsverzeichnis

### 3.1. Liste der verwendeten Abkürzungen

In Tabelle 1 sind die in der Arbeit verwendeten Abkürzungen aufgeführt.

**Tabelle 1: Liste der verwendeten Abkürzungen**

<b>Abkürzung</b>	<b>Bedeutung</b>
ADAM	<i>A Disintegrin And Metalloprotease</i>
ADAMTS	<i>A disintegrin and metalloproteinases with thrombospondin motifs</i>
AG	Arbeitsgruppe
Amp	Ampicillin
APP	<i><math>\beta</math>-amyloid precursor protein</i>
APS	Ammoniumpersulfat
AREG	Amphiregulin
AS	Aminosäure
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
CD	Cluster of differentiation
cDNA	Komplementäre DNA
CNTF	<i>Ciliary Neurotrophic Factor</i>

---

<b>Abkürzung</b>	<b>Bedeutung</b>
COPD	Chronische obstruktive Lungenerkrankung
Da	Dalton
DD	<i>death domain</i>
DMARD	<i>Disease-modifying antirheumatic drugs</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor
eGFP	Enhanced GFP
EGFR	EGF Rezeptor
EGTA	Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERK	<i>extra cellular signal-related kinase</i>
EZM	Extrazelluläre Matrix
<i>f.c.</i>	Endkonzentration, <i>final concentration</i>

---

<b>Abkürzung</b>	<b>Bedeutung</b>
FADD	<i>Fas associated death domain</i>
FBS	Fetales, bovines Serum
fl	<i>full length</i>
FLIP	<i>FLICE inhibitory protein</i>
GFP	Grün fluoreszierendes Protein
gp130	Glykoprotein 130
GW	GW 280264X
h	human
HB-EGF	<i>Heparin binding EGF-like growth factor</i>
HSP	<i>Heat shock protein</i>
IgG	Immunglobulin G
IgGR	IgG Rezeptor
IL	Interleukin
IL-6R	Interleukin 6 Rezeptor
JAK	Januskinase
JNK	<i>Jun N-terminal kinase</i>
kb	Kilobasen
LIF	<i>Leukemia inhibitory factor</i>

---

<b>Abkürzung</b>	<b>Bedeutung</b>
LPA	Lysophosphatidsäure
LPS	Lipopolysaccharid
Lsg.	Lösung
LT	Lymphotoxin
mAB	Monoklonaler Antikörper
MAPK	<i>mitogen activated protein kinase</i>
MMP	Matrix Metalloproteinase
MS	Multiple Sklerose
MTX	Methotrexat
Neo	Neomycin
NF- $\kappa$ B	<i>nuclear factor <math>\kappa</math>B</i>
NK	Negativkontrolle
NRG1	Neuregulin
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PK	Positivkontrolle

---

<b>Abkürzung</b>	<b>Bedeutung</b>
PKB	Proteinkinase B
PKC	Proteinkinase C
PLAD	<i>pre-ligandbinding assembly domain</i>
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
PVDF	Polyvinylidenfluorid
RA	Rheumatoide Arthritis
RIP	<i>Regulated Intramembrane Proteolysis</i>
rpm	<i>revolutions per minute</i>
RT	Raumtemperatur
s	<i>Soluble</i> / löslich
s.	siehe
SD	<i>standard deviation</i>
sdAb	Single domain antibody
SDS	Natriumdodecylsulfat
SG	Sammelgel
sgp130 Fc	Lösliches gp130 Fc-Fusionsprotein
SMI	<i>Small molecule inhibitor</i>
SODD	<i>Silencer of death domain</i>

---

<b>Abkürzung</b>	<b>Bedeutung</b>
sog.	sogenannt
SP	Signalpeptid
STAT	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
TACE	<i>Tumor necrosis factor-<math>\alpha</math> converting enzyme</i>
TBS	Trisgepufferte Salzlösung
TG	Trenngel
TGF $\alpha$	<i>Transforming growth factor <math>\alpha</math></i>
TIM	<i>TRAF interacting motif</i>
TIMP	<i>Tissue Inhibitors of metalloproteinases</i>
T <sub>m</sub>	Schmelztemperatur
tm	Transmembran
TNF	Tumornekrosefaktor
TNFR	TNF Rezeptor 1
TNFSF	TNF Superfamilie
TRADD	<i>TNFR associated Death Domain</i>
TRAF	<i>TNFR associated factor 2</i>
UV	Ultraviolett
wt	Wildtyp

## 3.2. Drei- und Einbuchstabencodes der Aminosäuren

In Tabelle 2 sind die Drei- und Einbuchstabencodes für Aminosäuren gelistet.

**Tabelle 2: Drei- und Einbuchstabencodes für Aminosäuren**

Aminosäure	Dreibuchstabencode	Einbuchstabencode
Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Asparaginsäure	Asp	D
Cystein	Cys	C
Glutamin	Gln	Q
Glutaminsäure	Glu	E
Glycin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleucin	Ile	I
Leucin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Methionin	Met	M

Aminosäure	Dreibuchstabencode	Einbuchstabencode
Phenylalanin	Phe	F
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptophan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V

### 3.3. Verwendete Abkürzungen für die im Rahmen dieser Arbeit erstellten Fusionsproteine

Tabelle 3 enthält die Abkürzungen und vollständigen Bezeichnungen aller im Rahmen dieser Arbeit erstellten ADAM17 inhibierenden Fusionsproteine.

**Tabelle 3: Liste der Abkürzungen für alle im Rahmen der Arbeit erstellten ADAM17 Inhibitoren**

Abkürzung	Fusionsprotein
T3S1(121)	TIMP3(1-121)-Linker-S1-Fc
T3S2(121)	TIMP3(1-121)-Linker-S2-Fc
T3S3(121)	TIMP3(1-121)-Linker-S3-Fc

---

<b>Abkürzung</b>	<b>Fusionsprotein</b>
T3S4(121)	TIMP3(1-121)-Linker-S4-Fc
T3S7(121)	TIMP3(1-121)-Linker-S7-Fc
T3S <sub>x</sub> 1(121)	TIMP3(1-121)-Linker-S <sub>x</sub> 1-Fc
T3S <sub>x</sub> 2(121)	TIMP3(1-121)-Linker-S <sub>x</sub> 2-Fc
T3(121)	TIMP3(1-121)-Linker-Fc
T3I(121)	TIMP3(1-121)-Linker-IL-6R sdAb-Fc
T3T(121)	TIMP3(1-121)-Linker-TNF sdAb-Fc
T3(120)	TIMP3(1-120)-Linker-Fc
T3I(120)	TIMP3(1-120)-Linker-IL-6R sdAb-Fc
T3T(120)	TIMP3(1-120)-Linker-TNF sdAb-Fc
T1(fl M)	TIMP1(fl M)-Linker-Fc
T1I(fl M)	TIMP1(fl M)-Linker-IL-6R sdAb-Fc
T1T(fl M)	TIMP1(fl M)-Linker-TNF sdAb-Fc

## 4. Einleitung

### 4.1. Wichtige Entzündungsmediatoren

Eine Entzündung ist eine lokale oder systemische Reaktion des Körpers auf einen inneren oder äußeren Reiz, der als körperfremd eingestuft wird. Sie dient der Elimination des Reizes und der Vorbereitung von Heilungsprozessen. Wichtige Komponenten der Entzündung sind immunkompetente Zellen, Antikörper, das Komplementsystem und Entzündungsmediatoren.

#### 4.1.1. Tumornekrosefaktor

Tumornekrosefaktor (TNF, früher  $\text{TNF}\alpha$ , Cachektin) wurde erstmals als lösliches Glykoprotein im Serum von *Bacillus Calmette-Guérin* infizierten Mäusen gefunden, denen Lipopolysaccharid (LPS) appliziert wurde. Dieses Serum führte nach intravenöser Applikation bei Mäusen mit subkutanen Sarkomen zur Tumornekrose (Carswell, Old et al. 1975, Green, Dobrjansky et al. 1976). Zehn Jahre später wurde erstmals cDNA kloniert, die für TNF kodiert (Shirai, Yamaguchi et al. 1985, Wang, Creasey et al. 1985).

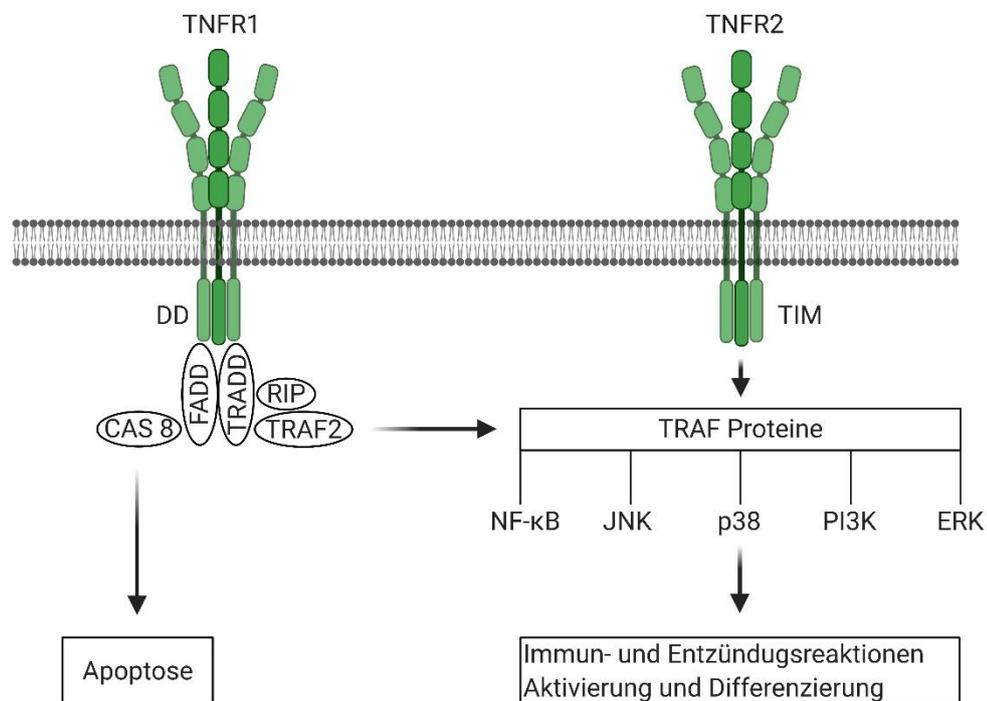
TNF ist ein Typ II Transmembranprotein, das vor allem von Makrophagen und T-Lymphozyten (Carswell, Old et al. 1975) als membrangebundenes, 26 kDa großes Protein (tmTNF) produziert wird. tmTNF kann von Proteasen wie ADAM17 geschnitten werden und es entsteht das 17 kDa große, lösliche TNF (sTNF). Es bildet sowohl in löslicher als auch membrangebundener Form Trimere und kann in beiden Formen mit TNF Rezeptoren interagieren und ein Signal induzieren (Hehlhans and Pfeffer 2005, McCoy and Tansey 2008).

TNF ist *in vivo* ein wichtiger Entzündungsmediator. Viele seiner Wirkungen treten im Zusammenwirken mit Interleukin-6 (IL-6) und IL-1 auf. Es stimuliert die Akute-Phase-Reaktion (Baumann and Gauldie 1994), vermittelt bei lokal erhöhter Konzentration die Kardinalsymptome einer Entzündung (*rubor, calor, dolor, tumor, functio laesa*) und spielt eine wichtige Rolle bei der Einwanderung von neutrophilen Granulozyten in

Entzündungsherde (Vieira, Lemos et al. 2009). Es vermindert die Insulinsensitivität (Hotamisligil 1999) und kann bei andauernd hohen Konzentration eine Kachexie (*wasting syndrom*) auslösen (Anker, Ponikowski et al. 1999).

TNF kann genau wie Lymphotoxin (LT), welches ebenfalls der TNF Superfamilie (TNFSF) angehört, die beiden Rezeptoren TNF Rezeptor 1 (TNFR1, p55, CD120a) und TNFR2 (p75, CD120b) aktivieren. Die beiden Rezeptoren unterscheiden sich in ihrem Expressionsprofil, ihrer Affinität zu den Liganden und in den aktivierbaren *downstream* Signalkaskaden (s. Abbildung 1) (Tracey, Klareskog et al. 2008).

TNFR1 enthält eine *death domain* (DD) und kann die Caspase 8 (FLICE) Kaskade aktivieren, die zur Apoptose führt. Allerdings dient im Gegensatz zum Fas Rezeptor (auch TNFSF), der bei Aktivierung die *Fas associated Death Domain* (FADD) rekrutiert und obligat eine Apoptose induziert (Sharma, Wang et al. 2000), beim TNFR die *TNFR associated Death Domain* (TRADD) als Adapterprotein. TRADD assoziiert nur in bestimmten Fällen, wie zum Beispiel gestörter Proteinsynthese oder fehlenden *downstream* Adapterproteinen, mit FADD und führt zur Apoptose. Im Normalfall bindet TRADD



**Abbildung 1: Schematische Darstellung des TNF signaling**

Eine Übersicht der wichtigsten Signaltransduktoren und Hauptsignalwege, die durch TNFR1 und TNFR2 aktiviert werden können.

*TNFR associated factor 2* (TRAF2), TRAF1 und *receptor interacting protein* und induziert *nuclear factor  $\kappa$ B* (NF- $\kappa$ B) und *Jun N-terminal kinase* (JNK) Signalwege, welche die Apoptose verhindern und zur Induktion inflammatorischer Prozesse führen. Die Balance zwischen pro- und antiapoptotischen Signalwegen ist komplex reguliert und hängt vom metabolischen Status der Zelle, von der Stärke des TNF Signals, der Konzentration intrazellulärer Inhibitoren verschiedener Komponenten der Signalwege (wie zum Beispiel *silencer of Death Domain* (SODD) oder *FLICE inhibitory protein* (FLIP)) und weiteren Faktoren ab (Dempsey, Doyle et al. 2003).

TNFR2 enthält keine *death domain*, sondern ein *TRAF interacting motif* (TIM) welches nach Aktivierung Proteine aus der TRAF Familie rekrutieren kann. Diese aktivieren verschiedenste Signalkaskaden wie NF- $\kappa$ B (Takeuchi, Rothe et al. 1996, Yang, Lin et al. 2001), JNK (Dadgostar and Cheng 1998, Dadgostar and Cheng 2000), p38, *extra cellular signal-related kinase* (ERK) und Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) (Dempsey, Doyle et al. 2003).

Beide Rezeptoren liegen aufgrund einer *pre-ligandbinding assembly domain* (PLAD) auch in inaktiver Form als Trimere vor (Chan, Chun et al. 2000). ADAM17 kann sowohl die extrazelluläre Domäne von TNFR1 (Reddy, Slack et al. 2000) als auch von TNFR2 (Higuchi and Aggarwal 1994, Peschon, Slack et al. 1998) schneiden. Es entstehen so lösliche TNFRs, die in der Lage sind TNF zu binden und zu neutralisieren. Sie wirken also (im Gegensatz zum sIL-6R s. Abschnitt 4.1.2) als natürliche Antagonisten zu den membranständigen Rezeptoren (Van Zee, Kohno et al. 1992).

Des Weiteren ist auch TNF *reverse* oder *outside to inside signaling* nachgewiesen (Harashima, Horiuchi et al. 2001). Wenn tmTNF TNFR bindet kommt es auf der Zytokin tragenden Zelle zum Calcium Influx und zur Aktivierung von p38 und *mitogen activated protein kinase* (MAPK) Signalwegen (Watts, Hunt et al. 1999, Kirchner, Boldt et al. 2004).

Aufgrund der großen Bedeutung von TNF in der Induktion von Immunantworten und der Beobachtung, dass die lokale Konzentration von TNF in Entzündungsherden stark erhöht ist, rückte die Möglichkeit einer TNF Inhibition *in vivo* in den Fokus der klinischen Forschung (Lebrec, Ponce et al. 2015) (s. Abschnitt 4.5). TNF spielt eine wichtige Rolle in einer großen Zahl von Erkrankungen wie dem septischen Schock (Tracey, Beutler et al.

1986), der rheumatoiden Arthritis (Feldmann, Brennan et al. 1996), Morbus Crohn und der ulcerativen Colitis (Murch, Braegger et al. 1993, Breese, Michie et al. 1994), der ankylosierenden Spondylitis (Lange, Teichmann et al. 2000), kardiovaskulären Erkrankungen (Bradley 2008), chronischer Bronchitis, COPD, Asthma (Mukhopadhyay, Hoidal et al. 2006) sowie Tumorentstehung, Tumorprogression und Metastasierung (Balkwill 2006, Mantovani, Allavena et al. 2008, Wang and Lin 2008, Balkwill 2009).

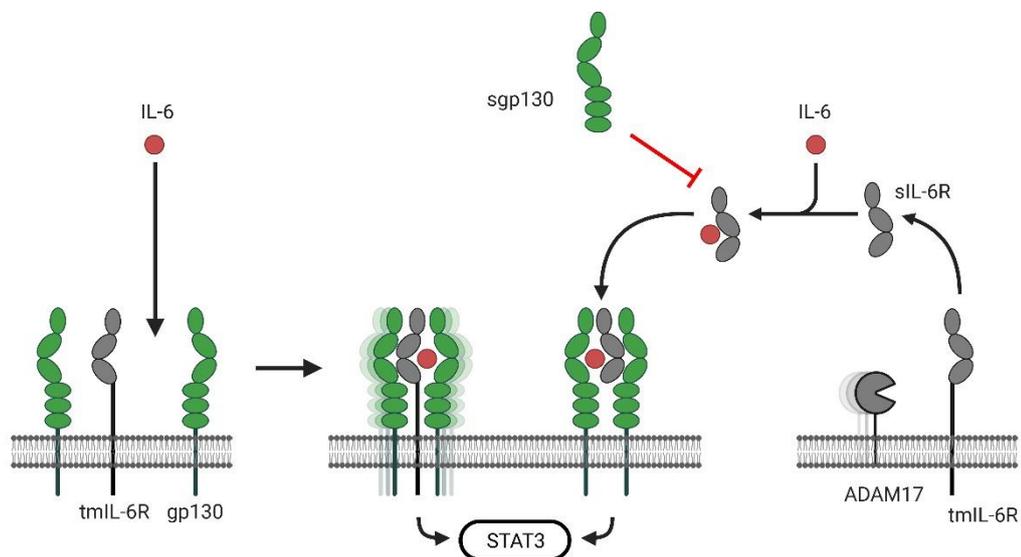
### **4.1.2. Interleukin 6**

IL-6 ist ein Zytokin mit einem breiten Spektrum an Funktionen in Homöostase und Immunantwort. Die IL-6 Expression ist stark reguliert und das Zytokin ist unter Normalbedingung nur in sehr niedriger Konzentration in humanem Serum detektierbar (Taupin, Toulmond et al. 1993, Bell, Kochanek et al. 1997, Maier, Laurer et al. 2005). Verschiedene Immun- und Nicht-Immunzellen wie B- und T-Zellen, Monozyten, Makrophagen, Adipozyten, Endothelzellen und Fibroblasten können IL-6 produzieren (Kishimoto, Akira et al. 1995). Es ist in der Aktivierung und Differenzierung von T-Zellen (Okada, Kitahara et al. 1988, Atreya, Mudter et al. 2000, Dominitzki, Fantini et al. 2007), Megakaryozyten (Ishibashi, Kimura et al. 1989), neutrophilen Granulozyten (Walker, Zhang et al. 2008) und Makrophagen (Nicola, Metcalf et al. 1983) involviert, spielt eine wichtige Rolle bei Epithel- (Grivennikov, Karin et al. 2009) und Leberregeneration (Drucker, Gewiese et al. 2010) sowie bei der Akute-Phase-Reaktion in der Leber (Gauldie, Richards et al. 1987). In Verbindung mit TNF und IL-1 führt es zu Leukozytose und Fieber und vermittelt so die Elimination von Pathogenen aus dem menschlichen Körper (Rose-John and Neurath 2004, Chen, Fisher et al. 2006).

Der IL-6 Rezeptorkomplex besteht aus einem 80 kDa großen Typ1 Transmembran Glykoprotein, dem IL-6 Rezeptor  $\alpha$  (IL-6R, auch CD126), IL-6 und zwei Glykoproteinen 130 (gp130). gp130 ist ein Typ1 Transmembran-Signaltransduktionsprotein, das obligat für das IL-6 Signal ist, da die intrazelluläre Domäne des IL-6R keine Bindungsstelle für Januskinasen (JAK) besitzt. Zusätzlich zu membranständigem gp130 kommen physiologisch auch verschiedene lösliche Varianten des Proteins vor, die antagonistisch auf IL-6 Signaltransduktion wirken und somit das IL-6 Signal regulieren (Sommer, Garbers et al. 2014). Nach Bindung von IL-6 an den IL-6R bindet gp130 an den IL-6/IL-6R-Komplex. Es entsteht entweder eine hexamere Struktur aus zwei Molekülen gp130

und zwei IL-6/IL-6R-Komplexen oder eine tetramere Struktur aus zwei Molekülen gp130 und einem IL-6/IL-6R-Komplex (Boulanger, Chow et al. 2003). Beide Strukturen sind dann in der Lage, JAK/ *signal transducer and activator of transcription* (STAT), *extracellular signal-regulated kinases* (ERK) und Phosphoinositid-3-Kinasen (PI3K) Signalwege zu aktivieren (Taga and Kishimoto 1997). gp130 ist das gemeinsame Signaltransduktionsprotein der IL-6 Zytokinfamilie und vermittelt zum Beispiel auch die Signaltransduktion von Zytokinen wie IL-11, LIF oder CNTF (Taga 1996, Chalaris, Garbers et al. 2011). Es ist nahezu ubiquitär exprimiert, wohingegen sich die Expression von IL-6R vor allem auf bestimmte Zellen des Immunsystems und Hepatozyten beschränkt (Oberge, Wesch et al. 2006, Scheller and Rose-John 2006).

Erhöhte IL-6 Konzentrationen wurden u.a. bei entzündlichen Darmerkrankungen, verschiedenen Typen von Arthritis, Multipler Sklerose, Sepsis und Kolonkarzinomen gefunden (Rose-John, Waetzig et al. 2007, Garbers, Aparicio-Siegmund et al. 2015), weshalb der IL-6 Signalkomplex als Ziel für Interventionen in den Fokus gerückt ist. Eine Übersicht experimenteller und zugelassener Pharmaka, die IL-6 Signaltransduktion zum Ziel haben findet sich in Abschnitt 4.5.



**Abbildung 2: Interleukin 6 classic und trans-signaling**

(A) Bei IL-6 *classic signaling* bindet IL-6 zuerst den membranständigen IL-6R. Dieser Komplex rekrutiert zwei Moleküle gp130, was zur Signaltransduktion führt.

(B) *Trans-signaling* ist dadurch charakterisiert, dass IL-6 an löslichen IL-6R bindet, der durch *ectodomain shedding* oder alternatives *splicen* entsteht. Dieser IL-6/sIL-6R Komplex kann jede gp130 exprimierende Zelle stimulieren.

Neben der Signaltransduktion über den membrangebundenen IL-6R (*classic signaling*) ist auch eine Aktivierung von gp130 über einen Komplex aus löslichem IL-6R (sIL-6R) und IL-6 möglich. Dieser Prozess wird *trans-signaling* genannt (s. Abbildung 2).

Manche dendritischen Zellen, die kein gp130 exprimieren, können außerdem einen präformierten Komplex aus IL-6 und IL-6R an der Zelloberfläche präsentieren, der mit gp130 auf der Zelloberfläche von nativen T-Zellen interagiert und in Kombination mit einer Antigenpräsentation zur Reifung der T-Zellen zu pathogenen TH17-Zellen führt. Dieser Modus der Signalübertragung wird *cluster signaling* genannt (Heink, Yogev et al. 2017, Lamertz, Rummel et al. 2018).

*Classic signaling* wird vor allem mit homöostatischen Prozessen und physiologischer Immunantwort in Verbindung gebracht. *Trans-signaling* hingegen wird überwiegend mit entzündlichen Erkrankungen und Tumorgenese assoziiert (Chalaris, Garbers et al. 2011, Hunter and Jones 2015). Etwa 10% des sIL-6R entstehen durch alternatives Spleißen (Lust, Donovan et al. 1992), die anderen 90% durch *ectodomain shedding* (Mullberg, Schooltink et al. 1993). Die beiden wichtigsten Proteasen in diesem Kontext sind ADAM10 und ADAM17. ADAM10 ist beim Menschen vor allem für konstitutives, ADAM17 für induziertes *ectodomain shedding* verantwortlich (Matthews, Schuster et al. 2003, Chalaris, Rabe et al. 2007, Garbers, Janner et al. 2011).

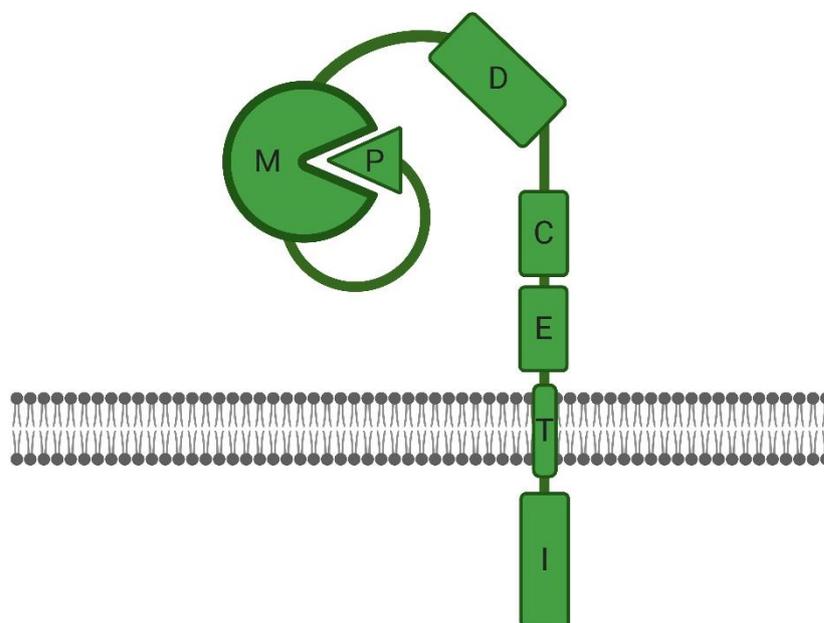
## 4.2. A Disintegrin And Metalloproteinase 17

Die A Disintegrin And Metalloproteinase (ADAM) Proteasesubfamilie enthält etwa 750 Aminosäuren lange, Zn<sup>+</sup>-haltige Metalloendopeptidasen, die zur M12B Adamalysinproteasesubfamilie gemäß der MEROPS Klassifikation (<http://merops.sanger.ac.uk>) (Rawlings, Morton et al. 2008)) gehören. Zu dieser Subfamilie gehören auch die strukturell eng verwandten Klasse PIII *snake venom reprolysins* und die *a disintegrin and metalloproteinases with thrombospondin motifs* (ADAMTSs).

ADAMs sind glykosylierte Typ I Transmembranproteine, die modular aufgebaut sind. Sie besitzen eine Prodomäne, die autoinhibitorisch wirkt und erst bei Prozessierung im Golginetzwerk abgespalten wird. Es folgt eine Metalloproteinasedomäne und dann eine Disintegrindomäne. Disintegrindomänen wurden zuerst bei Schlangengiften beschrieben und

verhindern *in vivo* die Thrombozytenaggregation (Niewiarowski, McLane et al. 1994). Die Disintegrindomäne der ADAMs besteht aus dem 14-17 Aminosäuren langen „*disintegrin loop*“ (Knight, Romano et al. 2007) und vermittelt eine Interaktion mit Integrinen (White 2003). Darauf folgt eine cysteinreiche Domäne und eine *epidermal growth factor* (EGF) - ähnliche Domäne, die sich bei ADAM10 und ADAM17 in der Anzahl der EGF-*repeats* von den anderen Proteasen der ADAM Familie unterscheidet (Janes, Saha et al. 2005). C-terminal schließt sich eine Transmembrandomäne und dann eine hochvariable intrazelluläre Domäne an (s. Abbildung 3).

Im Menschen existieren 21 Gene, die für ADAM Proteasen kodieren (Edwards, Handsley et al. 2008). Jedoch weisen nur 13 Proteine die für die Metzincin-Superfamilie typische Zink-Bindungsstelle auf, die aus dem Aminosäuren Motiv HEXXHXXGXXH und dem C-terminal davon gelegenen *Met-turn* besteht (Bode, Gomisruth et al. 1993). Diese potenziell katalytisch aktiven Enzyme sind ADAM8, 9, 10, 12, 15, 17, 19, 20, 21, 28, 30, 33 und ADAMDEC1.



**Abbildung 3: Schematischer Aufbau von ADAMs**

Schematische Darstellung des modularen Aufbaus von Proteinen aus der ADAM Familie. P: Prodomäne, M: Metalloproteinase Domäne, D: Disintegrin Domäne, C: Cysteinreiche Domäne, E: EGF-ähnliche Domäne, T: Transmembrandomäne, I: Intrazelluläre Domäne.

Das in dieser Arbeit hauptsächlich betrachtete ADAM17 gehört zu den katalytisch aktiven ADAMs und findet seine Funktion vor allem im *ectodomain shedding*. Es wurde im Zusammenhang mit der Freisetzung von sTNF aus tmTNF zuerst als *tumor necrosis factor- $\alpha$  converting enzyme* (TACE) beschrieben (Black, Rauch et al. 1997, Moss, Jin et al. 1997). Später wurde es der Gruppe der ADAM Proteasen zugeordnet. Im Laufe der Zeit wurde eine Vielzahl von ADAM17 Substraten entdeckt. So spaltet es nicht nur Zytokine, wie TNF, sondern auch Zytokinrezeptoren (z.B. IL-6R (Chalaris, Rabe et al. 2007), TNFR (Peschon, Slack et al. 1998, Reddy, Slack et al. 2000)), Adhäsionsmoleküle und ErbB-Liganden (Edwards, Handsley et al. 2008). Für eine umfassendere Darstellung der ADAM17-Substrate s. Edwards, Handsley et al. (2008). ADAM17 spielt aufgrund seines weiten Substratprofils eine wichtige Rolle in vielen physiologischen und pathologischen Prozessen wie Immunantwort, Inflammation, Gewebsregeneration und Tumorgenese (Scheller, Chalaris et al. 2011) sowie in Erkrankungen verschiedener Organe (Gooz 2010).

## **4.2.1. ADAM17 - vielfältige Funktionen *in vivo***

### **4.2.1.1. *Ectodomain shedding***

Die prominenteste Funktion von ADAM17 ist die z.B. durch Proteinkinase C (PKC) nach Stimulation mit Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA) ausgelöste regulierte Proteolyse von Transmembranproteinen. Dieser Vorgang wird *ectodomain shedding* genannt und beschreibt einen Mechanismus, bei dem ein Transmembranprotein geschnitten wird. Hierbei wird die Transmembrandomäne gegebenenfalls durch *regulated intramembrane proteolysis* (RIP) weiter prozessiert. Der Effekt der löslichen, extrazellulären Domäne hängt vom Charakter des Transmembranproteins ab. Ist die extrazelluläre Domäne des Substrates beispielsweise ein funktionales, lösliches Zytokin (wie TNF) kann es zu auto- oder parakrinen Effekten kommen (Scheller, Chalaris et al. 2011). Falls ein Zytokinrezeptor freigesetzt wird ist auch ein entgegengesetzter Effekt möglich, da die Signaltransduktion beendet oder verhindert werden kann. Außerdem können große Mengen von proteolytisch gespaltenem Rezeptor einen *decoy* Effekt bewirken. Dieser trägt zum Beispiel zur Immunevasion und zur Resistenzbildung von Tumorzellen bei (Brodowicz, Wiltschke et al. 1997, Munoz, Yannone et al. 2019).

#### 4.2.1.2. *Regulated intramembrane proteolysis (RIP)*

Für bestimmte Substrate von ADAM17 wie Notch, *β-amyloid precursor protein (APP)* und einige ErbB-Liganden ist neben dem *ectodomain shedding* auch RIP nachgewiesen. Hierbei wird nach Abtrennung der extrazellulären Domäne die Transmembrandomäne geschnitten (im Fall von Notch (Six, Ndiaye et al. 2003) und APP (Buxbaum, Liu et al. 1998) durch Presenilin). Die intrazelluläre Domäne dient als Signaltransduktor und wird in den Nukleus transferiert. Dort kann sie die Transkription verschiedener Gene regulieren.

#### 4.2.2. Regulation von ADAMs

Initial dient die Prodomäne von ADAM17 als Inhibitor (Gonzales, Solomon et al. 2004, Wang, Herrera et al. 2009). Im Trans-Golginetzwerk wird sie durch Furin abgeschnitten und es kommt zur Disinhibition von ADAM17 (Schlondorff, Becherer et al. 2000). Das Enzym ist nun potenziell aktiv und kann induziert werden. Während der Passage des Golginetzwerkes wird ADAM17 in *lipid rafts* verpackt (Tellier, Canault et al. 2006) und nach Prozessierung der Prodomäne und Vollendung des „Reifungsprozesses“ vor allem intrazellulär, perinukleär gespeichert (Schlondorff, Becherer et al. 2000). Diese submembranöse „stand-by“ Position von aktivem ADAM17 kann als Form der Regulation angesehen werden, da Enzym und Substrat räumlich voneinander getrennt sind.

Eine „Induktion der ADAM17 Aktivität“ wie zum Beispiel durch PKC nach Stimulation mit PMA führt zum Transport von ADAM17 in die Zellmembran, wo es zu *ectodomain shedding* und RIP kommt. Im Anschluss wird ADAM17 internalisiert. Physiologische *Stimuli*, die zu katalytischer Aktivität von ADAM17 führen, sind unter anderem Thrombin, Lysophosphatidsäure (LPA), TNF, EGF (Le Gall, Maretzky et al. 2010) und Caspase 3 im Falle einer Apoptose (Chalaris, Rabe et al. 2007).

*In vivo* existiert eine Klasse von inhibitorischen Regulatoren namens *Tissue Inhibitors of metalloproteinases (TIMP)*. Dieser Familie gehören beim Menschen die Proteine TIMP1 bis TIMP4 an, wobei ADAM17 vor allem durch TIMP3 inhibiert wird. Weitere Erläuterungen zu TIMPs finden sich in Abschnitt 4.3.

### 4.2.3. Die Rolle von ADAM17 in physiologischen Prozessen

ADAM17 spielt eine wichtige Rolle in der embryonalen Entwicklung. Mäuse mit einer Deletion der Zink Bindestelle (ADAM17<sup>ΔZN/ΔZN</sup>) sind nicht lebensfähig und sterben zwischen Tag 17,5 der embryonalen Entwicklung und der Geburt (Peschon, Slack et al. 1998). Todesursache sind Defekte in Lunge (Zhao, Chen et al. 2001) und Plazenta. Des Weiteren finden sich bei den Tieren Dysregulationen bei der Entwicklung von Haaren, Haut, Augen und Organen. Die Herzen der Tiere weisen eine Hyperplasie (Shi, Chen et al. 2003) und verdickte Herzklappen (Jackson, Qiu et al. 2003) auf. Die Ähnlichkeit der Phänotypen von ADAM17<sup>ΔZN/ΔZN</sup> mit EGF Rezeptor (EGFR) und ErbB-Liganden defizienten Mäuse lässt den Schluss zu, dass die Entwicklungsdefizite sich überwiegend auf eine gestörte oder fehlende Aktivierung des EGFR zurückführen lassen (Blobel 2005).

ADAM17 ist für das *ectodomain shedding* diverser ErbB Liganden wie *Transforming growth factor α* (TGFα) (Peschon, Slack et al. 1998, Althoff, Mullberg et al. 2001, Borrell-Pages, Rojo et al. 2003, Sahin, Weskamp et al. 2004, Kenny and Bissell 2007), *Heparin binding EGF-like growth factor* (HB-EGF) (Merlos-Suarez, Ruiz-Paz et al. 2001, Sahin, Weskamp et al. 2004), Amphiregulin (AREG) (Sunnarborg, Hinkle et al. 2002) und Neuregulin (NRG1) (Montero, Yuste et al. 2000, Fleck, van Bebber et al. 2013) verantwortlich. Es nimmt somit in der Aktivierung von EGFR eine Schlüsselrolle ein. Mäuse zeigen bei Verlust der ADAM17 Aktivität einen vollständigen Verlust von ErbB-*signaling* (Chalaris, Adam et al. 2010).

Aufgrund der hohen Relevanz des *ectodomain shedding* für die proinflammatorischen Signalkomplexe verschiedener Zytokine wie IL-6 und TNF gilt ADAM17 als wichtiger Kontrollpunkt in der Immunantwort (Scheller, Chalaris et al. 2011). Es ist die Hauptsheddase des Adhäsionsmoleküls L-Selectin, welches Migration und Infiltration von neutrophilen Granulozyten und aktivierten Lymphozyten reguliert (Venturi, Tu et al. 2003, Smalley and Ley 2005). Andererseits vermittelt es aber auch wichtige regenerative und antiapoptotische Effekte vor allem über das ErbB-Liganden *shedding*.

---

## 4.2.4. ADAM17 Pathologien

### 4.2.4.1. Kardiovaskuläre Erkrankungen

Bei Patienten mit Myokarditis korrelieren die ADAM17 und TNF Konzentrationen im Serum negativ mit der linksventrikulären systolischen Funktion (Satoh, Nakamura et al. 2000). Im akuten Myokardinfarkt sind hohe Expressionslevel von ADAM17 in peripheren mononukleären Zellen mit Komplikationen wie rezidivierenden, malignen, ventrikulären Arrhythmien und Herzversagen assoziiert (Shimoda, Satoh et al. 2005). In Tierversuchen mit hypertonen Ratten konnte außerdem gezeigt werden, dass eine ADAM17 Inhibition mittels RNA-Interferenz kardiale Hypertrophie und Fibrose verhindert (Wang, Oka et al. 2009).

### 4.2.4.2. Inflammatorische Prozesse

Entzündliche Prozesse sind gekennzeichnet durch erhöhte Konzentrationen von Zytokinen wie TNF, IL-6 und IL-1. Für die entzündungsfördernden Effekte von TNF und IL-6 ist das ADAM17 vermittelte *ectodomain shedding* ein Schlüsselmechanismus und auch in der Regulation der IL-1 Aktivität spielt ADAM17 eine Rolle (Uchikawa, Yoda et al. 2015).

Beim IL-6 *signaling* verschiebt ADAM17 durch *shedding* des tmIL-6R das Gleichgewicht auf Kosten des *classic signaling* zum *trans-signaling* (Jones, Scheller et al. 2011, Scheller, Chalaris et al. 2011, Baran, Nitz et al. 2013). Dies führt zum Beispiel bei experimenteller Colitis sowie Morbus Crohn zu T-Zellen, die gegen Apoptose resistent sind (Atreya, Mudter et al. 2000). tmTNF wird erst durch ADAM17 *shedding* proinflammatorisch aktiv. Es spielt dann eine wichtige Rolle in verschiedensten entzündlichen Erkrankungen wie Osteoarthritis (Patel, Attur et al. 1998, Amin 1999), rheumatoider Arthritis (Ohta, Harigai et al. 2001, Charbonneau, Harper et al. 2007), endotoxischem Schock und Sepsis (Mohler, Sleath et al. 1994, Tsuji, Oki et al. 2002, Horiuchi, Kimura et al. 2007). Außerdem wurden erhöhte ADAM17 Konzentrationen bei Psoriasis (Moriyama, Tsukida et al. 2004, Kawaguchi, Mitsuhashi et al. 2005) und entzündlichen Lungenerkrankungen (Gomez, Sokol et al. 2005, Ju, Xia et al. 2007) nachgewiesen.

In verschiedenen Zellpopulationen von Patienten mit aktiver Multipler Sklerose (MS) wurde eine erhöhte ADAM17 Aktivität nachgewiesen (Seifert, Kieseier et al. 2002,

Kieseier, Pischel et al. 2003, Plumb, McQuaid et al. 2006). Verantwortlich für die Symptomatik ist TNF. Interessanterweise wurde bei der experimentellen autoimmunen Encephalomyelitis, einem Mausmodell der MS, ein entzündungshemmender Effekt von tmTNF entdeckt (Alexopoulou, Kranidioti et al. 2006). Dieser könnte erklären warum TNF Blocker den Zustand von MS-Patienten verschlechtern bzw. MS ähnliche Syndrome provozieren, da sie auch das tmTNF *signaling* verhindern. (Thomas, Weinshenker et al. 2004, Feldmann and Steinman 2005). TNF Blocker sind deshalb bei MS Patienten kontraindiziert.

In manchen Erkrankungen vermittelt eine erhöhte ADAM17 Aktivität auch protektive Effekte. Ein Beispiel für eine solche Erkrankung ist Morbus Alzheimer. ADAM17 wirkt als  $\alpha$ -Sekretase für APP und produziert das lösliche, nicht amyloide Fragment APP $\alpha$  (Allinson, Parkin et al. 2003). Wird APP aber durch eine  $\beta$ -Sekretase geschnitten bildet sich das amyloide A $\beta$  Peptid, welches entzündungsfördernd wirkt und zur Aktivierung von Mikroglia und Astrozyten in der Nähe der amyloiden Plaques führt (Sastre, Walter et al. 2008).

#### **4.2.4.3. Tumorentstehung, -progression und -migration**

Viele Tumoren sind in ihrer Progression obligat auf ErbB-Signalwege und damit auf ADAM17 vermitteltes *ectodomain shedding* angewiesen (Hanahan and Weinberg 2000, Gooz 2010). Übereinstimmend lässt sich auch in vielen Tumoren eine Überexpression von ADAM17 nachweisen (Arribas, Bech-Serra et al. 2006).

Am Beispiel von Mammakarzinomzellen wird deutlich, dass ADAM17 eine mehrschichtige Rolle in der Tumorprogression spielt. Zum einen können Her2 positive Tumorzellen dem anti-Her2 Antikörper Herceptin entgehen, indem große Mengen Her2 Rezeptor mittels *shedding* von der Zelloberfläche entfernt werden. Die löslichen Her2 Rezeptoren sättigen die Antikörper vor Bindung an die Zelle ab und es kommt zu keinem Effekt (Brodowicz, Wiltschke et al. 1997). Zum anderen induziert an die Tumorzelle gebundenes Herceptin über PKB Inhibition die ADAM17 Aktivität und es kommt in der Folge zum *ectodomain shedding* von anderen ErbB-Liganden, wodurch die Tumorblokade umgangen wird (Gijzen, King et al. 2010).

### 4.3. *Tissue inhibitors of metalloproteinases*

*Tissue inhibitors of metalloproteinases* (TIMPs) sind physiologisch vorkommende Regulatoren von Matrix Metalloproteinasen (MMP) und anderen Metalloendopeptidasen wie zum Beispiel ADAMs. Bei Säugetieren existieren vier Mitglieder dieser Familie, TIMP1 (Docherty, Lyons et al. 1985, Gasson, Golde et al. 1985), TIMP2 (Stetler-Stevenson, Brown et al. 1990), TIMP3 (Pavloff, Staskus et al. 1992) und TIMP4 (Greene, Wang et al. 1996), die unterschiedliche Substratprofile und Affinitäten aufweisen.

Alle vier Säugetier-TIMPs weisen eine N-terminale Domäne mit etwa 125 Aminosäuren und eine C-terminale Domäne mit etwa 65 Aminosäuren auf. Beide Domänen werden durch jeweils drei Cystin-Brücken stabilisiert (Williamson, Marston et al. 1990). Die N-terminale Domäne kann experimentell auch ohne die C-terminale Domäne exprimiert werden. Die entstehenden Proteine werden N-TIMPs genannt und behalten ihre volle inhibitorische Aktivität (Murphy, Houbrechts et al. 1991, Williamson, Bartels et al. 1994, Huang, Suzuki et al. 1996).

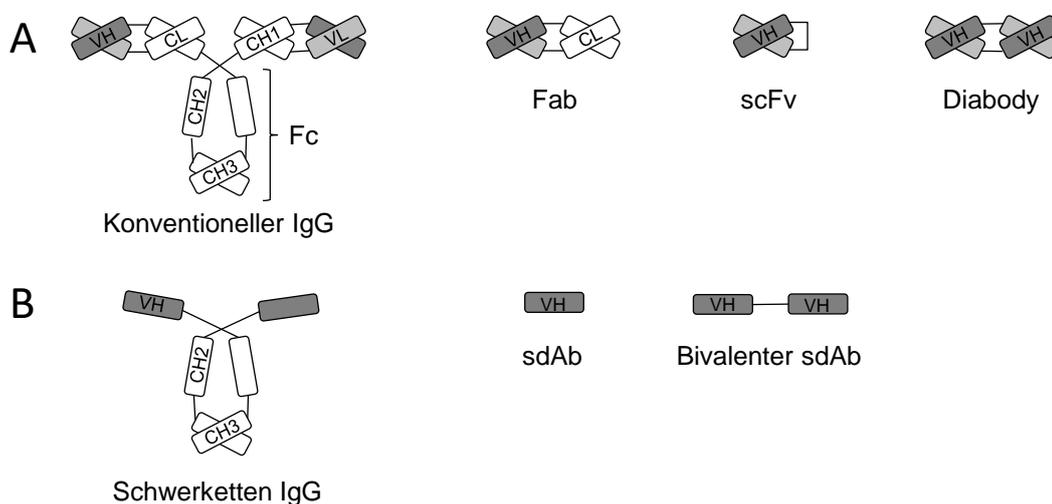
In dieser Arbeit sind vor allem TIMP1 und TIMP3 sowie ihre inhibitorischen Effekte gegenüber ADAMs Gegenstand der Betrachtung. TIMP3 hat gegenüber TIMP1 ein deutlich breiteres Inhibitionsspektrum und hemmt neben diversen MMPs ADAM17 (Amour, Slocombe et al. 1998), ADAMTSs (Kashiwagi, Tortorella et al. 2001), ADAM10 (Amour, Knight et al. 2000), ADAM12 (Jacobsen, Visse et al. 2008), ADAM28 und ADAM33 (Edwards, Handsley et al. 2008), wohingegen TIMP1 nur ADAM10 zu inhibieren vermag (Amour, Knight et al. 2000). Interessanterweise sind weder N-TIMP1 noch N-TIMP3 zur ADAM10 Inhibition in der Lage (Rapti, Atkinson et al. 2008). Im Gegensatz zu TIMP1, TIMP2 und TIMP4, die als lösliche Proteine sezerniert werden, bindet TIMP3 Bestandteile der extrazellulären Matrix (EZM) (Blenis and Hawkes 1983, Blenis and Hawkes 1984, Lee, Atkinson et al. 2007).

Es sind Mutationen beschrieben worden, mit deren Hilfe N-TIMP1 eine vergleichbare Aktivität wie N-TIMP3 zur katalytischen Domäne von ADAM17 (cdADAM17) gewinnt (Lee, Maskos et al. 2002, Lee, Rapti et al. 2004). N-TIMP1(V4S, TIMP3AB, V69L, T98L) bindet aber im Gegensatz zu N-TIMP3 nicht an die EZM.

## 4.4. Einzeldomänenantikörper und Peptide

Antikörper sind Proteine, die bestimmte, charakteristische Strukturen anderer Moleküle erkennen und diese hochaffin binden können. Sie werden beim Menschen von B-Zellen produziert und dem erworbenen Immunsystem zugerechnet. Es gibt verschiedene Klassen von Antikörpern. Alle bestehen aus schweren und leichten Ketten und jede Kette hat sowohl eine variable Domäne, die das Epitop des zu erkennenden Moleküls bindet und eine bzw. drei konstante Domäne(n), die z.B. den Immunglobulin G Rezeptor (IgGR) oder Komplementfaktoren binden kann/können (s. Abbildung 4).

Sowohl isolierte leichte (Yoo, Roholt et al. 1967) als auch schwere (Utsumi and Karush 1964) Ketten können Antigene binden. Allerdings weisen sie eine im Vergleich zu vollständigen Antikörpern stark verringerte Affinität und Löslichkeit auf (Ward, Gussow et al. 1989). Die kombinierten variablen Domänen von leichter und schwerer Kette können als scFv oder Fab-Fragment hergestellt werden und binden Antigene deutlich besser als die einzelnen Ketten (Sundberg and Mariuzza 2002). Allerdings ist die Produktion dieser Moleküle schwierig, da die Fragmente der beiden Ketten miteinander paaren müssen. Ein



**Abbildung 4: Schematische Darstellung von konventionellen (A) und Schwerketten (B) IgGs und darauf basierenden Fragmenten**

Variable Domänen, die sich von der leichten (VL) bzw. der schweren (VH) Kette der Antikörper ableiten sind hell- bzw. dunkelgrau gefärbt. Konstante Domänen sind weiß. Beim Schwerketten IgG fehlen die CH1 Domäne und die leichte Kette vollständig. Antikörper Domänen, die über nicht-kovalente Bindungen verknüpft sind, sind überlappend dargestellt.

weiterer Fortschritt war die Entdeckung der *heavy chain antibodies* bei *camelidae* (Hamers-Casterman, Atarhouch et al. 1993), denen die leichte Kette und die CH1 Domäne fehlt. Die N-terminale, variable Domäne dieser *heavy chain antibodies* kann auch als Einzeldomänenantikörper (*single domain antibody*, sdAb, auch VHH oder nanobody®) vorkommen und ist in der Antigenbindung nicht auf Dimerisierung angewiesen. Die Affinitäten der sdAbs zu ihren jeweiligen Substraten liegen im niedrigen nanomolaren Bereich und sind vergleichbar mit denen von IgG-Antikörpern (Lauwereys, Arbabi Ghahroudi et al. 1998).

Die Vorteile der Nutzung von sdAbs gegenüber anderen Antikörperfragmenten und klassischen Antikörpern sind vielfältig. sdAbs weisen eine gute Wasserlöslichkeit (Conrath, Vincke et al. 2005) und Hitzestabilität (van der Linden, Frenken et al. 1999) auf. Es zeigte sich, dass in manchen Einsatzbereichen multivalente Antikörper Vorteile gegenüber klassischen divalenten Antikörpern besitzen. Die Herstellung derartiger Moleküle ist zwar auch mit anderen Antikörperstrukturen wie scFv Fragmenten möglich, aber mit Problemen wie *domain mispairing* und Aggregation behaftet. Die Herstellung aus sdAbs weist diese Probleme aufgrund der besonderen Struktur der sdAbs nicht auf (Glockshuber, Malia et al. 1990, Whitlow, Bell et al. 1993). Es werden Epitope erschlossen, die durch herkömmliche Antikörper nicht erkannt werden können (Lauwereys, Arbabi Ghahroudi et al. 1998, Stijlemans, Conrath et al. 2004) und auf Grund ihrer Größe von nur etwa 15 kDa sind sdAbs sehr gut gewebsgängig. Sie werden zwar auch schnell renal eliminiert (Cortez-Retamozo, Lauwereys et al. 2002), ihre Plasmahalbwertszeit kann aber z.B. durch Kopplung an ELPs (Conrad, Plagmann et al. 2011), PEGylierung oder Bindung an andere Polymere verlängert werden (van Witteloostuijn, Pedersen et al. 2016). Ein großer technischer Vorteil ist die erleichterte Produktion von sdAbs in großen Mengen. Klassische Antikörper müssen in eukaryotischen Zellen produziert werden, sdAbs dagegen können in mikrobiellen Systemen wie in *E.coli* (Rahbarizadeh, Rasaee et al. 2005), *filamentous funghi* (Joosten, Roelofs et al. 2005) und Hefen (Thomassen, Meijer et al. 2002, Rahbarizadeh, Rasaee et al. 2006)) hergestellt werden. Dies führt zu einer beschleunigten Produktion und größerer Ausbeute.

In der vorliegenden Arbeit wurden sdAbs gegen IL-6R (Kolkman and Beirnaert 2008) und gegen TNF (Giersberg, Floss et al. 2010, Conrad, Plagmann et al. 2011) verwendet.

Eine andere interessante Methode um spezifisch Epitope, wie zum Beispiel Oberflächenproteine von Tumoren, zu binden, ist es, kleine Bindepeptide zu benutzen (Liu, Li et al. 2017). Solche Peptide existieren beispielsweise für den IL-6R (Su, Lai et al. 2005). Die beschriebenen IL-6R Bindeproteine bestehen aus jeweils sieben Aminosäuren und binden mit Affinitäten im niedrigen nanomolaren Bereich an den IL-6R (Li, Zhang et al. 2016). Es gibt unter den beschriebenen Peptiden sowohl neutralisierende, d.h. die Signaltransduktion unterbindende, als auch nicht neutralisierende (Su, Lai et al. 2005).

## **4.5. Klinische und präklinische Entzündungshemmung in der Praxis**

In der klinischen Praxis spielen entzündungshemmende Medikamente eine große Rolle. Viele verschiedene Wirkstoffklassen sind etabliert und zugelassen. Die bekannteste Gruppe der entzündungshemmenden Medikamente sind sicherlich die nicht-steroidalen Antirheumatika/Antiphlogistika (NSAR, NSAIDS), die über eine Inhibition der Cyclooxygenasen 1 und 2 wirken. Stärkeren Einfluss auf Inflammation und Aktivität des Immunsystems nehmen Medikamente wie Methotrexat und Kortison. In schwer zu beherrschenden chronischen Entzündungszuständen können Immunsuppressiva wie Azathioprin, Cyclophosphamid oder Cyclosporin A zum Einsatz kommen.

Generell gilt, je unspezifischer der Wirkmechanismus eines Medikamentes ist, desto breiter ist das Nebenwirkungsspektrum. Die Grundannahme modernen *drug designs* ist es, dass ein hypothetisches, maximal spezifisches Medikament keine Nebenwirkungen und dosisabhängig auch keine unerwünschten Wirkungen zeigen sollte.

Eine wichtige neuere Klasse von antiinflammatorischen Medikamenten stellen monoklonale Antikörper, wie zum Beispiel die TNF-spezifischen, inhibitorischen Antikörper Infliximab oder Adalimumab, und Rezeptorfusionsproteine wie Etanercept oder Abatacept dar. Diese Rezeptorfusionsproteine sind nicht *signaling*-fähige sogenannte *decoy*-Rezeptoren, die lösliches TNF binden und so kompetitiv die Signaltransduktion verhindern. (Zalevsky, Secher et al. 2007).

Besondere Relevanz im Kontext dieser Arbeit hat der IL-6 Inhibitor Tocilizumab, der 2009 in Europa und 2010 in den USA zugelassen wurde und erstmalig die IL-6 Signaltransduktion als Ziel therapeutischer Intervention in der Klinik verfügbar machte (Sheppard, Laskou et al. 2017). Mit fortschreitender Aufklärung der IL-6 vermittelten pleiotropen Regulations- und Effektorprozesse ergab sich ein Verständnis dafür, dass ein Teil der unerwünschten Wirkungen einer Tocilizumab Therapie, wie zum Beispiel die erhöhte Anfälligkeit für bakterielle Infektionen oder die Verschlechterung des Lipidprofils wohl auf Inhibition des *classic signaling* zurückzuführen sind (Rose-John 2012). Eine spezifische IL-6 *trans-signaling* Inhibition wäre deshalb in der klinischen Praxis wünschenswert.

Eine Weiterentwicklung im Bereich der Biologicals stellen die sdAbs dar. Eines dieser auf sdAbs beruhenden Medikamente ist Vobarilizumab (ALX-0061), das in Phase II Studien auf seine Eignung als Therapeutikum der rheumatoiden Arthritis und des systemischen Lupus erythematoses getestet wurde (NCT02309359, NCT02287922, NCT02437890, NCT02518620). Es handelt sich um einen bivalenten Antikörper, bei dem ein neutralisierender sdAb gegen IL-6R ist mit einem sdAb gegen humanes Serumalbumin (HSA) verknüpft ist. Der anti-HSA sdAb vermittelt hierbei eine erhöhte Plasmahalbwertszeit, während der anti-IL-6R sdAb die spezifische Wirkung vermittelt. Auch Vobarilizumab hemmt genau wie Tocilizumab sowohl *classic* als auch *trans-signaling* (Van Roy, Ververken et al. 2015). Weitere sdAbs in klinischen Studien sind zum Beispiel Ozoralizumab (ATN-103), ein anti-TNF sdAb zur Behandlung der rheumatoiden Arthritis, der verschiedene Phase I und II Studien durchlaufen hat (NCT00916110, NCT01007175, NCT00959036, NCT01063803), ALX-0171, der zur Behandlung von RSV bedingten Infektionen der Atemwege eingesetzt werden soll und ebenfalls in mehreren Phase I und II Studien getestet wurde (NCT01483911, NCT01875926, NCT01909843, NCT02309320, NCT02979431, NCT03418571, NCT03468829) und andere (Jovcevska and Muyldermans 2020).

Caplacizumab (ALX-0681), ein sdAb gegen den von-Willebrand Faktor, ist das erste Medikament aus der Gruppe der sdAbs, das am 3. September 2018 zur Therapie der Thrombotisch-thrombozytopenischen Purpura in Europa zugelassen wurde (Duggan 2018).

Ein spezifischer Ansatz zur Inhibition von IL-6 *trans-signaling* existiert in Form eines löslichen gp130 Fc-Fusionsprotein (sgp130Fc), das sich derzeit in Phase II Studien befindet. Im Gegensatz zu Tocilizumab, welches sowohl membrangebundenen und löslichen IL-6R bindet und damit IL-6 *classic* und *trans-signaling* inhibiert (Nishimoto, Kanakura et al. 2005) bindet das lösliche gp130 nur an einen präformierten Komplex aus sIL-6R und IL-6 und inhibiert dementsprechend ausschließlich *trans-signaling* (Jostock, Mullberg et al. 2001). Nachdem in Tierversuchen gezeigt wurde, dass sgp130 Fc zu einem positiven *outcome* bei experimenteller Arthritis (Nowell, Richards et al. 2003), Peritonitis (Hurst, Wilkinson et al. 2001), entzündlichen Darmerkrankungen (Atreya, Mudter et al. 2000) und Kolonkarzinomen (Becker, Fantini et al. 2004) führt, wurden klinische Studien eingeleitet und erste Experimente am Menschen durchgeführt. Die wichtigste Frage bleibt ob sgp130 Fc einen klinischen Vorteil gegenüber zum Beispiel Tocilizumab haben wird.

Mit zunehmendem Verständnis und zunehmender Strukturaufklärung von Zytokinrezeptoren, den sich formierenden Zytokin/Rezeptor Komplexen und den nachfolgenden Signalkaskaden eröffnen sich neue Ansätze für die Erstellung synthetischer Fusionsproteine zur Behandlung verschiedener Erkrankungen. Zur Aktivierung der Signaltransduktion durch Zytokine müssen in der Regel mindestens zwei Rezeptoruntereinheiten durch Bindung des Zytokins an verschiedenen Bindungsstellen dimerisiert werden. Es ist mittlerweile möglich, dominant negative, antagonistische Zytokine herzustellen, die eine höhere Bindungsaffinität für eine Rezeptorbindungsstelle haben aber durch Mutation der zweiten Bindungsstelle nicht zu einer Rezeptordimerisierung führen und somit eine inhibitorische Wirkung auf die Signalkaskade vermitteln (Sporeno, Savino et al. 1996). Ein Beispiel für einen derartigen *super binding cytokine antagonist* ist das zur Therapie der rheumatoiden Arthritis zugelassene Anakinra (Eisenberg, Evans et al. 1990). Ein weiterer Fortschritt war die Etablierung sog. Synthekine, Fusionsproteine, die aus zwei dominant negativen *super binding* Zytokinen bestehen, die je nur eine Rezeptoruntereinheit rekrutieren. Über die Fusion zweier *super binder* kommt es zu einer Rezeptordimerisierung der rekrutierten Rezeptoruntereinheiten und in der Folge zu einer Signaltransduktion (Moraga, Spangler et al. 2017). Es ist mit diesen Synthekinen sowohl möglich, physiologische Rezeptordimerisierung zu forcieren als auch Rezeptoruntereinheiten zu homo- oder heterodimerisieren, die physiologischer Weise nicht zusammenkommen würden und so gezielt neuartige Signalkaskaden zu aktivieren.

Eine weitere neu etablierte Strategie zeigt sich am Beispiel der *chimeric antigen receptor* (CAR) T-Zellen (Si, Li et al. 2018, Scheller, Engelowski et al. 2019), die 2017 in den USA für Patienten unter 25 Jahren mit molekularem oder zytologischem Rezidiv einer akuten lymphoblastischen Leukämie zugelassen wurden. Eine Zulassung von zwei Präparaten (Kymriah<sup>®</sup> und Yescarta<sup>®</sup>) in einem ähnlichen Indikationsrahmen erfolgte in Europa im Jahr 2018 (Ali, Kjekken et al. 2020, Yakoub-Agha, Chabannon et al. 2020). Diese Zellen tragen auf ihrer Zelloberfläche ein anti-CD19 (höhere Expression auf den entarteten B-Zellen) scFv Fragment, das an die Transmembrandomäne sowie die intrazelluläre Domäne und die kostimulatorischen Domänen des T-Zell-Rezeptor gekoppelt ist. Es werden der Patientin oder dem Patienten T-Zellen entnommen, genetisch mit der CAR cDNA modifiziert, expandiert und retransfundiert. Diese genetisch modifizierten T-Zellen sind konsekutiv in der Lage Tumorzellen über die Interaktion des CAR-Rezeptors und der Oberflächenantigene der Tumorzellen zu erkennen und zytotoxisch zu eliminieren.

Eine besondere Herausforderung beim Design synthetischer, zytokinartiger Medikamente ist die pleiotrope Wirkung physiologischer Zytokine *in vivo*. Ein synthetisches Zytokin kann den gewünschten Effekt gegen eine bestimmte Tumorzelle haben und gleichzeitig schwere Nebenwirkungen an *off-site* Zielstrukturen hervorrufen (Michallet, Maloisel et al. 2004, Pachella, Madsen et al. 2015). Ein möglicher Lösungsansatz besteht darin, die Effektorzytokine an affinitätsvermittelnde Strukturen wie zum Beispiel Antikörper oder Peptide zu koppeln (Ndong, Toraya-Brown et al. 2015). Eine andere Möglichkeit ist die Bindung an Nanopartikel oder die lokale Applikation (Zhang, Li et al. 2018).

## 5. Ziel der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit ist es zu untersuchen, ob eine substratspezifische ADAM Inhibition durch neuartige Fusionsproteine aus substratspezifischen Bindestrukturen wie Peptiden oder Einzeldomänenantikörpern (sdAb) mit natürlichen Proteaseinhibitoren wie TIMP1 oder TIMP3 erreicht werden kann. Zu diesem Zweck soll in einem ersten Schritt die Erstellung verschiedener IL-6R spezifischer ADAM17-Inhibitoren erfolgen. Diese müssen kloniert und in Zelllinien exprimiert werden. Wenn die Fusionsproteine in ausreichender Quantität und Qualität produzierbar sind, kann die Wirkung dieses Proteins auf ADAM17 vermitteltes IL-6R *shedding* orientierend eingeschätzt werden, um einen sog. *proof of concept* zu erbringen. In zellulären Assays soll dann überprüft werden, ob die erstellten Inhibitoren in der Lage sind, die Freisetzung von sIL-6R zu verhindern. Erfüllen die Fusionsproteine alle nötigen Kriterien werden die jeweiligen Expressionsplasmide stabil in CHO-K1-Zellen transfiziert werden, um eine größere Proteinausbeute zu erreichen. Die produzierten Fusionsproteine werden dann gereinigt und biochemisch z.B. mittels Konzentrations-/Wirkungskurven untersucht.

Ein weiterer Teil der Arbeit wird die Erstellung komplementärer, TNF spezifischer Fusionsproteine sein. Auf diesem Wege lässt sich ein modularer Aufbau etablieren sowie zeigen, dass die generierten inhibitorischen Proteine spezifisch die Freisetzung eines definierten Substrates verhindern. Auch diese Proteine werden im Verlauf bei vielversprechenden ersten *shedding* Analysen stabil in CHO-K1-Zellen transfiziert, selektiert, produziert und letztlich charakterisiert werden.

## 6. Material und Methoden

### 6.1. Antibiotika

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Antibiotika sind in Tabelle 4 aufgelistet.

**Tabelle 4: Liste der verwendeten Antibiotika**

Antibiotikum	Stammkonzentration	Arbeitskonzentration	Hersteller
Ampicillin	100 mg/ml	Agarplatten: 200 µg/ml Flüssigmedium: 100 µg/ml	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Penicillin G	10.000 U/ml	60 µg/ml	Genaxxon, Ulm
Streptomycin	10 mg/ml	100 µg/ml	Genaxxon, Ulm
Geneticin (G418)	50 mg/ml	variabel	Genaxxon, Ulm

### 6.2. Antikörper

Die Zusammenstellung der verwendeten Antikörper ist in Tabelle 5 und Tabelle 6 aufgeführt.

**Tabelle 5: Liste der verwendeten Primärantikörper**

Antikörper	Beschreibung
$\alpha$ -humaner IL-6R (4-11)	Monoklonaler Antikörper aus der Maus gegen ein Epitop der extrazellulären Domäne 1 des IL-6R, Stammkonzentration: 1 mg/ml  Verwendete Verdünnung 1:1000 (Western Blot und ELISA). Herstellung beschrieben bei Chalaris, Rabe et al. (2007)

Antikörper	Beschreibung
$\alpha$ -humaner IL-6R (BAF 227)	<p>Polyklonaler Antikörper aus der Ziege gegen humanen IL-6R, Stammkonzentration: 0,2 mg/ml</p> <p>Verwendete Verdünnung 1:1000 (ELISA). R&amp;D Systems, Inc, Minneapolis, USA</p>

Tabelle 6: Liste der verwendeten Sekundärantikörper

Antikörper	Beschreibung
$\alpha$ -mouse-POD	<p>ImmunoPure Peroxidase Conjugated Goat Anti-Mouse IgG (H+L), Stammkonzentration: 0,6 mg/ml</p> <p>Verwendete Verdünnung 1:5000 (Western Blot). Thermo Scientific, St. Leon-Rot</p>
$\alpha$ -Fc-POD	<p>Anti-human IgG; Host: Rabbit, Stammkonzentration: 0,6 mg/ml</p> <p>Verwendete Verdünnung 1:5000 (Western Blot). Thermo Scientific, St. Leon-Rot</p>

### 6.3. Chemikalien

In Tabelle 7 sind alle Chemikalien gelistet, die für die vorliegende Arbeit verwendet wurden.

Tabelle 7: Liste der verwendeten Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Acrylamid-Mix 30%	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Agar	AppliChem GmbH, Darmstadt
Agarose	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf

---

<b>Chemikalie</b>	<b>Hersteller</b>
Albumin Fraktion V (8076.3)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat (APS)	Merck KGaA, Darmstadt
Ampicillin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
<i>Bovine Serum Albumin A7030</i>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Brillant-Blau R250	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Citronensäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
<i>Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets (EDTA-free)</i>	Roche Diagnostics, Mannheim
Concanavalin-A-Sepharose	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
dATP	Thermo Scientific, St. Leon-Rot
dCTP	Thermo Scientific, St. Leon-Rot
dGTP	Thermo Scientific, St. Leon-Rot
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck KGaA, Darmstadt
dTTP	Thermo Scientific, St. Leon-Rot
<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)</i>	Thermo Scientific, St. Leon-Rot
Essigsäure	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Ethanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München

<b>Chemikalie</b>	<b>Hersteller</b>
Ethidiumbromid	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Ethylenglycol-bis(aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure (EGTA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Geneticin (G418)	Genaxxon, Ulm, Deutschland
<i>Gibco® fetal bovine serum (FBS)</i>	Thermo Scientific, St. Leon-Rot
<i>Gibco® Ultra-Low IGG fetal bovine serum (FBS)</i>	Thermo Scientific, St. Leon-Rot
Glycerol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Glycin	Merck KGaA, Darmstadt
GW280264X(GW)	Glaxo Smith Kline, Stevenage, UK
Immobilon Western HRP Substrat	Merck KGaA, Darmstadt
Isopropanol	AppliChem GmbH, Darmstadt
Kaliumacetat	Merck KGaA, Darmstadt
Kaliumchlorid	VWR International BVBA
Kaliumchlorid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Kaliumdihydrogenphosphat	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Kaliumhydrogenphosphat	Merck KGaA, Darmstadt
LB-Medium	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
<i>Loading-Dye Solution (6x)</i>	Thermo Scientific, St. Leon-Rot

---

<b>Chemikalie</b>	<b>Hersteller</b>
Magermilchpulver	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Methanol	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumchlorid	AppliChem GmbH, Darmstadt
Natriumcitrat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Natriumhydroxid	Merck KGaA, Darmstadt
Nonidet® P 40 Substitute	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Orange G	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Penicillin	Genaxxon, Ulm
Phorbol 12-myristate 13-acetate(PMA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
POD Substrat	Roche Holding GmbH, Mannheim
Protein A Agarose	Roche Holding GmbH, Mannheim
RNase A	QIAGEN, Hilden
Roswell Park Memorial Institute (RPMI) Medium 1640	Thermo Scientific, St. Leon-Rot
Schwefelsäure	AppliChem GmbH, Darmstadt
Streptavidin-HRP Lösung	R&D Systems, Wiesbaden
Streptomycin	Genaxxon, Ulm
Sucrose	Merck KGaA, Darmstadt

<b>Chemikalie</b>	<b>Hersteller</b>
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich, München
Tris	Bethesda Research Laboratories, USA
Triton X-100	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Trypan Blue Dye, 0,4%	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Trypsin/EDTA (10x)	Genaxxon, Ulm
TurboFect™ Transfektionsreagenz	Thermo Scientific, St. Leon-Rot
Tween-20	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München

## 6.4. Enzyme

Alle in dieser Arbeit verwendeten Enzyme (Polymerasen, Restriktionsenzyme, Ligasen etc.) stammen von der Firma Thermo Scientific, St. Leon-Rot und sind im Folgenden aufgeführt:

BamHI, BglII, BshTI(AgeI), BspTI(AfIII), Cfr42I(SacII), DpnI, Dreamtaq, Eco32I(EcoRV), Eco72I(PmlI), EcoRI, Fast-AP Thermosensitive Alkaline Phosphatase, HincII, HindIII, KpnI, NcoI, NotI, Pfu DNA Polymerase native, Phusion® High-Fidelity DNA-Polymerase, PmlI, Polynucleotide Kinase, PstI, PvuI, ScaI, T4-Ligase.

## 6.5. Plasmide

In Tabelle 8 sind alle in der vorliegenden Dissertation genutzten Plasmide aufgelistet.

Tabelle 8: Liste der verwendeten Plasmide

Name	Beschreibung	Referenz
pcDNA3.1(+)	Expressionsvektor für transiente und stabile Proteinexpression in eukaryotischen Zellen	Thermo Scientific, St. Leon-Rot
pCR-Script Amp SK(+)	Klonierungsvektor, Derivat des pBluescript II SK(+) mit einer <i>SrfI</i> Schnittstelle, um <i>blunt end</i> PCR-Produkte zu ligieren	(Ketteler, Glaser et al. 2002)
pcDNA3.1-IL-6R	pcDNA3.1(+) dessen Insert für IL-6R kodiert	Diese AG
pcDNA3.1-TNF	pcDNA3.1(+) dessen Insert für TNF kodiert	Diese AG
pET-23a- TNF sdAb	pET-23a dessen Insert für den TNF-sdAb kodiert.	Diese AG
pcDNA3.1(+)-TIMP3(1-121)-Linker-Fc	pcDNA3.1(+) dessen Insert für T3(121) kodiert	Diese AG
pcDNA3.1(+)-TIMP3(1-121)-Linker-IL-6R sdAb-Fc	pcDNA3.1(+) dessen Insert für T3I(121) kodiert	Diese AG
pcDNA3.1(+)-TIMP3(1-121)-Linker-TNF sdAb-Fc	pcDNA3.1(+) dessen Insert für T3T(121) kodiert	Diese Arbeit
pcDNA3.1(+)-TIMP3(1-121)-Linker-S1-Fc	pcDNA3.1(+) dessen Insert für T3S1(121) kodiert	Diese Arbeit
pcDNA3.1(+)-TIMP3(1-121)-Linker-S2-Fc	pcDNA3.1(+) dessen Insert für T3S2(121) kodiert	Diese Arbeit
pcDNA3.1(+)-TIMP3(1-121)-Linker-S3-Fc	pcDNA3.1(+) dessen Insert für T3S3(121) kodiert	Diese Arbeit
pcDNA3.1(+)-TIMP3(1-121)-Linker-S4-Fc	pcDNA3.1(+) dessen Insert für T3S4(121) kodiert	Diese Arbeit

<b>Name</b>	<b>Beschreibung</b>	<b>Referenz</b>
pcDNA3.1(+)-TIMP3(1-121)-Linker-S7-Fc	pcDNA3.1(+) dessen Insert für T3S7(121) kodiert	Diese Arbeit
pcDNA3.1(+)-TIMP3(1-121)-Linker-S <sub>x</sub> 1-Fc	pcDNA3.1(+) dessen Insert für T3S <sub>x</sub> 1(121) kodiert	Diese Arbeit
pcDNA3.1(+)-TIMP3(1-121)-Linker-S <sub>x</sub> 2-Fc	pcDNA3.1(+) dessen Insert für T3S <sub>x</sub> 2(121) kodiert	Diese Arbeit
pcDNA3.1(+)-TIMP3(1-120)-Linker-Fc	pcDNA3.1(+) dessen Insert für T3(120) kodiert	Diese Arbeit
pcDNA3.1(+)-TIMP3(1-120)-Linker-IL-6R sdAb-Fc	pcDNA3.1(+) dessen Insert für T3I(120) kodiert	Diese Arbeit
pcDNA3.1(+)-TIMP3(1-120)-Linker-TNF sdAb-Fc	pcDNA3.1(+) dessen Insert für T3T(120) kodiert	Diese Arbeit
pcDNA3.1(+)-TIMP3(1-120)-Linker-TEV-Fc	pcDNA3.1(+) dessen Insert für T3(120TEV) kodiert	Diese Arbeit
pcDNA3.1(+)-TIMP3(1-120)-Linker-IL-6R sdAb -TEV-Fc	pcDNA3.1(+) dessen Insert für T3I(120TEV) kodiert	Diese Arbeit
pcDNA3.1(+)-TIMP3(full length wt)	pcDNA3.1(+) dessen Insert für TIMP3 (fl, wt) kodiert	Diese Arbeit
PMA-T-TIMP1(V4S, TIMP3AB, V69L, T98L)	Klonierungsvektor, dessen Insert für ein TIMP1 Variante mit den Mutationen V4S, TIMP3AB, V69L und T98L kodiert	Thermo Scientific, St. Leon-Rot
pcDNA3.1(+)-TIMP1(V4S, TIMP3AB, V69L, T98L)(fl)-Linker-Fc	pcDNA3.1(+) dessen Insert für T1(fl M) kodiert	Diese Arbeit
pcDNA3.1(+)-TIMP1(V4S, TIMP3AB, V69L, T98L)(fl)-Linker-IL-6R sdAb-Fc	pcDNA3.1(+) dessen Insert für T1I(fl M) kodiert	Diese Arbeit
pcDNA3.1(+)-TIMP1(V4S, TIMP3AB, V69L, T98L)(fl)-Linker-TNF sdAb-Fc	pcDNA3.1(+) dessen Insert für T1T(fl M) kodiert	Diese Arbeit

Name	Beschreibung	Referenz
pPCR-script- TIMP1(V4S, TIMP3AB, V69L, T98L)(1-120)	Klonierungsvektor dessen Insert für die ersten 120 AS von TIMP1 (V4S, TIMP3AB, V69L, T98L) kodiert	Diese Arbeit
pcDNA3.1(+)-TIMP1(V4S, TIMP3AB, V69L, T98L)(1-120)-Linker-Fc	pcDNA3.1(+) dessen Insert für T1(120M) kodiert	Diese Arbeit
pcDNA3.1(+)-TIMP1(V4S, TIMP3AB, V69L, T98L) (1-120)-Linker-IL-6R sdAb-Fc	pcDNA3.1(+) dessen Insert für T1I(120M) kodiert	Diese Arbeit
pcDNA3.1(+)-TIMP1(V4S, TIMP3AB, V69L, T98L) (1-120)-Linker-TNF sdAb-Fc	pcDNA3.1(+) dessen Insert für T1T(120M) kodiert	Diese Arbeit

## 6.6. Oligonukleotide

Für die Klonierung wurden Oligonukleotide der Firma Eurofins MWG Operon GmbH, Ebersberg verwendet. Eine Übersicht dieser findet sich in Tabelle 9.

**Tabelle 9: Liste der verwendeten Oligonukleotide**

Primer	Sequenz (5' → 3')
mIL-11R fw	5'-AAACTTAAGGTACCATGAGCAGCACTGCTCAGG-3'
mIL-11R rev	5'-AAACTCGAGCGCCGCTAGCTGAAGTTCTCTGGGGTC-3'
mgp130 fw	5'-AAACTTAAGGTACCATGTCAGCACCAAGGA-3'
mgp130 rev	5'-AAACTCGAGCGCCGCTACTGCGGCATGTAGCCACCT-3'
TNF_VH_fw	5'-GCGGCCGCACAAGTTCAGCTTCAAGAATCTGGT-3'
TNF_VH_rev	5'-GTTTCTTCTGCCGCGGCCGC-3'
EcoRI(3147) rv	5'-GGAGAACCTGCGTGCAATCC-3'

<b>Primer</b>	<b>Sequenz (5' → 3')</b>
EcoRI(5227) fw	5'-GCAATAGCATCCCAAATTCAC-3'
TIMP3fl fw	5'-CACGTG TTAAACACCATGACCCCTTGGCTCGGGC-3'
TIMP3fl rev	5'-CATCATCAATGCCACAGACCCCGGTACCCTCGAG-3'
M13 rev	5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'
S1fw	5'-AATTCGCTGAGCCTGATGCCGCGCCTGTTCG-3'
S1rev	5'-GCCAGGCGCGGCATCAGGCTCAGAGCTTA-3'
S2fw	5'-AATTCGAACCCGATGATGCGCCCGCTGTTCG-3'
S2rev	5'-GCCAGCGGGCGCATCATCGGGTTAGCTTA-3'
S3fw	5'-CGCAGATGCGCACCAACCATTCGCTCG-3'
S3 rev	5'-GCGAATGGTGGTGCATCTGAGCTTA-3'
S4fw	5'-AATTCGCGCCTGATGATGCTGCAGCAGTCG-3'
S4rev	5'-GCCTGCTGCAGCATCATCAGGCGAGCTTA-3'
S7fw	5'-AATTCGCTGAGCCTGATTACCCGCCTGTTCG-3'
S7rev	5'-GCCAGGCGGGTAATCAGGCTCAGAGCTTA-3'
TIMP3flrevXho	5'-CTCGAGGGGTCTGTGGCATTGATGATG-3'
S1fw	5'-AATTCGCTGAGCCTGATGCCGCGCCTGGCG-3'
S1 rev	5'-AATTCGCCAGGCGCGGCATCAGGCTCAGCG-3'
S2fw	5'-AATTCGAACCCGATGATGCGCCCGCTCGGG-3'

<b>Primer</b>	<b>Sequenz (5' → 3')</b>
S2 rev	5'-AATTCCCGAGCGGGCGCATCATCGGGTTCG-3'
S3fw	5'-AATTCGCAGATGCGCACACCATTTCGCGGG-3'
S3 rev	5'-AATTCCCGCGAATGGTGGTGCATCTGCG-3'
S4fw	5'-AATTCGCGCCTGATGATGCTGCAGCAGGGG-3'
S7fw	5'-AATTCGCTGAGCCTGATTACCCGCCTGGGG-3'
TNF_ sdAb_fw	5'-CTGCGCGGCCGCAAGAGTTCAGATCC-3'
TNF_ sdAb_rev	5'-GGATCTGAACTCTTGC GGCCGCGCAG-3'
S4rev	5'-AATCCCCTGCTGCAGCATCATCAGGCGCG-3'
S7rev	5'-AATTCGCCAGGCGGGTAATCAGGCTCAGCG-3'
T7fw	5'-CCCCAGGCGGGTAATCAGGCTCAGCG-3'
T3fwdeltaC	5'-GTATCACCTGGGTTGTAACCGGGGTACCCTC-3'
T3rvdeltaC	5'-GAGGGTACCCCGTTACAACCCAGGTGATAC-3'
TIMP3rv( 1-121 )	5'-GGTACCACAACCCAGGTGATACCGATAG-3'
TIMP3fw	5'-CACGTGTTTAAACGGTACCATGAC-3'
TIMP1(120M)fw	5'-GTTTAAACGGTACCGCCACCATGGCC-3'
TIMP1(120M)rev	5'-GGTACCTTCCTCGCAGCCACGGTGTAGGTC-3'
TEV_fw_NotI	5'-GGCCGCTTACGACATCCCCACTACTGAGAATCTTTATTTCA- GGGCGC-3'
TEV_rv_NotI	5'-GGCCGCGCCCGAAAATAAAGATTCTCAGTAGTGGGGATGTTCG- TAAGC-3'

Primer	Sequenz (5' → 3')
TIMP3(121M)opt_r	5'-GGTACCGCAGTTGCAGCCCAGGTGGTATCTGTAG-3'
TIMP3(120M)opt_r	5'-GGTACCGCAGCCCAGGTGGTATCTGTAG-3'

## 6.7. Aminosäuresequenzen der verwendeten IL-6R bindenden Peptide

In Tabelle 10 sind die Aminosäuresequenzen der in der Arbeit verwendeten, IL-6R bindenden Peptiden aufgelistet (vgl. Abschnitte 4.4 und 7.1).

**Tabelle 10: Aminosäuresequenzen der verwendeten IL-6R bindenden Peptide**

Peptid	Aminosäuresequenz
S1	LSLMPRL
S2	NPMMRPL
S3	QMRTTIR
S4	RLMMLQQ
S7	LSLITRL
S <sub>x</sub> 1	QARHQAQ
S <sub>x</sub> 2	ERAHHRV

## 6.8. Medien und Lösungen

Die in Tabelle 11 und Tabelle 12 gelisteten Medien wurden zur Kultivierung von Bakterien und eukaryotischen Zellen verwendet.

### 6.8.1. Medien zur Kultivierung von Bakterien

Die Zusammensetzung des LB-Mediums entspricht der Methode von Bertani (1951).

**Tabelle 11: Liste der verwendeten Medien zur Kultivierung von Bakterien**

Kulturmedium	Zusammensetzung
Lysogeny-Broth-(LB)-Medium	1% NaCl, 0,5% Hefeextrakt, 1% Trypton
LB-Agar	1% NaCl, 0,5% Hefeextrakt, 1% Trypton, 1,5% Agar

### 6.8.2. Medien zur Kultivierung von eukaryotischen Zellen

**Tabelle 12: Liste verwendeter Medien zur Kultivierung von eukaryotischen Zellen**

Kulturmedium	Zusammensetzung
DMEM <sup>(-/-)</sup>	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium, high Glucose (4,5 g/l), with stable Glutamine</i>
DMEM <sup>(+/+)</sup>	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium, high Glucose (4,5 g/l), with stable Glutamine + 10% FBS, 1% Penicillin/Streptomycin</i>
DMEM <sup>(+/+/+)</sup>	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium, high Glucose (4,5 g/l), with stable Glutamine + 10% FBS, 1% Penicillin/Streptomycin, G418 (entsprechend der Antibiotika-Sensitivität der zu transfizierenden Zellen)</i>

<b>Kulturmedium</b>	<b>Zusammensetzung</b>
DMEM <sup>(+/+/+)</sup> Ultra Low IGG	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium, high Glucose (4,5 g/l), with stable Glutamine + 5% Ultra-Low IGG FBS , 1% Penicillin/Streptomycin, G418 (entsprechend der Antibiotika-Sensitivität der zu transfizierenden Zellen)</i>
RPMI <sup>(-/-)</sup>	<i>Roswell Park Memorial Institute Medium 1640</i>
RPMI <sup>(+/+)</sup>	<i>Roswell Park Memorial Institute Medium 1640 + 10% FBS, 1% Penicillin/Streptomycin</i>

## 6.9. Geräte

Für die vorliegende Dissertation wurden die Geräte verwendet, die in Tabelle 13 aufgeführt sind.

**Tabelle 13: Liste der benutzten Geräte**

<b>Gerät</b>	<b>Hersteller</b>
Absaugpumpe für die Sterilbank	HLC BioTech, Göttingen
Analysewaage Precisa 100M-300C	Hartenstein GmbH, Würzburg
Autoklav Laboklav 25	SHP Steriltechnik AG, Detzel Schloss/ Satuelle
Zentrifuge 5417R	Eppendorf GmbH, Hamburg
Zentrifuge 5424	Eppendorf GmbH, Hamburg
Zentrifuge 5810R	Eppendorf GmbH, Hamburg
CO <sub>2</sub> -Inkubator 150 (E2)	Binder GmbH, Tuttlingen
ECL ChemoCam Imager	INTAS Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen

<b>Gerät</b>	<b>Hersteller</b>
Fluorometer Infinite® M200 PRO reader	Tecan GmbH, Maennedorf, Schweiz
Gefrierschrank comfort	Liebherr GmbH, Rostock
Gelelektrophoresekammer	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Heizbad Julabo sw21	Julabo GmbH, Seelbach
Heraeus Function Line T6 Trockenschrank	Thermo Scientific, St. Leon-Rot
Kühlschrank	Liebherr GmbH, Rostock
Magnetrührer mit Heizung	Heidolph Instruments GmbH, Schwabach
Mikropipetten Research®	Eppendorf GmbH, Hamburg
Mikrowelle Optiquick	Moulinex (Krupps), Offenbach
Mini-PROTEAN Tetra System	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Pegstar 2x Twin Block Thermal Cycler	PEQLAB Ltd, Crableck Lane, UK
pH-Meter	Sartorius, Ratingen
Pipetus®-Akku	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Primovert	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Göttingen
Scanlaf Mars Safety Class 2	Weiss Labortechnik GmbH, Heroldsberg
Spannungsquelle Power Pac 300	BioRad Laboratories GmbH, Hercules, USA
Spektrophotometer NanoDrop 2000c	Thermo Scientific, St. Leon-Rot
Stuart Roller Mixer SRT 9D	Bibby Scientific, Staffordshire, England

Gerät	Hersteller
TC10 Automated Cell Counter	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Thermomixer® Komfort	Eppendorf GmbH, Hamburg
Trans-Blot® Turbo™	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
UV-Tisch	Bio-Budget Technologies GmbH
Vortex Mixer	IKA Labortechnik GmbH, Staufen
ÄKTAprime™ PLUS	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg

## 6.10. Kits

Die im Rahmen der Arbeit verwendeten Kits sind in Tabelle 14 gelistet.

**Tabelle 14: Liste der verwendeten Kits**

Kit	Hersteller
ECL Prime Western Blotting Detection Reagent	Merck KGaA, Darmstadt
<i>NucleoSpin® Gel and PCR Cleanup</i>	Machery-Nagel, Düren
NucleoBond® Xtra Midi/Maxi	Machery-Nagel, Düren
Human TNF DuoSet ELISA	R&D Systems, Wiesbaden

## 6.11. Größenstandards

Alle für die Dissertation genutzten Größenstandards finden sich in Tabelle 15.

**Tabelle 15: Liste der verwendeten Größenstandards**

<b>Größenstandard</b>	<b>Hersteller</b>
GeneRuler Express DNA Ladder, ready-to-use	Thermo Scientific, St. Leon-Rot
GeneRuler 1 kb DNA Ladder, ready-to-use	Thermo Scientific, St. Leon-Rot
PageRuler™ Prestained Protein Ladder, 10 to 180 kDa	Thermo Scientific, St. Leon-Rot
Spectra™ Multicolor High Range Protein Ladder	Thermo Scientific, St. Leon-Rot

## 6.12. Puffer und Lösungen

Alle Puffer und Lösungen aus Tabelle 16 wurden soweit nicht anders angegeben in H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> angesetzt und gegebenenfalls autoklaviert (120°C, 2 bar, 20 min).

**Tabelle 16: Liste der verwendeten Puffer und Lösungen**

<b>Lösung/Puffer</b>	<b>Zusammensetzung</b>
Ammoniumperoxidsulfat(APS)-Lösung	10% (m/v) APS
Blockierlösung für IL-6R ELISA	5% (m/v) Sucrose in <i>Reagent Diluent</i>
Blockierlösung für TNF ELISA	<i>Reagent Diluent</i>
Blockierlösung für Western Blot	5% (m/v) Magermilchpulver in TBS-T
<i>Coomassie Brilliant Blue staining solution</i>	2,4 mM Coomassie-Brillant-Blau 40% (v/v) Methanol 1,75 M CH <sub>3</sub> COOH

---

<b>Lösung/Puffer</b>	<b>Zusammensetzung</b>
dNTP	10 mM dATP 10 mM dCTP 10 mM dGTP 10 mM dTTP
Elutionspuffer I	Citrat Puffer 50 mM pH 3,25
Elutionspuffer II	Citrat Puffer 50 mM pH 5,5
Equilibrierungspuffer	20 mM Tris-HCl pH 8 150 mM NaCl
GW-Lösung	3 mM GW in DMSO
Hochsalzpuffer	20 mM Tris-HCl pH 8 1 M NaCl
IP Puffer	20 mM Tris 150 mM NaCl 1 mM EDTA 1 mM EGTA
Laemmlipuffer (5x)	10% (m/v) SDS 50% (v/v) Glycerol 50 mM Tris-HCl pH 6,8 5% (v/v) $\beta$ -Mercaptoethanol 0,5% (m/v) Bromphenolblau

---

<b>Lösung/Puffer</b>	<b>Zusammensetzung</b>
MLB	50 mM Tris-HCl pH 7,5 150 mM NaCl 1% (v/v) Triton X-100 Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablet (1 Tablette auf 50 ml Puffer)
Nicht reduzierender Laemmlipuffer	10% (m/v) SDS 50% (v/v) Glycerol 50 mM Tris-HCl pH 6,8 0,5% (m/v) Bromphenolblau
<i>Orange G Loading Dye Buffer (6x)</i>	30% (v/v) Glycerol 50 mM EDTA 0,25% (m/v) Orange G
PBS-T	0,05% (v/v) Tween-20 in PBS
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	137 mM NaCl 8,1 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (pH 7,4) 1,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (pH 7,4) 2,7 mM KCl
PMA-Lösung	100 µM PMA in DMSO
<i>Reagent Diluent</i>	1% (m/v) BSA in PBS
Sammelgepuffer	250 mM Tris-HCl pH 6,8 0,2% (m/v) SDS

<b>Lösung/Puffer</b>	<b>Zusammensetzung</b>
<i>SDS-PAGE Destaining Solution</i>	20% Methanol 1,75 M CH <sub>3</sub> COOH
SDS-PAGE Laufpuffer	25 mM Tris-HCl pH 8,3 192 mM Glycin 1% (m/v) SDS
<i>Solution 1 (S1) für DNA-Minipräparation</i>	50 mM Glucose 25 mM Tris-HCl pH 8 10 mM EDTA 0,1% (v/v) RNase
<i>Solution 2 (S2) für DNA-Minipräparation</i>	0,2 M NaOH 1% SDS
<i>Solution 3 (S3) für DNA-Minipräparation</i>	5 M CH <sub>3</sub> COOK 2 M CH <sub>3</sub> COOH
Streptavidin-POD-Lösung	0,5% (v/v) Streptavidin <i>in Reagent Diluent</i>
<i>Stripping Buffer</i>	62,5 mM Tris-HCl pH 6,8 2% (m/v) SDS 0,1% (v/v) β-Mercaptoethanol
TAE-Puffer	0,04 M Tris-HCl pH 8,8 0,01 M EDTA 0,02 M Essigsäure
TBS-T	0,05% (v/v) Tween-20 <i>in TBS</i>

<b>Lösung/Puffer</b>	<b>Zusammensetzung</b>
Transferpuffer	25 mM Tris-HCl pH 8,3 192 mM Glycin 20% (v/v) Methanol 0,01 % (m/v) SDS
Trenngelpuffer	750 mM Tris-HCl pH 8,8 0,2% (m/v) SDS
Trisgepufferte Salzlösung (TBS)	50 mM Tris-HCl pH 7,5 150 mM NaCl
Trypsin/EDTA-Lösung	10% (v/v) Trypsin/EDTA (10x) in PBS

## 6.13. Rekombinante Proteine

Alle in der vorliegenden Arbeit genutzten rekombinanten Proteine sind in Tabelle 17 gelistet.

**Tabelle 17: Liste der verwendeten rekombinanten Proteine**

<b>Protein</b>	<b>Beschreibung</b>
sIL-6R	CONARIS Research Institute AG, Kiel

## 6.14. Verbrauchsmaterial

Die Zusammenstellung der verwendeten Verbrauchsmaterialien ist in Tabelle 18 aufgeführt.

**Tabelle 18: Liste des verwendeten Verbrauchsmaterials**

<b>Verbrauchsmaterial</b>	<b>Hersteller</b>
<i>Wide-mouth Polypropylene Bottle</i>	Beckman Coulter, Krefeld
Einmalspitzen	B.Braun, Melsungen
Eppendorf Tubes (1,5 und 2 ml)	Eppendorf AG, Hamburg
Falcon Röhrchen (15 und 50 ml)	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
Handschuhe Nitra Tex	Ansell Healthcare, Brüssel, Belgien
HiTrap™ Protein A HP 1ml	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
Superose™ 6 10/300 GL	GE Healthcare Europe GmbH, Freiburg
PVDF-Membran (Porengröße 0,45 µm)	Carl Roth GmbH + Co, KG, Karlsruhe
Sterilpipetten Costar Stripette	Corning Incorporated, Coming, USA
TC10 System Counting Slides, Dual Chamber	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Zellkulturschalen	TPP, Trasadingen, Schweiz
Whatman-Papier	VWR International GmbH, Darmstadt
<i>TPP® tissue culture plates</i>	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Nunc-Immuno™ MicroWell™ 96 well solid plates	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Polystyrol Filter Rollerflaschen	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich

Verbrauchsmaterial	Hersteller
<i>Amicon Ultra-15 Centrifugal Filters</i>	Merck KGaA, Darmstadt

## 6.15. Zelllinien

Alle in der Dissertation verwendeten Zelllinien finden sich in Tabelle 19 und Tabelle 20.

**Tabelle 19: Prokaryotische Zelllinien**

Stamm	Genotyp
XL-1 Blue	recA1, endA1, gyrA96, thi-1, hsdR17, supE44, relA1, lac [F' <i>proAB lacIqZΔM15</i> Tn10 (TetR)]

**Tabelle 20: Eukaryotische Zelllinien**

Zelllinie	Herkunft	Wachstum
HEK293	DMSZ GmbH, Braunschweig	DMEM <sup>(+/+)</sup>
CHO-K1	DMSZ GmbH, Braunschweig	DMEM <sup>(+/+)</sup>
SKOV3	zur Verfügung gestellt von Prof. Hans Neubauer, Klinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe, UKD, Düsseldorf	RPMI <sup>(+/+)</sup>
HepG2	DMSZ GmbH, Braunschweig	DMEM <sup>(+/+)</sup>

## 6.16. Molekularbiologische Methoden

### 6.16.1. Anzucht von *Escherichia coli*

*Escherichia coli* (*E.coli*) Kulturen wurden auf LB-Agarplatten oder in LB-Flüssigmedium bei 37°C angezogen. Die Selektion erfolgte durch Zugabe von 200 µg/ml Ampicillin zu den LB Agarplatten bzw. 100 µg/ml zu dem LB-Medium.

Die *E.coli* Kultur wurde zunächst auf Agarplatten ausplattiert und über Nacht im Inkubator kultiviert. Es wurde im Anschluss eine oder mehrere Kolonien von der Platte in LB-Medium mit Antibiotika überführt und bei 37°C über Nacht und unter ständigem Schütteln (2 ml Kulturen: 1400 rpm, 100 ml Kulturen: 140 rpm) inkubiert. Anschließend konnten die Kulturen für die Plasmidpräparation verwendet werden.

### 6.16.2. Polymerasekettenreaktion

Die PCR („*polymerase chain reaction*“ engl., Polymerase-Kettenreaktion) ist eine molekularbiologische Methode zur Amplifizierung von DNA-Abschnitten (Mullis and Faloona 1987). Es wird eine thermostabile DNA-Polymerase verwendet, durch welche distinkte DNA-Sequenzen exponentiell vervielfältigt werden. Zu Beginn jedes Zyklus wird die Matrizen-DNA bei 98°C denaturiert. Es folgt eine Erniedrigung der Temperatur, wodurch sich die Oligonukleotide an die homologen Bereiche der Matrizen-DNA anlagern (*Annealing*). Die *Annealing*-Temperatur ist abhängig von der Schmelztemperatur der Oligonukleotide, welche wiederum vom GC-Gehalt, der Länge der Oligonukleotide und der Salzkonzentration beeinflusst wird. Nach dem Anlagern der Oligonukleotide an den Matrizen-Strang wird die Temperatur auf das thermodynamische Optimum der verwendeten DNA-Polymerase erhöht. Diese beginnt vom 3'OH-Ende des angelagerten Oligonukleotides aus den DNA-Abschnitt zu verlängern (Elongation), was zu einem doppelsträngigen DNA-Abschnitt führt. Durch die Wiederholung dieser drei Schritte wird die DNA exponentiell amplifiziert. Die PCR wurde im Thermocycler durchgeführt. Es wurden die Phusion<sup>®</sup> High-Fidelity DNA-Polymerase und die PFU DNA-Polymerase, welche eine zusätzlich Korrekturlese-Funktion („*proof-reading*“) aufweisen, verwendet. Falsch eingebaute Oligonukleotide werden von der Polymerase erkannt und korrigiert. In

Tabelle 21 ist der verwendete PCR-Ansatz und in Tabelle 22 das durchgeführte PCR-Programm aufgeführt.

**Tabelle 21: Standard PCR-Ansatz**

<b>Komponente</b>	<b>PCR mit Pfu DNA Polymerase</b>	<b>PCR mit Phusion® High-Fidelity DNA-Polymerase</b>
<i>Template</i> -DNA	100 ng	100 ng
MgCl <sub>2</sub>	2,5 mM	2,5 mM
Puffer	10 µl PFU Buffer(10x)	10 µl HF- oder GC-Puffer (5x)
dNTP	1 µl	1 µl
Oligonukleotid 1	0,5 µl	0,25 µl
Oligonukleotid 2	0,5 µl	0,25 µl
Enzym	2,5 U	1 U
Gesamtvolumen	100 µl in H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>	50 µl in H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>

**Tabelle 22: Standard PCR-Programm**

Phase	PCR mit Pfu DNA Polymerase		PCR mit Phusion® High-Fidelity DNA-Polymerase	
	Temperatur [°C]	Dauer [s]	Temperatur [°C]	Dauer [s]
Initiale Denaturierung	95	30	98	300

Phase	PCR mit Pfu DNA Polymerase		PCR mit Phusion® High-Fidelity DNA-Polymerase	
	Temperatur [°C]	Dauer [s]	Temperatur [°C]	Dauer [s]
Denaturierung	95	30	98	30
<i>Annealing</i>	} 35x Tm -5	30	Tm -5	30
Elongation		72	500 bp/min.	72
Finale Elongation	72	600	72	600

### 6.16.3. Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese ist eine Methode, um DNA-Fragmente in einem elektrischen Feld ihrer Größe nach zu trennen. Agarose ist ein Polysaccharid, das aus Galaktose und 3,6-Anhydrogalactose besteht. Nach dem Aufkochen mit TAE-Puffer vernetzen sich die Agarose-Fäden beim Erkalten, so dass Poren im Gel entstehen. Auf Grund der negativen Ladung an der Phosphatgruppe der Nucleinsäuren wandern diese beim Anlegen eines elektrischen Feldes zur Anode. Die Trennung der DNA-Fragmente nach Molekulargewicht ist darin begründet, dass die Wanderungsgeschwindigkeit von der Größe der Nucleinsäuren abhängig ist.

Um die Nucleinsäuren im Gel sichtbar zu machen, wird dem Agarosegel Ethidiumbromid zugesetzt. Ethidiumbromid (EtBr) interkaliert zwischen den Basenpaaren der DNA und emittiert Licht nach Bestrahlung mit UV-Licht bei einer Wellenlänge von 255-366 nm. Zur DNA-Größentrennung wurden 1-2%ige Agarosegele verwendet. Die entsprechende Menge Agarose wurde abgewogen und mit TAE-Puffer in der Mikrowelle aufgekocht. Nach Abkühlen auf 60°C wurde 0,01% EtBr-Lösung (Stammlösung 5 mg/ml) zum Agarosegel hinzugefügt und das Gel auf den Gelträger gegossen. Nachdem das Gel auspolymerisiert war, wurde es in die Elektrophoresekammer überführt und mit 1x TAE-Puffer übergossen. Die Nucleinsäureproben wurden mit *Orange G Loading Dye (6x)* versetzt und auf das Gel aufgetragen. Die Gelelektrophorese wurde bei einer Spannung von 90 -

130 V bis zur gewünschten Auftrennung durchgeführt. Die anschließende Dokumentation erfolgte mit dem INTAS iX Imager.

#### **6.16.4. PCR Cleanup**

Zur Reinigung der PCR-Produkte von anderen Komponenten des PCR Ansatzes wurde das *NucleoSpin® Gel and PCR Cleanup Kit* verwendet. Hierbei bindet die DNA bei basischem pH-Wert an eine Silikatmembran einer speziellen Säule. Dies wird gewährleistet durch die negative Ladung des Phosphatrückgrats der DNA. Alle anderen Stoffe passieren die Membran. Das Kit wurde entsprechend den Angaben des Herstellerprotokolls verwendet.

#### **6.16.5. Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen**

Das Prinzip der Extraktion von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen ist beschrieben bei Vogelstein und Gillespie (1979). Zunächst wurde die DNA in einem Agarosegel gelelektrophoretisch nach Molekulargewicht aufgetrennt. Unter UV-Licht wurde das DNA Fragment der gesuchten Größen mit einem Skalpell aus dem Gel isoliert.

Die Isolierung der DNA aus dem Gelstück erfolgte mit Hilfe des *NucleoSpin® Gel and PCR Cleanup Kits* nach Protokoll des Herstellers (s. Abschnitt 6.16.4).

#### **6.16.6. Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren**

Die Konzentration und Reinheit von Nukleinsäuren wurde photometrisch gemessen (NanoDrop ND-1000). Hierzu wurde die optische Dichte der Probe bei 230 nm (Polysaccharide), 260 nm (Nukleinsäuren) und 280 nm (Proteine) ermittelt.

Liegt ein Verhältnis von  $OD_{230} : OD_{260} : OD_{280} = 1 : 2 : 1$  vor, wurde die Nukleinsäure Probe als „rein“ bezeichnet. Außerdem sollte der Quotient aus  $OD_{260}/OD_{280}$  zwischen 1,7 und 2 liegen.

### 6.16.7. Klonierung

Die Klonierung ist eine molekularbiologische Methode zur Vervielfältigung von bestimmten DNA-Sequenzen oder Expression von Proteinen. Dazu werden die DNA-Sequenzen in spezielle Vektoren ligiert und anschließend in einen prokaryotischen Wirtsorganismus transformiert, um den Vektor zu vervielfältigen oder in einen eukaryotischen Organismus zu transfizieren, um ein Protein zu exprimieren. Auf den Vektoren liegen Antibiotikaresistenzgene, damit auf transformierte/transfizierte Organismen selektiert werden kann.

### 6.16.8. Ligation von DNA-Fragmenten

Zur Ligation eines DNA-Fragments (Insert) in einen Zielvektor wurden 5 U der T4 DNA Ligase verwendet. Es wurden 100 ng des Vektors verwendet und mit folgender Formel die benötigte Menge des *Inserts* für ein Verhältnis *Insert:Vector* = 3:1 bestimmt:

$$3 \times m[\text{Vektor}] \times (\text{bp}[\text{Insert}] / \text{bp}[\text{Vektor}]) = m[\text{Insert}]$$

Der Ligationsansatz wurde für mindestens 1 h bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Bei der Ligation von *blunt-end* DNA-Fragmenten wurden zusätzlich 2 µl einer 50% PEG4000-Lösung hinzugegeben. Anschließend wurden 5 µl des Ligationsansatzes für die Transformation in *E.coli* XL-1 Blue verwendet.

### 6.16.9. Hitzeschock-Transformation von *E.coli* XL-1 Blue

Zur Transformation wurden chemisch kompetente *E.coli* XL-1 Blue verwendet. Diese wurden 5 min auf Eis aufgetaut. Anschließend wurde 1-5 µg Plasmid DNA hinzugegeben und weitere 5 min auf Eis inkubiert. Danach erfolgte der Hitzeschock bei 42°C für 60 s unter schütteln bei 900 rpm, nachfolgend wurden die Zellen ein weiteres Mal für 5 min auf Eis inkubiert. Damit die transformierten Zellen die Antibiotikaresistenz ausbilden konnten, wurden 500 µl LB-Medium hinzugegeben und 60 min bei 37°C unter schütteln bei 1400 rpm inkubiert. Anschließend wurden die Zellen auf LB-Amp-Platten ausgestrichen.

### **6.16.10. Plasmid „Mini“-Präparation**

Zur Isolierung von Plasmiden aus *E.coli* wurde die Methode der alkalischen Lyse nach Birnboim und Doly (1979) verwendet. Es wurde je 1 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin mit einer Kolonie von einer LB-Amp-Agarplatte (s. Abschnitt 6.16.1) angeimpft und über Nacht bei 37°C auf einem Schüttler (1400 rpm) inkubiert. Die Übernachtskultur wurde bei 13000 rpm für 1 min abzentrifugiert und das Pellet wurde in 100 µl S1-Puffer resuspendiert. Anschließend wurden 200 µl S2-Puffer hinzugegeben und 4-6 mal invertiert. Durch Zugabe von NaOH und SDS, welche in S2-Puffer vorhanden sind, kommt es zum Aufschluss der Zellmembran und zur Denaturierung der Proteine und der DNA. Auch die RNA wird durch den alkalischen pH-Wert fragmentiert. Das SDS lagert sich an die Proteine an und durch Zugabe von Kalium bilden sich schwerlösliche Komplexe. Die DNA und die Proteine fallen aus. Danach wurden 150 µl S3-Puffer zugegeben und erneut 4-6 mal invertiert. Durch Zugabe von Acetat wird der pH-Wert neutralisiert und die Plasmid DNA kann renaturieren. Danach wurde der Ansatz 10 min bei 4°C inkubiert und dann bei 18000 x g und 4°C für 10 min zentrifugiert. Die Plasmid DNA sollte anschließend im Überstand vorliegen. Dieser wurde überführt, um nachfolgend die Plasmid-DNA mit Ethanol zu fällen. Dazu wird der Ansatz mit 900 µl 100%igem Ethanol versetzt, 5 min bei 4°C inkubiert und dann bei 18000 x g und 4°C für 15 min zentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde mit 500 µl 70% Ethanol resuspendiert und bei 18000 x g und 4°C für 5 min zentrifugiert. Danach wurde das Pellet bei 37°C getrocknet und in 30 µl sterilem H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> aufgenommen.

### **6.16.11. Plasmid „Midi“-Präparation**

Für die Isolierung von größeren Mengen an Plasmid-DNA wurde das Kit NucleoBond Xtra Midi (Machery-Nagel GmbH & Co. KG, Düren) verwendet. Dazu wurde 100 ml LB-Medium mit Ampicillin (100 µg/ml) mit einer Kolonie von einer LB-Amp-Agarplatte (s. Abschnitt 6.16.1) angeimpft und über Nacht bei 37°C in einem Schüttler bei 140 rpm inkubiert. Nachfolgend wurde die Übernachtskultur pelletiert (3200 x g, 4°C, 15 min) und der Überstand verworfen. Die weitere Plasmid Präparation erfolgte nach Herstellerangaben.

Die Konzentration der isolierten Plasmid DNA wurde mittels des „NanoDrop“ (s. Abschnitt 6.16.6) bestimmt.

### **6.16.12. Sequenzierung von DNA-Fragmenten**

Die Sequenzierung von DNA-Fragmenten in Plasmiden wurde von der Firma SeqLab-Sequence Laboratories GmbH, Göttingen durchgeführt.

### **6.16.13. Restriktion**

Restriktionsendonukleasen sind Enzyme, die aus Bakterien stammen und definierte Nukleotidsequenzen erkennen und schneiden. In Plasmiden werden spezielle Erkennungssequenzen eingebracht, an denen Restriktionsendonukleasen schneiden können. Nachfolgenden können an diesen Schnittstellen gezielt DNA-Sequenzen ligiert werden. Für die Restriktion wurden die vom Hersteller angegebenen Puffer- und Temperaturbedingungen eingehalten. Es wurden dazu pro 1 µg DNA 2 U des Restriktionsenzym verwendet. Der Restriktionsansatz wurde bei 37°C für zwei Stunden zum Zweck analytischer Restriktionen oder über Nacht zum Zweck präparativer Restriktionen inkubiert. Anschließend erfolgte die gelelektrophoretische Größentrennung der DNA-Fragmente im Agarosegel, um die gewünschten Fragmente zu isolieren. Für Klonierungsarbeiten wurde 5 µg Plasmid DNA und für analytische Arbeiten 1 µg Plasmid-DNA aus einer Plasmid Mini-Präparation verwendet.

### **6.16.14. Phosphorylierung von Plasmid-DNA**

Um eine Ligation eines PCR Produktes in einen linearisierten Vektor zu gewährleisten, muss das 5'-Ende des PCR Produktes zuvor phosphoryliert werden. Hierzu wurden nach dem *PCR Cleanup* (s. Abschnitt 6.16.4) 20 µl des PCR Produktes mit 15 U der T4 *Poly-nucleotide Kinase* und H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> in einem Gesamtansatz von 50 µl bei 37°C für 30 min inkubiert. Anschließend wurde das Enzym bei 75°C für 10 min hitzeinaktiviert und es erfolgte ein weiterer *PCR Cleanup*.

### 6.16.15. Dephosphorylierung von Plasmid-DNA

Damit keine Religation des 5' und 3'- Endes von linearisierten Plasmiden erfolgt, wurde 1 U der Fast-AP Thermosensitive Alkaline Phosphatase nach dem Restriktionsansatz hinzugegeben. Diese dephosphoriert das 5'-Ende des DNA-Stranges. Der Probenansatz wurde für 30 min bei 37°C inkubiert und anschließend wurde das Enzym für 5 min bei 75°C inaktiviert.

### 6.16.16. Gerichtete Mutagenese

Die gerichtete Mutagenese erfolgte nach der Methode von Kunkel (1985). Grundlegend für die Erstellung der Mutageneseoligonukleotide war die Arbeit von Novoradovsky, Zhang et al. (2005).

Die Punktmutation wurde mit Hilfe der Mutageneseoligonukleotide in das Plasmid eingebracht. Dies erfolgte über zwei konsekutive PCR-Reaktionen. In Tabelle 23 sind beide PCR Ansätze und in Tabelle 24 das verwendete PCR-Programm aufgeführt.

**Tabelle 23: Standard Ansatz gerichtete Mutagenese-PCR**

Komponente	A	B
Template-DNA	10 ng	10 ng
Phusion® High-Fidelity DNA-Polymerase	2 U	2 U
Puffer	10 µl HF-Puffer (5x)	10 µl HF-Puffer (5x)
dNTP	1 µl	1 µl
Oligonukleotid	0,4 µl <i>sense primer</i> (f.c.0,8 mM)	0,4 µl <i>antisense primer</i> (f.c.0,8 mM)
Gesamtvolumen	50 µl in H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>	50 µl in H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>

**Tabelle 24: Standard PCR-Programm gerichtete Mutagenese-PCR**

Phase	Temperatur [°C]	Dauer [s]
Initiale Denaturierung	98	240
Denaturierung	98	60
<i>Annealing</i>	T <sub>m</sub> -5	60
Elongation	72	2000 bp/min
Finale Elongation	72	720

Nach Durchführung der PCR wurden beide Ansätze gemischt und wieder auf zwei Reaktionsgefäße verteilt. Jedem neuen Ansatz (50 µl) wurden 2 U *Phusion*<sup>®</sup> *High-Fidelity DNA-Polymerase* hinzugefügt. Anschließend wurde das in Tabelle 24 beschriebene PCR-Programm erneut durchgeführt. Bei der gerichteten Mutagenese-PCR wird das vollständige Plasmid amplifiziert. Der Erfolg der PCR wurde mittels gelelektrophoretischer Trennung der DNA überprüft. Der PCR-Ansatz wurde mit Hilfe des *NucleoSpin*<sup>®</sup> *Gel and PCR Cleanup Kit* gereinigt und anschließend mit dem Restriktionsenzym DpnI behandelt. Dabei wurden die methylierten Ausgangsplasmide, die aus *E.coli* stammen, gespalten. Die mutierten Plasmide blieben intakt. Das Endprodukt der PCR wurde in *E.coli* transformiert. Der Erfolg der Mutagenese wurde mittels Sequenzierung überprüft.

### 6.16.17. Colony-PCR

Die *Colony-PCR* ist eine Methode zur Überprüfung des Erfolges einer Ligation (s. Abschnitt 6.16.8). Sie ist eine Alternative zur Plasmidpräparation („Mini“) (s. Abschnitt 6.16.10) mit anschließender Restriktion (s. Abschnitt 6.16.13).

Es wurde je eine Kolonie mit einer Pipettenspitze von einer LB-Amp-Agarplatte genommen und in ein PCR-Reaktionsgefäß mit 20 µl H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> getaucht. Hierbei verbleiben einige Zellen im Reaktionsgefäß. Die Kolonie wurde direkt im Anschluss in 1 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin überführt und über Nacht bei 37°C auf einem Schüttler

(1400 rpm) inkubiert. Der Ansatz im PCR-Reaktionsgefäß wurde gemäß Tabelle 25 vervollständigt und die PCR wird gemäß Tabelle 26 durchgeführt.

**Tabelle 25: Standard Ansatz *Colony-PCR***

Komponente	Menge/Volumen
<i>E.coli</i> in H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>	20 µl
<i>Dreamtaq</i> DNA Polymerase	2,5 U
Puffer	5 µl <i>Dreamtaq Buffer</i> (10x)
MgCl <sub>2</sub>	f.c. 4 mM
dNTP	1 µl
Oligonukleotid 1	0,25 µl
Oligonukleotid 2	0,25 µl
Gesamtvolumen	50 µl in H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>

**Tabelle 26: Standardprogramm *Colony-PCR***

Phase	Temperatur [°C]	Dauer [s]
Initiale Denaturierung	95	600
Denaturierung	95	30
<i>Annealing</i>	T <sub>m</sub> -5	30
Elongation	72	1000 bp/min.
Finale Elongation	72	600

} 35x

Der Erfolg der PCR wurde mittels gelelektrophoretischer Trennung der DNA überprüft. Die 1 ml LB-Amp-Kulturen, die zu *E.coli* Kolonien gehören, die als positiv (d.h. mit dem korrekten Plasmid transformiert) identifiziert wurden, wurden in 100 ml LB-Amp-Kulturen überführt und über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte eine Plasmidpräparation („Midi“) (s. Abschnitt 6.16.11). Die finale Kontrolle des Plasmids erfolgte mittels Sequenzierung.

## 6.17. Proteinbiochemische Methoden

### 6.17.1. hIL-6R ELISA

Um die Konzentration des durch ADAM 17 proteolytisch gespaltenen sIL-6R in Zellkulturüberständen von *shedding assays* (s. Abschnitt 6.18.6) zu bestimmen, wurde ein hIL-6R Sandwich ELISA durchgeführt.

Zu Beginn wurde eine 96-Mikrotiterplatte mit dem Primärantikörper über Nacht inkubiert. Dabei wurde für den hIL-6R ELISA der  $\alpha$ -hIL-6R (4 - 11) Antikörper 1:1000 in PBS verdünnt und auf die 96-Mikrotiterplatte pipettiert (50  $\mu$ l/Well). Nicht gebundener Antikörper wurde am folgenden Tag in drei Waschschritten mit jeweils 300  $\mu$ l/Well TBS-T entfernt. Anschließend wurden freie Bindungsstellen durch eine zweistündige Inkubation mit Blockierlösung für IL-6R ELISA (200  $\mu$ l/Well) abgesättigt. Vor dem Auftragen des Standards und der verdünnten Proben folgten drei weitere Waschschrritte mit TBS-T. Die Proben sowie der Standard, welcher aus rekombinantem sIL-6R besteht, wurden in *Reagent Diluent* verdünnt und zu je 50  $\mu$ l/Well aufgetragen. Die Standardreihe dient der Quantifizierung der zu messenden Proben. Für die sIL-6R Standardreihe wurden Konzentrationen von 2000 pg/ml bis 15.625 pg/ml verwendet. Nach zweistündiger Inkubationszeit wurden nicht gebundene Proteine erneut mit drei Waschschrritten entfernt. Danach wurde der anti-IL-6R Antikörper Baf227 (1:1000 in *Reagent Diluent*, 50  $\mu$ l/Well) auf die 96-Mikrotiterplatte gegeben und für zwei Stunden inkubiert. Nicht gebundener Antikörper wurde erneut durch drei Waschschrritte mit TBS-T entfernt. Im Anschluss erfolgte eine 30 minütige Inkubation mit 100  $\mu$ l/Well Streptavidin-POD-Lösung. Anschließend folgten drei weitere Waschschrritte und die Zugabe von 75  $\mu$ l POD-Substrat. Die Inkubation erfolgte

unter Vermeidung direkter Lichteinstrahlung für maximal 20 min bei RT. Abgestoppt wurde die Reaktion durch Zugabe von 75  $\mu$ l 1,8 M Schwefelsäure und die anschließende Auswertung erfolgte mit Hilfe des Tecan Infinite M200 Pro Reader bei 450 nm.

### **6.17.2. hTNF ELISA**

Um die Konzentration des durch ADAM 17 proteolytisch gespaltenen sTNF in Zellkulturüberständen von *shedding assays* (s. Abschnitt 6.18.6) zu bestimmen, wurde ein hTNF Sandwich ELISA durchgeführt.

Der Ablauf des ELISAs entspricht dem des hIL-6R Sandwich ELISA (s. Abschnitt 6.17.1). Es wurde das *Human TNF DuoSet ELISA* Kit verwendet und nach dem Protokoll des Herstellers verfahren.

### **6.17.3. Zellaufschluss**

Die zu untersuchenden Zellen wurden mit 1 ml PBS mit Hilfe einer Pipettenspitze von der Kulturschale abgelöst und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Zellen wurden anschließend pelletiert (8000 x g, 4°C, 60 s) und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in 200  $\mu$ l Mild Lysis Puffer resuspendiert. Danach erfolgte eine Inkubationszeit von 2 h bei 4°C, wobei die Zellen unter ständiger Bewegung lysiert wurden. Anschließend erfolgte die Zentrifugation (10000 x g, 4°C, 5 min), um den Überstand von den Zellresten zu isolieren. Der Überstand wurde anschließend in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt.

### **6.17.4. SDS-PAGE**

Proteine wurden durch eine diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) in einem Polyacrylamidgel bestehend aus Trenngel (TG) und Sammelgel (SG) (Zusammensetzung s. Tabelle 27) nach ihrem Molekulargewicht voneinander getrennt (Laemmli, Molbert et al. 1970). Zu den Proteinproben wurde Laemmli-Puffer (5x) hinzugegeben, für 10 min bei 95°C gekocht und anschließend zentrifugiert (8000 x g, 4°C, 1 min). Das SDS bewirkt eine einheitliche negative Ladung der Proteine, wodurch

die Proteine im elektrischen Feld zur Anode wandern. Die Größentrennung der Proteine erfolgte bei 90 - 120 V (konstanter Ampere-Wert).

**Tabelle 27: Zusammensetzung von Sammel- und Trenngel für SDS-PAGE**

	6% AA	8% AA	10% AA	12% AA	SG
H <sub>2</sub> O	5,3 ml	4,6 ml	4,0 ml	3,3 ml	1,72 ml
Acrylamid 30% (AA)	2,0 ml	2,7 ml	3,3 ml	4,0 ml	0,5 ml
Trenngelpuffer	2,6 ml	2,6 ml	2,6 ml	2,6 ml	-
Sammelgelpuffer	-	-	-	-	0,75 ml
TEMED	8 µl	6 µl	4 µl	4 µl	3 µl
APS-Lsg.	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	30 µl

### 6.17.5. Western Blot

Die Durchführung basiert auf der erstmaligen Beschreibung der Methode von Renart, Reiser et al. (1979).

Der Western Blot ist eine Methode, um Proteine von einem SDS-Polyacrylamid-Gel elektrophoretisch auf eine PVDF-Membran zu transferieren. Die Membran besitzt eine hohe Bindungskapazität, wodurch die Proteine für weitere Untersuchungen genutzt werden können. Für den Transfer der Proteine auf die Membran wurde das *Trans-Blot-Turbo semidry Transfer System* genutzt. Es wurden dazu sechs Lagen Whatman Papier 3 mm und eine PVDF-Membran auf die Maße des SDS-Gels zugeschnitten. Auf die Anode der Blotkammer wurden drei Lagen in Transferpuffer getränktes Whatman 3 mm-Papier aufgelegt. Danach folgte die PVDF-Membran. Diese wurde zuvor für 1 min in Methanol aktiviert und anschließend für 1 min in Transferpuffer gewaschen. Das SDS-Gel wurde auf die Membran gelegt und mit drei weiteren Lagen des zuvor in Transferpuffer

getränkten Whatman 3 mm-Papiers bedeckt. Beim Auflegen der Schichten wurde darauf geachtet, dass keine Luftblasen entstehen, die den Transfer der Proteine behindern. Anschließend wurde die Kathode aufgelegt und konstante Spannung von 40 V angeschlossen. Nach 40 min war der Transfer abgeschlossen.

### **6.17.6. Immunodetektion**

Die zuvor geblottete PVDF-Membran wurde mit Antikörpern behandelt, um bestimmte Proteine spezifisch nachzuweisen. Dazu wurde die Membran in ein 50 ml Falcon überführt und mit Blockierlösung für 1 - 2 h bei Raumtemperatur blockiert. Dadurch wurden freie Bindungsstellen der Membran abgesättigt und unspezifische Bindungen der Antikörper konnten vermieden werden. Anschließend folgten drei Waschschriffe mit TBS-T für jeweils 5 min. Bei Nachweis von Proteinen, die Primär- und Sekundärantikörper verlangen, wurde der Primärantikörper über Nacht bei 4°C und der Sekundärantikörper für 1 h bei RT inkubiert. Bei Nachweis von Fc-Fusionsproteinen wurde der Antikörper 2 h bei RT inkubiert. Der Sekundärantikörper ist an eine Peroxidase gekoppelt. Diese katalysiert die Oxidation von Luminol durch Wasserstoffperoxid. Es wurde zweimal 5 min mit TBS-T und einmal 5 min mit TBS gewaschen. Zur Detektion des Signals wurde das *ECL Prime Western Blotting Detection Reagent* Kit nach Herstellerangaben verwendet. Die Entwicklung erfolgte mit Hilfe des INTAS Chemo Cam Imagers und die Auswertung mit Hilfe der Software ChemoStar Professional (INTAS Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen).

### **6.17.7. Stripping von Western Blot Membranen**

Bei der Auswertung der Immunopräzipitation wurden mehrere Proteine des präzipitierten Proteinkomplexes auf der PVDF-Membran nachgewiesen. Hierzu musste nach Detektion des ersten Proteins mittels Primär- und Sekundärantikörper die Bindung der Antikörper an die Membran aufgehoben werden, um in einem weiteren Immunodetektionsschritt weitere Proteine nachzuweisen. Die Membran wurde nach der Detektion einmal für 5 min mit TBS-T gewaschen und danach mit 50 ml des *Stripping Buffer* bei 60°C für 30 min inkubiert. Anschließend wurde die Membran dreimal für 5 min mit TBS-T gewaschen

und danach erneut für 1 h in Blockierlösung geblockt. Die Immunodetektion erfolgte wie in Abschnitt 6.17.6 beschrieben.

### **6.17.8. Coomassie-Brillant-Blau Färbung von SDS-PAGE Gelen**

Um in einem SDS-PAGE-Gel alle Proteine unspezifisch anzufärben, wurde der Farbstoff *Brillant Blue R250* verwendet. Dazu wurde das Gel mit *Coomassie Brilliant Blue staining solution* in einer Mikrowelle aufgeköcht, 5 min unter Schütteln bei RT erkalten lassen und mit H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> gewaschen. Danach folgten 3 bis 5 Entfärbeschritte. Hierzu wurde das Gel mit *SDS-PAGE Destaining Solution* in der Mikrowelle aufgeköcht und 5 min unter Schütteln bei RT abkühlen lassen. Bei ausreichender Entfärbung wurde das Gel unter Schütteln mit H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub> gewaschen. Mit einem herkömmlichen Flachbettscanner wurde ein Bild des Gels aufgenommen.

### **6.17.9. Immunopräzipitation**

Die Immunopräzipitation ist eine biochemische Methode zum Nachweis der Interaktion von Proteinen. In der vorliegenden Arbeit wurde die Bindung von sIL-6R an Fc-Fusionsproteine, von denen manche einen sIL-6R-sdAb besitzen, untersucht. Zu diesem Zweck wurden *Protein A Agarose beads* benutzt. Diese binden den Fc-Teil der Fusionsproteine.

Es wurden Zellkulturüberstände verwendet, die zu untersuchende Proteine enthielten. Je 1 ml der Zellkulturüberstände wurden 500 ng sIL-6R und 100 µl einer Proteaseinhibitor-Lösung (1 Tablette *Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablet (EDTA-free)* in 1 ml IP-Puffer) zugesetzt und über Nacht unter ständiger Rotation bei 4°C inkubiert.

Am nächsten Tag wurden pro Bedingung 50 µl *Protein A Agarose beads* vorbereitet. Zu diesem Zweck wurden die *beads* dreimal mit IP-Puffer gewaschen (Zugabe von 200 µl, Zentrifugation mit 2700 x g, bei 4°C für 30 s, Verwerfen des Überstandes). Im Anschluss wurden die *beads* in IP Puffer resuspendiert und den Zellkulturüberständen hinzugefügt. Vor Zugabe der Protein A Agarose wurden noch 100 µl Proben entnommen. Diese werden in der vorliegenden Arbeit als *Input*-Fraktion bezeichnet. Es folgte eine zweistündige

Inkubation bei 4°C unter ständigem Rollen. Danach wurden die Reaktionsansätze zentrifugiert (2700 x g, 4°C, 30 s) und es wurde der Überstand abgenommen. Proben aus diesem Überstand werden im Weiteren als *Unbound*-Fraktion bezeichnet. Die *beads* wurden dreimal mit IP-Puffer gewaschen und anschließend in 50 µl Laemmli Puffer (5x) bei 95°C für 10 min aufgekocht. Diese Fraktion wird im Folgenden als IP-Fraktion bezeichnet.

### **6.17.10. Affinitätsreinigung von Proteinen aus Zellkulturüberständen**

Zur Affinitätsreinigung von Fc-Fusionsproteinen wurden 400 - 800 ml Zellkulturüberstand aus in *Rollerbottles* kultivierten, stabil transfizierten CHO-K1-Zellen verwendet. Je 400 ml Kulturüberstand wurde beim Auftauen eine Tablette *Complete Protease Inhibitor Cocktail* und 100 µl DNase zugesetzt. Nach dem Auftauen wurden die Überstände mit einem 45 µm Filter steril filtriert. Zur späteren Analyse wurde 1 ml der Probe abgenommen (*Input*-Fraktion). Die Proteinreinigung erfolgte mit Hilfe der ÄKTAprime™ PLUS. Bevor die Zellkulturüberstände geladen wurden, erfolgte die Reinigung der Schlauchverbindungen mit 1 M NaOH für 30 min. Danach wurde mit Equilibrierungspuffer gespült. Anschließend wurde die HiTrap™ Protein A HP Säule angeschlossen und das gesamte System mit 1 ml/min Equilibrierungspuffer gewaschen bis die Leitfähigkeit auf null gefallen war. Die Kulturüberstände wurden auf die Säule geladen und 1 ml des Durchflusses wurde zur späteren Analyse entnommen (*unbound*-Fraktion). Nachdem die kompletten Kulturüberstände die Säule passiert hatten, wurde mit Equilibrierungspuffer gewaschen, um nicht gebundene Proteine zu entfernen. Auch von der Waschfraktion wurde für die spätere Untersuchung 1 ml entnommen (*wash*-Fraktion). Die Elution der gebundenen Proteine erfolgte mit den Elutionspuffern I und II. In den Elutionsreaktionsgefäßen wurde 1M Tris-HCl-Lösung mit einem pH-Wert von 11 vorgelegt, um den pH-Wert der Elutionsfraktionen zu neutralisieren. Um die Proteinprobe zu konzentrieren, wurde ein *Amicon Ultra-15 Centrifugal Filter* verwendet und die Probe bei 3000 x g und 4°C zentrifugiert. Zur Analyse der Reinigung und der gereinigten Proteinmenge wurde je eine SDS-PAGE mit anschließendem Western Blot und Coomassie Färbung durchgeführt.

In einem zweiten Schritt wurde das gewonnene Protein mittels Gelfiltration nach Molekulargewicht gereinigt. Hierzu wurde eine Superose™ 6 Säule, wie oben beschrieben, an

die ÄKTAprime™ PLUS angeschlossen und das Protein über die Säule filtriert. Auch in diesem Schritt wurden *unbound*- und *wash*-Fraktionen entnommen. Zur Analyse der Reinigung und der gereinigten Proteinmenge wurde je eine SDS-PAGE mit anschließendem Western Blot und Coomassie Färbung durchgeführt.

## 6.18. Zellkultur Methoden

### 6.18.1. Kultivierung adhärenter Zellen

Alle Zelllinien wurden in einem Inkubator mit 5% CO<sub>2</sub>, gesättigter Wasserdampfatosphäre und 37°C kultiviert. Verwendet wurden Kulturschalen mit Ø = 9 cm und 10 ml Medium oder Kulturschalen mit Ø = 14 cm und 25 ml Medium. Eine Übersicht, welche Zelllinien in welchem Medium gehalten wurden findet sich in Abschnitt 6.15. Für das Passagieren der Zellen wurde das Medium entfernt und die Zellen mit 10 ml PBS gewaschen. Danach wurden die Zellen durch 2 ml (kleine Schale) bzw. 4 ml (große Schale) Trypsin/EDTA-Lösung abgelöst (bei 37°C im Inkubator bis zum Verlust der Adhärenz). Zur Neutralisation der Trypsin/EDTA-Lösung wurden 2 ml / 4 ml Zellkulturmedium hinzugegeben. Die Zellen wurden in ein Falcon-Röhrchen überführt und pelletiert (1200 x g, 5 min, RT). Das Zellpellet wurde in entsprechendem Medium resuspendiert und die entsprechende Zellmenge wurde in eine neue Schale mit Zellkulturmedium überführt. Dabei wurden HEK293-Zellen bei Konfluenz in einem Verhältnis von 1:20, HepG2-Zellen in einem Verhältnis von 1:5, SKOV3-Zellen in einem Verhältnis von 1:20 und CHO-Zellen in einem Verhältnis von 1:50 bis 1:200 passagiert.

### 6.18.2. Kultivierung adhärenter Zellen in *Rollerbottles*

Um größere Mengen Protein in Zellkulturüberständen zu generieren, wurden stabil transfizierte CHO-K1-Zellen in sog. *Rollerbottles* kultiviert. Zu diesem Zweck wurden die ausgewählten Einzelklone auf jeweils 14 Zellkulturschalen (Ø 14 cm) passagiert, bei voller Konfluenz abgelöst und in 400 ml DMEM<sup>(+/+/+)</sup> in je eine *Rollerbottle* überführt. Nach 3,5 Tagen erfolgte ein Mediumswechsel zu DMEM<sup>(+/+/+)</sup> Ultra Low IGG, in

welchem die Zellen von diesem Moment an kultiviert wurden. Die erste Charge DMEM<sup>(+/+)</sup> Ultra Low IGG wurde verworfen. Alle weiteren Chargen wurden direkt nach Abnahme zentrifugiert (1200 x g, 4°C, 15 min). Das Pellet wurde verworfen und es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt (10000 x g, 4°C, 30 min). Anschließend wurde die Charge bei -80°C bis zur Proteinreinigung (s. Abschnitt 6.17.10) gelagert.

### **6.18.3. Zellzahlbestimmung**

Die Zellzahl wurde mit Hilfe des *TC10 Automated Cell Counter* bestimmt. Dazu wurden 10 µl der Zellsuspension mit 10 µl *Trypan Blue Dye* vermischt und anschließend 10 µl der Mischung auf ein *TC10 System Counting Slides Dual Chamber* geladen.

### **6.18.4. Transiente Transfektion von HEK293-Zellen**

Für die Transfektion von HEK293-Zellen wurden  $2 \times 10^6$  Zellen auf Kulturschalen (Ø 9 cm) mit 10 ml DMEM<sup>(+/+)</sup> ausgesät. Nach 24 Stunden erfolgte die Transfektion. Dazu wurde 1 ml DMEM<sup>(-/-)</sup> mit 10 µl TurboFect<sup>TM</sup> und 5 µg Plasmid-DNA (bei Transfektion mehrerer Plasmide betrug die Gesamtmenge verwendeter DNA auch 5 µg) versetzt und invertiert. Der Transfektionsansatz wurde für 15 min bei 37°C inkubiert und anschließend auf die Zellen getropft. Nach 48 Stunden wurden die Zellkulturüberstände abgenommen, steril filtriert und die Zellen gegebenenfalls lysiert.

### **6.18.5. Transiente Transfektion von CHO-K1-Zellen**

Für die Transfektion von CHO-K1-Zellen wurden 500.000 Zellen auf Kulturschalen (Ø 9 cm) mit 10 ml DMEM<sup>(+/+)</sup> ausgesät. Nach 24 Stunden erfolgte die Transfektion. Dazu wurde 1 ml DMEM<sup>(-/-)</sup> mit 10 µl TurboFect<sup>TM</sup> und 5 µg Plasmid-DNA versetzt und invertiert. Der Transfektionsansatz wurde für 15 min bei 37°C inkubiert und anschließend auf die Zellen getropft. Nach 3-5 h erfolgte ein Mediumswechsel zu frischem DMEM<sup>(+/+)</sup>. Sollten die Zellkulturüberstände später mittels SDS-PAGE und Western Blot auf Fusionsproteine untersucht werden, so wurde 24 h nach Transfektion ein erneuter Mediumswechsel zu einem Gemisch aus 90% DMEM<sup>(-/-)</sup> und 10% DMEM<sup>(+/+)</sup> durchgeführt. 48

Stunden nach Transfektion wurden die Zellkulturüberstände abgenommen, steril filtriert und die Zellen gegebenenfalls lysiert.

### **6.18.5.1. Stabile Transfektion von CHO-K1-Zellen**

Das Prinzip der stabilen Transfektion von CHO-K1-Zellen entspricht der transienten Transfektion von CHO-K1-Zellen. Es wurden allerdings nur 250.000 Zellen pro Kulturschale (Ø 9 cm) ausgesät. Die im Rahmen dieser Arbeit stabil transfizierten Plasmide trugen alle ein Gen, das Neomycinresistenz und damit verbunden auch Geneticinresistenz vermittelt. Es wurde außerdem immer eine Kulturschale mit einem Plasmid transfiziert, das für GFP kodiert, um eine visuelle Kontrolle des Transfektionserfolges und der Selektion zu ermöglichen. 48 h Stunden nach Transfektion wurde eine mittels Antibiotikadosiswirkungskurve (s. Abschnitt 6.18.5.2) ermittelte Menge G418 hinzugeben. Hierdurch wurde ein Selektionsdruck erzeugt, der dafür sorgte, dass Zellen, bei denen keine genomische Integration erfolgte innerhalb von 7 - 10 Tagen apoptotisch wurden. Bei Ansäuerung des Zellkulturmediums wurde ein Mediumswechsel zu frischem DMEM<sup>(+/+/+)</sup> durchgeführt. Wenn die Zellen wieder Konfluenz erreichten wurde passagiert. Nach Abschluss dieses ersten Selektionsschrittes erfolgte eine Einzelklonselektion zum Ausschluss von nicht transfizierten, antibiotikaresistenten CHO-K1-Zellen und zur Bestimmung des Klons, der am meisten Protein produzierte.

### **6.18.5.2. Antibiotikadosiswirkungskurve**

Zur Bestimmung der notwendigen Geneticinkonzentration für die Selektion stabil transfizierter CHO-K1-Zellen wurde eine Dosis-Wirkungs-Kurve angelegt. Hierzu wurde eine definierte Anzahl von Wildtyp CHO-K1-Zellen ausgesät. Am nächsten Tag wurden dem Zellkulturmedium verschiedene Konzentrationen Geneticin zugesetzt. Es erfolgte täglich die visuelle Kontrolle aller ausgesäten Proben auf Konfluenz. Es wurde zur Selektion eine Zielkonzentration von 1125 µg/ml Geneticin ausgewählt. Bei dieser Konzentration starben innerhalb von 7 - 10 Tagen etwa 99% aller Zellen, die nicht über einen resistenzvermittelnden Mechanismus verfügten.

### **6.18.5.3. Einzelklonselektion nach stabiler Transfektion**

Zum Zwecke der Einzelklonselektion nach stabiler Transfektion wurden die Zellen bei Konfluenz von der Kulturschale (Ø 9 cm) abgelöst (s. Abschnitt 6.18.1). Es wurde so

verdünnt, dass statistisch 0,5 Zellen/Well auf eine 96-Mikrotiterplatte ausgesät wurden. Nach 2-3 Tagen erfolgte eine visuelle Kontrolle der Mikrotiterplatte. Mischklone (zwei oder mehr Kolonien pro Well) wurden von der weiteren Selektion ausgeschlossen. Einzelklone wurden nach 5 – 10 Tagen (je nach Konfluenz) auf Kulturschalen ( $\varnothing$  3 cm) überführt. Bei der nächsten Passage wurden Zellen auf je eine Kulturschale ( $\varnothing$  3 cm) mit einem Gemisch aus 90% DMEM<sup>(-/-)</sup> und 10% DMEM<sup>(+/+)</sup> und eine Kulturschale ( $\varnothing$  3 cm) mit DMEM<sup>(+/+/+)</sup> überführt. Von der Kulturschale ( $\varnothing$  3 cm) mit 90% DMEM<sup>(-/-)</sup> und 10% DMEM<sup>(+/+)</sup> erfolgte ein Screening mittels SDS-PAGE und Western Blot. Positiv identifizierte Einzelklone wurden von der Kulturschale ( $\varnothing$  3 cm) mit DMEM<sup>(+/+/+)</sup> auf eine Kulturschale ( $\varnothing$  9 cm) mit DMEM<sup>(+/+/+)</sup> überführt. Es erfolgte ein weiterer Selektionsschritt in dem je 500.000 Zellen jedes Einzelklons auf eine Kulturschale ( $\varnothing$  9 cm) ausgesät wurden. Nach 24 h erfolgte ein Mediumswechsel zu 90% DMEM<sup>(-/-)</sup> und 10% DMEM<sup>(+/+)</sup>. Nach weiteren 24 h erfolgte eine quantitative Analyse der Überstände mittels SDS-PAGE und Western Blot. Der Einzelklon mit der effektivsten Produktion des Zielproteins wurde in Kultur genommen.

### **6.18.6. ADAM17 mediated shedding assay**

Bei den in dieser Arbeit durchgeführten *shedding assays* wurde der Einfluss verschiedener Proteine auf die proteolytische Spaltung von Zelloberflächenproteinen durch ADAM17 untersucht. Hierzu wurde eine definierte Menge Zellen auf *6-Well Plates* ausgesät und ein *shedding assay* durchgeführt. Bei HepG2-Zellen wurden 350.000 Zellen/Well und bei SKOV3-Zellen 500.000 Zellen/Well ausgesät und der Assay 24 h später durchgeführt. HEK293-Zellen wurden mit Expressionsplasmiden für TNF und IL-6R transfiziert (s. Abschnitt 6.18.4). 24 h nach Transfektion wurde je eine Kulturschale ( $\varnothing$  9 cm) mit transfizierten HEK293-Zellen gleichmäßig auf 5 *Wells* einer *6-Well Plate* ausgesät. Weitere 24 h später wurde der Assay durchgeführt.

Das Zellkulturmedium wurde abgesaugt und durch Zellkulturüberstände ersetzt, welche die Fusionsproteine enthielten. Des Weiteren wurden eine Negativkontrolle (NK) (Zellkulturüberstand von Wildtyp-CHO-K1-Zellen) und eine Positivkontrolle (PK) (Zellkulturüberstand von Wildtyp-CHO-K1-Zellen mit 0,1% GW280264X) durchgeführt. Es folgte eine dreißigminütige Inkubation bei 37°C im Inkubator. Danach wurde mit 0,1% PMA-Lösung ADAM17 *shedding* induziert. Es wurde zu jeder

Bedingung eine Kontrolle durchgeführt, bei der nur 0,1% DMSO zugegeben wurde. Nach 2 h Inkubation bei 37°C im Inkubator wurden die Überstände abgenommen, zentrifugiert (8000 x g, 4°C, 5 min) und wiederum die Überstände in neue Reaktionsgefäße überführt. Diese wurden bei -20°C bis zur Analyse mittels ELISA gelagert.

## 6.19. Normierung und statistische Analysen

Zur statistischen Analyse der Ergebnisse wurde das Programm GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, Inc., La Jolla – San Diego, CA, USA) verwendet.

Die bei der Auswertung der *shedding assays* ermittelten Konzentrationen wurden, sofern keine absoluten Konzentrationen angegeben wurden, auf die Konzentration der nicht stimulierten Negativkontrolle (Zellkulturüberstand aus Wildtyp Cho-K1-Zellen + DMSO) in der Form:

$$\frac{c(\text{Probe})}{c(\text{NK+ DMSO})} \text{ normiert.}$$

Es wurden Mittelwerte (MW) und Standardabweichungen (SD) mittels GraphPad berechnet und in der Form  $MW \pm SD$  angegeben. Die Werte wurden mittels einfaktorieller Varianzanalyse (One-way ANOVA) und anschließendem Bonferroni-Test analysiert. Als Signifikanzniveau wurde  $\alpha = 0,05$  festgelegt. p-Werte mit  $p \leq 0,05$  wurden als signifikant, p-Werte mit  $p \leq 0,01$  wurden als sehr signifikant und p-Werte mit  $p \leq 0,001$  wurden als hoch signifikant erachtet.

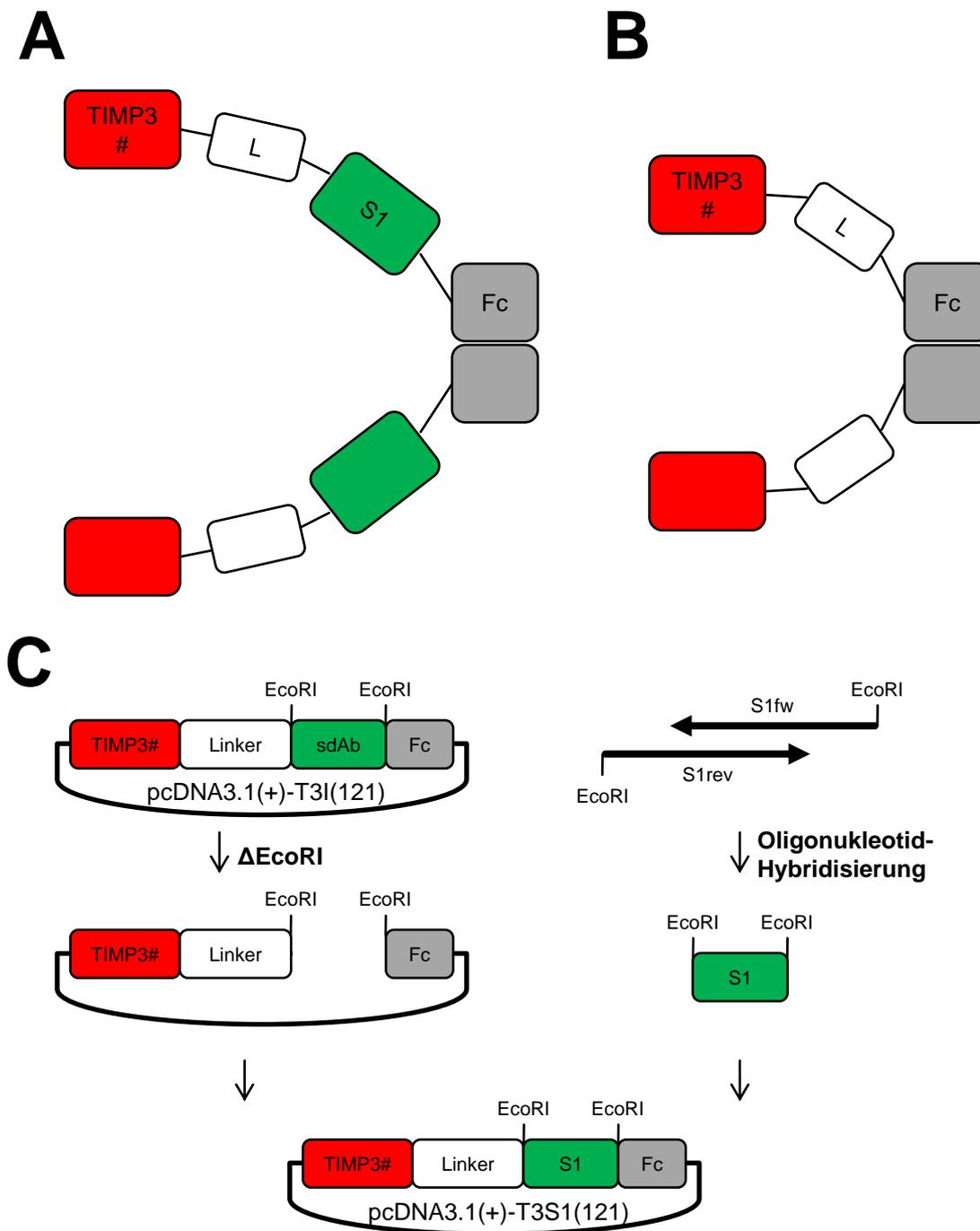
---

## 7. Ergebnisse

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der substratspezifischen Inhibition des durch ADAM17 vermittelten *ectodomain shedding* (im Weiteren nur als *shedding* bezeichnet). Es wurden zu diesem Zweck verschiedene Fusionsproteine erstellt und hinsichtlich ihres Effektes auf *shedding* untersucht. Dazu wurden Aktivität und Substratspezifität getestet. Die Abschnitte 7.1 und 7.2 behandeln die Modulation des IL-6R *shedding*. In Abschnitt 7.3 wird die Möglichkeit einer TNF spezifischen Inhibition von ADAM17 untersucht.

### 7.1. Peptidvermittelte Substratspezifität für selektives Proteasetargeting

In diesem Abschnitt wurde untersucht, ob sich Peptide mit einer hohen IL-6R Bindungsaffinität eignen, um Proteine zu generieren, die substratspezifisch ADAM17 vermitteltes *shedding* des IL-6R verhindern. Dazu wurde der natürliche ADAM17 Inhibitor TIMP3 mit Peptiden (S1, S2, S3, S4 oder S7), die nanomolare Affinität zum IL-6R besitzen (Su, Lai et al. 2005, Li, Zhang et al. 2016) und einem C-terminalen IgG1 Fc-Teil fusioniert. Dadurch sollte lokal am Substrat eine hohe Inhibitorkonzentration und damit substratspezifische ADAM Proteaseinhibition erzielt werden. Des Weiteren wurde cDNA kloniert, die für zwei Negativkontrollen S<sub>x</sub>1 und S<sub>x</sub>2 kodiert. Hierbei handelt es sich um Peptide, die entstehen, wenn die DNA-Sequenzen von S1 (für S<sub>x</sub>1) oder S2 (für S<sub>x</sub>2) in falscher Orientierung kloniert werden. Durch die Fusion von TIMP3 mit den IL-6R spezifischen Peptiden sollte ein Molekül generiert werden, welches aufgrund der hohen Affinitäten zu sowohl einem spezifischen ADAM17 Substrat als auch zu ADAM17 selbst, eine substratspezifische ADAM17 Inhibition ermöglicht.



**Abbildung 5: Schematische Darstellung der Peptid basierten Inhibitoren und Klonierungsschema der zugehörigen Expressionsplasmide**

(A) Schematische Darstellung von T3S1(121). Inhibitorische Domäne (rot), (GGGGS)<sub>3</sub>-Linker (weiß), Substratspezifität vermittelnde Domäne (grün), IgG1 Fc-Teil (grau), # Aminosäure 1 – 121;

(B) Schematische Darstellung von T3(121), Farbkodierung wie (A).

(C) Klonierungsschema von pcDNA3.1(+)-T3S1(121) aus pcDNA3.1(+)-T3(121) unter Verwendung der Oligonukleotide S1fw und S1rev.

### 7.1.1. Klonierung von IL-6R spezifischen ADAM17 Inhibitoren unter Nutzung von IL-6R bindenden Peptiden

In Abbildung 5A findet sich eine schematische Darstellung eines auf IL-6R bindenden Peptiden basierenden Fc-Fusionsproteins. Hierbei ist in roter Farbe die inhibitorische Domäne, in grüner Farbe die Spezifität vermittelnde Domäne und in Grau der IgG1 Fc-Teil dargestellt. Die inhibitorische und die Spezifität vermittelnde Domäne wurden mit einer flexiblen Linkersequenz (GGGS)<sub>3</sub> verknüpft, um der inhibitorischen TIMP3 Domäne Raum für die ADAM17 Blockade zu geben.

Als Ausgangsplasmid für die Klonierung wurde pcDNA3.1(+)-TIMP3(1-121)-Linker-Fc (pcDNA3.1(+)-T3)) verwendet. Dieses Plasmid kodiert für ein Fusionsprotein namens T3(121) (s. Abbildung 5B) und wurde von unserer Arbeitsgruppe durch Dr. Jens Moll erstellt. Wie in Abbildung 5C gezeigt wurde das Plasmid mit EcoRI zwischen dem (GGGS)<sub>3</sub>-Oligopeptidlinker und dem IgG1 Fc-Teil gespalten und somit linearisiert. Der linearisierte Vektor wurde dephosphoryliert. Da die IL-6R bindenden Peptide jeweils nur aus sieben Aminosäuren bestehen, wurden die kodierenden Gensequenzen mittels

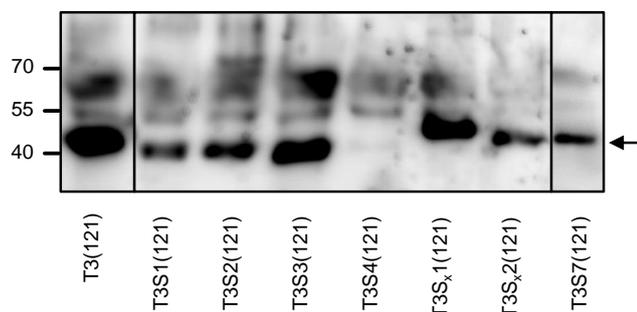
**Tabelle 28: Übersicht der Expressionsplasmide für Fusionsproteine die auf IL-6R bindenden Peptiden (bzw. nicht bindenden Kontrollpeptiden) basieren**

Peptid	Expressionsplasmid	Abkürzung
S1	pcDNA3.1(+)-TIMP3(1-121)-Linker-S1-Fc	pcDNA3.1(+)-T3S1(121)
S2	pcDNA3.1(+)-TIMP3(1-121)-Linker-S2-Fc	pcDNA3.1(+)-T3S2(121)
S3	pcDNA3.1(+)-TIMP3(1-121)-Linker-S3-Fc	pcDNA3.1(+)-T3S3(121)
S4	pcDNA3.1(+)-TIMP3(1-121)-Linker-S4-Fc	pcDNA3.1(+)-T3S4(121)
S7	pcDNA3.1(+)-TIMP3(1-121)-Linker-S7-Fc	pcDNA3.1(+)-T3S7(121)
S <sub>x</sub> 1	pcDNA3.1(+)-TIMP3(1-121)-Linker-S <sub>x</sub> 1-Fc	pcDNA3.1(+)-T3S <sub>x</sub> 1(121)
S <sub>x</sub> 2	pcDNA3.1(+)-TIMP3(1-121)-Linker-S <sub>x</sub> 2-Fc	pcDNA3.1(+)-T3S <sub>x</sub> 2(121)

Ligation von hybridisierten Oligonukleotiden in den Vektor eingebracht. Es wurden jeweils komplementäre Oligonukleotide miteinander hybridisiert (z.B. S1fw mit S1rev, S2fw mit S2rev etc. s. Abschnitt 6.6), wodurch ein EcoRI Restriktionsüberhang entstand. Die hybridisierten Oligonukleotide wurden phosphoryliert und in das linearisierte Plasmid ligiert. Es entstanden die in Tabelle 28 aufgeführten Plasmide. Die Verifizierung einer erfolgreichen Klonierung erfolgte mittels *Colony-PCR* und anschließender Sequenzierung. Als Negativkontrollen wurden zwei Konstrukte gewählt in denen das Insert in umgekehrter Orientierung (3'-5' statt 5'-3' Richtung), aber frei von Stopcodons, eingesetzt ist. Die kodierten Peptide wurden  $S_x1$  und  $S_x2$  genannt.  $S_x1$  entsteht bei umgekehrter Orientierung der Gensequenz für S1,  $S_x2$  entsprechend bei umgekehrter Orientierung der Gensequenz des S2 Peptids. Diese beiden Plasmide sind ebenfalls Tabelle 28 zu entnehmen. Die Aminosäuresequenzen aller hier benutzten Peptide finden sich in Abschnitt 6.7. Eine vollständige Übersicht der Aminosäuresequenzen und Plasmidkarten sämtlicher in dieser Arbeit erstellten Fusionsproteine findet sich in Abschnitt 13.1.

### **7.1.2. Expressionsanalyse der peptidbasierten Inhibitoren**

Um im Folgenden die Aktivität der Konstrukte überprüfen zu können, wurden die in Abschnitt 7.1.1 erstellten Expressionsplasmide transient in CHO-K1-Zellen transfiziert. Als positive Transfektionskontrolle diente das etablierte pcDNA3.1(+)-T3(121) Plasmid. Die Expressionsanalyse erfolgte mit einem  $\alpha$ -Fc-POD Antikörper 48 h nach Transfektion in Zellkulturüberständen. Wie in Abbildung 6 zu erkennen ist, sind alle Fusionsproteine im Zellkulturüberstand nachweisbar. Alle hier untersuchten Zellkulturüberstände wurden im folgenden Kapitel auf ihr inhibitorisches Potenzial getestet, um zu entscheiden, welches der Fusionsproteine den interessantesten Forschungsgegenstand darstellt.



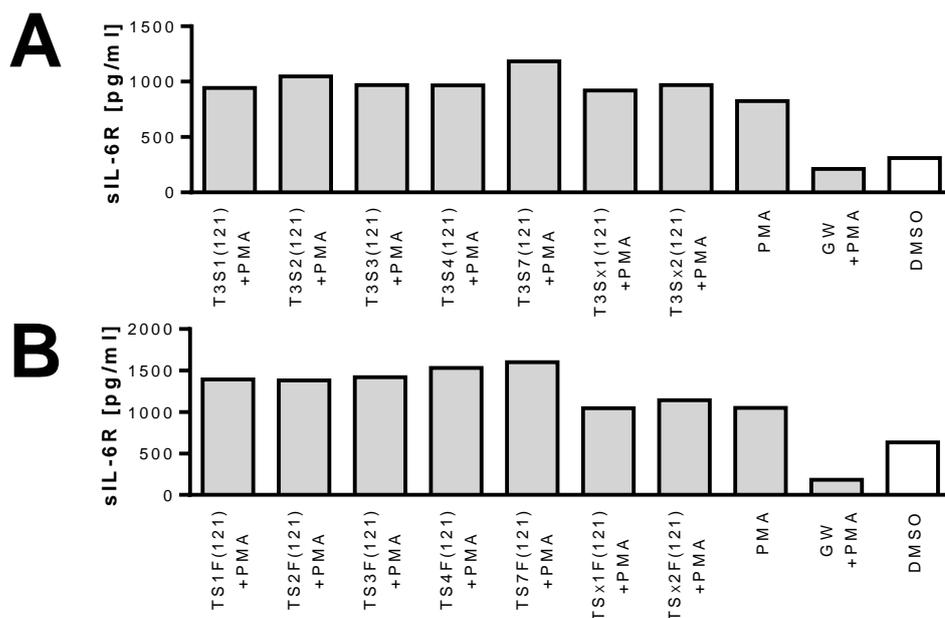
**Abbildung 6: Expression der Inhibitoren T3S1(121), T3S2(121), T3S3(121), T3S4(121), T3S7(121) und Kontrollen T3S<sub>x</sub>1(121) und T3S<sub>x</sub>2(121)**

CHO-K1-Zellen wurden mit folgenden Plasmiden transfiziert: pcDNA3.1(+)-T3S1(121), pcDNA3.1(+)-T3S2(121), pcDNA3.1(+)-T3S3(121), pcDNA3.1(+)-T3S4(121), pcDNA3.1(+)-T3S7(121), pcDNA3.1(+)-T3S<sub>x</sub>1(121) und pcDNA3.1(+)-T3S<sub>x</sub>2(121). Die Zellkulturüberstände wurden 48 h nach Transfektion mittels Western Blot unter Verwendung eines  $\alpha$ -Fc-POD Antikörpers analysiert, die erwartete Molekülmasse der Fusionsproteine ist mit einem Pfeil markiert (n = 1).

### 7.1.3. Fusionsproteine aus IL-6R bindenden Proteinen und TIMP3 haben keinen inhibitorischen Effekt auf das IL-6R *shedding*

Die Aktivität der Fusionsproteine wurde durch Analyse ihrer Wirkung auf ADAM17 vermitteltes IL-6R *shedding* untersucht. Hierzu wurde ADAM17 vermitteltes IL-6R *shedding* in Anwesenheit der potenziellen Inhibitoren mittels PMA induziert und die Zellkulturüberstände anschließend hinsichtlich der Konzentration von sIL-6R mittels hIL-6R ELISA quantifiziert.

In Abbildung 7 ist zu erkennen, dass im Vergleich mit der Negativkontrolle (PMA), in welcher das ADAM17 vermittelte *shedding* durch keinen Inhibitor beeinflusst wird, entgegen der vertretenen These keine Reduktion der sIL-6R Konzentrationen erfolgt. Dieser Effekt ist sowohl für HEK293-Zellen, die transient mit pcDNA3.1(+)-IL-6R transfiziert wurden, als auch für HepG2-Zellen konsistent, welche endogen IL-6R exprimieren.



**Abbildung 7: Die Peptid basierten Inhibitorstrukturen haben keinen Einfluss auf ADAM17 vermitteltes shedding**

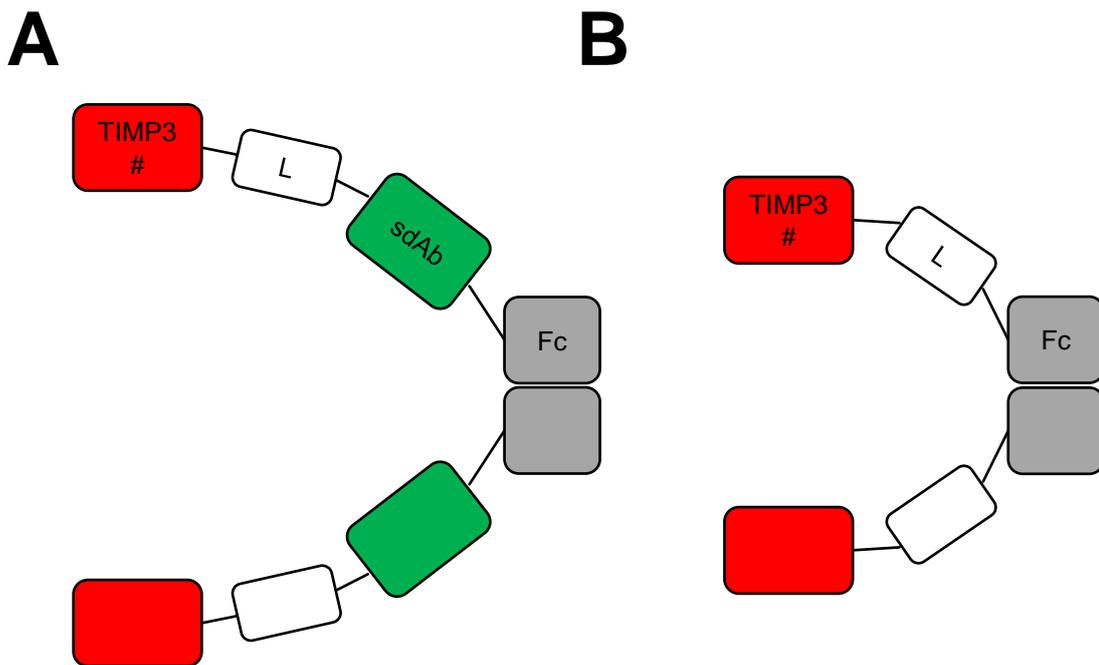
(A) HEK293-Zellen wurden mit einem Plasmid, das für humanen IL-6R kodiert, transfiziert. 48 h später wurden die Zellen 30 min mit den in Abschnitt 7.1.2 gewonnenen Zellkulturüberständen inkubiert und anschließend 2 h mit 100 nM PMA stimuliert. Der lösliche Rezeptor im Zellkulturüberstand wurde mittels hIL-6R ELISA quantifiziert (n = 1).

(B) Das Experiment wurde durchgeführt, wie in (A) beschrieben, aber es wurden HepG2-Zellen benutzt (n = 1).

Diese Experimente zeigen also, dass die Verwendung der IL-6R bindenden Peptide nicht die gewünschten Effekte vermittelt. Eine mögliche Erklärung für dieses Ergebnis könnte eine zu niedrige Affinität der Peptide zum IL-6R oder ein zu hoher  $k_{off}$  Wert bei der Komplexbildung sein. Die resultierenden Komplexe hätten eine geringe Stabilität und wären damit keine effizienten Inhibitoren von ADAM Proteasen.

## 7.2. Verwendung eines IL-6R sdAb zur Vermittlung von Substratspezifität

Aufgrund des fehlenden Effektes der Fusionsproteine, deren Substratspezifität auf den genannten IL-6R bindenden Peptiden basiert, wurden Expressionsplasmide erstellt in denen die Substratspezifität durch einen *single domain Antibody* (sdAb) gewährleistet wird (s. Abbildung 8). Zu diesem Zweck wurde ein IL-6R sdAb verwendet, der *site 1* des IL-6R mit einer Affinität von etwa 1,3 nM (Kolkman and Beirnaert 2008) bindet. Der verwendete sdAb inhibiert die IL-6 Signaltransduktion.



**Abbildung 8 Schematische Darstellung von T3I(121) und T3(121)**

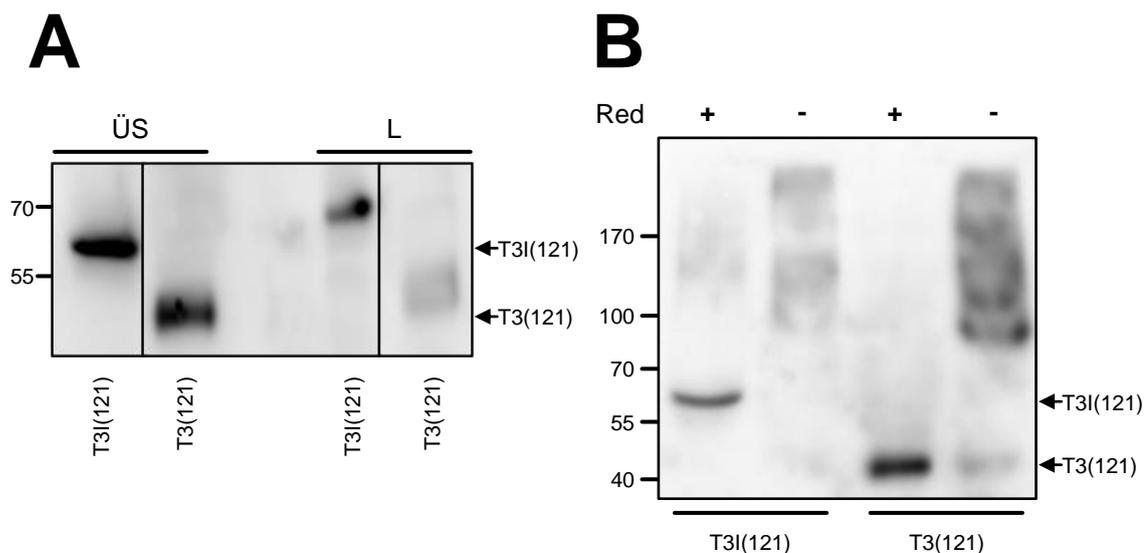
(A) Schematische Darstellung von T3I(121): Inhibitorische Domäne (rot), (GGGGS)<sub>3</sub>-Linker (weiß), Substratspezifität vermittelnde Domäne (grün), IgG1 Fc-Teil (grau), # Aminosäure 1 - 121.

(B) Schematische Darstellung von T3(121), Farbkodierung wie (A).

### 7.2.1. Das TIMP3(1-121)-Linker-IL-6R sdAb-Fc Fusionsprotein wird exprimiert und sekretiert

Die Erstellung der kodierenden cDNA für TIMP3(1-121)-Linker-IL-6R sdAb-Fc (T3I(121)) erfolgte durch Dr. Jens Moll aus dieser Arbeitsgruppe. Das Expressionsplasmid wurde pcDNA3.1(+)-TIMP3(1-121)-Linker-IL-6R sdAb-Fc (pcDNA3.1(+)-T3I(121)) genannt. Es wurde ebenfalls ein Fusionsprotein erstellt, das keinen IL-6R sdAb und somit keine Domäne enthält, die eine Substratspezifität vermitteln könnte. Dieses Fusionsprotein wurde pcDNA3.1(+)-TIMP3(1-121)-Linker-Fc (pcDNA3.1(+)-T3(121)) genannt und im Weiteren als Kontrolle genutzt.

Zur Analyse von Expression und Sekretion des Fusionsproteins erfolgte eine transiente Transfektion von CHO-K1-Zellen. Die Auswertung erfolgte mittels SDS-PAGE und Western Blot mit einem  $\alpha$ -Fc-POD Antikörper. Monomeres T3(121) besitzt eine Molekülmasse von etwa 45 kDa, monomeres T3I(121) eine Molekülmasse von etwa 58 kDa.



**Abbildung 9: T3I(121) wird von CHO-K1-Zellen exprimiert. Es bildet unter nicht reduzierenden Bedingungen multimere Aggregate.**

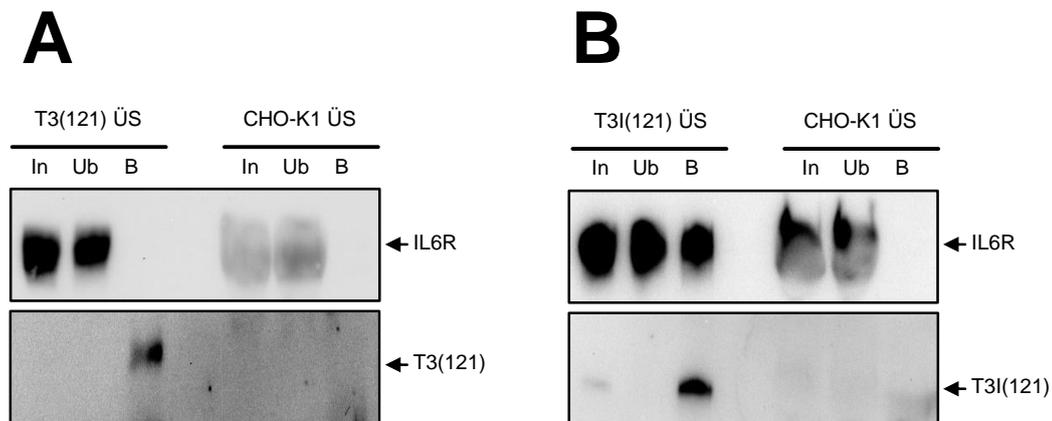
(A) CHO-K1-Zellen wurden mit pcDNA3.1(+)-T3I(121) und pcDNA3.1(+)-T3(121) transfiziert. 48 h nach Transfektion wurde ein Zellaufschluss durchgeführt. Die Detektion erfolgte in Überständen (ÜS) und Ly-saten (L) mittels Western Blot unter Verwendung eines  $\alpha$ -Fc-POD Antikörpers ( $n = 1$ ).

(B) CHO-K1-Zellen wurden mit pcDNA3.1(+)-T3I(121) und pcDNA3.1(+)-T3(121). Die Detektion der Proteine in den Überständen erfolgte unter reduzierenden und nicht reduzierenden Bedingungen mittels Western Blot unter Verwendung eines  $\alpha$ -Fc-POD Antikörper. Reduktionsmittel (Red):  $\beta$ -Mercaptoethanol ( $n = 1$ ).

Das Protein wurde wie in Abbildung 9 zu sehen exprimiert und gut detektierbar sekretiert. Bei einer Western Blot Analyse mit nicht denaturierendem Laemmli-puffer zeigten sich bei beiden transfizierten Proteinen Aggregate, die größer waren als durch Fc vermittelte Dimerisierung zu erwarten. In Abwesenheit von Reduktionsmitteln schienen sich keine klaren Banden in der Western Blot Analyse auszubilden. Dies deutet darauf hin, dass es sich bei den Aggregaten nicht um Oligomere mit Molekülmassen handelt, bei denen es sich jeweils um ein ganzzahliges Vielfaches der monomeren Molekülmasse handelt, sondern um ein Gemisch von verschieden großen Komplexen.

### 7.2.2. Nachweis der Bindung von sIL-6R durch T3I(121)

In einem nächsten Schritt wurde untersucht, ob die erstellten Fusionsproteine in der Lage sind den IL-6R zu binden. Zum Nachweis der Bindung von T3I(121) an den IL-6R wurde die Methode der Immunopräzipitation verwendet. Hierzu wurden Zellkulturüberstände mit T3I(121) und T3(121) aus transienten Transfektionen sowie Zellkulturüberstände von untransfizierten CHO-K1-Zellen (Negativkontrolle) aus Abschnitt 7.2.1 mit sIL-6R über



**Abbildung 10: T3I(121) bindet den sIL-6R über den IL-6R sdAb**

(A) Zellkulturüberstand aus mit pcDNA3.1(+)-T3(121) transfizierten CHO-K1-Zellen und Überstände von Wildtyp-CHO-K1-Zellen wurden mit rekombinantem sIL-6R über Nacht inkubiert und mit Protein A Agarose gefällt. Auf der oberen Membran ist ein Western Blot mit einem  $\alpha$ -humanen IL-6R Antikörper, auf der unteren Membran ein Western Blot mit einem  $\alpha$ -Fc-POD Antikörper zu sehen. ÜS: Zellkulturüberstand, In: *input*-Fraktion vor Fällung, Ub: *unbound*-Fraktion, B: Präzipitat (n=3).

(B) Immunopräzipitation wie in (A), aber Zellkulturüberstände, die T3I(121) enthalten (n=3).

Nacht inkubiert. Dann wurden die Komplexe mit Protein A Agarose gefällt. Die präzipitierten Komplexe wurden mit Laemmli-Puffer wieder dissoziiert. Mittels SDS-PAGE, Western Blot und anschließender Immunodetektion mit  $\alpha$ -humanem IL-6R (4-11) Antikörper wurde sIL-6R detektiert. Anschließend wurden mit  $\alpha$ -Fc-POD Antikörper die Fc-Fusionsproteine nachgewiesen.

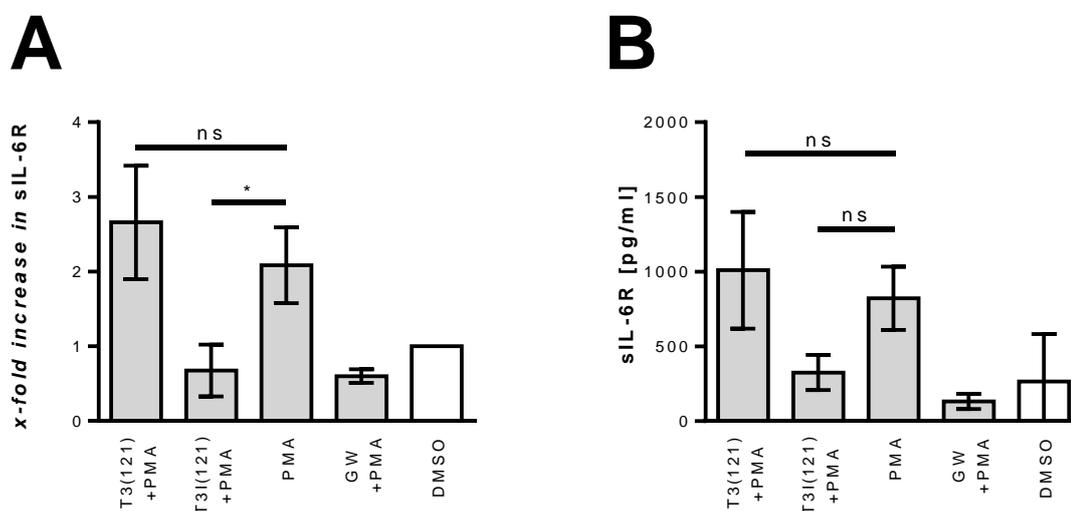
In allen Proben war sIL-6R vor Fällung nachweisbar. Nach Fällung fand sich IL-6R nur im Präzipitat von T3I(121), jedoch nicht in den Proben mit T3(121) und der Negativkontrolle. Als Gegenkontrolle dienten die Überstände nach Fällung. Hier ließ sich der IL-6R für T3(121) und die Negativkontrolle nachweisen (s. Abbildung 10).

Die Immunopräzipitation zeigt eindeutig, dass eine Bindung zwischen dem IL-6R und T3I(121) besteht und durch den IL-6R sdAb vermittelt sein muss.

### 7.2.3. T3I(121) ist in der Lage, ADAM17 vermitteltes IL-6R *shedding* zu inhibieren

Um die Wirkung von T3I(121) auf das ADAM17 vermittelte *shedding* quantitativ zu analysieren, wurde induziertes *shedding* in HepG2- und HEK293-Zellen untersucht. Es wurden Zellkulturüberstände von transient transfizierten CHO-K1-Zellen eingesetzt und die Aktivität von ADAM17 mit PMA-Lösung induziert. Die Zellkulturüberstände wurden nach Inkubation entnommen und mittels hIL-6R ELISA quantifiziert. Eine statistische Auswertung der Ergebnisse findet sich in Abbildung 11.

Bei Verwendung von HEK293-Zellen zeigte sich eine inhibitorische Aktivität von T3I(121), die sich in einer signifikanten Reduktion der Konzentration des sIL-6R im Vergleich mit der Negativkontrolle manifestierte ( $p = 0,0447$ ). Das Fusionsprotein T3(121) zeigte keinen signifikanten Effekt auf das IL-6R *shedding* ( $p = 0,5175$ ). Bei den mit HepG2-Zellen durchgeführten Experimenten ließ sich jedoch zum Signifikanzniveau  $\alpha = 0,05$  kein signifikanter Effekt von T3I(121) auf das IL-6R *shedding* nachweisen



**Abbildung 11: T3I(121) führt auf HEK293-Zellen zu einer signifikanten Reduktion der ADAM17 vermittelten Bildung von sIL-6R**

(A) HEK293-Zellen wurden mit einem Plasmid, das für humanen IL-6R kodiert transfiziert. 48 h später wurden die Zellen 30 min mit T3I(121), T3(121) oder GW inkubiert und anschließend 2 h mit 100 nM PMA stimuliert. Der sIL-6R im Zellkulturüberstand wurde mittels hIL-6R ELISA quantifiziert. Die Konzentration des löslichen Rezeptors ohne Stimulation wurde auf 1 gesetzt und die Erhöhung nach Stimulation (*x-fold increase*) dementsprechend berechnet. Als Signifikanztest wurde eine einfaktorische Varianzanalyse (One-way ANOVA) mit anschließendem Bonferroni-Test durchgeführt. ( $n = 3$ , MW  $\pm$  SD), \* $p < 0,05$ , nicht signifikant (ns).

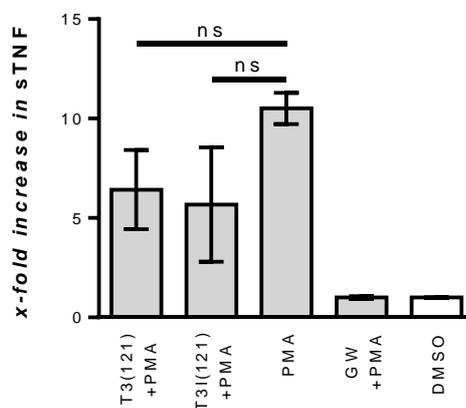
(B) Das Experiment wurde, wie in (A) beschrieben, durchgeführt, aber es wurden HepG2-Zellen benutzt. ( $n = 3$ , MW  $\pm$  SD), nicht signifikant (ns).

( $p = 0,1236$ ). Dies liegt möglicherweise an der hohen Variabilität zwischen den einzelnen Experimenten, die bei Betrachtung der einzelnen Rohdaten einen deutlichen Trend zu zeigen schienen.

#### 7.2.4. T3I(121) wirkt spezifisch auf das *shedding* von IL-6R

Zum Nachweis der Selektivität von T3I(121) wurde ADAM17 vermitteltes *shedding* bei SKOV3-Zellen untersucht. Diese Zellen exprimieren endogen TNF auf der Zelloberfläche, welches ebenso wie der IL-6R durch ADAM17 proteolytisch freigesetzt wird (Black, Rauch et al. 1997). Wenn das Fusionsprotein T3I(121) ADAM17 substratspezifisch inhibiert, sollten die sTNF Konzentrationen in diesem Experiment im Gegensatz zu den sIL-6R Konzentrationen (s. Abschnitt 7.2.3) nicht vermindert sein.

Abbildung 12 zeigt, dass T3I(121) im Vergleich zu der Negativkontrolle keine signifikante Verminderung der ADAM17 Aktivität bewirkt ( $p = 0,0574$ ). Auch T3(121) zeigt



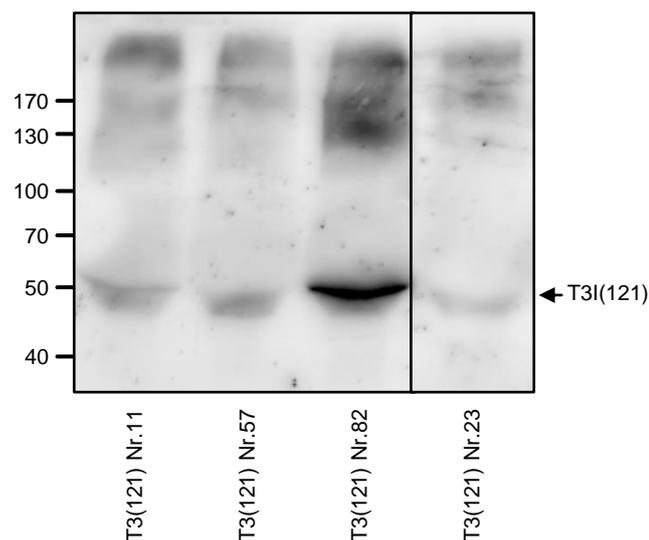
**Abbildung 12: In SKOV3-Zellen hat T3I(121) keinen signifikanten Effekt auf die Freisetzung von TNF durch ADAM17**

SKOV3-Zellen wurden 30 min mit T3I(121), T3(121) und GW inkubiert und anschließend 2 h mit 100 nM PMA stimuliert. Der sTNF im Zellkulturüberstand wurde mittels hTNF ELISA quantifiziert. Die Konzentration des löslichen Rezeptors ohne Stimulation wurde auf 1 gesetzt und die Erhöhung nach Stimulation (*x-fold increase*) dementsprechend berechnet. Als Signifikanztest wurde eine einfaktorische Varianzanalyse (One-way ANOVA) mit anschließendem Bonferroni-Test durchgeführt. ( $n = 3$ ,  $MW \pm SD$ ), nicht signifikant (ns);

wie erwartet keine signifikante Wirkung ( $p = 0,1036$ ). T3I(121) ist also sowohl aktiv als auch spezifisch für IL-6R.

### 7.2.5. Affinitätsreinigung von T3I(121) aus Zellkulturüberständen stabil transfizierter Zelllinien

Im weiteren Verlauf sollte der Effekt von T3I(121) quantifiziert werden. Zu diesem Zweck musste das Fusionsprotein aus Zellkulturüberständen gereinigt werden. Um eine möglichst hohe Ausbeute zu erreichen, wurden CHO-K1-Zellen stabil mit pcDNA3.1(+)-T3I(121) transfiziert und es erfolgte die Selektion des Einzelklons, der die beste Effizienz bei der Bildung des Fusionsproteins zeigte (s. Abbildung 13 sowie Abschnitt 6.18.5.1ff). Die so selektierten Zellen wurden in *Rollerbottle*-Zellkultur gehalten bis genug Zellkulturüberstand für eine Reinigung zur Verfügung stand, dann wurde das Protein mittels Affinitätsreinigung gewonnen.



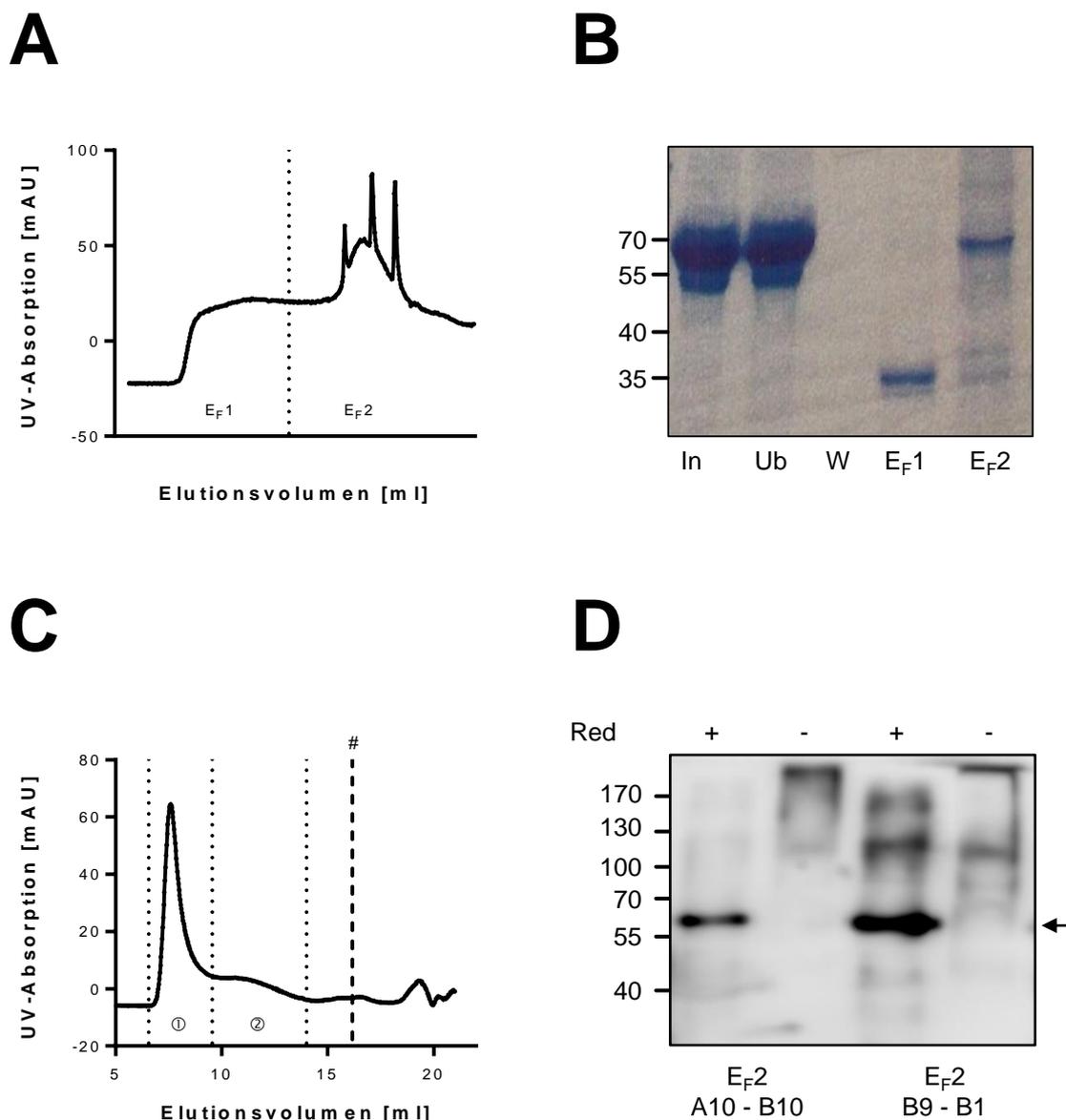
**Abbildung 13: Verschiedene stabil transfizierte CHO-K1-Zelllinien zeigen unterschiedliche T3I(121)-Expressionslevel**

CHO-K1-Zellen wurden stabil mit pcDNA3.1(+)-T3I(121) transfiziert. Nach einer zehntägigen Selektionsphase wurden Zellkulturüberstände von zeitgleich und in gleicher Anzahl ausgesäten Zelllinien mittels Western Blot unter Verwendung eines  $\alpha$ -Fc-POD Antikörpers auf die Produktion von T3I(121) untersucht. Einzelklon Nr. 82 wurde für die Produktion von T3I(121)-haltigen *Rollerbottle*-Zellkulturüberständen ausgewählt ( $n = 1$ ).

Bei der Affinitätsreinigung werden die Zellkulturüberstände über eine Protein-A-Säule gepumpt, wobei die IgG1 Fc-Teile der Fusionsproteine an das Protein A binden. Danach können die gebundenen Proteine mit saurem Zitratpuffer eluiert werden. Die eluierten Proteine werden über eine Gelfiltrationssäule nach Molekülmassen voneinander getrennt und in einzelnen Fraktionen gesammelt. Die Abbildungen zeigen jeweils die UV-Absorption zu unterschiedlichen Zeiten bei  $\lambda = 280$  nm. UV-Strahlen dieser Wellenlänge werden von Proteinen (hauptsächlich durch Tryptophan) absorbiert. Auf der X-Achse wird das Elutionsvolumen angegeben, welches nach einer bestimmten Zeit unter Voraussetzung einer konstanten Flussrate über die jeweilige Säule geflossen ist. Bei der Gelfiltration kann unter Voraussetzung globulärer Proteinkonfiguration mit Hilfe eines Größenstandards abgeschätzt werden, welche Molekülmasse eine Proteinfraktion hat, die bei einem bestimmten Elutionsvolumen eluiert.

Abbildung 14A zeigt den Verlauf der UV-Absorption während der Elution von gebundenem T3I(121) von der Protein A Agarose Säule. Es wurden zwei Elutionsfraktionen gewonnen. Elutionsfraktion 1 ( $E_{F1}$ ) wurde mit einem Puffergemisch aus 70% Elutionspuffer I und 30% Elutionspuffer II eluiert. Elutionsfraktion 2 ( $E_{F2}$ ) wurde mit Elutionspuffer II eluiert. Die *spikes* in der Elutionskurve sind artifiziell. Sie entstehen durch Anhalten der peristaltischen Pumpe. Gemäß der Absorptionskurve sollte nur Elutionsfraktion 2 T3I(121) enthalten. Beide Elutionsfraktionen, eine Probe der Überstände vor und nach Bindung an die Protein A Säule sowie eine Probe der *wash*-Fraktion wurden via SDS-PAGE und anschließender Coomassie-Brillant-Blau Färbung auf Reinheit überprüft (s. Abbildung 14B).  $E_{F1}$  enthielt erwartungsgemäß kein T3I(121). Bei dem vorhandenen Protein mit einer Molekülmasse von etwa 35 kDa könnte es sich um freien IgG1 Fc-Teil von degradiertem T3I(121) handeln.  $E_{F2}$  enthält T3I(121).

In einem zweiten Schritt wurden die Proteine der  $E_{F2}$  über eine Gelfiltrationssäule nach Molekülmasse voneinander getrennt. Abbildung 14C zeigt eine UV-Absorptionskurve der Gelfiltration. Markiert sind die erwartete Größe des T3I(121)-Dimers von etwa 116 kDa (gestrichelte Linie, Elutionsvolumen ca. 16 ml) sowie die gewonnenen Elutionsfraktionen (zwischen den gepunkteten Linien). Entgegen der Erwartung hat die Hauptfraktion (Fraktionen  $E_{F2}$  A10-B10, Elutionsvolumina 6,5 ml – 9,5 ml) der eluierten Proteine eine sehr hohe Molekülmasse. Die Ausschlussgröße liegt bei etwa 4000 kDa, der Größenstandard beginnt bei 12,46 ml. Hier eluierende Proteine haben bei globulärer Konfiguration



#### Abbildung 14: Affinitätsreinigung von T3I(121)

(A) UV-Absorptionskurve (bei  $\lambda = 280$  nm) der Protein A Affinitätsreinigung. Elutionsfraktion 1 ( $E_{F1}$ ): 70% Elutionspuffer 1 und 30% Elutionspuffer 2; Elutionsfraktion 2 ( $E_{F2}$ ): Elutionspuffer 2; Eine detaillierte Beschreibung der Reinigung findet sich in Abschnitt 7.2.5. Das verwendete Protokoll findet sich in Abschnitt 6.17.10 ( $n = 1$ ).

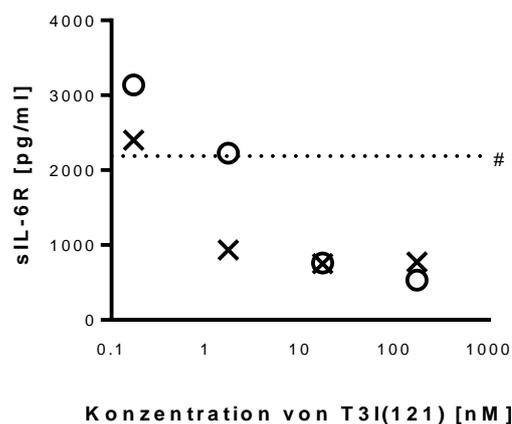
(B) Coomassie-Brillant-Blue Färbung der Reinigungsfraktionen  $E_{F1}$  und  $E_{F2}$ . Input (In): Zellkulturüberstände aus Rollerbottles, Unbound (Ub): Zellkulturüberstände nach Passage der Protein A Säule, Wash (W): Waschfraktion der Säule nach Bindung des Proteins ( $n = 1$ ).

(C) UV-Absorptionskurve (bei  $\lambda = 280$  nm) der Gelfiltration von  $E_{F2}$  aus (A). #: mit diesem Elutionsvolumen müsste ein T3I(121) Dimer der Molekülgröße 116 kDa eluieren. (1): Elutionsfraktionen  $E_{F2}$  A10 – B10, (2): Elutionsfraktionen  $E_{F2}$  B9 – B1. Eine detaillierte Beschreibung der Reinigung findet sich in Abschnitt 7.2.5. Das verwendete Protokoll findet sich in Abschnitt 6.17.10 ( $n = 1$ ).

(D) Western Blot der Elutionsfraktionen der Gelfiltration (C). Es wurde ein  $\alpha$ -Fc-POD Antikörper verwendet. Die Molekülmasse von T3I(121) ist mit einem Pfeil markiert. Reduktionsmittel (Red):  $\beta$ -Mercaptoethanol ( $n = 1$ ).

eine Molekülmasse von ca. 700 kDa. Auch die zweite gesammelte Fraktion E<sub>F2</sub> B9-B1 (Elutionsvolumina 9,5 ml – 14,0 ml) enthielt Proteine, die deutlich größer als 116 kDa sind. Da die gewonnene Proteinmenge nach Gelfiltration aus einem Liter *Rollerbottle*-Zellkulturüberstand bei einer Konzentration von 3 µg/ml nur im zweistelligen Mikrogrammbereich lag wurde keine SDS-PAGE mit Coomassie-Brillant-Blau Färbung, sondern die deutlich sensitivere SDS-PAGE mit Immunodetektion des IgG1 Fc-Teils durchgeführt. Zusätzlich wurden die Proben hier reduzierend und nicht-reduzierend aufgetragen, um eine Komplexbildung durch Disulfidbrückenbindungen zu untersuchen. Abbildung 14D zeigt, dass sowohl E<sub>F2</sub> A10-B10 als auch E<sub>F2</sub> B9-B1 T3I(121) enthielten. Beide Elutionsfraktionen wiesen außerdem unter nicht reduzierenden Bedingungen eine hohe Aggregation bzw. Multimerformation auf.

### 7.2.6. Quantifizierung der biologischen Aktivität des gereinigten T3I(121)



**Abbildung 15: Gereinigtes T3I(121) inhibiert dosisabhängig ADAM17 vermitteltes IL-6R shedding**  
HepG2-Zellen wurden für 30 min mit verschiedenen Konzentrationen zwischen 0,172 nM und 172 nM des gereinigten T3I(121) sowie dem Elutionspuffer (als Negativkontrolle) inkubiert und dann für 2 h mit 100 nM PMA stimuliert. Der lösliche Rezeptor im Zellkulturüberstand wurde mittels hIL-6R ELISA quantifiziert. #: Konzentration des sIL-6R in der Negativkontrolle; x: T3I(121) E<sub>F1</sub> A10 – B10; o: T3I(121) E<sub>F2</sub> B9 – B1 (s. Abschnitt 7.2.5) (n = 1).

Die inhibitorische Aktivität des gereinigten Proteins gegenüber ADAM17 wurde durch Analyse des Einflusses auf induziertes *shedding* und Quantifizierung des freigesetzten Substrates mittels hIL-6R ELISA quantifiziert.

Interessanterweise zeigt sich trotz der in den Abschnitten 7.2.1 und 7.2.5 beschriebenen Aggregation in Abbildung 15 ein deutlicher Effekt des gereinigten T3I(121) auf die ADAM17 Aktivität in HepG2-Zellen. Bei Konzentrationen von etwa 1,5 – 15 nM kommt es zum maximalen inhibitorischen Effekt.

Aufgrund der nicht vorhandenen Sättigung im Bereich niedriger Konzentrationen sowie der lediglich einmaligen Durchführung dieses Experimentes war es nicht möglich eine  $IC_{50}$  für T3I(121) zu berechnen. Allerdings zeugt schon ein grober, qualitativer Vergleich mit etablierten Inhibitoren von der inhibitorischen Potenz des Fusionsproteins. Der für die in dieser Arbeit gezeigten Positivkontrollen verwendete, für Disintegrin-ähnliche Metalloproteinasen spezifische Inhibitor GW280264X weist in zellbasierten *assays* eine  $IC_{50}$  von 1,9  $\mu$ M für ADAM17 auf (Ludwig, Hundhausen et al. 2005).

### **7.2.7. Klonierung einer Cys(121)-freien T3I Variante**

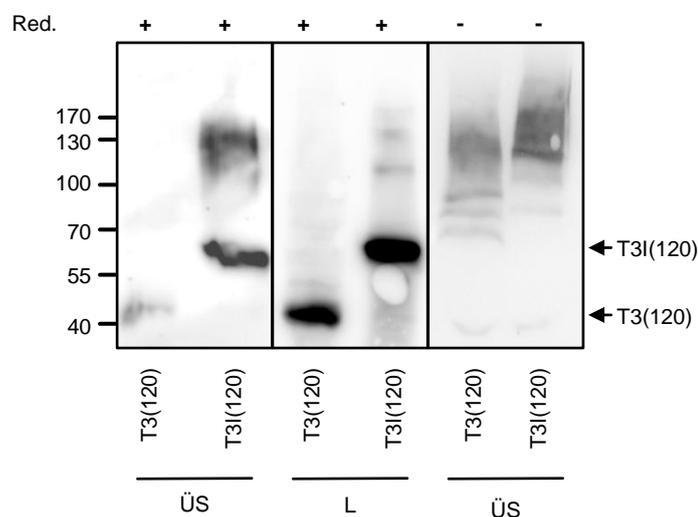
Aufgrund der starken Polymerisierung wurde eine Variante des T3I(121) kloniert, deren inhibitorische Domäne gegenüber dem Ausgangsprotein um eine Aminosäure verkürzt ist. Hierdurch sollte erreicht werden, dass keine freien, d.h. nicht oxidierten Thiolgruppen des Cysteins in Position 121 zu Quervernetzungen zwischen den T3I(120) Dimeren führen. Es wurde ebenfalls ein T3(120) kloniert.

Zur Deletion des Codons, das für Cys(121) kodiert, wurde die gerichtete Mutagenese verwendet. Die mutierten Plasmide wurden pcDNA3.1(+)-TIMP3(1-120)-Linker-IL-6R sdAb-Fc (pcDNA3.1(+)-T3I(120)) und pcDNA3.1(+)-TIMP3(1-120)-Linker-Fc (pcDNA3.1(+)-T3(120)) genannt und mittels Sequenzierung überprüft und verifiziert.

## 7.2.8. Generierung von T3I(120) enthaltenden Zellkulturüberständen

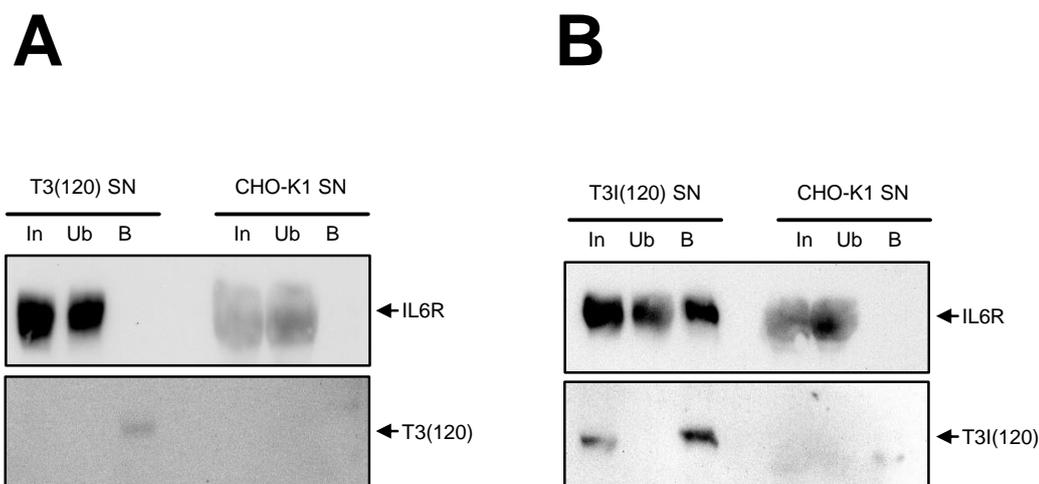
Die Proteine T3I(120) und T3(120) wurden in CHO-K1-Zellen mittels transienter Transfektion exprimiert und sekretiert. Die Überstände wurden mit SDS-PAGE und Western Blot mit einem  $\alpha$ -Fc-POD Antikörper untersucht.

Abbildung 16 zeigt eine deutliche Expression und Sekretion von T3I(120) (Molekülmasse ca. 58 kDa) in den Zellkulturüberstand. Interessant ist vor allem die nicht reduzierende Gelelektrophorese die im Vergleich mit der nicht reduzierenden Gelelektrophorese von T3I(121) (s. Abschnitt 7.2.1 oder Abbildung 9) eine eindeutige Verschiebung der Hauptfraktion des Proteins zu Komplexen mit niedrigeren und definierten Molekülmassen zeigt. Es zeigen sich zwei größere distinkte Fraktionen bei etwa 120 kDa und 180 kDa. Diese Molekülmassen entsprechen den errechneten Massen von Di- und Trimeren.



### Abbildung 16: Detektion der Expression von T3I(120) durch CHO-K1-Zellen

CHO-K1-Zellen wurden mit pcDNA3.1(+)-T3I(120) und pcDNA3.1(+)-T3(120) transfiziert. 48 h nach Transfektion wurde ein Zellaufschluss durchgeführt. Die Detektion erfolgte in Überständen (ÜS) und Ly-saten (L) mittels Western Blot unter Verwendung eines  $\alpha$ -Fc-POD Antikörper; Reduktionsmittel (Red):  $\beta$ -Mercaptoethanol (n = 1).



**Abbildung 17: sIL-6R bindet an den IL-6R sdAb von T3I(120)**

(A) Zellkulturüberstand aus mit pcDNA3.1(+)-T3(120) transfizierten CHO-K1-Zellen und Überstände von Wildtyp-CHO-K1-Zellen wurden mit rekombinantem sIL-6R über Nacht inkubiert und mit Protein A Agarose gefällt. Auf der oberen Membran ist ein Western Blot mit einem  $\alpha$ -humanen IL-6R Antikörper, auf der unteren Membran ein Western Blot mit einem  $\alpha$ -Fc-POD Antikörper zu sehen. ÜS: Zellkulturüberstand, In: *input*-Fraktion vor Fällung, Ub: *unbound*-Fraktion, B: Präzipitat (n=3).

(B) Immunopräzipitation wie in (A), aber Zellkulturüberstände, die T3I(120) enthalten (n=3).

### 7.2.9. T3I(120) bindet den IL-6R

Die Interaktion von T3I(120) mit dem IL-6R wurde mittels Immunopräzipitation (s. Abschnitt 6.17.9) analysiert. Die in Abschnitt 7.2.8 beschriebenen Zellkulturüberstände wurden mit rekombinantem sIL-6R inkubiert und anschließend mit Protein A Agarose gefällt.

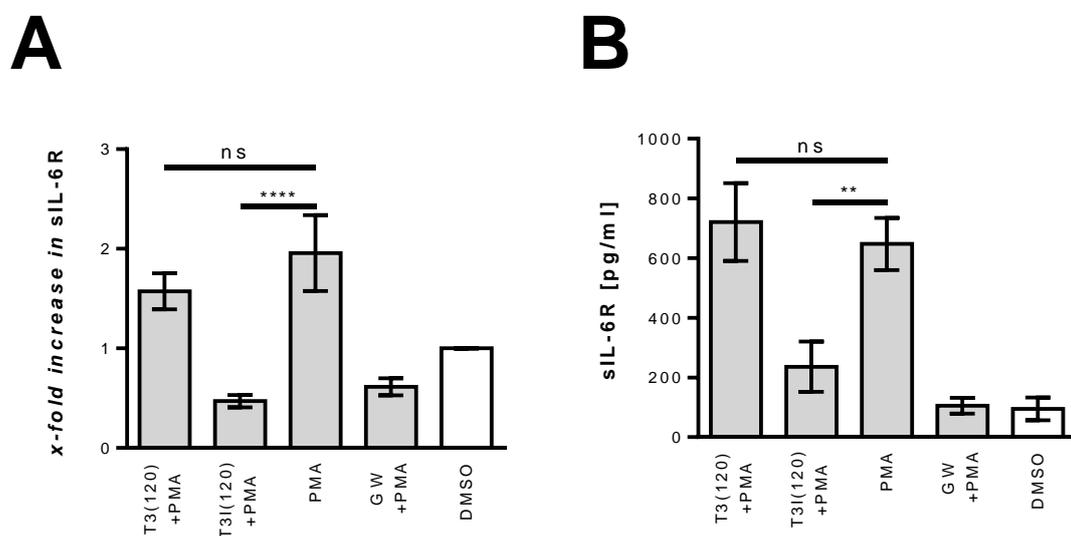
Aus Abbildung 17 ist ersichtlich, dass das Fusionsprotein den IL-6R bindet. Des Weiteren weist T3(120) genau wie die Negativkontrolle keine Affinität für den IL-6R auf. Der IL-6R sdAb vermittelt also die Substratbindung von T3I(120). Die Deletion von Cys(121) aus T3I(121) hat, dementsprechend, keine Auswirkung auf die Interaktion mit dem IL-6R.

## 7.2.10. T3I(120) verhindert die proteolytische Spaltung von IL-6R durch ADAM17

Die Untersuchung von ADAM17 vermitteltem *shedding* sollte Aufschluss darüber geben, ob T3I(120) nach wie vor über inhibitorisches Potential verfügt. Zu diesem Zweck wurde induziertes *shedding* in Anwesenheit des Fusionsproteins sowohl auf HepG2-Zellen als auch auf HEK293-Zellen untersucht.

Abbildung 18A zeigt bei HEK293-Zellen eine signifikante Reduktion der Konzentration von sIL-6R im Vergleich zur Negativkontrolle ( $p < 0,0001$ ). T3(120) zeigt keinen signifikanten Effekt ( $p = 0,0585$ ). Abbildung 18B zeigt eine signifikante Inhibition von ADAM17 durch T3I(120) ( $p = 0,0053$ ) sowie erneut keinen signifikanten Effekt von T3(120) bei HepG2-Zellen ( $p = 0,8298$ ).

Diese Ergebnisse sind konsistent mit dem bereits in Abschnitt 7.2.3 für T3I(121) belegten inhibitorischen Effekt.



**Abbildung 18: Das *shedding* von IL-6R durch ADAM17 wird durch T3I(120) gehemmt**

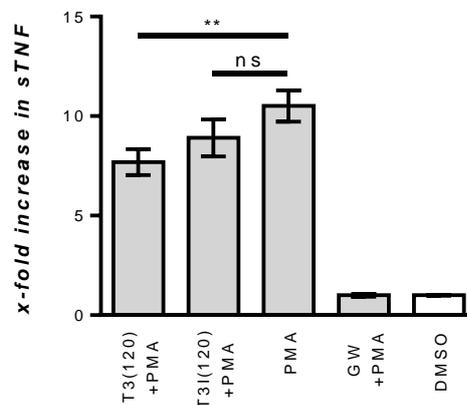
(A) Das Experiment wurde entsprechend der Beschreibung in Abbildung 11A mit HEK293-Zellen durchgeführt. Allerdings wurden Überstände mit T3I(120) und T3(120) verwendet. Als Signifikanztest wurde eine einfaktorische Varianzanalyse (One-way ANOVA) mit anschließendem Bonferroni-Test durchgeführt. ( $n = 5$ ,  $MW \pm SD$ ) \*\*\*\* $p < 0,0001$ . ns, nicht signifikant.

(B) Das Experiment wurde wie in Abbildung 11A beschrieben durchgeführt aber es wurden Überstände mit T3I(120) und T3(120) und HepG2-Zellen benutzt. Als Signifikanztest wurde eine einfaktorische Varianzanalyse (One-way ANOVA) mit anschließendem Bonferroni-Test durchgeführt. ( $n = 3$ ,  $MW \pm SD$ ) \*\* $p < 0,01$ . ns, nicht signifikant.

### 7.2.11. T3I(120) zeigt keinen kreuzreaktiven Einfluss auf die Freisetzung von sTNF

Im Anschluss an den Nachweis der Aktivität von T3I(120) wurde die Substratspezifität der generierten Fusionsproteine hinsichtlich des ADAM17 vermittelten *shedding* überprüft.

Abbildung 19 zeigt die Konzentration von sTNF nach induzierter ADAM17 Aktivität. T3I(120) hat keinen signifikanten Effekt auf die Menge des freigesetzten sTNF ( $p = 0,0971$ ). Interessanterweise führt T3(120) in den hier ausgewerteten Experimenten zu einer signifikanten Reduktion der Konzentration von sTNF ( $p = 0,0098$ ). Dieser Effekt ist möglicherweise dadurch erklärbar, dass TIMP3 *in vivo* als Inhibitor von ADAM17 wirkt (Amour, Slocombe et al. 1998). Ein auf TIMP3 basierendes Fusionsprotein sollte in ausreichend hoher Konzentration auch ohne zusätzliche, affinitätsvermittelnde Struktur in der Lage sein, ADAM17 Aktivität zu beeinflussen. Die meisten Experimente dieser



**Abbildung 19: T3I(120) hemmt das ADAM17 vermittelte TNF *shedding* in SKOV3-Zellen nicht**

Das Experiment wurde wie in Abbildung 12 mit SKOV3-Zellen durchgeführt. Es wurden Zellkulturüberstände mit T3I(120) und T3(120) verwendet. Als Signifikanztest wurde eine einfaktorische Varianzanalyse (One-way ANOVA) mit anschließendem Bonferroni-Test durchgeführt. ( $n = 3$ ,  $MW \pm SD$ )  $**p < 0,01$ . ns, nicht signifikant.

Arbeit zeigen allerdings keinen signifikanten Effekt von Inhibitorstrukturen ohne eine Domäne, die Substratspezifität vermittelt.

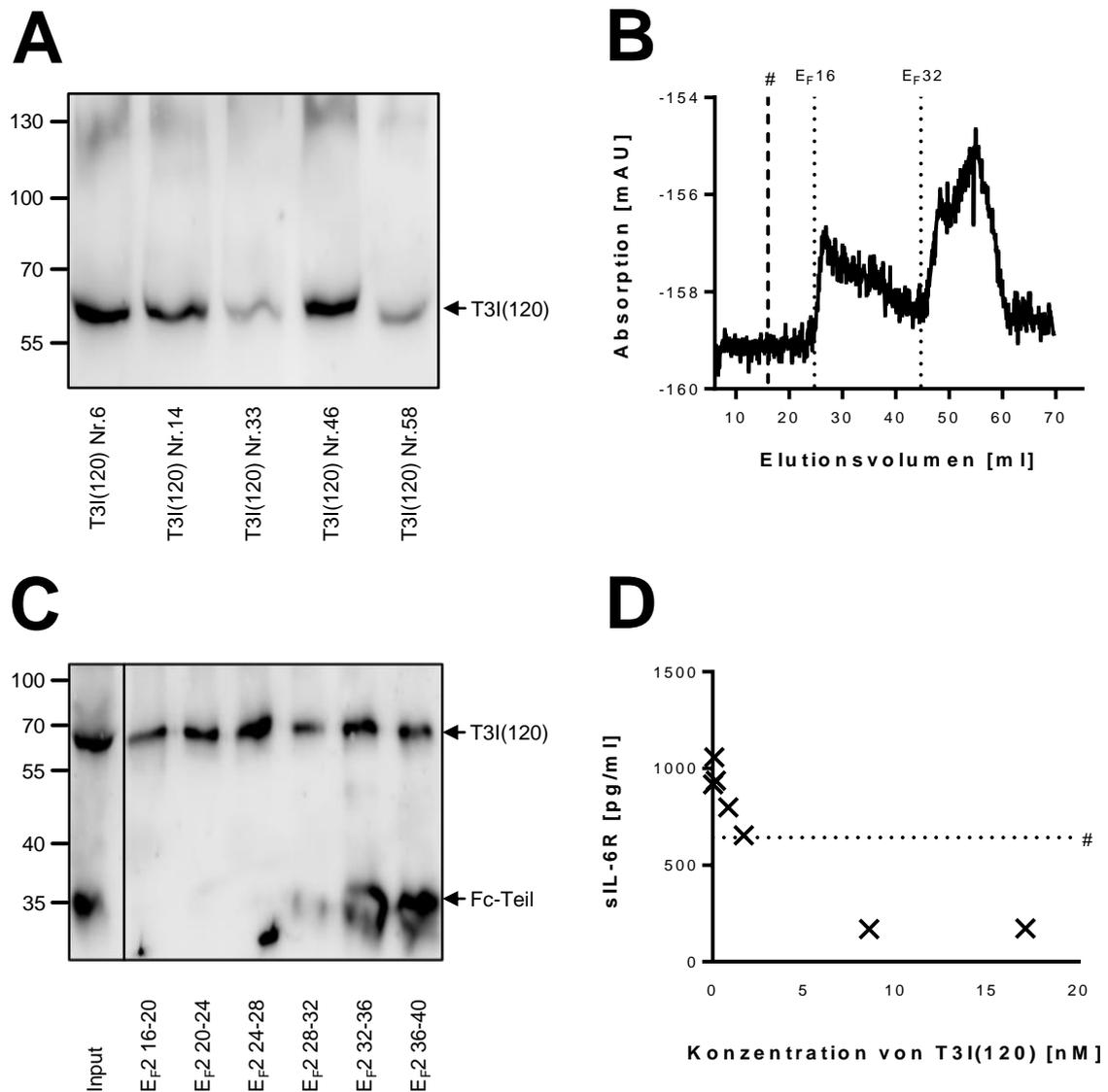
T3I(120) ist im Vergleich zu T3I(121) ähnlich aktiv und substratspezifisch. Es bindet ebenfalls eindeutig den IL-6R, allerdings aggregiert es weniger und bildet distinktere Oligomere.

### **7.2.12. Isolierung von T3I(120) aus Zellkulturüberständen und Untersuchung auf Affinität und biologische Aktivität**

Da sich T3I(120) in den vorausgegangenen Experimenten als Alternative zu T3I(121) dargestellt hatte, wurden CHO-K1-Zellen stabil mit pcDNA3.1(+)-T3I(120) transfiziert. Nach einer Selektionsphase wurde der beste Klon per Screening mittels Western Blot (s. Abbildung 20A) ausgewählt und in *Rollerbottles* kultiviert. Die Zellkulturüberstände aus den *Rollerbottles*, welche lösliches T3I(120) enthielten wurden gesammelt und das Protein im Anschluss isoliert.

Die Methode der Affinitätsreinigung wurde entsprechend der Reinigung von T3I(121) (s. Abschnitt 7.2.5) durchgeführt. Abbildung 20B zeigt die Gelfiltration (s. Abschnitt 6.17.10) von Elutionsfraktion 2 aus dem zuvor erfolgten Reinigungsschritt mittels Protein A Säule. Es wurden Elutionsfraktionen von je 0,5 ml Volumen genommen und anschließend mittels Western Blot auf enthaltenes T3I(120) getestet. Es zeigte sich, dass mit zunehmendem Elutionsvolumen mehr freie Fc-Fragmente auftraten (vgl. Abbildung 20C). Aus diesem Grund wurden nur die Fraktionen E<sub>F2</sub> 16 bis E<sub>F2</sub> 32 vereinigt, konzentriert und auf ihren Proteingehalt untersucht. Die Ausbeute der Proteinreinigung aus einem Liter Zellkulturüberstand der stabil transfizierten CHO-K1-Zellen betrug etwa 14 µg T3I(120) bei einer Konzentration von 56 µg/ml in einem Gesamtvolumen von 250 µl.

Das gereinigte Protein wurde hinsichtlich seines Einflusses auf ADAM17 vermitteltes IL-6R *shedding* untersucht. Zu diesem Zweck wurde nach Inkubation von HepG2-Zellen mit verschiedenen Konzentrationen T3I(120) *shedding* induziert und im Anschluss die Konzentration des freigesetzten sIL-6R mit hIL-6R ELISA bestimmt.



**Abbildung 20: Vergleich der Expressionslevel von T3I(120) in stabil transfizierten CHO-K1-Zellen, Affinitätsreinigung von T3I(120) und Nachweis der Aktivität von gereinigtem T3I(120)**

(A) Das Experiment wurde wie in Abbildung 13 beschrieben durchgeführt. Nach zehntägiger Selektionsphase wurde unter Verwendung eines  $\alpha$ -Fc-POD Antikörpers die Produktion von T3I(120) nachgewiesen. Einzelklon Nr. 6 wurde zur Produktion von T3I(120)-haltigen *Rollerbotte*-Zellkulturüberständen ausgewählt ( $n = 1$ ).

(B) UV-Absorptionskurve (bei  $\lambda = 280$  nm) der Gelfiltration der Elutionsfraktion 2 des ersten Reinigungsschrittes mittels einer Protein-A-Säule. #, mit diesem Elutionsvolumen müsste ein T3I(120) Dimer der Molekülgröße 116 kDa eluieren. Es wurden Elutionsfraktionen von je 1 ml Volumen entnommen. Markiert sind die Fraktionen 16 und 32. Eine detaillierte Beschreibung der Reinigung findet sich in Abschnitt 7.2.12. Das verwendete Protokoll findet sich in 6.17.10 ( $n = 1$ ).

(C) Western Blot der Elutionsfraktionen der Gelfiltration (C). Input: Zellkulturüberstand vor Protein A Affinitätsreinigung. Es wurde ein  $\alpha$ -Fc-POD Antikörper verwendet. Fc-Teil: Bei dieser Bande handelt es sich am ehesten um freie Fc-Fragmente ( $n = 1$ ).

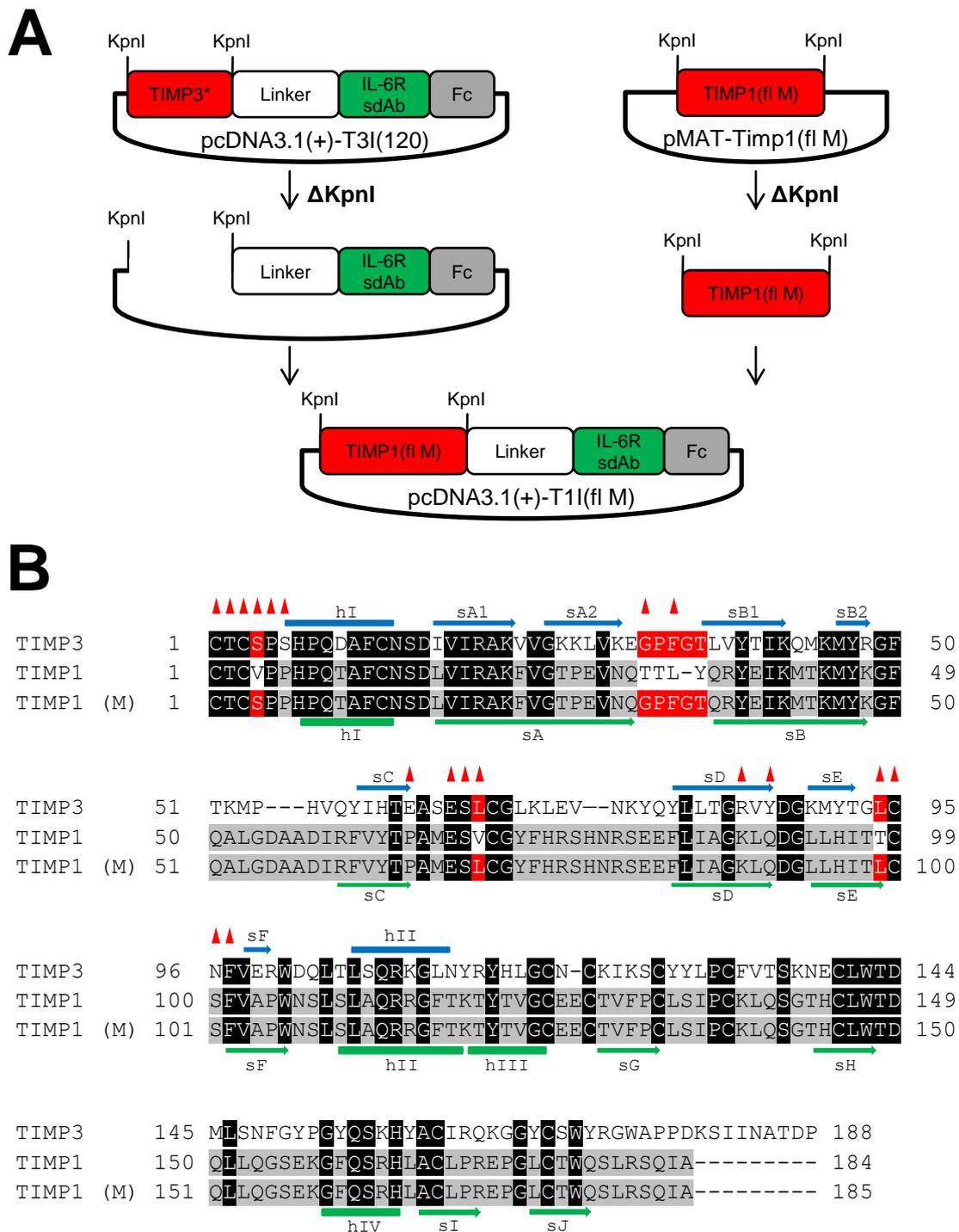
(D) HepG2-Zellen wurden für 30 min mit verschiedenen Konzentrationen zwischen 0,017 nM und 17 nM des gereinigten T3I(120) sowie dem Elutionspuffer (als Negativkontrolle) inkubiert und dann für 2 h mit 100 nM PMA stimuliert. Der lösliche Rezeptor im Zellkulturüberstand wurde mittels hIL-6R ELISA quantifiziert. #, Konzentration des sIL-6R in der Negativkontrolle. x, T3I(120) EF2 16-32 (s. Abschnitt 7.2.12) ( $n = 1$ ).

Abbildung 20D zeigt eine eindeutige, starke Wirkung des gereinigten T3I(120) auf die ADAM17 Aktivität. Die Konzentrationen, die zur maximalen Inhibition des Enzyms nötig sind, liegen im nanomolaren Bereich und entsprechen ungefähr den benötigten Konzentrationen von T3I(121) (vgl. Abschnitt 7.2.6). T3I(120) ist also ebenso wie T3I(121) ein potenter, spezifischer Inhibitor von ADAM17. Allerdings eluiert T3I(120) ähnlich wie T3I(121) nicht mit der erwarteten, sondern einer deutlich höheren Molekülmasse. Die Multimerisierungs- bzw. Aggregationsproblematik ist also augenscheinlich nicht behoben.

### **7.2.13. Implementierung einer TIMP1 Mutationsvariante an Stelle von TIMP3 zur Reduzierung der Multimerisierungstendenz**

Aufgrund der geringen Ausbeuten von TIMP3 basierten *shedding* Inhibitoren und der in Abschnitt 7.2.12 beschriebenen weiterhin auftretenden Aggregationsproblematik wurde in einem nächsten Schritt ein TIMP3-freier ADAM Proteaseinhibitor entworfen. Ein potenzieller weiterer Mechanismus, der die geringen Ausbeuten und Multimerisierung der TIMP3-Fc-Fusionsproteine erklären könnte, ist die genauer in Abschnitt 4.3 beschriebene Bindung von TIMP3 an extrazelluläre Matrix (Yu, Yu et al. 2000). Darum wurde ein anderes Mitglied der TIMP Familie, nämlich TIMP1, für weitere Fusionsproteine verwendet. TIMP1 ist ein potenter, natürlich auftretender Inhibitor von ADAM10, allerdings nicht von ADAM17. Wildtyp-TIMP1 besitzt eine Affinität von  $K_i = 356 \pm 87$  nM zur katalytischen Domäne von ADAM17, während die Affinität von TIMP3 zur katalytischen Domäne von ADAM17 bei  $0,22 \pm 0,07$  nM liegt (Lee, Maskos et al. 2002). Für die Erstellung eines neuen Fusionsproteins verwendeten wir daher die inhibitorische Domäne eines modifizierten TIMP1, die mit einem IL-6R sdAb fusioniert wurde (s. Abbildung 21A).

Die drei Aminosäuren Ser(4) und Leu(69) (Lee, Maskos et al. 2002) sowie Thr(98) (Lee, Rapti et al. 2004) wurden als affinitätsvermittelnde Strukturen identifiziert, welche TIMP1 die Fähigkeit verleihen ADAM17 zu binden. Außerdem ist der AB-Loop obligat für die Stabilität der Bindung zwischen TIMP3 und ADAM17 (Lee, Maskos et al. 2002). Die Mutationen V4L, V69L und der Austausch des AB-Loops Thr(32)-Thr(33)-Leu(34)-



**Abbildung 21: Klonierungsschema für pcDNA3.1(+)-T1I(fl M) und *sequence alignment* von TIMP3, Wildtyp-TIMP1 und TIMP1 (V4S, TIMP3AB, V69L, T98L)**

(A) Klonierungsschema für die Erstellung des Expressionsplasmids pcDNA3.1(+)-T1I(fl M). Eine detaillierte Erläuterung der Klonierung ist Abschnitt 7.2.13 zu entnehmen.

(B) *Sequence alignment* von humanem TIMP3, humanem Wildtyp-TIMP1 und TIMP1 (V4S, TIMP3AB, V69L, T98L), in der Abbildung als TIMP1 (M) bezeichnet. Rote Dreiecke markieren Aminosäuren, die für die Bindung an die katalytische Domäne von ADAM17 relevant sind. Blaue Pfeile zeigen die Position und Größe der  $\alpha$ -Helices (h), blaue Pfeile die Position und Größe der  $\beta$ -Faltblätter (s) von TIMP3 (Analog in grün für TIMP1). Aminosäuren, die allen drei Proteinen gemeinsam sind, sind schwarz hinterlegt. Aminosäuren, die nur wt-TIMP1 und TIMP1(M) gemeinsam sind, sind grau hinterlegt. Aminosäuren, die nur wt-TIMP3 und TIMP1(M) gemeinsam sind, sind rot hinterlegt. Die für die Klonierung verwendeten Oligonukleotide sind in Abschnitt 6.6 aufgeführt.

Tyr(35) gegen Gly(32)-Pro(33)-Phe(34)-Gly(35)-Thr(36) (im Weiteren als TIMP3AB bezeichnet) führen zu einer Affinität von  $K_i = 15 \pm 3$  nM von TIMP1 zur katalytischen Domäne von ADAM17 (Lee, Maskos et al. 2002). Eine zusätzliche Modifikation von Thr(98) zu Leucin erhöht diese Affinität auf  $0,14 \pm 0,06$  nM (Lee, Rapti et al. 2004). Ein *sequence alignment* von TIMP3, Wildtyp-TIMP1 und der von uns erstellten Variante TIMP1(V4S, TIMP3AB, V69L, T98L) ist in Abbildung 21B zu sehen.

Die TIMP1(V4S, TIMP3AB, V69L, T98L)-cDNA wurde durch GeneArt (Thermo Scientific) synthetisiert, mit flankierenden KpnI-Schnittstellen versehen und in ein pMAT-Plasmid kloniert, welches pMAT-TIMP1(V4S, TIMP3AB, V69L, T98L) genannt wurde. Aus diesem wurde das TIMP1(V4S, TIMP3AB, V69L, T98L)-Fragment mit KpnI ausgeschnitten, phosphoryliert und subkloniert.

Als Ausgangsplasmide dienten die in Abschnitt 7.2.7 beschriebenen Plasmide pcDNA3.1(+)-T3I(120) und pcDNA3.1(+)-T3(120), in denen die für TIMP3(1 - 120) kodierende Sequenz ebenfalls von KpnI-Schnittstellen flankiert ist. Sie wurden mit KpnI gespalten, dephosphoryliert und mit dem TIMP1(V4S, TIMP3AB, V69L, T98L)-Fragment ligiert.

Die entstandenen Plasmide wurden pcDNA3.1(+)-TIMP1(V4S, TIMP3AB, V69L, T98L)(*full length*)-Linker-Fc (pcDNA3.1(+)-T1(fl M)) und pcDNA3.1(+)-TIMP1(V4S, TIMP3AB, V69L, T98L)(*full length*)-Linker-IL-6R sdAb-Fc (pcDNA3.1(+)-T1I(fl M)) genannt und durch Sequenzierung verifiziert. Die erwartete Molekülmasse von T1(fl M) beträgt etwa 51 kDa, die Molekülmasse von T1I(fl M) beträgt etwa 66 kDa.

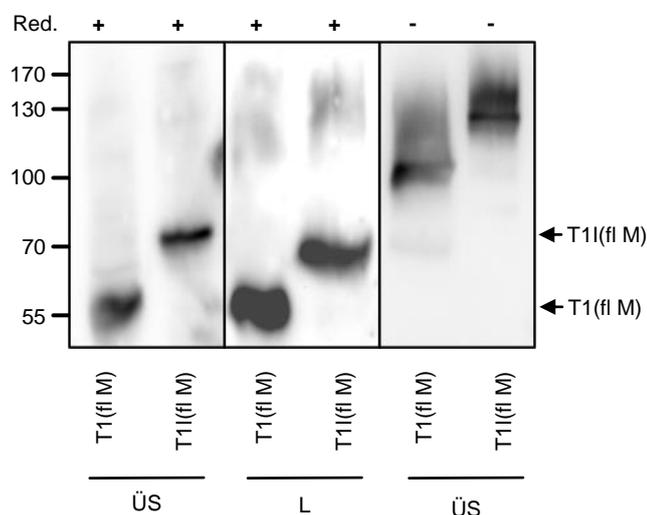
Es wurden auch Expressionsplasmide kloniert, welche nur die 120 Aminosäuren lange n-terminale Domäne von TIMP1(V4S, TIMP3AB, V69L, T98L) enthalten. Hierzu wurde eine PCR-Reaktion durchgeführt und die für TIMP1(V4S, TIMP3AB, V69L, T98L) (1-120) kodierende Gensequenz mittels KpnI wie oben bereits beschrieben in die, mit KpnI geschnittenen, Plasmide pcDNA3.1(+)-T3I(120) und pcDNA3.1(+)-T3(120) subkloniert. Diese Plasmide wurden pcDNA3.1(+)-TIMP1(V4S, TIMP3AB, V69L, T98L)(1-120)-Linker-Fc (pcDNA3.1(+)-T1(120M)) und pcDNA3.1(+)-TIMP1(V4S, TIMP3AB, V69L, T98L) (1-120)-Linker-IL-6R sdAb-Fc (pcDNA3.1(+)-T1I(120M)) genannt und durch Sequenzierung verifiziert.

Die Proteine T1(120M) und T1I(120M) zeigten in ersten orientierenden Experimenten in CHO-K1-Zellen eine deutlich geringere Expression und Sekretion als T1(fl M) und T1I(fl M). Zudem hatten sie bei Versuchen mit HEK293- und HepG2-Zellen auch eine geringere Auswirkung auf ADAM17 vermitteltes IL-6R *shedding*. Aus diesem Grund und zur Vermeidung von Redundanz werden im Folgenden nur die Ergebnisse aus Experimenten mit T1(fl M) und T1I(fl M) vorgestellt.

### 7.2.14. T1I(fl M) wird von CHO-K1-Zellen exprimiert und sekretiert

Die Expressionsplasmide pcDNA3.1(+)-T1(fl M) und pcDNA3.1(+)-T1I(fl M) wurden transient in CHO-K1-Zellen transfiziert und die Zellkulturüberstände mittels Western Blot untersucht.

Abbildung 22 zeigt, dass sowohl T1(fl M) als auch T1I(fl M) exprimiert und in den Zellkulturüberstand sekretiert werden. Die nicht reduzierende Gelelektrophorese zeigt im



**Abbildung 22: Transient transfizierte CHO-K1-Zellen exprimieren T1I(fl M)**

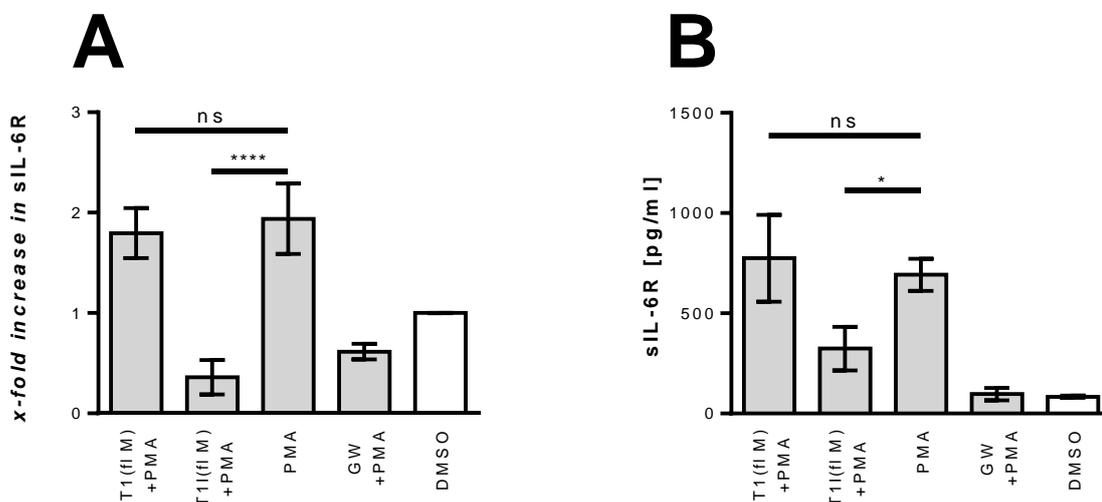
CHO-K1-Zellen wurden mit pcDNA3.1(+)-T1I(fl M) und pcDNA3.1(+)-T1(fl M) transfiziert. 48 h nach Transfektion wurde ein Zellaufschluss durchgeführt. Die Detektion erfolgte in Überständen (ÜS) und Ly-saten (L) mittels Western Blot unter Verwendung eines  $\alpha$ -Fc-POD Antikörper. Reduktionsmittel (Red):  $\beta$ -Mercaptoethanol (n=1).

Vergleich mit den für T3I(121) (vgl. Abbildung 9) und T3I(120) (vgl. Abbildung 16) gezeigten nicht reduzierenden Gelelektrophoresen eine geringere Aggregationsneigung. Die Hauptfraktion des Proteins im Zellkulturüberstand liegt in Form eines Dimers vor.

### 7.2.15. T1I(fl M) inhibiert die Freisetzung von sIL-6R durch ADAM17

Um die inhibitorische Aktivität von T1I(fl M) zu eruieren, wurde der Einfluss auf induziertes, ADAM17 vermitteltes *shedding* des IL-6R in Zellen untersucht.

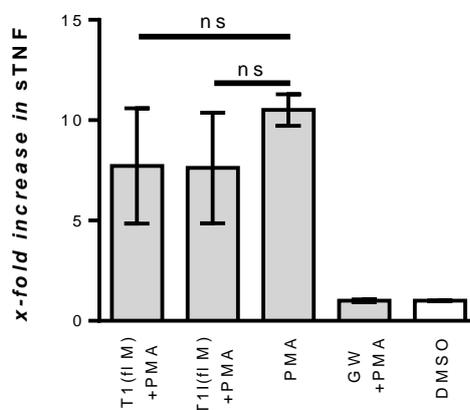
Aus Abbildung 23 wird ersichtlich, dass das Kontrollkonstrukt T1(fl M) wie erwartet zu keiner signifikanten Veränderung der Konzentration des freigesetzten sIL-6R im Vergleich zur Negativkontrolle führte ( $p = 0,7293$  auf HEK293-Zellen und  $p > 0,9999$  auf HepG2-Zellen). Im Gegensatz dazu wurde die Menge des proteolytisch gespaltenen IL-6R in Gegenwart von T1I(fl M) auf HepG2-Zellen ( $p = 0,0447$ ) und auf HEK293-Zellen ( $p < 0,0001$ ) signifikant reduziert.



**Abbildung 23: T1I(fl M) vermindert die proteolytische Spaltung von membrangebundenem IL-6R durch ADAM17**

(A) Das Experiment wurde entsprechend der Beschreibung in Abbildung 11A mit HEK-293-Zellen durchgeführt. Allerdings wurden Überstände mit T1I(fl M) und T1(fl M) verwendet. Als Signifikanztest wurde eine einfaktorische Varianzanalyse (One-way ANOVA) mit anschließendem Bonferroni-Test durchgeführt. ( $n = 6$ , MW  $\pm$  SD) \*\*\*\* $p < 0,0001$ . ns, nicht signifikant.

(B) Das Experiment wurde wie in Abbildung 11A beschrieben durchgeführt, aber es wurden Überstände mit T1I(fl M) und T1(fl M) sowie HepG2-Zellen benutzt. Als Signifikanztest wurde eine einfaktorische Varianzanalyse (One-way ANOVA) mit anschließendem Bonferroni-Test durchgeführt. ( $n = 3$ , MW  $\pm$  SD) \* $p < 0,05$ . ns, nicht signifikant.



**Abbildung 24: Der Effekt von T1I(fl M) auf die ADAM17 Aktivität ist substratspezifisch**

Das Experiment wurde wie in Abbildung 12 mit SKOV3-Zellen durchgeführt. Es wurden mit T1I(fl M) und T1(fl M) verwendet. Als Signifikanztest wurde eine einfaktorielle Varianzanalyse (One-way ANOVA) mit anschließendem Bonferroni-Test durchgeführt ( $n = 3$ ,  $MW \pm SD$ ). ns, nicht signifikant.

### 7.2.16. Die ADAM17-Inhibition durch T1I(fl M) ist substratspezifisch

Zur Analyse der Substratspezifität wurde die Wirkung von T1I(fl M) auf die proteolytische Freisetzung von TNF durch ADAM17 nach Induktion mit PMA-Lösung untersucht. Diese sollte unverändert, d.h. auf dem Niveau der Negativkontrolle sein. In Abbildung 24 zeigt sich bei Experimenten mit SKOV3-Zellen kein signifikanter inhibitorischer Effekt auf die proteolytische Spaltung von sTNF ( $p = 0,3614$ ). Auch T1(fl M) führt zu keiner signifikanten Veränderung der Konzentration von freigesetztem sTNF ( $p = 0,3889$ ).

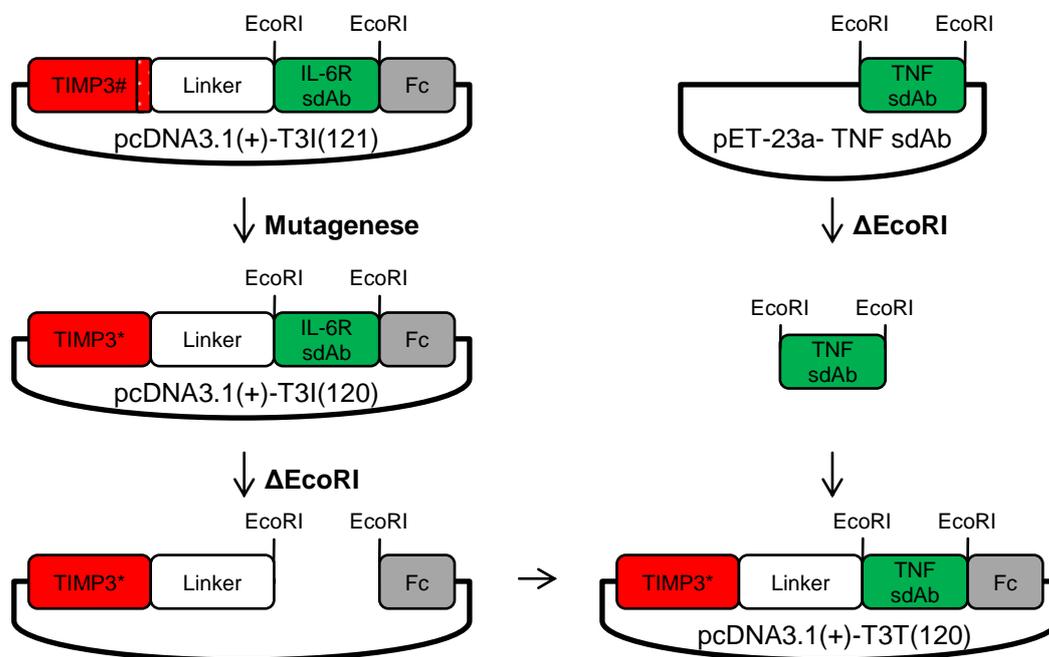
## 7.3. Inhibition von TNF *shedding*

Der Nachweis der Aktivität (s. Abschnitt 7.2.3) und IL-6R-Spezifität (s. Abschnitt 7.2.4) sowie die orientierende Einschätzung der Affinität von T3I(121) (s. Abschnitt 7.2.6)

erbrachten den Beweis, dass eine substratspezifische Inhibition durch Verwendung von sdAbs möglich ist. In einem nächsten Schritt sollte ein weiteres therapeutisch relevantes Substrat von ADAM17 als Ziel der Intervention getestet werden. Zu diesem Zweck wurden Fusionsproteine kloniert, deren Substratspezifität durch einen sdAb gegen TNF vermittelt wird. TNF ist ein klinisch hochgradig relevantes Substrat von ADAM17 (Black, Rauch et al. 1997, Moss, Jin et al. 1997). Es spielt eine wichtige Rolle in einer Vielzahl von physiologischen und pathologischen Prozessen. Diese Weiterführung des Projektes sollte neben der offensichtlich interessanten Modulation der TNF Freisetzung vor allem auch ein Beweis der Modularität der Inhibitorstrukture erbringen. Es sollte mit diesem System möglich sein, bei vorliegender cDNA für einen sdAb gegen ein ADAM17 Substrat kurzfristig einen spezifischen, hochaffinen Inhibitor gegen dieses herzustellen.

### 7.3.1. Klonierung eines Expressionsplasmids für T3T(120)

Expressionsplasmide für einen TIMP3 basierten TNF spezifischen *shedding* Inhibitor wurden hergestellt, indem die Sequenz eines TNF spezifischen sdAbs in



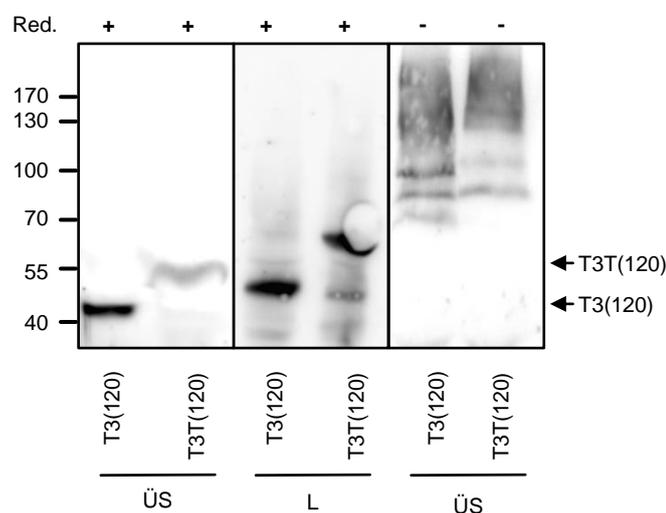
**Abbildung 25: Schematische Klonierung des Expressionsplasmids für T3T(120)**

Klonierungsschema für die Erstellung des Expressionsplasmids pcDNA3.1(+)-T3T(120). Eine detaillierte Erläuterung der Klonierung ist Abschnitt 7.3.1 zu entnehmen. Die für die Klonierung verwendeten Oligonukleotide sind in Abschnitt 6.6 aufgeführt. TIMP3#: 121 Aminosäuren lange TIMP3 Teildomäne; TIMP3\*, 120 Aminosäuren lange TIMP3 Teildomäne.

pcDNA3.1(+)-T3I(120)-Plasmid (s. Abschnitt 7.2.7) subkloniert wurde. Die cDNA des TNF-sdAb wurde dabei mittels EcoRI Restriktion aus einem in der Arbeitsgruppe vorhandenen pet-23a-TNF sdAb-Plasmid (Plagmann, Chalaris et al. 2009) gespalten und phosphoryliert. Durch Ligation beider Komponenten entstand ein Plasmid, das pcDNA3.1(+)-TIMP3(1-120)-Linker-TNF sdAb-Fc (pcDNA3.1(+)-T3T(120)) genannt und mittels Sequenzierung verifiziert wurde (vgl. Abbildung 25).

### 7.3.2. T3T(120) wird von transient transfizierten CHO-K1-Zellen exprimiert

pcDNA3.1(+)-T3T(120) wurde transient in CHO-K1-Zellen transfiziert und die Zellkulturüberstände 48 h nach Transfektion mittels Western Blot mit einem  $\alpha$ -Fc-POD Antikörper qualitativ analysiert. pcDNA3.1(+)-T3(120) wurde als Kontrolle ebenfalls transfiziert.



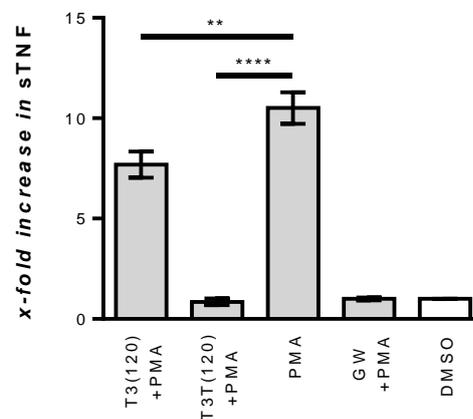
#### Abbildung 26: Expression von T3T(120) in CHO-K1-Zellen

CHO-K1-Zellen wurden mit pcDNA3.1(+)-T3T(120) und pcDNA3.1(+)-T3(120) transfiziert. 48 h nach Transfektion wurde ein Zellaufschluss durchgeführt. Die Detektion erfolgte in Überständen (ÜS) und Ly-saten (L) mittels Western Blot unter Verwendung eines  $\alpha$ -Fc-POD Antikörper. Reduktionsmittel (Red):  $\beta$ -Mercaptoethanol (n=1).

Abbildung 26 zeigt eine deutliche Expression und Sekretion des Fusionsproteins T3T(120) in den Zellkulturüberstand. Die Gelelektrophorese mit nicht denaturierendem Laemmlipuffer zeigt ein stabiles Dimer bei etwa 130 kDa sowie zusätzlich eine deutliche Aggregation. Dies kann an der Bindung extrazellulärer Matrix durch TIMP3 liegen (Yu, Yu et al. 2000).

### 7.3.3. T3T(120) verhindert effektiv die proteolytische Freisetzung von sTNF durch ADAM17

Die in Abschnitt 7.3.2 gewonnenen Zellkulturüberstände wurden hinsichtlich ihrer Wirkung auf die proteolytische Freisetzung von TNF durch ADAM17 auf SKOV3-Zellen untersucht. Hierzu wurde ADAM17 vermitteltes *shedding* in Anwesenheit von T3T(120) sowie T3(120) mit PMA induziert und die Konzentration des freigesetzten sTNF mit hTNF ELISA quantifiziert.



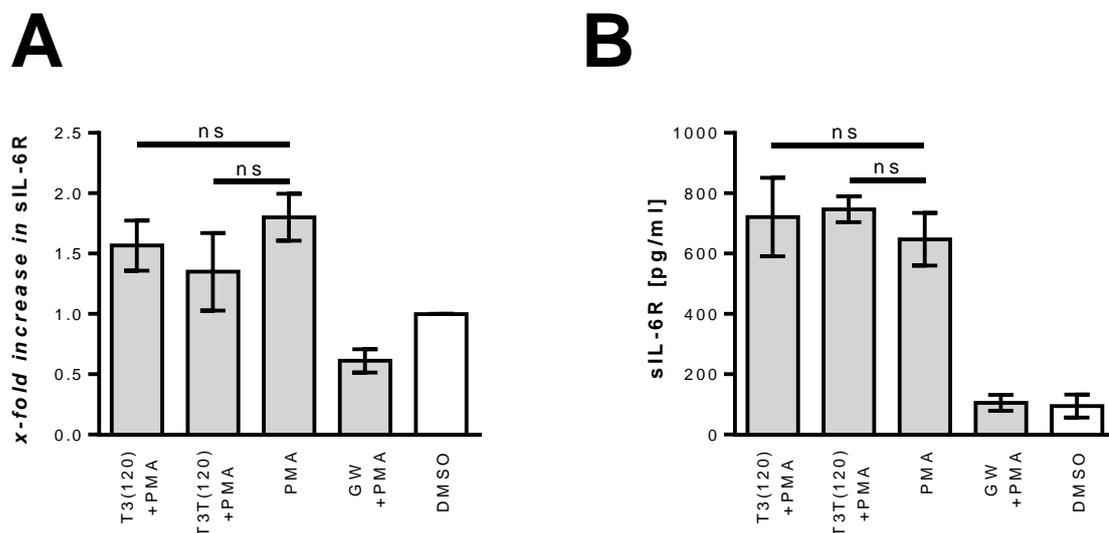
**Abbildung 27: T3T(120) reduziert das ADAM17 vermittelte *shedding* von TNF**

Das Experiment wurde wie in Abbildung 12 mit SKOV3-Zellen beschrieben durchgeführt. Es wurden Zellkulturüberstände mit T3T(120) und T3(120) verwendet. Als Signifikanztest wurde eine einfaktorische Varianzanalyse (One-way ANOVA) mit anschließendem Bonferroni-Test durchgeführt ( $n = 3$ ,  $MW \pm SD$ ). \*\*\*\* $p < 0,0001$ , \*\* $p < 0,01$ .

T3T(120) zeigt eine signifikante Verminderung des proteolytisch freigesetzten sTNF im Vergleich mit der Negativkontrolle ( $p < 0,0001$ ). Auch T3(120) zeigt eine signifikante, allerdings deutlich schwächere Reduktion der sTNF Konzentration ( $p = 0,0023$ ) (s. Abbildung 27). Wie schon in Abschnitt 7.2.11 (für ein ebenfalls mit SKOV3-Zellen und T3(120) durchgeführtes Experiment) diskutiert, widerspricht die signifikante, aber schwache Inhibition von ADAM17 durch T3(120) nicht den Thesen dieser Arbeit, ist aber nur in der Minorität der Experimente nachweisbar.

### 7.3.4. T3T(120) hat keinen signifikanten Effekt auf das IL-6R shedding

Um dem Anspruch der Substratspezifität zu genügen wurde ein inhibitorischer Effekt auf ADAM17 vermitteltes *shedding* von IL-6R untersucht. Zu diesem Zweck wurden Experimente mit HepG2- und HEK293-Zellen durchgeführt.



**Abbildung 28: T3T(120) ist substratspezifisch für TNF**

(A) Das Experiment wurde entsprechend der Beschreibung in Abbildung 11A mit HEK293-Zellen durchgeführt. Allerdings wurden Überstände mit T3T(120) und T3(120) verwendet. Als Signifikanztest wurde eine einfaktorische Varianzanalyse (One-way ANOVA) mit anschließendem Bonferroni-Test durchgeführt ( $n = 4$ ,  $MW \pm SD$ ). ns, nicht signifikant.

(B) Das Experiment wurde wie in Abbildung 11A beschrieben durchgeführt aber es wurden Überstände mit T3T(120) und T3(120) sowie HepG2-Zellen benutzt. Als Signifikanztest wurde eine einfaktorische Varianzanalyse (One-way ANOVA) mit anschließendem Bonferroni-Test durchgeführt ( $n = 3$ ,  $MW \pm SD$ ). ns, nicht signifikant.

Abbildung 28 weist auf HepG2-Zellen weder für T3(120) ( $p = 0,7494$ ) noch für T3T(120) ( $p = 0,4840$ ) einen signifikanten Effekt auf die Freisetzung von sIL-6R auf. Auch auf HEK293-Zellen haben beide Fusionsproteine keinen signifikanten Effekt (T3(120) vs. NK  $p = 0,4264$  und T3T(120) vs. NK  $p = 0,0599$ ).

Die Ergebnisse der Proteinreinigung von T3I(120) (s. Abschnitt 7.2.12) führten zu dem Entschluss keinen Versuch zu unternehmen, T3T(120) aus Zellkulturüberständen zu isolieren. Der Suche nach einem nicht aggregierenden Fusionsprotein wurde an dieser Stelle Priorität eingeräumt.

### **7.3.5. Klonierung einer TNF-spezifischen TIMP1 basierten Inhibitorvariante**

Aufgrund der problematischen Aggregation und der geringen Ausbeute des T3I(120) Fusionsproteins (s. Abschnitt 7.2.12) wurde eine Produktion und Isolierung von T3T(120) nicht weiterverfolgt. Stattdessen wurde ein Expressionsplasmid kloniert, dessen inhibitorische Domäne keine extrazelluläre Matrix zu binden vermag. Es wurde das in Abschnitt 7.2.13 beschriebene TIMP1(V4S, TIMP3AB, V69L, T98L) als inhibitorische Komponente gewählt, da es durch die eingeführten Mutationen eine gute Affinität zu ADAM17 gewinnt und wie TIMP1 keine Matrixbindung aufweist. Die Klonierungsstrategie entsprach hierbei der Klonierung von pcDNA3.1(+)-T1I(fl M) aus pcDNA3.1(+)-T3I(120) (vgl. Abschnitt 7.2.13).

Die für TIMP3(120) kodierende DNA-Sequenz wurde mittels KpnI aus pcDNA3.1(+)-T3T(120) entfernt und durch die für TIMP1(V4S, TIMP3AB, V69L, T98L) kodierende DNA-Sequenz, welche ebenfalls mit KpnI aus pMAT-TIMP1(V4S, TIMP3AB, V69L, T98L) gewonnen wurde, ersetzt.

Das entstandene Plasmid wurde pcDNA3.1(+)-TIMP1(V4S, TIMP3AB, V69L, T98L)(fl)-Linker-TNF sdAb-Fc (pcDNA3.1(+)-T1T(fl M)) genannt und durch Sanger-Sequenzierung bestätigt.

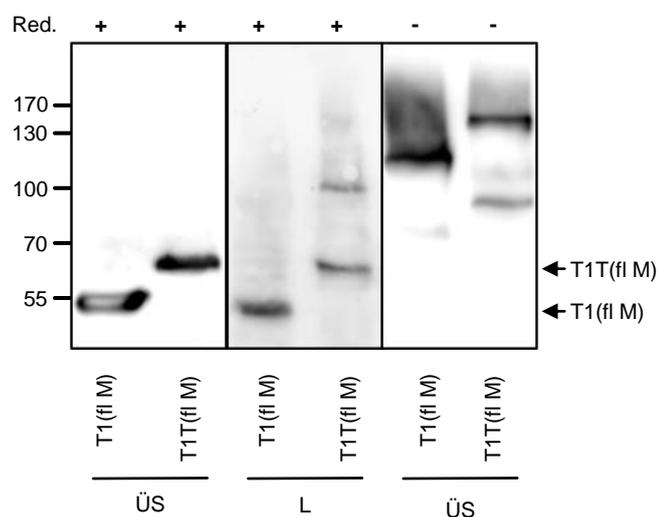
Analog zu der in Abschnitt 7.2.13 beschriebenen Erstellung von pcDNA3.1(+)-T1I(120M) aus pcDNA3.1(+)-T1I(fl M) wurde ein Plasmid kloniert, das nur für die 120 Aminosäuren lange N-terminale Domäne von TIMP1(V4S, TIMP3AB, V69L, T98L)

kodiert. Dieses Plasmid mit der Sequenzen für TIMP1(V4S, TIMP3AB, V69L, T98L) (1-120)-Linker-TNF sdAb-Fc wurde pcDNA3.1(+)-T1T(120M) genannt. Nach erfolgreicher Klonierung wurde die korrekte Sequenz mittels Sanger-Sequenzierung bestätigt. Aus den weiter oben bereits erläuterten Gründen (s. Abschnitt 7.2.13) wird auch hier auf die Präsentation der Ergebnisse aus Experimenten mit T1T(120M) verzichtet.

### 7.3.6. T1T(fl M) wird von CHO-K1-Zellen exprimiert

Um Zellkulturüberstände und -lysate zu gewinnen, die auf Expression und Sekretion überprüft sowie zur weiteren Analyse der Aktivität verwendet werden konnten, wurden die Plasmide pcDNA3.1(+)-T1(fl M) und pcDNA3.1(+)-T1T(fl M) transient in CHO-K1-Zellen transfiziert. Die erwartete Molekülmasse von T1T(fl M) liegt bei etwa 66 kDa, die Molekülmasse von T1(fl M) beträgt, wie weiter oben bereits erwähnt, etwa 51 kDa.

Abbildung 29 zeigt das Ergebnis von SDS-PAGE und Western Blot der Zellkulturüberstände und -lysate. Beide Fusionsproteine wurden exprimiert und sekretiert.



**Abbildung 29: Nachweis von T1T(fl M) bei transient transfizierten CHO-K1-Zellen**

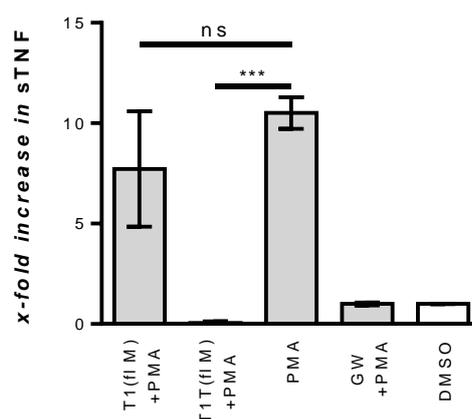
CHO-K1-Zellen wurden mit pcDNA3.1(+)-T1T(fl M) und pcDNA3.1(+)-T1(fl M) transfiziert. 48 h nach Transfektion wurde ein Zellaufschluss durchgeführt. Die Detektion erfolgte in Überständen (ÜS) und Lysaten (L) mittels Western Blot unter Verwendung eines  $\alpha$ -Fc-POD Antikörper. Reduktionsmittel (Red):  $\beta$ -Mercaptoethanol (n = 1).

Interessanterweise zeigte sich in der SDS-PAGE unter nicht reduzierenden Bedingungen (ähnlich wie bei T1I(fl M), s. Abschnitt 7.2.14) im Vergleich zu T3T(120) (s. Abschnitt 7.3.2) eine deutlich geringere Aggregation. Die Hauptfraktion des T1T(fl M) bildete eindeutig ein Dimer mit einer Molekülmasse von etwa 130 kDa, welche der erwarteten Molekülmasse des Dimers entspricht.

### 7.3.7. T1T(fl M) senkt die Konzentration von freiem sTNF nach Induktion von ADAM17

Die im vorangegangenen Abschnitt 7.3.6 beschriebenen Zellkulturüberstände wurden hinsichtlich ihres Einflusses auf das ADAM17 vermittelte TNF *shedding* untersucht. Zu diesem Zweck wurde in Anwesenheit von T1I(fl M) und T1(fl M) *shedding* auf SKOV3-Zellen induziert. Die Auswertung erfolgte durch hTNF ELISA.

T1(fl M) hat keinen signifikanten Einfluss auf die Menge des proteolytisch gespaltenen sTNF ( $p = 0,1887$ ). Im Gegensatz dazu entfaltet T1T(fl M) auf SKOV3-Zellen einen



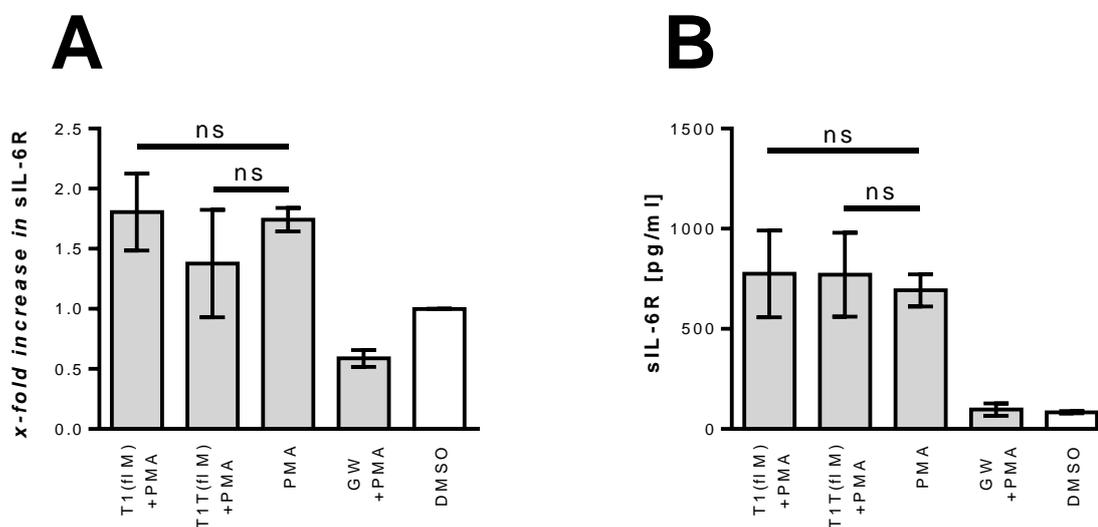
**Abbildung 30: Die Freisetzung von sTNF durch ADAM17 wird durch T1T(fl M) drastisch reduziert**  
Das Experiment wurde wie in Abbildung 12 mit SKOV3-Zellen beschrieben durchgeführt. Es wurden Zellkulturüberstände mit T1T(fl M) und T1(fl M) verwendet. Als Signifikanztest wurde eine einfaktorische Varianzanalyse (One-way ANOVA) mit anschließendem Bonferroni-Test durchgeführt ( $n = 3$ ,  $MW \pm SD$ ). \*\*\* $p < 0,001$ . ns, nicht signifikant.

fulminanten Effekt auf die Aktivität von ADAM17. Mit hoher Signifikanz ( $p = 0,0006$ ) wird die Freisetzung von sTNF reproduzierbar auf  $0,7 \pm 0,7$  % der Negativkontrolle reduziert (s. Abbildung 30).

### 7.3.8. T1T(fl M) ist substratspezifisch für TNF

Im Anschluss an den Nachweis der Aktivität von T1T(fl M) erfolgte der Test auf Substratspezifität. Hierzu wurde der Einfluss von T1T(fl M) auf induziertes, ADAM17 vermitteltes IL-6R *shedding* untersucht. Diese Experimente wurden sowohl mit HEK293- als auch mit HepG2-Zellen durchgeführt.

Weder T1(fl M) ( $p > 0,9999$ ) noch T1T(fl M) ( $p = 0,2860$ ) zeigten einen Effekt auf die IL-6R Freisetzung bei HEK-293-Zellen (s. Abbildung 31A). Auch auf HepG2-Zellen (s. Abbildung 31B) führten T1(fl M) ( $p > 0,9999$ ) und T1T(fl M) ( $p > 0,9999$ ) nicht zu einer signifikanten Verminderung an proteolytisch gespaltenem sIL-6R.



**Abbildung 31: T1T(fl M) beeinflusst das *shedding* von IL-6R durch ADAM17 nicht**

(A) Das Experiment wurde entsprechend der Beschreibung in Abbildung 11A mit HEK293-Zellen durchgeführt. Allerdings wurden Überstände mit T1T(fl M) und T1(fl M) verwendet. Als Signifikanztest wurde eine einfaktorische Varianzanalyse (One-way ANOVA) mit anschließendem Bonferroni-Test durchgeführt ( $n = 4$ , MW  $\pm$  SD). ns, nicht signifikant.

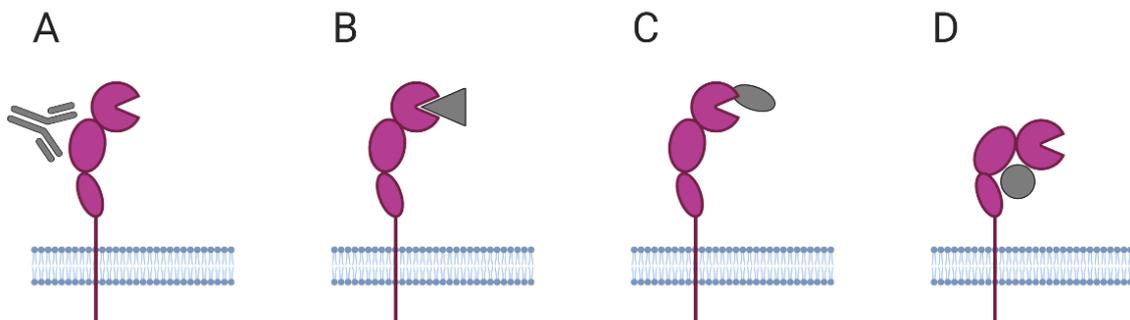
(B) Das Experiment wurde wie in Abbildung 11A beschrieben durchgeführt aber es wurden Überstände mit T1T(fl M) und T1(fl M) sowie HepG2-Zellen benutzt. Als Signifikanztest wurde eine einfaktorische Varianzanalyse (One-way ANOVA) mit anschließendem Bonferroni-Test durchgeführt ( $n = 3$ , MW  $\pm$  SD). ns, nicht signifikant.

T1T(fl M) wird also gut exprimiert und sekretiert, neigt weniger zur Aggregation als die TIMP3 enthaltenden Fusionsproteine, ist stark inhibitorisch aktiv und substratspezifisch.

## 8. Diskussion

ADAM Proteasen werden aufgrund ihrer pleiotropen Wirkmechanismen (s. Abschnitt 4.2.1 sowie bei Moss and Minond (2017)) in verschiedenen Krankheitsentitäten schon lange als interessante Ziele therapeutischer Intervention eingeschätzt.

Trotz der eindeutigen Bedeutung von ADAM Proteasen in der klinischen Praxis und diversen Versuchen Inhibitoren zu entwickeln und zu etablieren stehen noch keine zugelassenen Medikamente in relevanter Indikation zur Verfügung. Der aktuelle Forschungsstand postuliert neben inhibitorischen Ansätzen im Zuge der Translation, Expression, Abspaltung der Prodomäne und Freisetzung aus dem endoplasmatischen Retikulum vier Ansätze zur direkten Inhibition von ADAM Proteasen, nämlich eine Inhibition mittels inhibitorischer Antikörper oder sdAbs (s. Abbildung 32A), eine Inhibition am aktiven Zentrum zum Beispiel über Zink bindende, hydroxamatbasierte *small molecule inhibitors* (SMIs) oder TIMPs (s. Abbildung 32B), rekombinante



**Abbildung 32: Schematische Übersicht verschiedener Ansatzpunkte einer ADAM Inhibition *in vivo***  
Mögliche Angriffspunkte für eine ADAM Inhibition *in vivo* (A) Eine Inhibition mittels inhibitorischer Antikörper oder sdAbs, (B) eine Inhibition am aktiven Zentrum zum Beispiel über Zink bindende hydroxamatbasierte SMIs oder TIMPs, (C) rekombinante Prodomänen oder (D) *exosite*-Inhibitoren.

---

Prodomänen (s. Abbildung 32C) oder *exosite*-Inhibitoren (s. Abbildung 32D). In klinischen Studien sind allerdings bisher nur SMIs getestet worden.

Für *in vitro* oder Tierversuche stehen einige ADAM Inhibitoren wie das für ADAM10 und ADAM17 spezifische GW 280264X (Ludwig, Hundhausen et al. 2005), das ADAM10 spezifische GI254023X oder der Breitspektrum Inhibitor Marimastat, der neben ADAM17 auch diverse MMPs inhibiert (Rasmussen and McCann 1997, Roghani, Becherer et al. 1999), zur Verfügung.

Batimastat war einer der ersten Breitspektrum MMP Inhibitoren, der es in klinische Studien schaffte. Dort zeigt sich aber schnell eine intolerabel schlechte Bioverfügbarkeit bei oraler Einnahme (Rasmussen and McCann 1997) und Nebenwirkungen wie Gelenksteifigkeit, Entzündungen und Schmerzsyndrome. Die Weiterentwicklung wurde in einem frühen Stadium eingestellt (Cathcart and Cao 2015).

Marimastat war eine Weiterentwicklung des gleichen Konzeptes auf dem auch Batimastat beruhte. Es zeigte sich insgesamt besser verträglich und besser bioverfügbar, weshalb es bis zu klinischen Phase III Studien weiterentwickelt, dann aber aufgrund niedriger Effektivität hinsichtlich der untersuchten Indikationen und dosisabhängiger, muskuloskelettaler Nebenwirkungen eingestellt wurde (Steward 1999, Sparano, Bernardo et al. 2004, Groves, Puduvalli et al. 2006).

Der nächste Fortschritt war die Entwicklung von SMIs. Zwei wichtige Vertreter dieser Klasse sind MMI270, ein hydroxamatbasierter SMI, der es bis in klinische Studien schaffte aber aufgrund von Hautausschlägen und muskuloskelettalen Nebenwirkungen eingestellt wurde (Levitt, Eskens et al. 2001), und BMS-561392, das eine gute ADAM17 Inhibition zeigte und sich im Mausmodell positiv auf Arthritis auswirkte (Moss, Sklair-Tavron et al. 2008, Arribas and Esselens 2009), allerdings in klinischen Studien eine deutliche Lebertoxizität aufwies und deshalb nicht weiterentwickelt wurde (Duffy, Mullooly et al. 2011). Lebertoxizität zeigte sich als Problem aller hydroxamatbasierten SMIs, was auf eine fehlende Substratspezifität der ADAM17 Inhibition zurückzuführen sein könnte (Peschon, Slack et al. 1998).

Der erste spezifischere MMP Inhibitor war Tanomastat (effektiv gegen MMP-2, -3, -8, -9, -13), ein carboxylatbasierter Inhibitor aus der Klasse der SMIs, der aufgrund hämatologischer Toxizität und mangelnder Effektivität bezüglich der Endpunkte der klinischen

---

Studien (*overall-* und *progression-free survival* bei fortgeschrittenem Ovarial-Ca) versagte (Hirte, Vergote et al. 2006).

Neuere, auf monoklonalen Antikörpern basierende, ADAM Inhibitoren zeigen in ersten Experimenten eine deutlich verbesserte Enzymspezifität. Erste Experimente mit D1 (A12), einem bispezifischen Antikörper, der sowohl die katalytische als auch die Disintegrin-cysteinreiche-Domäne von ADAM17 bindet, verhinderte in einem Mausmodell des Ovarialkarzinoms effektiv das Tumorstadium und reduzierte das *shedding* von ADAM17 Substraten, darunter TNF, TGF $\alpha$ , HG-EGF und Amphiregulin (Tape, Willems et al. 2011, Richards, Tape et al. 2012, Huang, Benaich et al. 2014). Auch MEDI3622, ebenfalls ein anti-ADAM17 Antikörper, zeigte eine gute antiprogredive Wirkung in verschiedenen Tumormodellen und blockiert das *shedding* diverser ADAM17 Substrate (Rios-Doria, Sabol et al. 2015).

Obwohl schon seit den 1990er Jahren verschiedene Ansätze zur Inhibition von MMPs und ADAM Proteasen in klinischen Studien getestet wurden, ist bisher nur ein einziger MMP Inhibitor in der klinischen Praxis zugelassen. Es handelt sich hierbei um das Antibiotikum Doxycyclin in subantimikrobieller Dosis zur Behandlung einer durch das übliche Therapieregime unzureichend behandelten Parodontose. Aufgrund strittiger Effektivität (Greenstein 2004, Caton and Ryan 2011) und bei mehrmonatiger Therapiedauer hohen Anforderungen an die Therapieadhärenz der Patienten besteht allerdings derzeit keine generelle Empfehlung in den Leitlinien der Fachgesellschaften.

Allen bisher in klinischen Studien getesteten Konzepten ist gemeinsam, dass keine Spezifität bezüglich einer Protease erzielt werden konnte. Die Entwicklung monoklonaler Antikörper gegen ADAM Proteasen befindet sich noch in einem frühen Stadium. Eine kombinierte Spezifität hinsichtlich Zielenzym und eines einzelnen Substrates ist unserer Kenntnis nach bisher nicht angestrebt worden. Wahrscheinlich trägt diese mangelnde Spezifität einen großen Teil zu den Nebenwirkungen, der Toxizität und der schlechten Effektivität in den klinischen Studien bei (Zucker, Cao et al. 2000, Coussens, Fingleton et al. 2002, Georgiadis and Yiotakis 2008, Moss, Sklair-Tavron et al. 2008).

Je unspezifischer die Inhibitoren hinsichtlich des Zielenzym sind, umso höher ist das Risiko *antitargets* negativ zu beeinflussen, beispielsweise neben dem eigentlichen Zielenzym auch ein Spektrum anderer, homöostatisch elementarer Enzyme zu inhibieren, was

---

Nebenwirkungen erzeugen, gewünschte Effekte maskieren und sich im schlechtesten Fall negativ auf den Erkrankungsverlauf auswirken kann (Overall and Kleinfeld 2006).

Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, ein neuartiges Konzept zur Generierung inhibitorischer Fusionsproteine zu erarbeiten, die in erster Linie substratspezifisch, aufgrund des verwendeten mechanistischen Ansatzes aber auch verhältnismäßig enzyspezifisch sind. Wir begannen mit der Etablierung eines Inhibitors von ADAM17 vermitteltem IL-6R *ectodomain shedding*. Dieser Inhibitor sollte in der Lage sein IL-6 *trans-signaling* zu unterbinden, während *classic signaling* über tmIL-6R relativ unbeeinflusst bleiben würde. Im weiteren Verlauf sollte gezeigt werden, dass dieses Konzept auch auf andere Substrate von ADAM17 übertragbar ist. Zu diesem Zweck generierten wir TNF spezifische Fusionsproteine und wiesen nach, dass diese bei drastischer Verringerung der sTNF Konzentrationen keinerlei signifikanten Einfluss auf das IL-6R *ectodomain shedding* zeigten.

Der Aufbau der Fusionsproteine basierte hierbei auf der Idee eines modifizierbaren, modularen Fusionsproteins, das aus mehreren leicht austauschbaren Domänen besteht. Die inhibitorische Effektor Komponente realisierten wir durch eine TIMP Teildomäne (s.u.), dann folgte ein Linker, der gewährleistet, dass nach Bindung des Fusionsproteins an sein Substrat eine Komplexbildung von TIMP mit ADAM17 nicht sterisch behindert würde. Die auf den Linker C-terminal folgende Domäne diente der Substratspezifität. Zur Vermittlung der Substratelektivität wurden hochaffine Bindungspeptiden und Einzeldomänenantikörper eingesetzt. Es folgte ein IgG1 Fc-Teil, der für den Nachweis des Proteins und die Reinigung aus Zellkulturüberständen benötigt wurde. Hier wären theoretisch auch andere Domänen, wie GFP und mCHERRY (Engelowski, Schneider et al. 2018, Temme, Baran et al. 2018) denkbar. Der Fc-Teil führt, abgesehen von den laborpraktischen Möglichkeiten, auch zu einer Dimerisierung und damit zu Aviditätseffekten, wie sie auch natürlich vorkommende Antikörper aufweisen.

TIMP ist ein natürlich vorkommender Inhibitor von Matrixmetalloproteinasen. TIMP3 ist ein potenter Inhibitor von ADAM17. Im Verlauf des Projektes wurde der Einsatz verschiedener Teildomänen von TIMP3 untersucht. Wir führten Experimente mit C-terminal verkürzten TIMP3 Varianten durch, da die N-terminale Subdomäne *in vivo* die Modulation von ADAMs vermittelt. Die erste Teildomäne, die wir etablierten, umfasste die ersten 121 N-terminalen Aminosäuren von humanem TIMP3. Die auf TIMP3(121)

basierenden Fusionsproteine zeigten bei der Affinitätsreinigung eine starke Multimerisierungstendenz. Wir vermuteten, dass die Aminosäure an Position 121, ein Cystein, das *in vivo* mit einem weiter C-terminal gelegenen Cystein eine Disulfidbrücke bildet und nun eine freie Sulfhydrylseitenkette hatte, mit anderen Fusionsproteinen Disulfidbrücken bildete und so zu einer intermolekularen Vernetzung führte. Wir erstellten eine 120 Aminosäuren lange TIMP3 Variante, die allerdings das Aggregationsproblem nur minimal verbesserte (s. Abschnitt 7.2.12). Aufgrund dieser Ergebnisse schlussfolgerten wir, dass die Multimerisierung eventuell eine Folge der für TIMP3 beschriebenen Matrixbindung sein könnte (Blenis and Hawkes 1983, Blenis and Hawkes 1984, Lee, Atkinson et al. 2007). Wir suchten aus diesem Grund nach einem ADAM17 Inhibitor, der keine Matrixbindung aufweist.

Für TIMP1, einen physiologischen ADAM10 Inhibitor ist eine deutlich geringere Matrixbindung im Vergleich zu TIMP3 beschrieben (Blenis and Hawkes 1983, Blenis and Hawkes 1984, Lee, Atkinson et al. 2007). Des Weiteren sind Mutationen beschrieben, die die Affinität von TIMP1 zu ADAM17 auf das Niveau der Affinität von TIMP3 zu ADAM17 erhöhen (Lee, Maskos et al. 2002, Lee, Rapti et al. 2004). Wir entschieden uns, TIMP1(V4S, TIMP3AB, V69L, T98L) zu verwenden und produzierten Fusionsproteine, die die mutierte TIMP1 Domäne enthielten. Im Gegensatz zu TIMP3 basierten Inhibitoren wurde bei diesen Fusionsproteinen deutlich weniger Aggregation beobachtet. Allerdings konnten auch TIMP1 basierte Fusionsproteine nicht in großem Maßstab produziert werden.

Alle inhibitorischen Fusionsproteine wurden hinsichtlich ihrer biologischen Aktivität charakterisiert. Fusionsproteine aus TIMP3 fusioniert mit IL-6R bindenden Peptiden konnten in ausreichender Quantität produziert werden, allerdings zeigten sie keinerlei inhibitorische Aktivität auf induziertes ADAM17 *ectodomain shedding* (s. Abschnitt 7.1).

Die eingesetzten Peptide wurden bereits hinsichtlich ihrer Bindung des IL-6R charakterisiert (Su, Lai et al. 2005, Li, Zhang et al. 2016). Auch TIMP3 ist ein gut charakterisierter ADAM17 Inhibitor. Während bekannt ist, dass die N-terminale Domäne von TIMP3 nicht ausreichend ist, um ADAM10 zu inhibieren, reicht diese Domäne aus, um ADAM17 zu inhibieren (Rapti, Atkinson et al. 2008). Es ist also nicht direkt ersichtlich, warum die erstellten Fusionsproteine keine biologische Aktivität aufwiesen. Möglicherweise kommt es durch die Fusion von einem der Peptide und TIMP3 zu einem

---

Funktionsverlust von TIMP3. Aus diesem Grund entschieden wir uns, Fusionsproteine herzustellen, die durch Fusion von TIMP3 mit einem IL-6R bindenden sdAb eine Substratspezifität vermitteln sollten.

Eine für unsere Zwecke vielversprechende, substratspezifische Domäne stellen sdAbs dar. Einzeldomänenantikörper sind in den letzten Jahren vermehrt Ziel pharmakologischer Forschung geworden. Im Jahr 2018 erfolgte mit der Zulassung von Caplacizumab zur Therapie der thrombotisch-thrombozytopenischen Purpura erstmalig die Zulassung eines auf sdAbs basierenden Medikamentes in Europa (Duggan 2018).

Im Lauf der letzten Jahre wurden mit sogenannten Immunokinen Ergebnisse erzielt, die die wirksamen Domänen der Zytokine mit Bindedomänen verknüpfen und den Zytokin-effekt so auf einen Bereich begrenzen, in dem die Zielstruktur vorliegt. Dieses Konzept wurde mit verschiedenen Antikörpern und deren Fragmenten umgesetzt, unter anderem mit sdAbs. Wir beschlossen einen sdAb als spezifitätsvermittelnde Domäne zu verwenden.

T3I(121), das erste Fusionsprotein, das erstellt wurde, zeigte gute Expressionslevel bei der Produktion in CHO-K1-Zellen und war in der Lage, einen signifikanten Anteil des ADAM17 vermittelten *shedding* zu verhindern (s. Abschnitt 7.2.3). Dieser Effekt ist spezifisch für IL-6R, wie wir in einem komplementären Experiment mit TNF tragenden SKOV3-Zellen zeigten. Wir konnten nachweisen, dass T3I(121) das IL-6R *shedding* in HepG2- und HEK293-Zellen blockiert, das *shedding* von TNF in SKOV3-Zellen aber nicht beeinflusst. Um diesen Effekt abzusichern, erstellten wir ebenfalls ein Fusionsprotein in dem der IL-6R sdAb durch einen anti-TNF sdAb ersetzt wurde. Dieser Inhibitor zeigte in HEK293- und HepG2-Zellen keinerlei Effekte auf die sIL-6R Konzentrationen im Zellkulturüberstand nach ADAM17 Induktion mit PMA, führte aber in TNF tragenden Zellen zu einer Reduzierung der Freisetzung von TNF von im Mittel etwa 46%.

Nachdem ein Beweis der Aktivität und Spezifität gelungen war, wollten wir das Protein reinigen und quantitativ charakterisieren. Zu diesem Zweck wurden CHO-K1-Zellen stabil transfiziert und besonders effektive Einzelklone selektiert. Diese wurden in *Roller-bottle*-Zellkultur gehalten und der Zellkulturüberstand dieser Kulturen wurde gereinigt. Wir untersuchten den Einfluss ansteigender Konzentrationen des gereinigten Proteins auf IL-6R *shedding*. Aufgrund der geringen Ausbeute der Reinigung war es uns nicht

möglich, die  $IC_{50}$  von T3I(121) zu bestimmen, wir vermuten einen Wert im Bereich zwischen 1,5 nM und 15 nM (vgl. Abschnitt 7.2.6). Als Positivkontrolle in diesem Experiment verwendeten wir GW280264X, einen gut etablierten ADAM17 Inhibitor, der in zellbasierten *assays* eine  $IC_{50}$  von 1,9  $\mu$ M aufweist (Ludwig, Hundhausen et al. 2005).

Wir glauben, dass diese hohe Affinität aus der sterischen Nähe resultiert und somit als Beweis für unser Konzept dienen kann. Zum anderen dimerisieren die Fusionsproteine höchstwahrscheinlich über ihre IgG1 Fc-Teile, was eine erhöhte Avidität bedingt.

Bei der Affinitätsreinigung des Fusionsproteins zeigte sich eine starke Tendenz zur Multimerisierung. Wir vermuteten eine Quervernetzung der Fusionsproteine über Cys(121) der TIMP3(121) Domäne. Wir erstellten ein Fusionsprotein, das keine freie Cysteinseitenkette enthielt (s. Abschnitt 7.2.7).

Dieses Fusionsprotein zeigte ebenfalls signifikante Effekte auf ADAM17 vermitteltes IL-6R *shedding*. Im Vergleich zur TIMP3(121) Variante war T3I(120) etwas effektiver, was sich eventuell auf bessere Produzierbarkeit in Zellen oder auf die geringere Multimerisierung zurückführen lassen könnte. T3I(120) ist ebenfalls spezifisch, d.h. es zeigt keine ADAM17 Inhibition des TNF *shedding* in SKOV3-Zellen. Ein analoges, anti-TNF sdAb enthaltendes Fusionsprotein, T3T(120), wurde ebenfalls etabliert und zeigte einen T3I(120) entgegengesetzten Effekt (kein IL-6R *shedding*, dafür potente TNF *shedding* Inhibition). Wir erstellten stabil transfizierte CHO-K1-Zellen und reinigten T3I(120). Obwohl die Multimerisierung zurückging, war das Ergebnis nicht überzeugend. Es fanden sich nach wie vor große Proteinaggregate mit einer vielfachen Größe des erwarteten Dimers in der Reinigungsfraktion (s. Abschnitt 7.2.12).

In Konsequenz der Ergebnisse mit T3I(121) und T3I(120) kamen wir zu dem Schluss, dass die Multimerisierungstendenz wahrscheinlich auf der Matrixbindung von TIMP3 beruht und beschlossen Fusionsproteine zu untersuchen, die auf der weiter oben beschriebenen, modifizierten, ADAM17 spezifischen TIMP1(fl M)-Domäne basierten (s. Abschnitt 7.2.13).

Wir erstellten sowohl auf anti-IL-6R sdAb als auch auf anti-TNF sdAb basierende Fusionsproteine, die hinsichtlich ihrer Effektivität und Substratspezifität ähnliche inhibitorische Eigenschaften gegenüber ADAM17 aufwiesen.

## 8.1. Fazit

Im direkten Vergleich aller im Rahmen der Arbeit erstellten Konstrukte zeigen sich alle sdAb basierten Fusionsproteine als potente Inhibitoren der ADAM17 Protease. Die Reduzierung der IL-6R Konzentrationen liegt je nach verwendeter TIMP Subdomäne bei 53% bis 81% Reduzierung von IL-6R *shedding* bzw. 92% bis 99% Reduzierung von TNF *shedding*. Unabhängig vom verwendeten sdAb zeigen sich verbesserte Eigenschaften im Hinblick auf die Aggregationstendenz bei Verwendung von TIMP3(120) gegenüber einer Verwendung von TIMP3(121). Die Nutzung von TIMP1(fl M) zeigt in ersten orientierenden Experimenten eine weitere Verbesserung dieser Eigenschaften. Eine stabile Transfektion mit anschließender Reinigung und Charakterisierung sollte hier Klarheit schaffen.

Insgesamt deuten die Experimente mit gereinigtem T3I(120) und T3I(121) auf einen ungefähren Dosisbereich von etwa 1- 20 nM hin (s. Abschnitte 7.2.6 und 7.2.12). Die Fusionsproteine sind damit ungefähr vergleichbar affin wie die in klinischen Studien getesteten SMIs (Camodeca, Cuffaro et al. 2019). Das größte Problem der SMIs *in vivo* ist bisher das weite Nebenwirkungsprofil, das muskuloskelettale Nebenwirkungen, Hautausschläge, Lebertoxizität und Antitargetinhibition, mit daraus resultierender Aufhebung erwünschter Effekte, umfasst. Alle diese Nebenwirkungen scheinen Ausdruck mangelnder Spezifität zu sein. Der Nachweis der substratspezifischen Wirkung aller von uns etablierten Konstrukte ist ein Hinweis darauf, dass derart breit gestreute Nebenwirkungen bei *in vivo* Versuchen nicht auftreten sollten.

## 9. Ausblick

In weiterführenden Experimenten sollte das etablierte Konzept erweitert und validiert werden. Es sollten in einem ersten Schritt Affinitätsreinigungen aller erstellten Fusionsproteine durchgeführt werden. Diese gereinigten Proteine müssen hinsichtlich ihrer Affinitäten bezüglich der Zielsubstrate und ihrer IC50 hinsichtlich ADAM17 charakterisiert werden. Ebenfalls sollte untersucht werden inwieweit andere MMPs beim *ectodomain shedding* der untersuchten Substrate eine Rolle spielen und wie die Interaktion der Fusionsproteine mit diesen MMPs ausfällt.

Es sollten weitere, unabhängige Nachweismethoden zum Nachweis der inhibitorischen Aktivität durchgeführt werden, um methodische Fehlerquellen zu eliminieren. Es sollten nicht neutralisierende sdAbs in die Fusionsproteine eingeführt werden, um zu überprüfen ob und wie IL-6R *classic signaling* beeinflusst wird.

Die bestehenden Fusionsproteine können mit Hilfe weiterer sdAbs für weitere Zielsubstrate wie zum Beispiel den EGFR nutzbar gemacht werden. Eine interessante Alternative zu den gewählten TIMP Proteinen stellen die aktuell in Forschung befindlichen anti-ADAM mAbs und sdAbs dar, die in Kombination mit den anti-Substrat sdAbs eine Bispezifität vermitteln würden.

Letztendlich könnten Experimente am Mausmodell erfolgen, um die Effizienz, Verträglichkeit und Bioverfügbarkeit *in vivo* zu beurteilen.

## 10. Literaturverzeichnis

Alexopoulou, L., K. Kranidioti, S. Xanthoulea, M. Denis, A. Kotanidou, E. Douni, P. J. Blackshear, D. L. Kontoyiannis and G. Kollias (2006). "Transmembrane TNF protects mutant mice against intracellular bacterial infections, chronic inflammation and autoimmunity." Eur J Immunol **36**(10): 2768-2780.

Ali, S., R. Kjekken, C. Niederlaender, G. Markey, T. S. Saunders, M. Opsata, K. Moltu, B. Bremnes, E. Gronevik, M. Muusse, G. D. Hakonsen, V. Skibeli, M. E. Kalland, I. Wang, I. Buajordet, A. Urbaniak, J. Johnston, K. Rantell, E. Kerwash, M. Schuessler-Lenz, T. Salmonson, J. Bergh, C. Gisselbrecht, K. Tzogani, I. Papadouli and F. Pignatti (2020). "The European Medicines Agency Review of Kymriah (Tisagenlecleucel) for the Treatment of Acute Lymphoblastic Leukemia and Diffuse Large B-Cell Lymphoma." Oncologist **25**(2): e321-e327.

Allinson, T. M., E. T. Parkin, A. J. Turner and N. M. Hooper (2003). "ADAMs family members as amyloid precursor protein alpha-secretases." J Neurosci Res **74**(3): 342-352.

Althoff, K., J. Mullberg, D. Aasland, N. Voltz, K. Kallen, J. Grotzinger and S. Rose-John (2001). "Recognition sequences and structural elements contribute to shedding susceptibility of membrane proteins." Biochem J **353**(Pt 3): 663-672.

Amin, A. R. (1999). "Regulation of tumor necrosis factor-alpha and tumor necrosis factor converting enzyme in human osteoarthritis." Osteoarthr. Cartil. **7**(4): 392-394.

Amour, A., C. G. Knight, A. Webster, P. M. Slocombe, P. E. Stephens, V. Knauper, A. J. P. Docherty and G. Murphy (2000). "The in vitro activity of ADAM-10 is inhibited by TIMP-1 and TIMP-3." FEBS Lett **473**(3): 275-279.

Amour, A., P. M. Slocombe, A. Webster, M. Butler, C. G. Knight, B. J. Smith, P. E. Stephens, C. Shelley, M. Hutton, V. Knäuper, A. J. P. Docherty and G. Murphy (1998). "TNF- $\alpha$  converting enzyme (TACE) is inhibited by TIMP-3." FEBS Lett **435**(1): 39-44.

Anker, S. D., P. P. Ponikowski, A. L. Clark, F. Leyva, M. Rauchhaus, M. Kemp, M. M. Teixeira, P. G. Hellewell, J. Hooper, P. A. Poole-Wilson and A. J. Coats (1999). "Cytokines and neurohormones relating to body composition alterations in the wasting syndrome of chronic heart failure." Eur Heart J **20**(9): 683-693.

Arribas, J., J. J. Bech-Serra and B. Santiago-Josefat (2006). "ADAMs, cell migration and cancer." Cancer Metastasis Rev **25**(1): 57-68.

Arribas, J. and C. Esselens (2009). "ADAM17 as a therapeutic target in multiple diseases." Curr Pharm Des **15**(20): 2319-2335.

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

- Balkwill, F. (2006). "TNF-alpha in promotion and progression of cancer." Cancer Metastasis Rev **25**(3): 409-416.
- Balkwill, F. (2009). "Tumour necrosis factor and cancer." Nat Rev Cancer **9**(5): 361-371.
- Baran, P., R. Nitz, J. Grotzinger, J. Scheller and C. Garbers (2013). "Minimal interleukin 6 (IL-6) receptor stalk composition for IL-6 receptor shedding and IL-6 classic signaling." J Biol Chem **288**(21): 14756-14768.
- Baumann, H. and J. Gauldie (1994). "The acute phase response." Immunol Today **15**(2): 74-80.
- Becker, C., M. C. Fantini, C. Schramm, H. A. Lehr, S. Wirtz, A. Nikolaev, J. Burg, S. Strand, R. Kiesslich, S. Huber, H. Ito, N. Nishimoto, K. Yoshizaki, T. Kishimoto, P. R. Galle, M. Blessing, S. Rose-John and M. F. Neurath (2004). "TGF-beta suppresses tumor progression in colon cancer by inhibition of IL-6 trans-signaling." Immunity **21**(4): 491-501.
- Bell, M. J., P. M. Kochanek, L. A. Doughty, J. A. Carcillo, P. D. Adelson, R. S. Clark, S. R. Wisniewski, M. J. Whalen and S. T. DeKosky (1997). "Interleukin-6 and interleukin-10 in cerebrospinal fluid after severe traumatic brain injury in children." J Neurotrauma **14**(7): 451-457.
- Bertani, G. (1951). "Studies on lysogenesis. I. The mode of phage liberation by lysogenic Escherichia coli." J Bacteriol **62**(3): 293-300.
- Birnboim, H. C. and J. Doly (1979). "A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA." Nucleic Acids Res **7**(6): 1513-1523.
- Black, R. A., C. T. Rauch, C. J. Kozlosky, J. J. Peschon, J. L. Slack, M. F. Wolfson, B. J. Castner, K. L. Stocking, P. Reddy, S. Srinivasan, N. Nelson, N. Boiani, K. A. Schooley, M. Gerhart, R. Davis, J. N. Fitzner, R. S. Johnson, R. J. Paxton, C. J. March and D. P. Cerretti (1997). "A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells." Nature **385**(6618): 729-733.
- Blenis, J. and S. P. Hawkes (1983). "Transformation-sensitive protein associated with the cell substratum of chicken embryo fibroblasts." Proc Natl Acad Sci U S A **80**(3): 770-774.
- Blenis, J. and S. P. Hawkes (1984). "Characterization of a transformation-sensitive protein in the extracellular matrix of chicken embryo fibroblasts." J Biol Chem **259**(18): 11563-11570.
- Blobel, C. P. (2005). "ADAMs: key components in EGFR signalling and development." Nat Rev Mol Cell Biol **6**(1): 32-43.
- Bode, W., F. X. Gomisruth and W. Stockler (1993). "Astacins, Serralysins, Snake-Venom and Matrix Metalloproteinases Exhibit Identical Zinc-Binding Environments (Hexxhxxgxxh and Met-Turn) and Topologies and Should Be Grouped into a Common Family, the Metzincins." FEBS Lett **331**(1-2): 134-140.

- Borrell-Pages, M., F. Rojo, J. Albanell, J. Baselga and J. Arribas (2003). "TACE is required for the activation of the EGFR by TGF-alpha in tumors." EMBO J **22**(5): 1114-1124.
- Boulanger, M. J., D. C. Chow, E. E. Brevnova and K. C. Garcia (2003). "Hexameric structure and assembly of the interleukin-6/IL-6 alpha-receptor/gp130 complex." Science **300**(5628): 2101-2104.
- Bradley, J. R. (2008). "TNF-mediated inflammatory disease." J Pathol **214**(2): 149-160.
- Breese, E. J., C. A. Michie, S. W. Nicholls, S. H. Murch, C. B. Williams, P. Domizio, J. A. Walker-Smith and T. T. MacDonald (1994). "Tumor necrosis factor alpha-producing cells in the intestinal mucosa of children with inflammatory bowel disease." Gastroenterology **106**(6): 1455-1466.
- Brodowicz, T., C. Wiltschke, A. C. Budinsky, M. Krainer, G. G. Steger and C. C. Zielinski (1997). "Soluble HER-2/neu neutralizes biologic effects of anti-HER-2/neu antibody on breast cancer cells in vitro." Int J Cancer **73**(6): 875-879.
- Buxbaum, J. D., K. N. Liu, Y. Luo, J. L. Slack, K. L. Stocking, J. J. Peschon, R. S. Johnson, B. J. Castner, D. P. Cerretti and R. A. Black (1998). "Evidence that tumor necrosis factor alpha converting enzyme is involved in regulated alpha-secretase cleavage of the Alzheimer amyloid protein precursor." J Biol Chem **273**(43): 27765-27767.
- Camodeca, C., D. Cuffaro, E. Nuti and A. Rossello (2019). "ADAM Metalloproteinases as Potential Drug Targets." Curr Med Chem **26**(15): 2661-2689.
- Carswell, E. A., L. J. Old, R. L. Kassel, S. Green, N. Fiore and B. Williamson (1975). "An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors." Proc Natl Acad Sci U S A **72**(9): 3666-3670.
- Cathcart, J. M. and J. Cao (2015). "MMP Inhibitors: Past, present and future." Front Biosci (Landmark Ed) **20**: 1164-1178.
- Caton, J. and M. E. Ryan (2011). "Clinical studies on the management of periodontal diseases utilizing subantimicrobial dose doxycycline (SDD)." Pharmacol Res **63**(2): 114-120.
- Chalaris, A., N. Adam, C. Sina, P. Rosenstiel, J. Lehmann-Koch, P. Schirmacher, D. Hartmann, J. Cichy, O. Gavrilova, S. Schreiber, T. Jostock, V. Matthews, R. Hasler, C. Becker, M. F. Neurath, K. Reiss, P. Saftig, J. Scheller and S. Rose-John (2010). "Critical role of the disintegrin metalloprotease ADAM17 for intestinal inflammation and regeneration in mice." J Exp Med **207**(8): 1617-1624.
- Chalaris, A., C. Garbers, B. Rabe, S. Rose-John and J. Scheller (2011). "The soluble Interleukin 6 receptor: generation and role in inflammation and cancer." Eur J Cell Biol **90**(6-7): 484-494.
- Chalaris, A., B. Rabe, K. Paliga, H. Lange, T. Laskay, C. A. Fielding, S. A. Jones, S. Rose-John and J. Scheller (2007). "Apoptosis is a natural stimulus of IL6R shedding and contributes to the proinflammatory trans-signaling function of neutrophils." Blood **110**(6): 1748-1755.

- Chan, F. K., H. J. Chun, L. Zheng, R. M. Siegel, K. L. Bui and M. J. Lenardo (2000). "A domain in TNF receptors that mediates ligand-independent receptor assembly and signaling." *Science* **288**(5475): 2351-2354.
- Charbonneau, M., K. Harper, F. Grondin, M. Pelmus, P. P. McDonald and C. M. Dubois (2007). "Hypoxia-inducible factor mediates hypoxic and tumor necrosis factor alpha-induced increases in tumor necrosis factor-alpha converting enzyme/ADAM17 expression by synovial cells." *J Biol Chem* **282**(46): 33714-33724.
- Chen, Q., D. T. Fisher, K. A. Clancy, J. M. Gauguet, W. C. Wang, E. Unger, S. Rose-John, U. H. von Andrian, H. Baumann and S. S. Evans (2006). "Fever-range thermal stress promotes lymphocyte trafficking across high endothelial venules via an interleukin 6 trans-signaling mechanism." *Nat Immunol* **7**(12): 1299-1308.
- Conrad, U., I. Plagmann, S. Malchow, M. Sack, D. M. Floss, A. A. Kruglov, S. A. Nedospasov, S. Rose-John and J. Scheller (2011). "ELPylated anti-human TNF therapeutic single-domain antibodies for prevention of lethal septic shock." *Plant Biotechnol J* **9**(1): 22-31.
- Conrath, K., C. Vincke, B. Stijlemans, J. Schymkowitz, K. Decanniere, L. Wyns, S. Muyldermans and R. Loris (2005). "Antigen binding and solubility effects upon the veneering of a camel VHH in framework-2 to mimic a VH." *J Mol Biol* **350**(1): 112-125.
- Cortez-Retamozo, V., M. Lauwereys, G. Hassanzadeh Gh, M. Gobert, K. Conrath, S. Muyldermans, P. De Baetselier and H. Revets (2002). "Efficient tumor targeting by single-domain antibody fragments of camels." *Int J Cancer* **98**(3): 456-462.
- Coussens, L. M., B. Fingleton and L. M. Matrisian (2002). "Matrix metalloproteinase inhibitors and cancer: trials and tribulations." *Science* **295**(5564): 2387-2392.
- Dadgostar, H. and G. Cheng (1998). "An intact zinc ring finger is required for tumor necrosis factor receptor-associated factor-mediated nuclear factor-kappaB activation but is dispensable for c-Jun N-terminal kinase signaling." *J Biol Chem* **273**(38): 24775-24780.
- Dadgostar, H. and G. Cheng (2000). "Membrane localization of TRAF 3 enables JNK activation." *J Biol Chem* **275**(4): 2539-2544.
- Dempsey, P. W., S. E. Doyle, J. Q. He and G. Cheng (2003). "The signaling adaptors and pathways activated by TNF superfamily." *Cytokine Growth Factor Rev* **14**(3-4): 193-209.
- Docherty, A. J., A. Lyons, B. J. Smith, E. M. Wright, P. E. Stephens, T. J. Harris, G. Murphy and J. J. Reynolds (1985). "Sequence of human tissue inhibitor of metalloproteinases and its identity to erythroid-potentiating activity." *Nature* **318**(6041): 66-69.
- Dominitzki, S., M. C. Fantini, C. Neufert, A. Nikolaev, P. R. Galle, J. Scheller, G. Monteleone, S. Rose-John, M. F. Neurath and C. Becker (2007). "Cutting edge: trans-signaling via the soluble IL-6R abrogates the induction of FoxP3 in naive CD4+CD25 T cells." *J Immunol* **179**(4): 2041-2045.

- Drucker, C., J. Gewiese, S. Malchow, J. Scheller and S. Rose-John (2010). "Impact of interleukin-6 classic- and trans-signaling on liver damage and regeneration." J Autoimmun **34**(1): 29-37.
- Duffy, M. J., M. Mullooly, N. O'Donovan, S. Sukor, J. Crown, A. Pierce and P. M. McGowan (2011). "The ADAMs family of proteases: new biomarkers and therapeutic targets for cancer?" Clin Proteomics **8**(1): 9.
- Duggan, S. (2018). "Caplacizumab: First Global Approval." Drugs **78**(15): 1639-1642.
- Edwards, D. R., M. M. Handsley and C. J. Pennington (2008). "The ADAM metalloproteinases." Mol Aspects Med **29**(5): 258-289.
- Eisenberg, S. P., R. J. Evans, W. P. Arend, E. Verderber, M. T. Brewer, C. H. Hannum and R. C. Thompson (1990). "Primary structure and functional expression from complementary DNA of a human interleukin-1 receptor antagonist." Nature **343**(6256): 341-346.
- Engelowski, E., A. Schneider, M. Franke, H. Xu, R. Clemen, A. Lang, P. Baran, C. Binsch, B. Knebel, H. Al-Hasani, J. M. Moll, D. M. Floss, P. A. Lang and J. Scheller (2018). "Synthetic cytokine receptors transmit biological signals using artificial ligands." Nat Commun **9**(1): 2034.
- Feldmann, M., F. M. Brennan and R. N. Maini (1996). "Role of cytokines in rheumatoid arthritis." Annu Rev Immunol **14**(1): 397-440.
- Feldmann, M. and L. Steinman (2005). "Design of effective immunotherapy for human autoimmunity." Nature **435**(7042): 612-619.
- Fleck, D., F. van Bebber, A. Colombo, C. Galante, B. M. Schwenk, L. Rabe, H. Hampel, B. Novak, E. Kremmer, S. Tahirovic, D. Edbauer, S. F. Lichtenthaler, B. Schmid, M. Willem and C. Haass (2013). "Dual cleavage of neuregulin 1 type III by BACE1 and ADAM17 liberates its EGF-like domain and allows paracrine signaling." J Neurosci **33**(18): 7856-7869.
- Garbers, C., S. Aparicio-Siegmund and S. Rose-John (2015). "The IL-6/gp130/STAT3 signaling axis: recent advances towards specific inhibition." Curr Opin Immunol **34**: 75-82.
- Garbers, C., N. Janner, A. Chalaris, M. L. Moss, D. M. Floss, D. Meyer, F. Koch-Nolte, S. Rose-John and J. Scheller (2011). "Species specificity of ADAM10 and ADAM17 proteins in interleukin-6 (IL-6) trans-signaling and novel role of ADAM10 in inducible IL-6 receptor shedding." J Biol Chem **286**(17): 14804-14811.
- Gasson, J. C., D. W. Golde, S. E. Kaufman, C. A. Westbrook, R. M. Hewick, R. J. Kaufman, G. G. Wong, P. A. Temple, A. C. Leary, E. L. Brown and et al. (1985). "Molecular characterization and expression of the gene encoding human erythroid-potentiating activity." Nature **315**(6022): 768-771.
- Gauldie, J., C. Richards, D. Harnish, P. Lansdorp and H. Baumann (1987). "Interferon beta 2/B-cell stimulatory factor type 2 shares identity with monocyte-derived hepatocyte-

stimulating factor and regulates the major acute phase protein response in liver cells." Proc Natl Acad Sci U S A **84**(20): 7251-7255.

Georgiadis, D. and A. Yiotakis (2008). "Specific targeting of metzincin family members with small-molecule inhibitors: progress toward a multifarious challenge." Bioorg Med Chem **16**(19): 8781-8794.

Giersberg, M., D. M. Floss, S. Kipriyanov, U. Conrad and J. Scheller (2010). "Covalent dimerization of camelidae anti-human TNF-alpha single domain antibodies by the constant kappa light chain domain improves neutralizing activity." Biotechnol Bioeng **106**(1): 161-166.

Gijssen, M., P. King, T. Perera, P. J. Parker, A. L. Harris, B. Larijani and A. Kong (2010). "HER2 phosphorylation is maintained by a PKB negative feedback loop in response to anti-HER2 herceptin in breast cancer." PLoS Biol **8**(12): e1000563.

Glockshuber, R., M. Malia, I. Pfitzinger and A. Pluckthun (1990). "A comparison of strategies to stabilize immunoglobulin Fv-fragments." Biochemistry **29**(6): 1362-1367.

Gomez, M. I., S. H. Sokol, A. B. Muir, G. Soong, J. Bastien and A. S. Prince (2005). "Bacterial induction of TNF-alpha converting enzyme expression and IL-6 receptor alpha shedding regulates airway inflammatory signaling." J Immunol **175**(3): 1930-1936.

Gonzales, P. E., A. Solomon, A. B. Miller, M. A. Leesnitzer, I. Sagi and M. E. Milla (2004). "Inhibition of the tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme by its pro domain." J Biol Chem **279**(30): 31638-31645.

Gooz, M. (2010). "ADAM-17: the enzyme that does it all." Crit Rev Biochem Mol Biol **45**(2): 146-169.

Green, S., A. Dobrjansky, E. A. Carswell, R. L. Kassel, L. J. Old, N. Fiore and M. K. Schwartz (1976). "Partial purification of a serum factor that causes necrosis of tumors." Proc Natl Acad Sci U S A **73**(2): 381-385.

Greene, J., M. Wang, Y. E. Liu, L. A. Raymond, C. Rosen and Y. E. Shi (1996). "Molecular cloning and characterization of human tissue inhibitor of metalloproteinase 4." J Biol Chem **271**(48): 30375-30380.

Greenstein, G. (2004). "Efficacy of subantimicrobial-dose doxycycline in the treatment of periodontal diseases: a critical evaluation." Int J Periodontics Restorative Dent **24**(6): 528-543.

Grivennikov, S., E. Karin, J. Terzic, D. Mucida, G. Y. Yu, S. Vallabhapurapu, J. Scheller, S. Rose-John, H. Cheroutre, L. Eckmann and M. Karin (2009). "IL-6 and Stat3 are required for survival of intestinal epithelial cells and development of colitis-associated cancer." Cancer Cell **15**(2): 103-113.

Groves, M. D., V. K. Puduvalli, C. A. Conrad, M. R. Gilbert, W. K. Yung, K. Jaeckle, V. Liu, K. R. Hess, K. D. Aldape and V. A. Levin (2006). "Phase II trial of temozolomide plus marimastat for recurrent anaplastic gliomas: a relationship among efficacy, joint toxicity and anticonvulsant status." J Neurooncol **80**(1): 83-90.

- Hamers-Casterman, C., T. Atarhouch, S. Muyldermans, G. Robinson, C. Hamers, E. B. Songa, N. Bendahman and R. Hamers (1993). "Naturally occurring antibodies devoid of light chains." Nature **363**(6428): 446-448.
- Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2000). "The hallmarks of cancer." Cell **100**(1): 57-70.
- Harashima, S., T. Horiuchi, N. Hatta, C. Morita, M. Higuchi, T. Sawabe, H. Tsukamoto, T. Tahira, K. Hayashi, S. Fujita and Y. Niho (2001). "Outside-to-inside signal through the membrane TNF-alpha induces E-selectin (CD62E) expression on activated human CD4+ T cells." J Immunol **166**(1): 130-136.
- Hehlgans, T. and K. Pfeffer (2005). "The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games." Immunology **115**(1): 1-20.
- Heink, S., N. Yogev, C. Garbers, M. Herwerth, L. Aly, C. Gasperi, V. Husterer, A. L. Croxford, K. Moller-Hackbarth, H. S. Bartsch, K. Sotlar, S. Krebs, T. Regen, H. Blum, B. Hemmer, T. Misgeld, T. F. Wunderlich, J. Hidalgo, M. Oukka, S. Rose-John, M. Schmidt-Supprian, A. Waisman and T. Korn (2017). "Trans-presentation of IL-6 by dendritic cells is required for the priming of pathogenic TH17 cells." Nat Immunol **18**(1): 74-85.
- Higuchi, M. and B. B. Aggarwal (1994). "TNF induces internalization of the p60 receptor and shedding of the p80 receptor." J Immunol **152**(7): 3550-3558.
- Hirte, H., I. B. Vergote, J. R. Jeffrey, R. N. Grimshaw, S. Coppieters, B. Schwartz, D. Tu, A. Sadura, M. Brundage and L. Seymour (2006). "A phase III randomized trial of BAY 12-9566 (tanomastat) as maintenance therapy in patients with advanced ovarian cancer responsive to primary surgery and paclitaxel/platinum containing chemotherapy: a National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group Study." Gynecol Oncol **102**(2): 300-308.
- Horiuchi, K., T. Kimura, T. Miyamoto, H. Takaishi, Y. Okada, Y. Toyama and C. P. Blobel (2007). "Cutting edge: TNF-alpha-converting enzyme (TACE/ADAM17) inactivation in mouse myeloid cells prevents lethality from endotoxin shock." J Immunol **179**(5): 2686-2689.
- Hotamisligil, G. S. (1999). "The role of TNFalpha and TNF receptors in obesity and insulin resistance." J Intern Med **245**(6): 621-625.
- Huang, W., K. Suzuki, H. Nagase, S. Arumugam, S. R. VanDoren and K. Brew (1996). "Folding and characterization of the amino-terminal domain of human tissue inhibitor of metalloproteinases-1 (TIMP-1) expressed at high yield in E-coli." FEBS Lett **384**(2): 155-161.
- Huang, Y., N. Benaich, C. Tape, H. F. Kwok and G. Murphy (2014). "Targeting the sheddase activity of ADAM17 by an anti-ADAM17 antibody D1(A12) inhibits head and neck squamous cell carcinoma cell proliferation and motility via blockage of bradykinin induced HERs transactivation." Int J Biol Sci **10**(7): 702-714.
- Hunter, C. A. and S. A. Jones (2015). "IL-6 as a keystone cytokine in health and disease." Nat Immunol **16**(5): 448-457.

- Hurst, S. M., T. S. Wilkinson, R. M. McLoughlin, S. Jones, S. Horiuchi, N. Yamamoto, S. Rose-John, G. M. Fuller, N. Topley and S. A. Jones (2001). "IL-6 and its soluble receptor orchestrate a temporal switch in the pattern of leukocyte recruitment seen during acute inflammation." Immunity **14**(6): 705-714.
- Ishibashi, T., H. Kimura, T. Uchida, S. Kariyone, P. Friese and S. A. Burstein (1989). "Human interleukin 6 is a direct promoter of maturation of megakaryocytes in vitro." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(15): 5953-5957.
- Jackson, L. F., T. H. Qiu, S. W. Sunnarborg, A. Chang, C. Zhang, C. Patterson and D. C. Lee (2003). "Defective valvulogenesis in HB-EGF and TACE-null mice is associated with aberrant BMP signaling." EMBO J **22**(11): 2704-2716.
- Jacobsen, J., R. Visse, H. P. Sorensen, J. J. Enghild, K. Brew, U. M. Wewer and H. Nagase (2008). "Catalytic properties of ADAM12 and its domain deletion mutants." Biochemistry **47**(2): 537-547.
- Janes, P. W., N. Saha, W. A. Barton, M. V. Kolev, S. H. Wimmer-Kleikamp, E. Nievergall, C. P. Blobel, J. P. Himanen, M. Lackmann and D. B. Nikolov (2005). "Adam meets Eph: an ADAM substrate recognition module acts as a molecular switch for ephrin cleavage in trans." Cell **123**(2): 291-304.
- Jones, S. A., J. Scheller and S. Rose-John (2011). "Therapeutic strategies for the clinical blockade of IL-6/gp130 signaling." J Clin Invest **121**(9): 3375-3383.
- Joosten, V., M. S. Roelofs, N. van den Dries, T. Goosen, C. T. Verrips, C. A. van den Hondel and B. C. Lokman (2005). "Production of bifunctional proteins by *Aspergillus awamori*: llama variable heavy chain antibody fragment (V(HH)) R9 coupled to *Arthromyces ramosus* peroxidase (ARP)." J Biotechnol **120**(4): 347-359.
- 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**(1): 160-167.
- Jovcevska, I. and S. Muyldermans (2020). "The Therapeutic Potential of Nanobodies." BioDrugs **34**(1): 11-26.
- Ju, C. R., X. Z. Xia and R. C. Chen (2007). "Expressions of tumor necrosis factor-converting enzyme and ErbB3 in rats with chronic obstructive pulmonary disease." Chin Med J (Engl) **120**(17): 1505-1510.
- Kashiwagi, M., M. Tortorella, H. Nagase and K. Brew (2001). "TIMP-3 is a potent inhibitor of aggrecanase 1 (ADAM-TS4) and aggrecanase 2 (ADAM-TS5)." J Biol Chem **276**(16): 12501-12504.
- Kawaguchi, M., Y. Mitsuhashi and S. Kondo (2005). "Overexpression of tumour necrosis factor-alpha-converting enzyme in psoriasis." Br J Dermatol **152**(5): 915-919.
- Kenny, P. A. and M. J. Bissell (2007). "Targeting TACE-dependent EGFR ligand shedding in breast cancer." J Clin Invest **117**(2): 337-345.

- Ketteler, R., S. Glaser, O. Sandra, U. M. Martens and U. Klingmuller (2002). "Enhanced transgene expression in primitive hematopoietic progenitor cells and embryonic stem cells efficiently transduced by optimized retroviral hybrid vectors." Gene Ther **9**(8): 477-487.
- Kieseier, B. C., H. Pischel, E. Neuen-Jacob, W. W. Tourtellotte and H. P. Hartung (2003). "ADAM-10 and ADAM-17 in the inflamed human CNS." Glia **42**(4): 398-405.
- Kirchner, S., S. Boldt, W. Kolch, S. Haffner, S. Kazak, P. Janosch, E. Holler, R. Andreesen and G. Eissner (2004). "LPS resistance in monocytic cells caused by reverse signaling through transmembrane TNF (mTNF) is mediated by the MAPK/ERK pathway." J Leukoc Biol **75**(2): 324-331.
- Kishimoto, T., S. Akira, M. Narazaki and T. Taga (1995). "Interleukin-6 family of cytokines and gp130." Blood **86**(4): 1243-1254.
- Knight, L. C., J. E. Romano, S. C. Cosenza, N. M. Iqbal and C. Marcinkiewicz (2007). "Differences in binding of (99m)Tc-disintegrins to integrin alphavbeta3 on tumor and vascular cells." Nucl Med Biol **34**(4): 371-381.
- Kolkman, J. A. and E. A. A. Beirnaert (2008). "Amino acid sequences directed against il-6r and polypeptides comprising the same for the treatment of diseases and disorders associated with il-6-mediated signalling." Worldwide Patent PCT/EP2007/058587.
- Kunkel, T. A. (1985). "Rapid and efficient site-specific mutagenesis without phenotypic selection." Proc Natl Acad Sci U S A **82**(2): 488-492.
- Laemmli, U. K., E. Molbert, M. Showe and E. Kellenberger (1970). "Form-determining function of the genes required for the assembly of the head of bacteriophage T4." J Mol Biol **49**(1): 99-113.
- Lamertz, L., F. Rummel, R. Polz, P. Baran, S. Hansen, G. H. Waetzig, J. M. Moll, D. M. Floss and J. Scheller (2018). "Soluble gp130 prevents interleukin-6 and interleukin-11 cluster signaling but not intracellular autocrine responses." Sci Signal **11**(550).
- Lange, U., J. Teichmann and H. Stracke (2000). "Correlation between plasma TNF-alpha, IGF-1, biochemical markers of bone metabolism, markers of inflammation/disease activity, and clinical manifestations in ankylosing spondylitis." Eur J Med Res **5**(12): 507-511.
- Lauwereys, M., M. Arbabi Ghahroudi, A. Desmyter, J. Kinne, W. Holzer, E. De Genst, L. Wyns and S. Muyldermans (1998). "Potent enzyme inhibitors derived from dromedary heavy-chain antibodies." EMBO J **17**(13): 3512-3520.
- Le Gall, S. M., T. Marezky, P. D. Issuree, X. D. Niu, K. Reiss, P. Saftig, R. Khokha, D. Lundell and C. P. Blobel (2010). "ADAM17 is regulated by a rapid and reversible mechanism that controls access to its catalytic site." J Cell Sci **123**(Pt 22): 3913-3922.
- Lebrec, H., R. Ponce, B. D. Preston, J. Iles, T. L. Born and M. Hooper (2015). "Tumor necrosis factor, tumor necrosis factor inhibition, and cancer risk." Curr Med Res Opin **31**(3): 557-574.

- Lee, M. H., S. Atkinson and G. Murphy (2007). "Identification of the extracellular matrix (ECM) binding motifs of tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-3 and effective transfer to TIMP-1." J Biol Chem **282**(9): 6887-6898.
- Lee, M. H., K. Maskos, V. Knauper, P. Dodds and G. Murphy (2002). "Mapping and characterization of the functional epitopes of tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-3 using TIMP-1 as the scaffold: a new frontier in TIMP engineering." Protein Sci **11**(10): 2493-2503.
- Lee, M. H., M. Rapti, V. Knauper and G. Murphy (2004). "Threonine 98, the pivotal residue of tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-1 in metalloproteinase recognition." J Biol Chem **279**(17): 17562-17569.
- Levitt, N. C., F. A. Eskens, K. J. O'Byrne, D. J. Propper, L. J. Denis, S. J. Owen, L. Choi, J. A. Foekens, S. Wilner, J. M. Wood, M. Nakajima, D. C. Talbot, W. P. Steward, A. L. Harris and J. Verweij (2001). "Phase I and pharmacological study of the oral matrix metalloproteinase inhibitor, MMI270 (CGS27023A), in patients with advanced solid cancer." Clin Cancer Res **7**(7): 1912-1922.
- Li, F., Z. Zhang, T. Cheng, R. Wei, Y. Dai, M. Lv, D. Luo, X. Zhu, D. Ma, L. Xi, Q. Dong and X. Ma (2016). "SPECT imaging of interleukin-6 receptor in ovarian tumor xenografts with a novel radiotracer of <sup>99m</sup>Tc-HYNIC-Aca-LSLITRL." Amino Acids **48**(1): 91-101.
- Liu, R., X. Li, W. Xiao and K. S. Lam (2017). "Tumor-targeting peptides from combinatorial libraries." Adv Drug Deliv Rev **110-111**: 13-37.
- Ludwig, A., C. Hundhausen, M. H. Lambert, N. Broadway, R. C. Andrews, D. M. Bickett, M. A. Leesnitzer and J. D. Becherer (2005). "Metalloproteinase inhibitors for the disintegrin-like metalloproteinases ADAM10 and ADAM17 that differentially block constitutive and phorbol ester-inducible shedding of cell surface molecules." Comb Chem High Throughput Screen **8**(2): 161-171.
- Lust, J. A., K. A. Donovan, M. P. Kline, P. R. Greipp, R. A. Kyle and N. J. Maihle (1992). "Isolation of an mRNA encoding a soluble form of the human interleukin-6 receptor." Cytokine **4**(2): 96-100.
- Maier, B., H. L. Laurer, S. Rose, W. A. Buurman and I. Marzi (2005). "Physiological levels of pro- and anti-inflammatory mediators in cerebrospinal fluid and plasma: a normative study." J Neurotrauma **22**(7): 822-835.
- Mantovani, A., P. Allavena, A. Sica and F. Balkwill (2008). "Cancer-related inflammation." Nature **454**(7203): 436-444.
- Matthews, V., B. Schuster, S. Schutze, I. Bussmeyer, A. Ludwig, C. Hundhausen, T. Sadowski, P. Saftig, D. Hartmann, K. J. Kallen and S. Rose-John (2003). "Cellular cholesterol depletion triggers shedding of the human interleukin-6 receptor by ADAM10 and ADAM17 (TACE)." J Biol Chem **278**(40): 38829-38839.
- McCoy, M. K. and M. G. Tansey (2008). "TNF signaling inhibition in the CNS: implications for normal brain function and neurodegenerative disease." J Neuroinflammation **5**(1): 45.

- Merlos-Suarez, A., S. Ruiz-Paz, J. Baselga and J. Arribas (2001). "Metalloprotease-dependent protransforming growth factor-alpha ectodomain shedding in the absence of tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme." J Biol Chem **276**(51): 48510-48517.
- Michallet, M., F. Maloisel, M. Delain, A. Hellmann, A. Rosas, R. T. Silver, C. Tendler and P. E.-I. C. S. Group (2004). "Pegylated recombinant interferon alpha-2b vs recombinant interferon alpha-2b for the initial treatment of chronic-phase chronic myelogenous leukemia: a phase III study." Leukemia **18**(2): 309-315.
- Mohler, K. M., P. R. Sleath, J. N. Fitzner, D. P. Cerretti, M. Alderson, S. S. Kerwar, D. S. Torrance, C. Otten-Evans, T. Greenstreet, K. Weerawarna and et al. (1994). "Protection against a lethal dose of endotoxin by an inhibitor of tumour necrosis factor processing." Nature **370**(6486): 218-220.
- Montero, J. C., L. Yuste, E. Diaz-Rodriguez, A. Esparis-Ogando and A. Pandiella (2000). "Differential shedding of transmembrane neuregulin isoforms by the tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme." Mol Cell Neurosci **16**(5): 631-648.
- Moraga, I., J. B. Spangler, J. L. Mendoza, M. Gakovic, T. S. Wehrman, P. Krutzik and K. C. Garcia (2017). "Synthekines are surrogate cytokine and growth factor agonists that compel signaling through non-natural receptor dimers." Elife **6**.
- Moriyama, H., T. Tsukida, Y. Inoue, K. Yokota, K. Yoshino, H. Kondo, N. Miura and S. Nishimura (2004). "Azasugar-based MMP/ADAM inhibitors as antipsoriatic agents." J Med Chem **47**(8): 1930-1938.
- Moss, M. L., S. L. Jin, M. E. Milla, D. M. Bickett, W. Burkhart, H. L. Carter, W. J. Chen, W. C. Clay, J. R. Didsbury, D. Hassler, C. R. Hoffman, T. A. Kost, M. H. Lambert, M. A. Leesnitzer, P. McCauley, G. McGeehan, J. Mitchell, M. Moyer, G. Pahel, W. Rocque, L. K. Overton, F. Schoenen, T. Seaton, J. L. Su, J. D. Becherer and et al. (1997). "Cloning of a disintegrin metalloproteinase that processes precursor tumour-necrosis factor-alpha." Nature **385**(6618): 733-736.
- Moss, M. L. and D. Minond (2017). "Recent Advances in ADAM17 Research: A Promising Target for Cancer and Inflammation." Mediators Inflamm **2017**: 9673537.
- Moss, M. L., L. Sklair-Tavron and R. Nudelman (2008). "Drug insight: tumor necrosis factor-converting enzyme as a pharmaceutical target for rheumatoid arthritis." Nat Clin Pract Rheumatol **4**(6): 300-309.
- Mukhopadhyay, S., J. R. Hoidal and T. K. Mukherjee (2006). "Role of TNFalpha in pulmonary pathophysiology." Respir Res **7**(1): 125.
- Mullberg, J., H. Schooltink, T. Stoyan, M. Gunther, L. Graeve, G. Buse, A. Mackiewicz, P. C. Heinrich and S. Rose-John (1993). "The soluble interleukin-6 receptor is generated by shedding." Eur J Immunol **23**(2): 473-480.
- Mullis, K. B. and F. A. Faloona (1987). "Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction." Methods Enzymol **155**: 335-350.
- Munoz, D. P., S. M. Yannone, A. Daemen, Y. Sun, F. Vakar-Lopez, M. Kawahara, A. M. Freund, F. Rodier, J. D. Wu, P. Y. Desprez, D. H. Raulet, P. S. Nelson, L. J. van 't Veer,

- J. Campisi and J. P. Coppe (2019). "Targetable mechanisms driving immunoevasion of persistent senescent cells link chemotherapy-resistant cancer to aging." JCI Insight **4**(14).
- Murch, S. H., C. P. Braegger, J. A. Walker-Smith and T. T. MacDonald (1993). "Location of tumour necrosis factor alpha by immunohistochemistry in chronic inflammatory bowel disease." Gut **34**(12): 1705-1709.
- Murphy, G., A. Houbrechts, M. I. Cockett, R. A. Williamson, M. O'Shea and A. J. Docherty (1991). "The N-terminal domain of tissue inhibitor of metalloproteinases retains metalloproteinase inhibitory activity." Biochemistry **30**(33): 8097-8102.
- Ndong, C., S. Toraya-Brown, K. Kekalo, I. Baker, T. U. Gerngross, S. N. Fiering and K. E. Griswold (2015). "Antibody-mediated targeting of iron oxide nanoparticles to the folate receptor alpha increases tumor cell association in vitro and in vivo." Int J Nanomedicine **10**: 2595-2617.
- Nicola, N. A., D. Metcalf, M. Matsumoto and G. R. Johnson (1983). "Purification of a Factor Inducing Differentiation in Murine Myelomonocytic Leukemia-Cells - Identification as Granulocyte Colony-Stimulating Factor." J Biol Chem **258**(14): 9017-9023.
- Niewiarowski, S., M. A. McLane, M. Kloczewiak and G. J. Stewart (1994). "Disintegrins and other naturally occurring antagonists of platelet fibrinogen receptors." Semin Hematol **31**(4): 289-300.
- Nishimoto, N., Y. Kanakura, K. Aozasa, T. Johkoh, M. Nakamura, S. Nakano, N. Nakano, Y. Ikeda, T. Sasaki, K. Nishioka, M. Hara, H. Taguchi, Y. Kimura, Y. Kato, H. Asaoku, S. Kumagai, F. Kodama, H. Nakahara, K. Hagihara, K. Yoshizaki and T. Kishimoto (2005). "Humanized anti-interleukin-6 receptor antibody treatment of multicentric Castleman disease." Blood **106**(8): 2627-2632.
- Novoradovsky, A., V. Zhang, M. Ghosh, H. Hogrefe, J. Sorge and T. Gaasterland (2005). "Computational Principles of Primer Design for Site Directed Mutagenesis." TechConnect Briefs **1**: 532-535.
- Nowell, M. A., P. J. Richards, S. Horiuchi, N. Yamamoto, S. Rose-John, N. Topley, A. S. Williams and S. A. Jones (2003). "Soluble IL-6 receptor governs IL-6 activity in experimental arthritis: blockade of arthritis severity by soluble glycoprotein 130." J Immunol **171**(6): 3202-3209.
- Oberg, H. H., D. Wesch, S. Grussel, S. Rose-John and D. Kabelitz (2006). "Differential expression of CD126 and CD130 mediates different STAT-3 phosphorylation in CD4+CD25- and CD25high regulatory T cells." Int Immunol **18**(4): 555-563.
- Ohta, S., M. Harigai, M. Tanaka, Y. Kawaguchi, T. Sugiura, K. Takagi, C. Fukasawa, M. Hara and N. Kamatani (2001). "Tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) converting enzyme contributes to production of TNF-alpha in synovial tissues from patients with rheumatoid arthritis." J Rheumatol **28**(8): 1756-1763.
- 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**(5): 1543-1549.

- Overall, C. M. and O. Kleinfeld (2006). "Tumour microenvironment - opinion: validating matrix metalloproteinases as drug targets and anti-targets for cancer therapy." Nat Rev Cancer **6**(3): 227-239.
- Pachella, L. A., L. T. Madsen and J. E. Dains (2015). "The Toxicity and Benefit of Various Dosing Strategies for Interleukin-2 in Metastatic Melanoma and Renal Cell Carcinoma." J Adv Pract Oncol **6**(3): 212-221.
- Patel, I. R., M. G. Attur, R. N. Patel, S. A. Stuchin, R. A. Abagyan, S. B. Abramson and A. R. Amin (1998). "TNF-alpha convertase enzyme from human arthritis-affected cartilage: isolation of cDNA by differential display, expression of the active enzyme, and regulation of TNF-alpha." J Immunol **160**(9): 4570-4579.
- Pavloff, N., P. W. Staskus, N. S. Kishnani and S. P. Hawkes (1992). "A new inhibitor of metalloproteinases from chicken: ChIMP-3. A third member of the TIMP family." J Biol Chem **267**(24): 17321-17326.
- Peschon, J. J., J. L. Slack, P. Reddy, K. L. Stocking, S. W. Sunnarborg, D. C. Lee, W. E. Russell, B. J. Castner, R. S. Johnson, J. N. Fitzner, R. W. Boyce, N. Nelson, C. J. Kozlosky, M. F. Wolfson, C. T. Rauch, D. P. Cerretti, R. J. Paxton, C. J. March and R. A. Black (1998). "An essential role for ectodomain shedding in mammalian development." Science **282**(5392): 1281-1284.
- Plagmann, I., A. Chalaris, A. A. Kruglov, S. Nedospasov, P. Rosenstiel, S. Rose-John and J. Scheller (2009). "Transglutaminase-catalyzed covalent multimerization of Camelidae anti-human TNF single domain antibodies improves neutralizing activity." J Biotechnol **142**(2): 170-178.
- Plumb, J., S. McQuaid, A. K. Cross, J. Surr, G. Haddock, R. A. Bunning and M. N. Woodroffe (2006). "Upregulation of ADAM-17 expression in active lesions in multiple sclerosis." Mult Scler **12**(4): 375-385.
- Rahbarizadeh, F., M. J. Rasaei, M. Forouzandeh-Moghadam and A. A. Allameh (2005). "High expression and purification of the recombinant camelid anti-MUC1 single domain antibodies in Escherichia coli." Protein Expr Purif **44**(1): 32-38.
- Rahbarizadeh, F., M. J. Rasaei, M. Forouzandeh and A. A. Allameh (2006). "Over expression of anti-MUC1 single-domain antibody fragments in the yeast Pichia pastoris." Mol Immunol **43**(5): 426-435.
- Rapti, M., S. J. Atkinson, M. H. Lee, A. Trim, M. Moss and G. Murphy (2008). "The isolated N-terminal domains of TIMP-1 and TIMP-3 are insufficient for ADAM10 inhibition." Biochem J **411**(2): 433-439.
- Rasmussen, H. S. and P. P. McCann (1997). "Matrix metalloproteinase inhibition as a novel anticancer strategy: a review with special focus on batimastat and marimastat." Pharmacol Ther **75**(1): 69-75.
- Rawlings, N. D., F. R. Morton, C. Y. Kok, J. Kong and A. J. Barrett (2008). "MEROPS: the peptidase database." Nucleic Acids Res **36**(Database issue): D320-325.

- Reddy, P., J. L. Slack, R. Davis, D. P. Cerretti, C. J. Kozlosky, R. A. Blanton, D. Shows, J. J. Peschon and R. A. Black (2000). "Functional analysis of the domain structure of tumor necrosis factor-alpha converting enzyme." J Biol Chem **275**(19): 14608-14614.
- Renart, J., J. Reiser and G. R. Stark (1979). "Transfer of proteins from gels to diazobenzyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure." Proc Natl Acad Sci U S A **76**(7): 3116-3120.
- Richards, F. M., C. J. Tape, D. I. Jodrell and G. Murphy (2012). "Anti-tumour effects of a specific anti-ADAM17 antibody in an ovarian cancer model in vivo." PLoS One **7**(7): e40597.
- Rios-Doria, J., D. Sabol, J. Chesebrough, D. Stewart, L. Xu, R. Tammali, L. Cheng, Q. Du, K. Schifferli, R. Rothstein, C. C. Leow, J. Heidbrink-Thompson, X. Jin, C. Gao, J. Friedman, B. Wilkinson, M. Damschroder, A. J. Pierce, R. E. Hollingsworth, D. A. Tice and E. F. Michelotti (2015). "A Monoclonal Antibody to ADAM17 Inhibits Tumor Growth by Inhibiting EGFR and Non-EGFR-Mediated Pathways." Mol Cancer Ther **14**(7): 1637-1649.
- Roghani, M., J. D. Becherer, M. L. Moss, R. E. Atherton, H. Erdjument-Bromage, J. Arribas, R. K. Blackburn, G. Weskamp, P. Tempst and C. P. Blobel (1999). "Metalloprotease-disintegrin MDC9: intracellular maturation and catalytic activity." J Biol Chem **274**(6): 3531-3540.
- Rose-John, S. (2012). "IL-6 trans-signaling via the soluble IL-6 receptor: importance for the pro-inflammatory activities of IL-6." Int J Biol Sci **8**(9): 1237-1247.
- Rose-John, S. and M. F. Neurath (2004). "IL-6 trans-signaling: The heat is on." Immunity **20**(1): 2-4.
- Rose-John, S., G. H. Waetzig, J. Scheller, J. Grotzinger and D. Seegert (2007). "The IL-6/sIL-6R complex as a novel target for therapeutic approaches." Expert Opin Ther Targets **11**(5): 613-624.
- Sahin, U., G. Weskamp, K. Kelly, H. M. Zhou, S. Higashiyama, J. Peschon, D. Hartmann, P. Saftig and C. P. Blobel (2004). "Distinct roles for ADAM10 and ADAM17 in ectodomain shedding of six EGFR ligands." J Cell Biol **164**(5): 769-779.
- Sastre, M., J. Walter and S. M. Gentleman (2008). "Interactions between APP secretases and inflammatory mediators." J Neuroinflammation **5**: 25.
- Satoh, M., M. Nakamura, H. Satoh, H. Saitoh, I. Segawa and K. Hiramori (2000). "Expression of tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme and tumor necrosis factor-alpha in human myocarditis." J Am Coll Cardiol **36**(4): 1288-1294.
- Scheller, J., A. Chalaris, C. Garbers and S. Rose-John (2011). "ADAM17: a molecular switch to control inflammation and tissue regeneration." Trends Immunol **32**(8): 380-387.
- 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**(5): 878-888.

- Scheller, J., E. Engelowski, J. M. Moll and D. M. Floss (2019). "Immunoreceptor Engineering and Synthetic Cytokine Signaling for Therapeutics." Trends Immunol **40**(3): 258-272.
- Scheller, J. and S. Rose-John (2006). "Interleukin-6 and its receptor: from bench to bedside." Med Microbiol Immunol **195**(4): 173-183.
- Schlondorff, J., J. D. Becherer and C. P. Blobel (2000). "Intracellular maturation and localization of the tumour necrosis factor alpha convertase (TACE)." Biochem J **347 Pt 1**: 131-138.
- Seifert, T., B. C. Kieseier, S. Ropele, S. Strasser-Fuchs, F. Quehenberger, F. Fazekas and H. P. Hartung (2002). "TACE mRNA expression in peripheral mononuclear cells precedes new lesions on MRI in multiple sclerosis." Mult Scler **8**(6): 447-451.
- Sharma, K., R. X. Wang, L. Y. Zhang, D. L. Yin, X. Y. Luo, J. C. Solomon, R. F. Jiang, K. Markos, W. Davidson, D. W. Scott and Y. F. Shi (2000). "Death the Fas way: regulation and pathophysiology of CD95 and its ligand." Pharmacol Ther **88**(3): 333-347.
- Sheppard, M., F. Laskou, P. P. Stapleton, S. Hadavi and B. Dasgupta (2017). "Tocilizumab (Actemra)." Hum Vaccin Immunother **13**(9): 1972-1988.
- Shi, W., H. Chen, J. P. Sun, S. Buckley, J. S. Zhao, K. D. Anderson, R. G. Williams and D. Warburton (2003). "TACE is required for fetal murine cardiac development and modeling." Developmental Biology **261**(2): 371-380.
- Shimoda, Y., M. Satoh, M. Nakamura, T. Akatsu and K. Hiramori (2005). "Activated tumour necrosis factor-alpha shedding process is associated with in-hospital complication in patients with acute myocardial infarction." Clin Sci (Lond) **108**(4): 339-347.
- Shirai, T., H. Yamaguchi, H. Ito, C. W. Todd and R. B. Wallace (1985). "Cloning and expression in Escherichia coli of the gene for human tumour necrosis factor." Nature **313**(6005): 803-806.
- Si, W., C. Li and P. Wei (2018). "Synthetic immunology: T-cell engineering and adoptive immunotherapy." Synth Syst Biotechnol **3**(3): 179-185.
- Six, E., D. Ndiaye, Y. Laabi, C. Brou, N. Gupta-Rossi, A. Israel and F. Logeat (2003). "The Notch ligand Delta1 is sequentially cleaved by an ADAM protease and gamma-secretase." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(13): 7638-7643.
- Smalley, D. M. and K. Ley (2005). "L-selectin: mechanisms and physiological significance of ectodomain cleavage." J Cell Mol Med **9**(2): 255-266.
- Sommer, J., C. Garbers, J. Wolf, A. Trad, J. M. Moll, M. Sack, R. Fischer, J. Grotzinger, G. H. Waetzig, D. M. Floss and J. Scheller (2014). "Alternative intronic polyadenylation generates the interleukin-6 trans-signaling inhibitor sgp130-E10." J Biol Chem **289**(32): 22140-22150.
- Sparano, J. A., P. Bernardo, P. Stephenson, W. J. Gradishar, J. N. Ingle, S. Zucker and N. E. Davidson (2004). "Randomized phase III trial of marimastat versus placebo in patients with metastatic breast cancer who have responding or stable disease after first-line

- chemotherapy: Eastern Cooperative Oncology Group trial E2196." J Clin Oncol **22**(23): 4683-4690.
- Sporeno, E., R. Savino, L. Ciapponi, G. Paonessa, A. Cabibbo, A. Lahm, K. Pulkki, R. X. Sun, C. Toniatti, B. Klein and G. Ciliberto (1996). "Human interleukin-6 receptor super-antagonists with high potency and wide spectrum on multiple myeloma cells." Blood **87**(11): 4510-4519.
- Stetler-Stevenson, W. G., P. D. Brown, M. Onisto, A. T. Levy and L. A. Liotta (1990). "Tissue inhibitor of metalloproteinases-2 (TIMP-2) mRNA expression in tumor cell lines and human tumor tissues." J Biol Chem **265**(23): 13933-13938.
- Steward, W. P. (1999). "Marimastat (BB2516): current status of development." Cancer Chemother Pharmacol **43 Suppl**: S56-60.
- Stijlemans, B., K. Conrath, V. Cortez-Retamozo, H. Van Xong, L. Wyns, P. Senter, H. Revets, P. De Baetselier, S. Muyldermans and S. Magez (2004). "Efficient targeting of conserved cryptic epitopes of infectious agents by single domain antibodies. African trypanosomes as paradigm." J Biol Chem **279**(2): 1256-1261.
- Su, J. L., K. P. Lai, C. A. Chen, C. Y. Yang, P. S. Chen, C. C. Chang, C. H. Chou, C. L. Hu, M. L. Kuo, C. Y. Hsieh and L. H. Wei (2005). "A novel peptide specifically binding to interleukin-6 receptor (gp80) inhibits angiogenesis and tumor growth." Cancer Res **65**(11): 4827-4835.
- Sundberg, E. J. and R. A. Mariuzza (2002). "Molecular recognition in antibody-antigen complexes." Adv Protein Chem **61**: 119-160.
- Sunnarborg, S. W., C. L. Hinkle, M. Stevenson, W. E. Russell, C. S. Raska, J. J. Peschon, B. J. Castner, M. J. Gerhart, R. J. Paxton, R. A. Black and D. C. Lee (2002). "Tumor necrosis factor-alpha converting enzyme (TACE) regulates epidermal growth factor receptor ligand availability." J Biol Chem **277**(15): 12838-12845.
- Taga, T. (1996). "Gp130, a shared signal transducing receptor component for hematopoietic and neuropoietic cytokines." J Neurochem **67**(1): 1-10.
- Taga, T. and T. Kishimoto (1997). "Gp130 and the interleukin-6 family of cytokines." Annu Rev Immunol **15**: 797-819.
- Takeuchi, M., M. Rothe and D. V. Goeddel (1996). "Anatomy of TRAF2. Distinct domains for nuclear factor-kappaB activation and association with tumor necrosis factor signaling proteins." J Biol Chem **271**(33): 19935-19942.
- Tape, C. J., S. H. Willems, S. L. Dombernowsky, P. L. Stanley, M. Fogarasi, W. Ouwehand, J. McCafferty and G. Murphy (2011). "Cross-domain inhibition of TACE ectodomain." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(14): 5578-5583.
- Taupin, V., S. Toulmond, A. Serrano, J. Benavides and F. Zavala (1993). "Increase in IL-6, IL-1 and TNF levels in rat brain following traumatic lesion. Influence of pre- and post-traumatic treatment with Ro5 4864, a peripheral-type (p site) benzodiazepine ligand." J Neuroimmunol **42**(2): 177-185.

- Tellier, E., M. Canault, L. Rebsomen, B. Bonardo, I. Juhan-Vague, G. Nalbone and F. Peiretti (2006). "The shedding activity of ADAM17 is sequestered in lipid rafts." Exp Cell Res **312**(20): 3969-3980.
- Temme, S., P. Baran, P. Bouvain, C. Grapentin, W. Kramer, B. Knebel, H. Al-Hasani, J. M. Moll, D. Floss, J. Schrader, R. Schubert, U. Flogel and J. Scheller (2018). "Synthetic Cargo Internalization Receptor System for Nanoparticle Tracking of Individual Cell Populations by Fluorine Magnetic Resonance Imaging." ACS Nano **12**(11): 11178-11192.
- Thomas, C. W., Jr., B. G. Weinshenker and W. J. Sandborn (2004). "Demyelination during anti-tumor necrosis factor alpha therapy with infliximab for Crohn's disease." Inflamm Bowel Dis **10**(1): 28-31.
- Thomassen, Y. E., W. Meijer, L. Sierkstra and C. T. Verrips (2002). "Large-scale production of VHH antibody fragments by *Saccharomyces cerevisiae*." Enzyme and Microbial Technology **30**(3): 273-278.
- Tracey, D., L. Klareskog, E. H. Sasso, J. G. Salfeld and P. P. Tak (2008). "Tumor necrosis factor antagonist mechanisms of action: a comprehensive review." Pharmacol Ther **117**(2): 244-279.
- Tracey, K. J., B. Beutler, S. F. Lowry, J. Merryweather, S. Wolpe, I. W. Milsark, R. J. Hariri, T. J. Fahey, 3rd, A. Zentella, J. D. Albert and et al. (1986). "Shock and tissue injury induced by recombinant human cachectin." Science **234**(4775): 470-474.
- Tsuji, F., K. Oki, A. Okahara, H. Suhara, T. Yamanouchi, M. Sasano, S. Mita and M. Horiuchi (2002). "Differential effects between marimastat, a TNF-alpha converting enzyme inhibitor, and anti-TNF-alpha antibody on murine models for sepsis and arthritis." Cytokine **17**(6): 294-300.
- Uchikawa, S., M. Yoda, T. Tohmonda, A. Kanaji, M. Matsumoto, Y. Toyama and K. Horiuchi (2015). "ADAM17 regulates IL-1 signaling by selectively releasing IL-1 receptor type 2 from the cell surface." Cytokine **71**(2): 238-245.
- Utsumi, S. and F. Karush (1964). "The Subunits of Purified Rabbit Antibody." Biochemistry **3**(9): 1329-1338.
- van der Linden, R. H., L. G. Frenken, B. de Geus, M. M. Harmsen, R. C. Ruuls, W. Stok, L. de Ron, S. Wilson, P. Davis and C. T. Verrips (1999). "Comparison of physical chemical properties of llama VHH antibody fragments and mouse monoclonal antibodies." Biochim Biophys Acta **1431**(1): 37-46.
- Van Roy, M., C. Ververken, E. Beirnaert, S. Hoefman, J. Kolkman, M. Vierboom, E. Breedveld, B. t Hart, S. Poelmans, L. Bontinck, A. Hemeryck, S. Jacobs, J. Baumeister and H. Ulrichs (2015). "The preclinical pharmacology of the high affinity anti-IL-6R Nanobody(R) ALX-0061 supports its clinical development in rheumatoid arthritis." Arthritis Res Ther **17**: 135.
- van Witteloostuijn, S. B., S. L. Pedersen and K. J. Jensen (2016). "Half-Life Extension of Biopharmaceuticals using Chemical Methods: Alternatives to PEGylation." ChemMedChem **11**(22): 2474-2495.

- Van Zee, K. J., T. Kohno, E. Fischer, C. S. Rock, L. L. Moldawer and S. F. Lowry (1992). "Tumor necrosis factor soluble receptors circulate during experimental and clinical inflammation and can protect against excessive tumor necrosis factor alpha in vitro and in vivo." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(11): 4845-4849.
- Venturi, G. M., L. L. Tu, T. Kadono, A. I. Khan, Y. Fujimoto, P. Oshel, C. B. Bock, A. S. Miller, R. M. Albrecht, P. Kubes, D. A. Steeber and T. F. Tedder (2003). "Leukocyte migration is regulated by L-selectin endoproteolytic release." Immunity **19**(5): 713-724.
- Vieira, S. M., H. P. Lemos, R. Grespan, M. H. Napimoga, D. Dal-Secco, A. Freitas, T. M. Cunha, W. A. Verri, Jr., D. A. Souza-Junior, M. C. Jamur, K. S. Fernandes, C. Oliver, J. S. Silva, M. M. Teixeira and F. Q. Cunha (2009). "A crucial role for TNF-alpha in mediating neutrophil influx induced by endogenously generated or exogenous chemokines, KC/CXCL1 and LIX/CXCL5." Br J Pharmacol **158**(3): 779-789.
- Vogelstein, B. and D. Gillespie (1979). "Preparative and analytical purification of DNA from agarose." Proc Natl Acad Sci U S A **76**(2): 615-619.
- Walker, F., H. H. Zhang, V. Matthews, J. Weinstock, E. C. Nice, M. Ernst, S. Rose-John and A. W. Burgess (2008). "IL6/sIL6R complex contributes to emergency granulopoietic responses in G-CSF- and GM-CSF-deficient mice." Blood **111**(8): 3978-3985.
- Wang, A. M., A. A. Creasey, M. B. Ladner, L. S. Lin, J. Strickler, J. N. Van Arsdell, R. Yamamoto and D. F. Mark (1985). "Molecular cloning of the complementary DNA for human tumor necrosis factor." Science **228**(4696): 149-154.
- Wang, X. and Y. Lin (2008). "Tumor necrosis factor and cancer, buddies or foes?" Acta Pharmacol Sin **29**(11): 1275-1288.
- Wang, X., T. Oka, F. L. Chow, S. B. Cooper, J. Odenbach, G. D. Lopaschuk, Z. Kassiri and C. Fernandez-Patron (2009). "Tumor necrosis factor-alpha-converting enzyme is a key regulator of agonist-induced cardiac hypertrophy and fibrosis." Hypertension **54**(3): 575-582.
- Wang, Y., A. H. Herrera, Y. Li, K. K. Belani and B. Walcheck (2009). "Regulation of mature ADAM17 by redox agents for L-selectin shedding." J Immunol **182**(4): 2449-2457.
- Ward, E. S., D. Gussow, A. D. Griffiths, P. T. Jones and G. Winter (1989). "Binding activities of a repertoire of single immunoglobulin variable domains secreted from *Escherichia coli*." Nature **341**(6242): 544-546.
- Watts, A. D., N. H. Hunt, Y. Wanigasekara, G. Bloomfield, D. Wallach, B. D. Roufogalis and G. Chaudhri (1999). "A casein kinase I motif present in the cytoplasmic domain of members of the tumour necrosis factor ligand family is implicated in 'reverse signalling'." EMBO J **18**(8): 2119-2126.
- White, J. M. (2003). "ADAMs: modulators of cell-cell and cell-matrix interactions." Curr Opin Cell Biol **15**(5): 598-606.
- Whitlow, M., B. A. Bell, S. L. Feng, D. Filpula, K. D. Hardman, S. L. Hubert, M. L. Rollence, J. F. Wood, M. E. Schott, D. E. Milenic and et al. (1993). "An improved linker

- for single-chain Fv with reduced aggregation and enhanced proteolytic stability." Protein Eng **6**(8): 989-995.
- Williamson, R. A., H. Bartels, G. Murphy and R. B. Freedman (1994). "Folding and stability of the active N-terminal domain of tissue inhibitor of metalloproteinases-1 and -2." Protein Eng **7**(8): 1035-1040.
- Williamson, R. A., F. A. Marston, S. Angal, P. Koklitis, M. Panico, H. R. Morris, A. F. Carne, B. J. Smith, T. J. Harris and R. B. Freedman (1990). "Disulphide bond assignment in human tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)." Biochem J **268**(2): 267-274.
- Yakoub-Agha, I., C. Chabannon, P. Bader, G. W. Basak, H. Bonig, F. Ciceri, S. Corbacioglu, R. F. Duarte, H. Einsele, M. Hudecek, M. J. Kersten, U. Kohl, J. Kuball, S. Mielke, M. Mohty, J. Murray, A. Nagler, S. Robinson, R. Saccardi, F. Sanchez-Guijo, J. A. Snowden, M. Srour, J. Styczynski, A. Urbano-Ispizua, P. J. Hayden and N. Kroger (2020). "Management of adults and children undergoing chimeric antigen receptor T-cell therapy: best practice recommendations of the European Society for Blood and Marrow Transplantation (EBMT) and the Joint Accreditation Committee of ISCT and EBMT (JACIE)." Haematologica **105**(2): 297-316.
- Yang, J., Y. Lin, Z. Guo, J. Cheng, J. Huang, L. Deng, W. Liao, Z. Chen, Z. Liu and B. Su (2001). "The essential role of MEKK3 in TNF-induced NF-kappaB activation." Nat Immunol **2**(7): 620-624.
- Yoo, T. J., O. A. Roholt and D. Pressman (1967). "Specific binding activity of isolated light chains of antibodies." Science **157**(3789): 707-709.
- Yu, W. H., S. Yu, Q. Meng, K. Brew and J. F. Woessner, Jr. (2000). "TIMP-3 binds to sulfated glycosaminoglycans of the extracellular matrix." J Biol Chem **275**(40): 31226-31232.
- Zalevsky, J., T. Secher, S. A. Ezhevsky, L. Janot, P. M. Steed, C. O'Brien, A. Eivazi, J. Kung, D. H. Nguyen, S. K. Doberstein, F. Erard, B. Ryffel and D. E. Szymkowski (2007). "Dominant-negative inhibitors of soluble TNF attenuate experimental arthritis without suppressing innate immunity to infection." J Immunol **179**(3): 1872-1883.
- Zhang, Y., N. Li, H. Suh and D. J. Irvine (2018). "Nanoparticle anchoring targets immune agonists to tumors enabling anti-cancer immunity without systemic toxicity." Nat Commun **9**(1): 6.
- Zhao, J., H. Chen, J. J. Peschon, W. Shi, Y. Zhang, S. J. Frank and D. Warburton (2001). "Pulmonary hypoplasia in mice lacking tumor necrosis factor-alpha converting enzyme indicates an indispensable role for cell surface protein shedding during embryonic lung branching morphogenesis." Dev Biol **232**(1): 204-218.
- Zucker, S., J. Cao and W. T. Chen (2000). "Critical appraisal of the use of matrix metalloproteinase inhibitors in cancer treatment." Oncogene **19**(56): 6642-6650.

# 11. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Liste der verwendeten Abkürzungen .....	XI
Tabelle 2: Drei- und Einbuchstabencodes für Aminosäuren .....	XVII
Tabelle 3: Liste der Abkürzungen für alle im Rahmen der Arbeit erstellten ADAM17 Inhibitoren .....	XVIII
Tabelle 4: Liste der verwendeten Antibiotika.....	21
Tabelle 5: Liste der verwendeten Primärantikörper .....	21
Tabelle 6: Liste der verwendeten Sekundärantikörper .....	22
Tabelle 7: Liste der verwendeten Chemikalien .....	22
Tabelle 8: Liste der verwendeten Plasmide .....	27
Tabelle 9: Liste der verwendeten Oligonukleotide .....	29
Tabelle 10: Aminosäuresequenzen der verwendeten IL-6R bindenden Peptide .....	32
Tabelle 11: Liste der verwendeten Medien zur Kultivierung von Bakterien .....	33
Tabelle 12: Liste verwendeter Medien zur Kultivierung von eukaryotischen Zellen ....	33
Tabelle 13: Liste der benutzten Geräte .....	34
Tabelle 14: Liste der verwendeten Kits .....	36
Tabelle 15: Liste der verwendeten Größenstandards.....	37
Tabelle 16: Liste der verwendeten Puffer und Lösungen .....	37
Tabelle 17: Liste der verwendeten rekombinanten Proteine .....	41
Tabelle 18: Liste des verwendeten Verbrauchsmaterials .....	42
Tabelle 19: Prokaryotische Zelllinien.....	43
Tabelle 20: Eukaryotische Zelllinien.....	43
Tabelle 21: Standard PCR-Ansatz .....	45
Tabelle 22: Standard PCR-Programm .....	45
Tabelle 23: Standard Ansatz gerichtete Mutagenese-PCR.....	51
Tabelle 24: Standard PCR-Programm gerichtete Mutagenese-PCR .....	52
Tabelle 25: Standard Ansatz <i>Colony-PCR</i> .....	53
Tabelle 26: Standardprogramm <i>Colony-PCR</i> .....	53
Tabelle 27: Zusammensetzung von Sammel- und Trenngel für SDS-PAGE.....	56
Tabelle 28: Übersicht der Expressionsplasmide für Fusionsproteine die auf IL-6R bindenden Peptiden (bzw. nicht bindenden Kontrollpeptiden) basieren ...	67

## 12. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schematische Darstellung des TNF <i>signaling</i> .....	2
Abbildung 2: Interleukin 6 <i>classic</i> und <i>trans-signaling</i> .....	5
Abbildung 3: Schematischer Aufbau von ADAMs .....	7
Abbildung 4: Schematische Darstellung von konventionellen (A) und Schwerketten (B) IgGs und darauf basierenden Fragmenten .....	14
Abbildung 5: Schematische Darstellung der Peptid basierten Inhibitoren und Klonierungsschema der zugehörigen Expressionsplasmide.....	66
Abbildung 6: Expression der Inhibitoren T3S1(121), T3S2(121), T3S3(121), T3S4(121), T3S7(121) und Kontrollen T3S <sub>x</sub> 1(121) und T3S <sub>x</sub> 2(121).....	69
Abbildung 7: Die Peptid basierten Inhibitorstrukturen haben keinen Einfluss auf ADAM17 vermitteltes <i>shedding</i> .....	70
Abbildung 8 Schematische Darstellung von T3I(121) und T3(121) .....	71
Abbildung 9: T3I(121) wird von CHO-K1-Zellen exprimiert. Es bildet unter nicht reduzierenden Bedingungen multimere Aggregate. ....	72
Abbildung 10: T3I(121) bindet den sIL-6R über den IL-6R sdAb.....	73
Abbildung 11: T3I(121) führt auf HEK293-Zellen zu einer signifikanten Reduktion der ADAM17 vermittelten Bildung von sIL-6R .....	74
Abbildung 12: In SKOV3-Zellen hat T3I(121) keinen signifikanten Effekt auf die Freisetzung von TNF durch ADAM17.....	75
Abbildung 13: Verschiedene stabil transfizierte CHO-K1-Zelllinien zeigen unterschiedliche T3I(121)-Expressionslevel .....	76
Abbildung 14: Affinitätsreinigung von T3I(121) .....	78
Abbildung 15: Gereinigtes T3I(121) inhibiert dosisabhängig ADAM17 vermitteltes IL- 6R <i>shedding</i> .....	79
Abbildung 16: Detektion der Expression von T3I(120) durch CHO-K1-Zellen.....	81
Abbildung 17: sIL-6R bindet an den IL-6R sdAb von T3I(120).....	82
Abbildung 18: Das <i>shedding</i> von IL-6R durch ADAM17 wird durch T3I(120) gehemmt .....	83
Abbildung 19: T3I(120) hemmt das ADAM17 vermittelte TNF <i>shedding</i> in SKOV3- Zellen nicht .....	84

---

Abbildung 20: Vergleich der Expressionslevel von T3I(120) in stabil transfizierten CHO-K1-Zellen, Affinitätsreinigung von T3I(120) und Nachweis der Aktivität von gereinigtem T3I(120) .....	86
Abbildung 21: Klonierungsschema für pcDNA3.1(+)-T1I(fl M) und <i>sequence alignment</i> von TIMP3, Wildtyp-TIMP1 und TIMP1(V4S, TIMP3AB, V69L, T98L).....	88
Abbildung 22: Transient transfizierte CHO-K1-Zellen exprimieren T1I(fl M) .....	90
Abbildung 23: T1I(fl M) vermindert die proteolytische Spaltung von membrangebundenem IL-6R durch ADAM17.....	91
Abbildung 24: Der Effekt von T1I(fl M) auf die ADAM17 Aktivität ist substratspezifisch.....	92
Abbildung 25: Schematische Klonierung des Expressionsplasmids für T3T(120).....	93
Abbildung 26: Expression von T3T(120) in CHO-K1-Zellen.....	94
Abbildung 27: T3T(120) reduziert das ADAM17 vermittelte <i>shedding</i> von TNF.....	95
Abbildung 28: T3T(120) ist substratspezifisch für TNF .....	96
Abbildung 29: Nachweis von T1T(fl M) bei transient transfizierten CHO-K1-Zellen..	98
Abbildung 30: Die Freisetzung von sTNF durch ADAM17 wird durch T1T(fl M) drastisch reduziert.....	99
Abbildung 31: T1T(fl M) beeinflusst das <i>shedding</i> von IL-6R durch ADAM17 nicht	100
Abbildung 32: Schematische Übersicht verschiedener Ansatzpunkte einer ADAM Inhibition <i>in vivo</i> .....	102
Abbildung 33: Schematische Darstellung von pcDNA3.1-TIMP3(1-121)-L-S1-Fc....	135
Abbildung 34: Schematische Darstellung von pcDNA3.1-TIMP3(1-121)-L-S2-Fc....	136
Abbildung 35: Schematische Darstellung von pcDNA3.1-TIMP3(1-121)-L-S3-Fc....	137
Abbildung 36: Schematische Darstellung von pcDNA3.1-TIMP3(1-121)-L-S4-Fc....	138
Abbildung 37: Schematische Darstellung von pcDNA3.1-TIMP3(1-121)-L-S7-Fc....	139
Abbildung 38: Schematische Darstellung von pcDNA3.1-TIMP3(1-121)-L-S <sub>x</sub> 1-Fc ..	140
Abbildung 39: Schematische Darstellung von pcDNA3.1-TIMP3(1-121)-L-S <sub>x</sub> 2-Fc ..	141
Abbildung 40: Schematische Darstellung von pcDNA3.1-TIMP3(1-121)-L-Fc .....	142
Abbildung 41: Schematische Darstellung von pcDNA3.1-TIMP3(1-121)-L-IL-6R sdAb-Fc .....	143
Abbildung 42: Schematische Darstellung von pcDNA3.1-TIMP3(1-121)-L-TNF sdAb-Fc .....	144
Abbildung 43: Schematische Darstellung von pcDNA3.1-TIMP3(1-120)-L-Fc .....	145

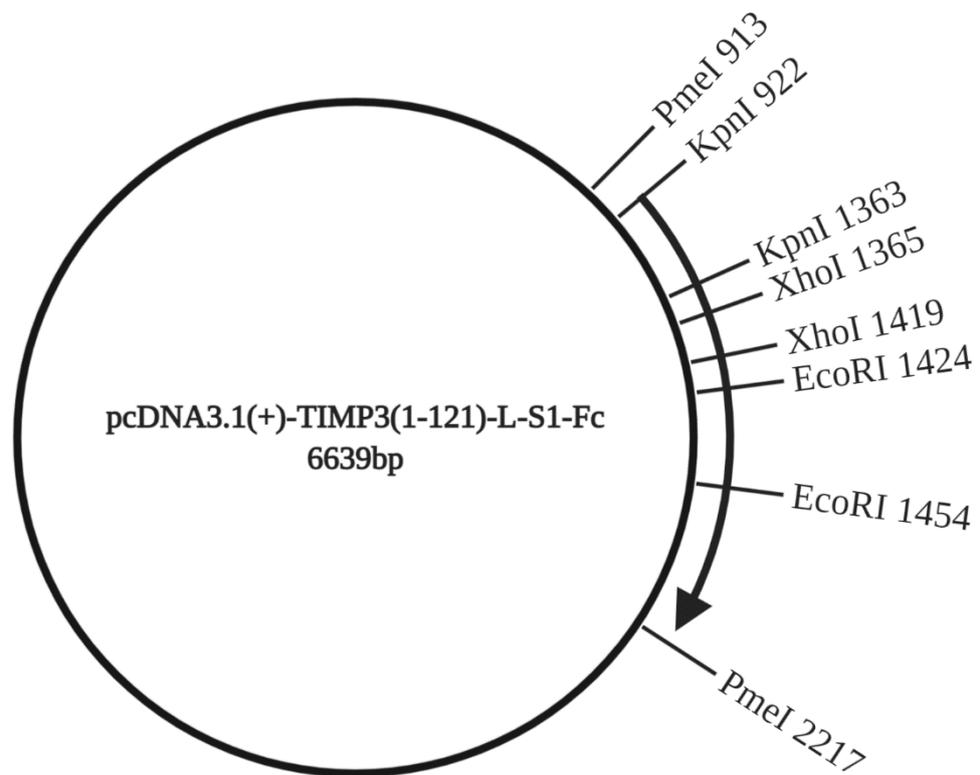
---

Abbildung 44: Schematische Darstellung von pcDNA3.1-TIMP3(1-120)-L-IL-6R	
sdAb-Fc .....	146
Abbildung 45: Schematische Darstellung von pcDNA3.1-TIMP3(1-120)-L-TNF	
sdAb-Fc .....	147
Abbildung 46: Schematische Darstellung von pcDNA3.1-TIMP1(fl M)-L-Fc .....	148
Abbildung 47: Schematische Darstellung von pcDNA3.1-TIMP1(fl M)-L-IL-6R	
sdAb-Fc .....	149
Abbildung 48: Schematische Darstellung von pcDNA3.1-TIMP1(fl M)-L-TNF	
sdAb-Fc .....	150

## **13. Anhang**

### **13.1. Plasmidkarten und vollständige Sequenzen aller Fusionsproteine**

### 13.1.1. pcDNA3.1-TIMP3(1-121)-L-S1-Fc



```

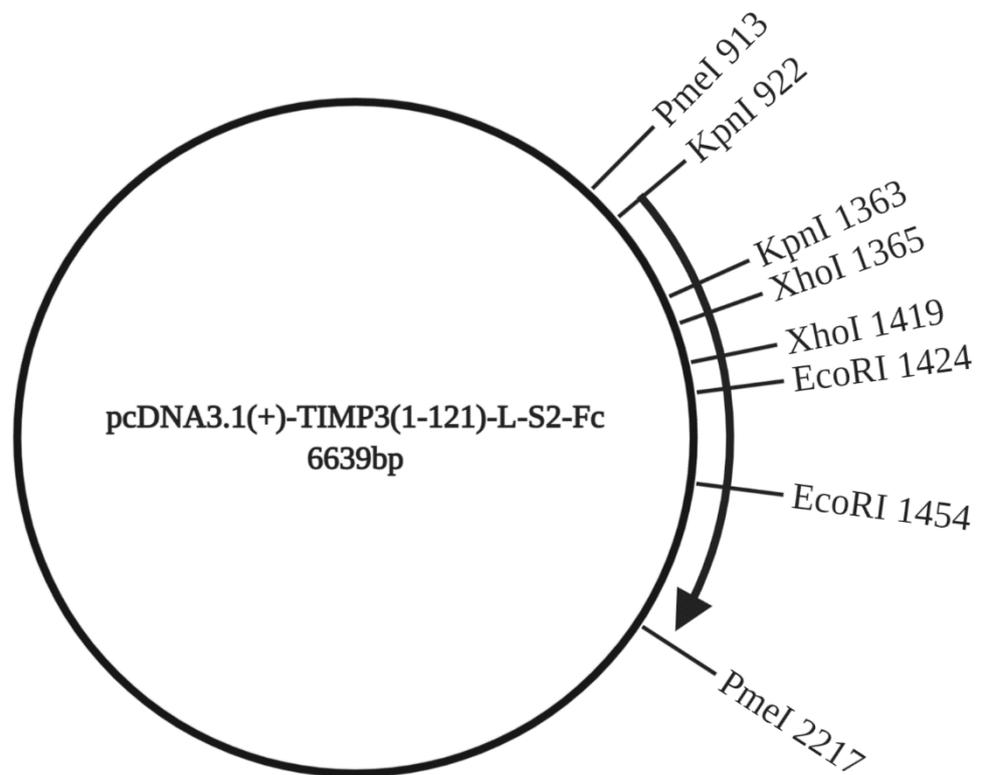
MTPWLGLIVLLGSWSLGDWGAEACTCSPSHPQDAFCNSDIVIRAKVVGKK 50
LVKEGPFGLVYTIKQMKMYRGFTKMPHVQYIHTASESLCGLKLEVNKY 100
QYLLTGRVYDGKMYTGLCNFVERWDQLTLSQRKGLNYRYHLGCNCGTLEG 150
GGGSGGGGSGGGGSVLENSLSLMPRLANSAAAEFRSCDKTHTCPPCPAPE 200
AEGAPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE 250
VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE 300
KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES 350
NGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMEALH 400
NHYTQKSLSLSPGK

```

#### Abbildung 33: Schematische Darstellung von pcDNA3.1-TIMP3(1-121)-L-S1-Fc

Schematische Darstellung des Plasmides pcDNA3.1-TIMP3(1-121)-L-S1-Fc mit ausgewählten Restriktionsschnittstellen und dem offenen Leserahmen von T3S1(121) (schwarzer Pfeil) sowie der Aminosäuresequenz von T3S1(121). Die Aminosäuresequenz des S1-Peptides ist unterstrichen.

### 13.1.2. pcDNA3.1-TIMP3(1-121)-L-S2-Fc



```

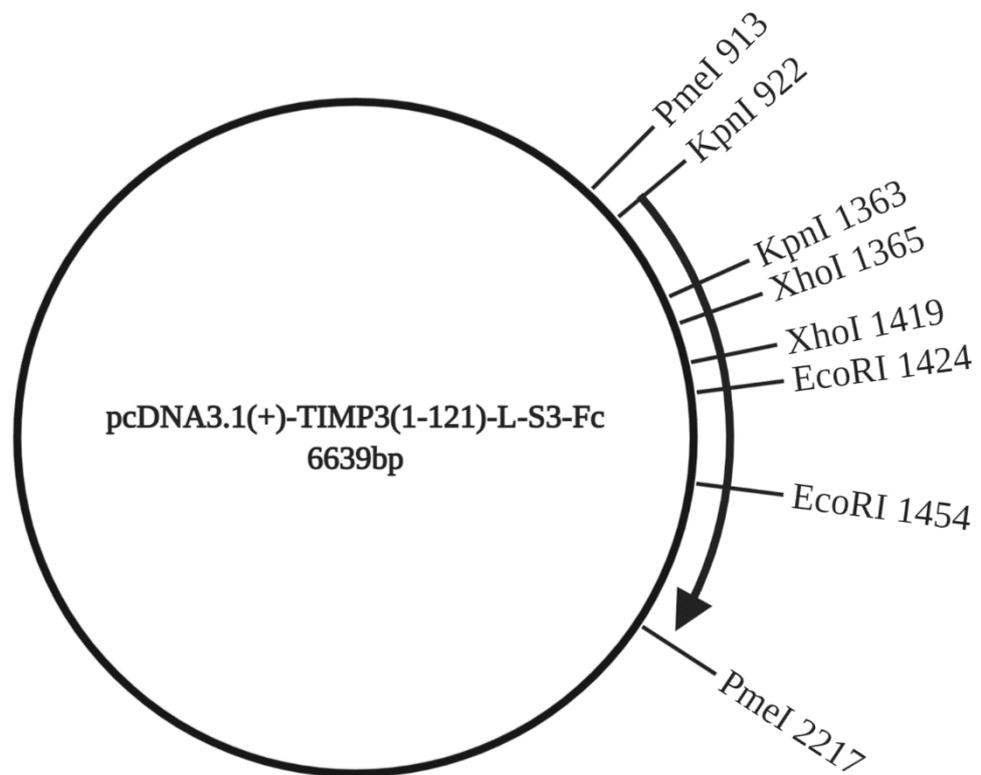
MTPWLGLIVLLGSWSLGDWGAEACTCSPSHPQDAFCNSDIVIRAKVVGKK 50
LVKEGPFGLVYTIKQMKMYRGFTKMPHVQYIHTASESLCGLKLEVNKY 100
QYLLTGRVYDGKMYTGLCNFVERWDQLTSLQRKGLNYRYHLGCNCGTLEG 150
GGGSGGGSGGGGSVLENSNPMMRPLGNSAAAEFRSCDKTHTCPPCPAPE 200
AEGAPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE 250
VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE 300
KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES 350
NGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVMSVHEALH 400
NHYTQKSLSLSPGK

```

#### Abbildung 34: Schematische Darstellung von pcDNA3.1-TIMP3(1-121)-L-S2-Fc

Schematische Darstellung des Plasmides pcDNA3.1-TIMP3(1-121)-L-S2-Fc mit ausgewählten Restriktionsschnittstellen und dem offenen Leserahmen von T3S2(121) (schwarzer Pfeil) sowie der Aminosäuresequenz von T3S2(121). Die Aminosäuresequenz des S2-Peptides ist unterstrichen.

### 13.1.3. pcDNA3.1-TIMP3(1-121)-L-S3-Fc



```

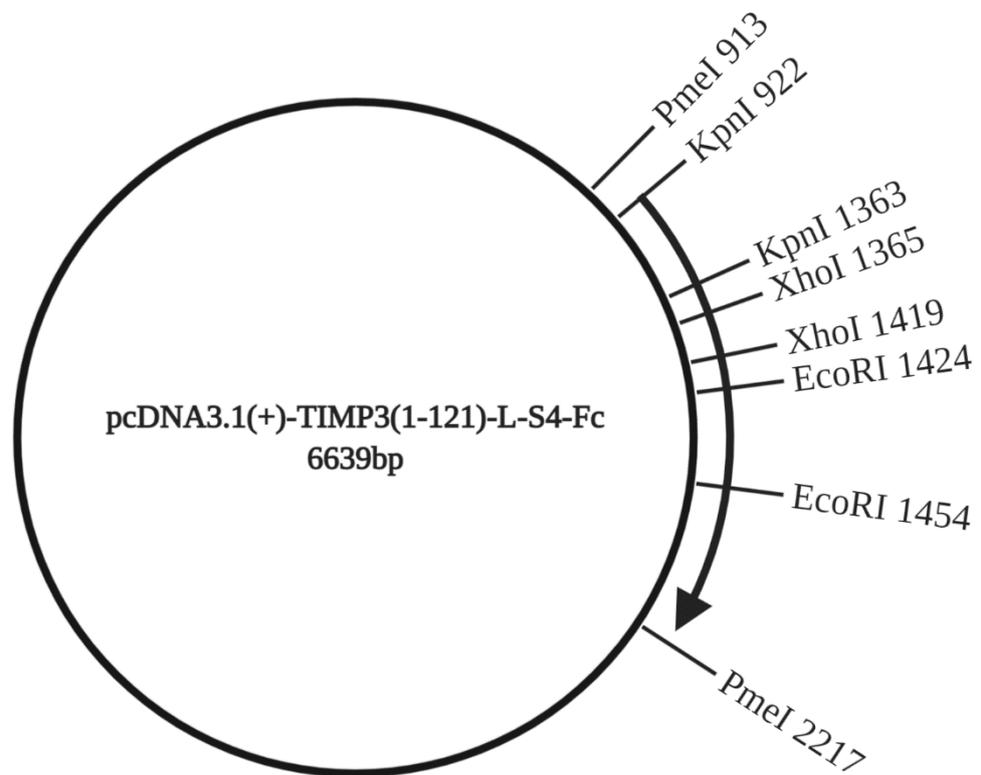
MTPWLGLIVLLGSWSLGDWGAEACTCSPSHPQDAFCNSDIVIRAKVVGKK  50
LVKEGPFGLVYTIKQMKMYRGFTKMPHVQYIHTASESLCGLKLEVNKY  100
QYLLTGRVYDGKMYTGLCNFVERWDQLTLSQRKGLNYRYHLGCNCGTLEG  150
GGGSGGGGSGGGGSVLENSQMRTTIRGNSAAAEFRSCDKTHTCPPCPAPE  200
AEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE  250
VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE  300
KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES  350
NGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH  400
NHYTQKSLSLSPGK

```

#### Abbildung 35: Schematische Darstellung von pcDNA3.1-TIMP3(1-121)-L-S3-Fc

Schematische Darstellung des Plasmides pcDNA3.1-TIMP3(1-121)-L-S3-Fc mit ausgewählten Restriktionsschnittstellen und dem offenen Leserahmen von T3S3(121) (schwarzer Pfeil) sowie der Aminosäuresequenz von T3S3(121). Die Aminosäuresequenz des S3-Peptides ist unterstrichen.

### 13.1.4. pcDNA3.1-TIMP3(1-121)-L-S4-Fc



```

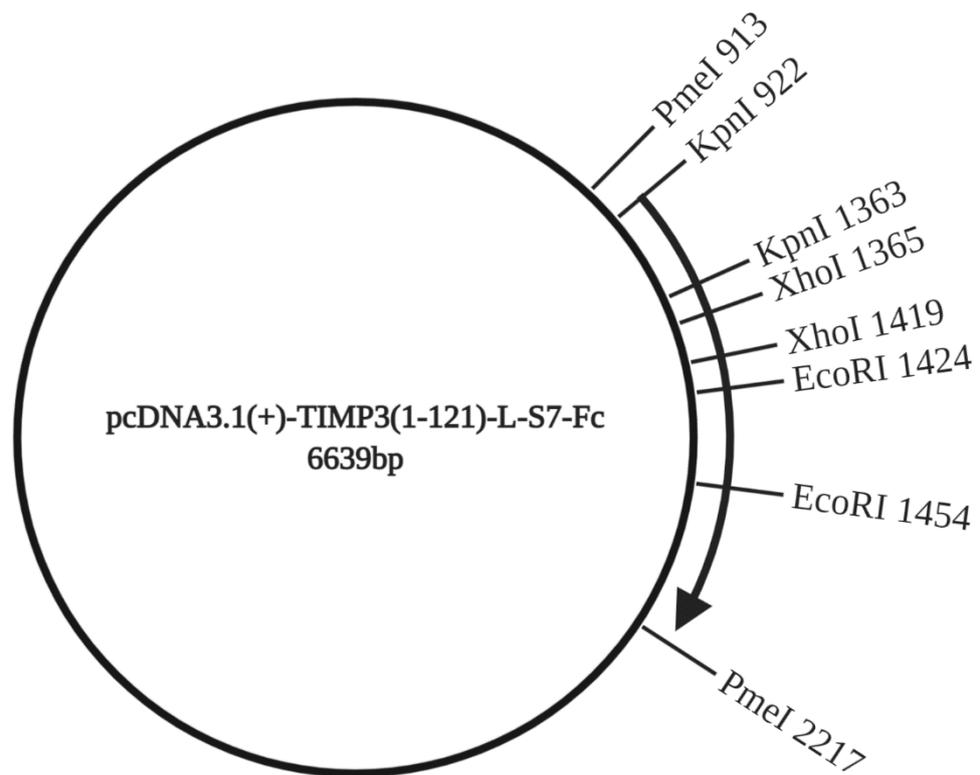
MTPWLGLIVLLGSWSLGDWGAEACTCSPSHPQDAFCNSDIVIRAKVVGKK 50
LVKEGPFGLVYTIKQMKMYRGFTKMPHVQYIHTEASESLCGLKLEVNKY 100
QYLLTGRVYDGKMYTGLCNFVERWDQLTLSQRKGLNYRYHLGCNCGTLEG 150
GGGSGGGGSGGGGSVLENSRLMMLQQGNSAAAEFRSCDKTHTCPPCPAPE 200
AEGAPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE 250
VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE 300
KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES 350
NGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVMSVHEALH 400
NHYTQKSLSLSPGK

```

#### Abbildung 36: Schematische Darstellung von pcDNA3.1-TIMP3(1-121)-L-S4-Fc

Schematische Darstellung des Plasmides pcDNA3.1-TIMP3(1-121)-L-S4-Fc mit ausgewählten Restriktionsschnittstellen und dem offenen Leserahmen von T3S4(121) (schwarzer Pfeil) sowie der Aminosäuresequenz von T3S4(121). Die Aminosäuresequenz des S4-Peptides ist unterstrichen.

### 13.1.5. pcDNA3.1-TIMP3(1-121)-L-S7-Fc



```

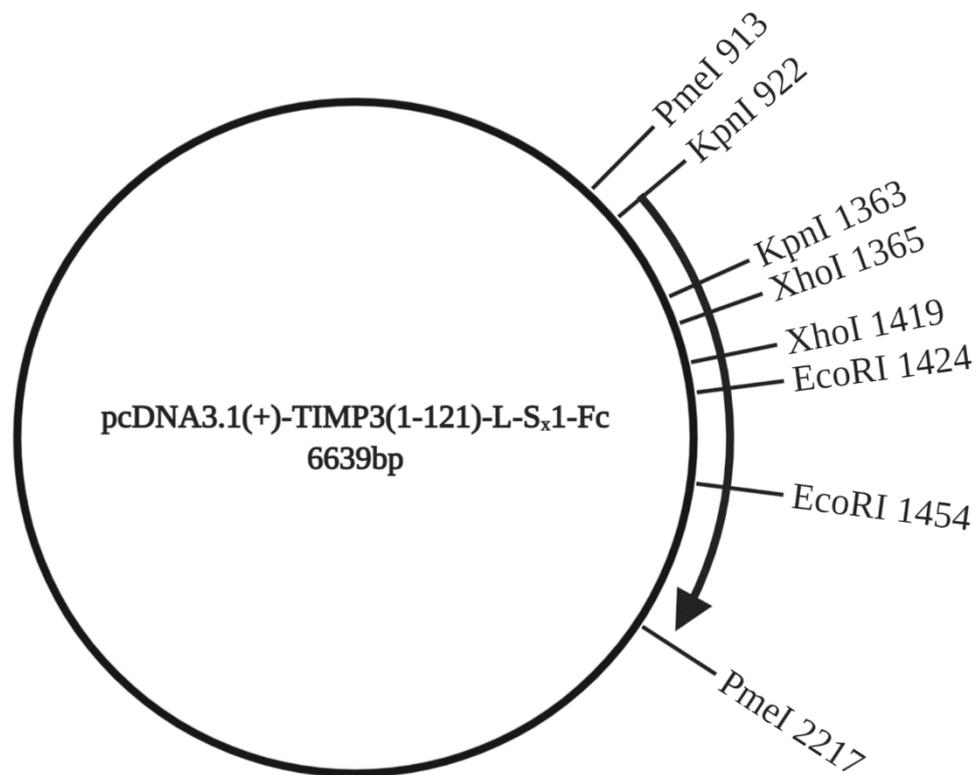
MTPWLGLIVLLGSWSLGDWGAEACTCSPSHPQDAFCNSDIVIRAKVVGKK  50
LVKEGPFGLVYTIKQMKMYRGFTKMPHVQYIHTASESLCGLKLEVNKY  100
QYLLTGRVYDGKMYTGLCNFVERWDQLTLSQRKGLNYRYHLGCNCGTLEG  150
GGGSGGGGSGGGGSVLENSLSLITRLGNSAAAEFRSCDKTHTCPPCPAPE  200
AEGAPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE  250
VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE  300
KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES  350
NGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVMSVHEALH  400
NHYTQKSLSLSPGK

```

#### Abbildung 37: Schematische Darstellung von pcDNA3.1-TIMP3(1-121)-L-S7-Fc

Schematische Darstellung des Plasmides pcDNA3.1-TIMP3(1-121)-L-S7-Fc mit ausgewählten Restriktionsschnittstellen und dem offenen Leserahmen von T3S7(121) (schwarzer Pfeil) sowie der Aminosäuresequenz von T3S7(121). Die Aminosäuresequenz des S7-Peptides ist unterstrichen.

### 13.1.6. pcDNA3.1-TIMP3(1-121)-L-S<sub>x</sub>1-Fc



```

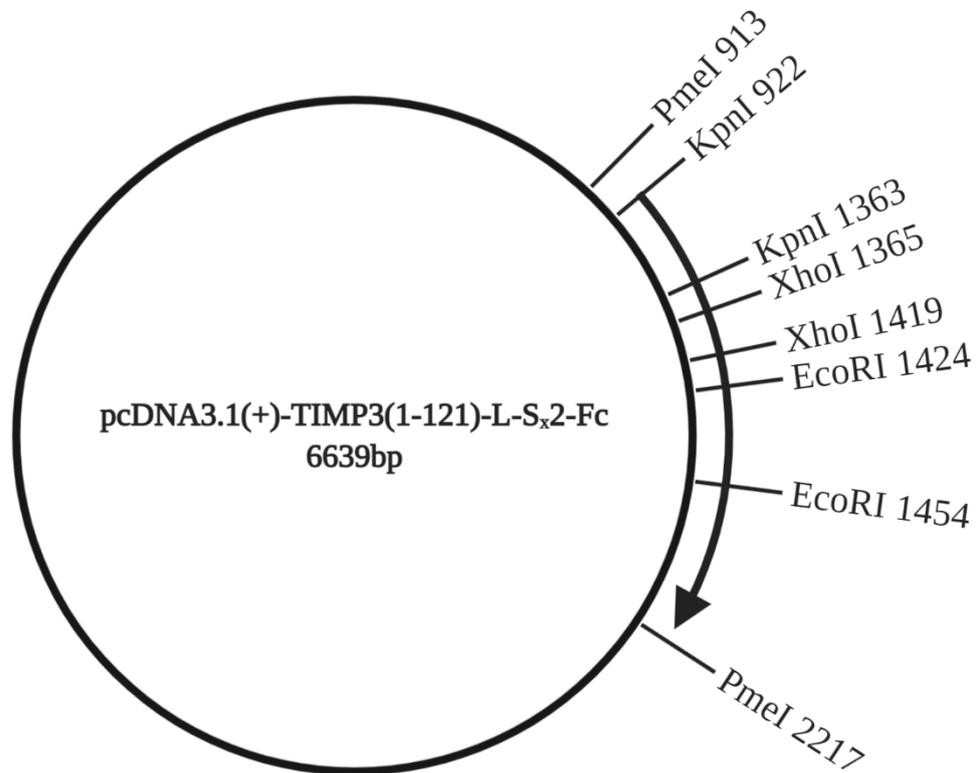
MTPWLGLIVLLGWSLGDWGAEACTCSPSHPQDAFCNSDIVIRAKVVGKK 50
LVKEGPFGLVYTIKQMKMYRGFTKMPHVQYIHTASESLCGLKLEVNKY 100
QYLLTGRVYDGMKMYTGLCNFVERWDQLTLSQRKGLNYRYHLGCNCGTLEG 150
GGGSGGGGSGGGSVLENSQARHQAQGNSAAAEFRSCDKTHTCPPCPAPE 200
AEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE 250
VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE 300
KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES 350
NGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH 400
NHYTQKSLSLSPGK

```

#### Abbildung 38: Schematische Darstellung von pcDNA3.1-TIMP3(1-121)-L-S<sub>x</sub>1-Fc

Schematische Darstellung des Plasmides pcDNA3.1-TIMP3(1-121)-L-S<sub>x</sub>1-Fc mit ausgewählten Restriktionsschnittstellen und dem offenen Leserahmen von T3S<sub>x</sub>1(121) (schwarzer Pfeil) sowie der Aminosäuresequenz von T3S<sub>x</sub>1(121). Die Aminosäuresequenz des S<sub>x</sub>1-Peptides ist unterstrichen.

### 13.1.7. pcDNA3.1-TIMP3(1-121)-L- S<sub>x</sub>2-Fc



```

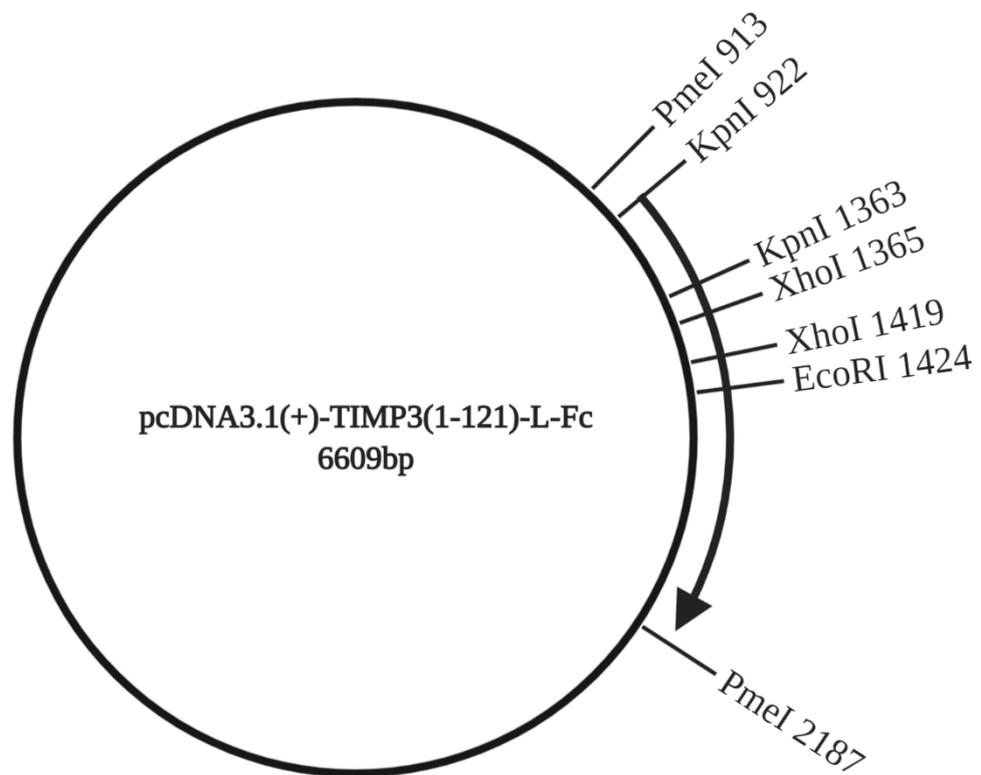
MTPWLGLIVLLGWSLGDWGAEACTCSPSHPQDAFCNSDIVIRAKVVGKK  50
LVKEGPFGLVYTIKQMKMYRGFTKMPHVQYIHTSEASESLCGLKLEVNKY 100
QYLLTGRVYDGMKMYTGLCNFVERWDQLTSLQRKGLNYRYHLGCNCGTLEG 150
GGGSGGGGSGGGGSVLENSERAHHRVGNSSAAAEFRSCDKTHTCPPCPAPE 200
AEGAPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE 250
VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE 300
KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES 350
NGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMHEALH 400
NHYTQKSLSLSPGK

```

#### Abbildung 39: Schematische Darstellung von pcDNA3.1-TIMP3(1-121)-L-S<sub>x</sub>2-Fc

Schematische Darstellung des Plasmides pcDNA3.1-TIMP3(1-121)-L-S<sub>x</sub>2-Fc mit ausgewählten Restriktionsschnittstellen und dem offenen Leserahmen von T3S<sub>x</sub>2(121) (schwarzer Pfeil) sowie der Aminosäuresequenz von T3S<sub>x</sub>2(121). Die Aminosäuresequenz des S<sub>x</sub>2-Peptides ist unterstrichen.

### 13.1.8. pcDNA3.1-TIMP3(1-121)-L-Fc



```

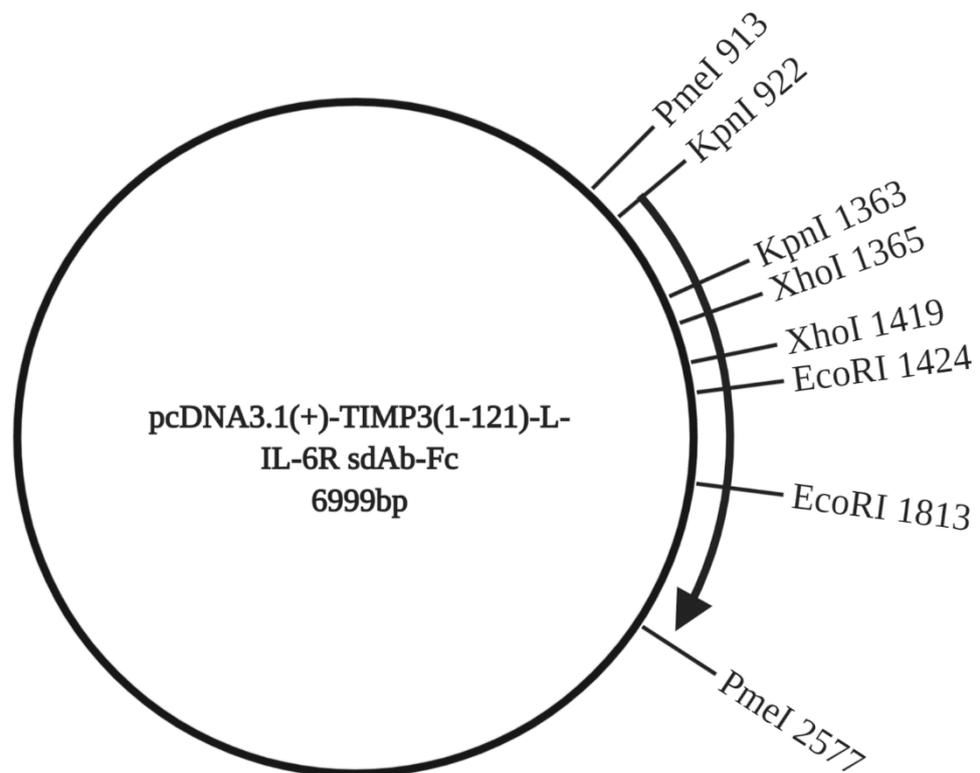
MTPWLGLIVLLGSWSLGDWGAEACTCSPSHPQDAFCNSDIVIRAKVVGKK 50
LVKEGPFGLVYTIKQMKMYRGFTKMPHVQYIHTEASESLCGLKLEVNKY 100
QYLLTGRVYDGKMYTGLCNFVERWDQLTLSQRKGLNYRYHLGCNCGTLEG 150
GGGSGGGGSGGGGSVLENSAAAEFRSCDKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLF 200
PPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE 250
EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP 300
REPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT 350
TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMHEALHNHYTQKSLSL 400
SPGK

```

**Abbildung 40: Schematische Darstellung von pcDNA3.1-TIMP3(1-121)-L-Fc**

Schematische Darstellung des Plasmides pcDNA3.1-TIMP3(1-121)-L-Fc mit ausgewählten Restriktionsschnittstellen und dem offenen Leserahmen von T3(121) (schwarzer Pfeil) sowie der Aminosäuresequenz von T3(121).

### 13.1.9. pcDNA3.1-TIMP3(1-121)-L-IL-6R sdAb-Fc



```

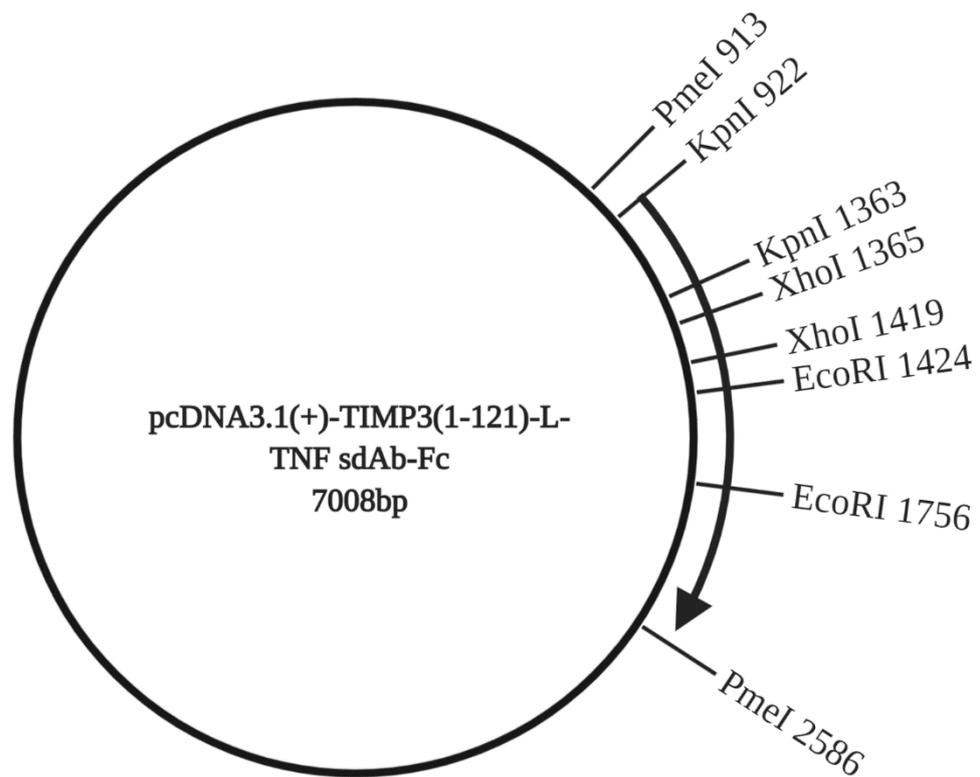
MTPWLGLIVLLGSWSLGDWGAEACTCSPSHPQDAFCNSDIVIRAKVVGKK 50
LVKEGPFGLVYTIKQMKMYRGFTKMPHVQYIHTEASESLCGLKLEVNKY 100
QYLLTGRVYDGKMYTGLCNFVERWDQLTLSQRKGLNYRYHLGCNCGTLEG 150
GGGSGGGGSGGGSVLENSEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFTFDD 200
YDIGWFRQAPGKEREGVSGISSSDGNTYYADSVKGRFTISSDNAKNTVYL 250
QMNSLKPEDTAVYYCAAEPDSSWYLDGSPEFFKYWGQGTQVTVSSGIPA 300
AAEFRSCDKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV 350
VDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW 400
LNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQV 450
SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVD 500
KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

```

**Abbildung 41: Schematische Darstellung von pcDNA3.1-TIMP3(1-121)-L-IL-6R sdAb-Fc**

Schematische Darstellung des Plasmides pcDNA3.1-TIMP3(1-121)-L-IL-6R sdAb-Fc mit ausgewählten Restriktionsschnittstellen und dem offenen Leserahmen von T3I(121) (schwarzer Pfeil) sowie der Aminosäuresequenz von T3I(121).

### 13.1.10. pcDNA3.1-TIMP3(1-121)-L-TNF sdAb-Fc



```

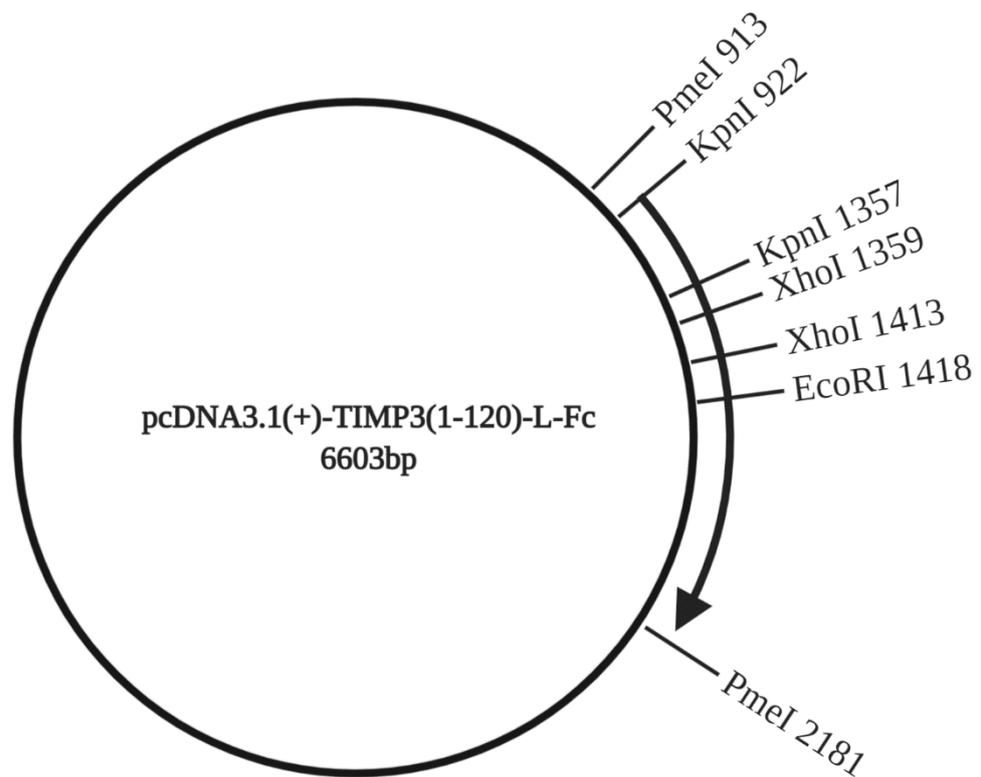
MTPWLGLIVLLGSWSLGDWGAEACTCSPSHPQDAFCNSDIVIRAKVVGKK 50
LVKEGPFGLVYTIKQMKMYRGFTKMPHVQYIHTSEASESLCGLKLEVNKY 100
QYLLTGRVYDGKMYTGLCNFVERWDQLTSLQRKGLNYRYHLGCNCGTLEG 150
GGGSGGGGSGGGSVLENSAAAQVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRT 200
FSDHSGYTYTIGWFRQAPGKEREVARIYWSSGNTYYADSVKGRFAISR 250
IAKNTVDLTMNNLEPEDTAVYYCAARDGIPTSRVSVSYNYWGQGTQVTVS 300
SAAAAEFRSCDKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT 350
CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH 400
QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK 450
NQVSLTCLVKGFIYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKL 500
TVDKSRWQQGNVFCSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

```

#### Abbildung 42: Schematische Darstellung von pcDNA3.1-TIMP3(1-121)-L-TNF sdAb-Fc

Schematische Darstellung des Plasmides pcDNA3.1-TIMP3(1-121)-L-TNF sdAb-Fc mit ausgewählten Restriktionsschnittstellen und dem offenen Leserahmen von T3T(121) (schwarzer Pfeil) sowie der Aminosäuresequenz von T3T(121).

### 13.1.11. pcDNA3.1-TIMP3(1-120)-L-Fc



```

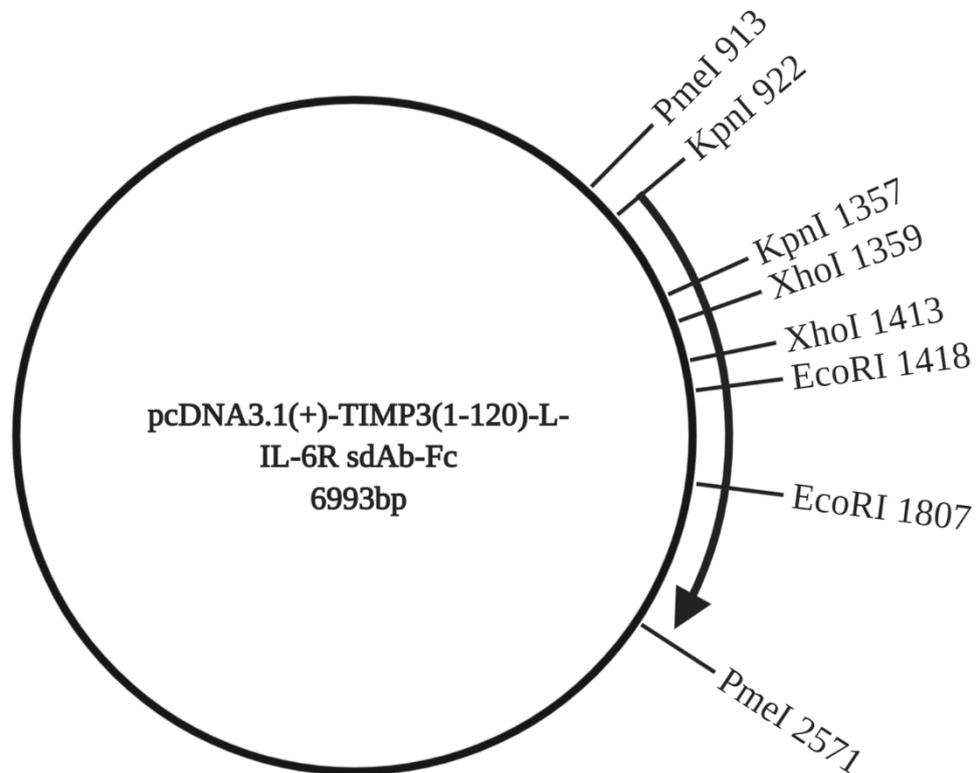
MTPWLGLIVLLGSWSLGDWGAEACTCSPSHPQDAFCNSDIVIRAKVVGKK  50
LVKEGPFGLVYTIKQMKMYRGFTKMPHVQYIHTEASESLCGLKLEVNKY  100
QYLLTGRVYDGKMYTGLCNFVERWDQLTLSQRKGLNYRYHLGCGTLEGGG  150
GSGGGGSGGGSVLENSAAAEFRSCDKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPP  200
KPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ  250
YNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE  300
PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT  350
PVLDSGDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQSVMHEALHNHYTQKSLSL  400
GK

```

**Abbildung 43: Schematische Darstellung von pcDNA3.1-TIMP3(1-120)-L-Fc**

Schematische Darstellung des Plasmides pcDNA3.1-TIMP3(1-120)-L-Fc mit ausgewählten Restriktionsschnittstellen und dem offenen Leserahmen von T3(120) (schwarzer Pfeil) sowie der Aminosäuresequenz von T3(120).

### 13.1.12. pcDNA3.1-TIMP3(1-120)-L-IL-6R sdAb-Fc



```

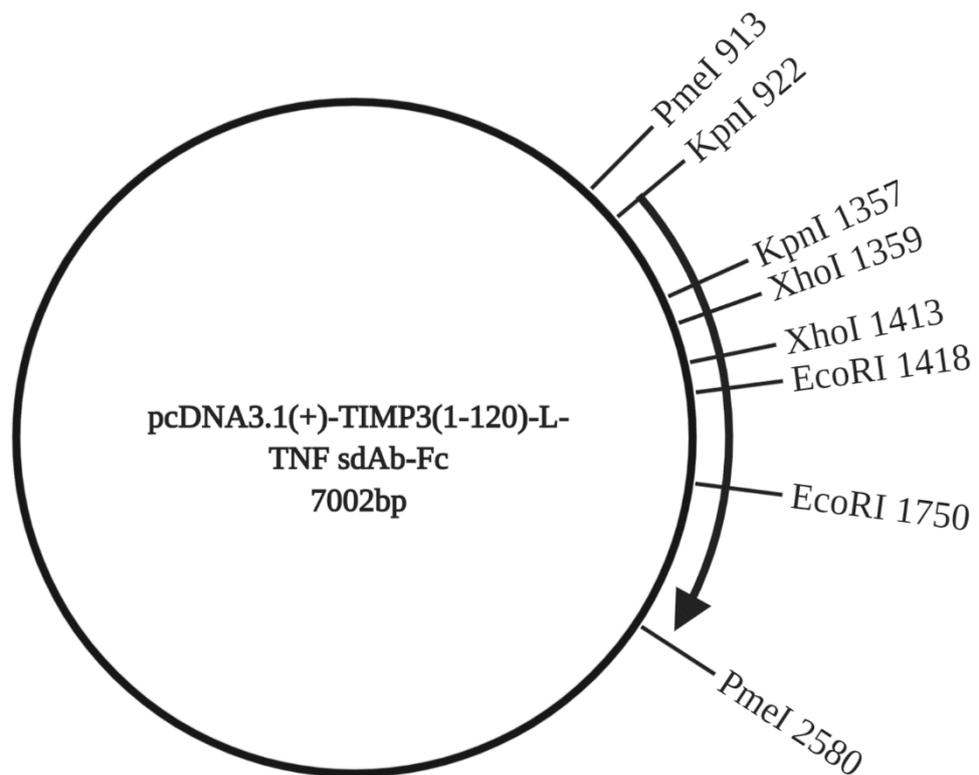
MTPWLGLIVLLGSWSLGDWGAEACTCSPSHPQDAFCNSDIVIRAKVVGKK  50
LVKEGPFGLVYTIKQMKMYRGFTKMPHVQYIHITEASESLCGLKLEVNKY  100
QYLLTGRVYDGKMYTGLCNFVERWDQLTLSQRKGLNYRYHLGCGTLEGGG  150
GSGGGGSGGGSVLENSEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFTFDDYD  200
IGWFRQAPGKEREGVSGISSSDGNTYYADSVKGRFTISSDNAKNTVYLQM  250
NSLKPEDTAVYYCAAEPDSSWYLDGSPEFFKYWGQGTQVTVSSGIPAAA  300
EFRSCDKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVD  350
VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN  400
GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL  450
TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS  500
RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

```

#### Abbildung 44: Schematische Darstellung von pcDNA3.1-TIMP3(1-120)-L-IL-6R sdAb-Fc

Schematische Darstellung des Plasmides pcDNA3.1-TIMP3(1-120)-L-IL-6R sdAb-Fc mit ausgewählten Restriktionsschnittstellen und dem offenen Leserahmen von T3I(120) (schwarzer Pfeil) sowie der Aminosäuresequenz von T3I(120).

### 13.1.13. pcDNA3.1-TIMP3(1-120)-L-TNF sdAb-Fc



```

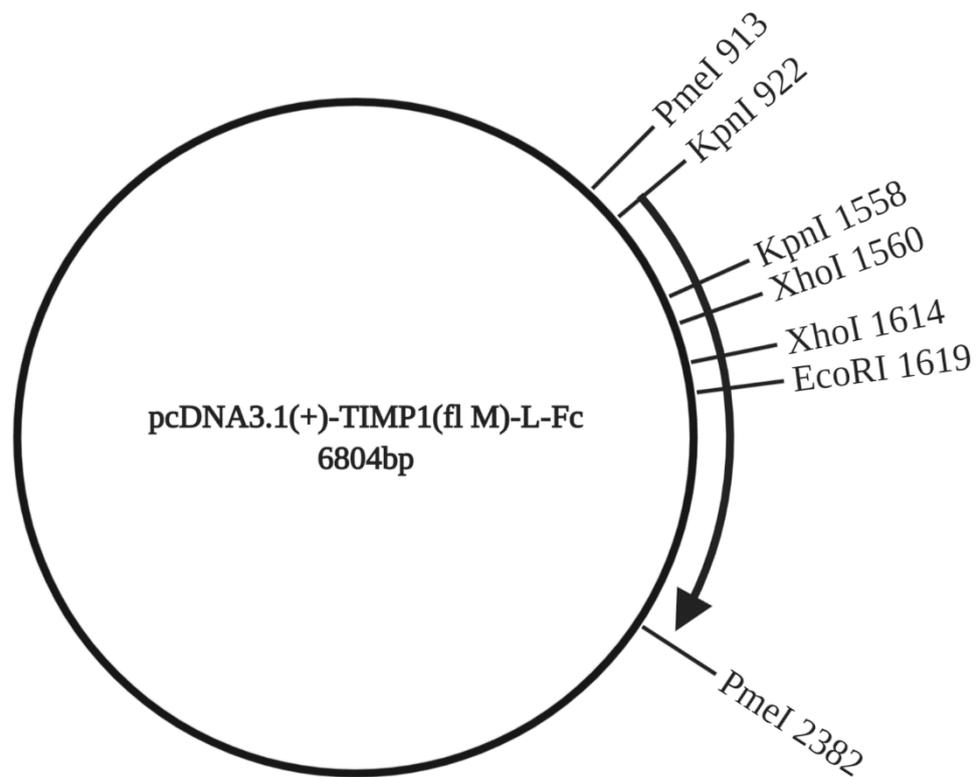
MTPWLGLIVLLGSWSLGDWGAEACTCSPSHPQDAFCNSDIVIRAKVVGKK 50
LVKEGPFGLVYTIKQMKMYRGFTKMPHVQYIHTSEASESLCGLKLEVNKY 100
QYLLTGRVYDGMKMYTGLCNFVERWDQLTSLQRKGLNYRYHLGCGTLEGGG 150
GSGGGGSGGGGSVLENSAAAQVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCLASGRTFS 200
DHSGYTYTIGWFRQAPGKEREVARIYWSSGNTYYADSVKGRFAISRDI 250
KNTVDLTMNNLEPEDTAVYYCAARDGIPTSRVSVSYNYWGQGTQVTVSSA 300
AAAEFRSCDKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV 350
VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD 400
WLNQKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ 450
VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTV 500
DKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

```

#### Abbildung 45: Schematische Darstellung von pcDNA3.1-TIMP3(1-120)-L-TNF sdAb-Fc

Schematische Darstellung des Plasmides pcDNA3.1-TIMP3(1-120)-L-TNF sdAb-Fc mit ausgewählten Restriktionsschnittstellen und dem offenen Leserahmen von T3T(120) (schwarzer Pfeil) sowie der Aminosäuresequenz von T3T(120).

### 13.1.14. pcDNA3.1-TIMP1(fl M)-L-Fc



```

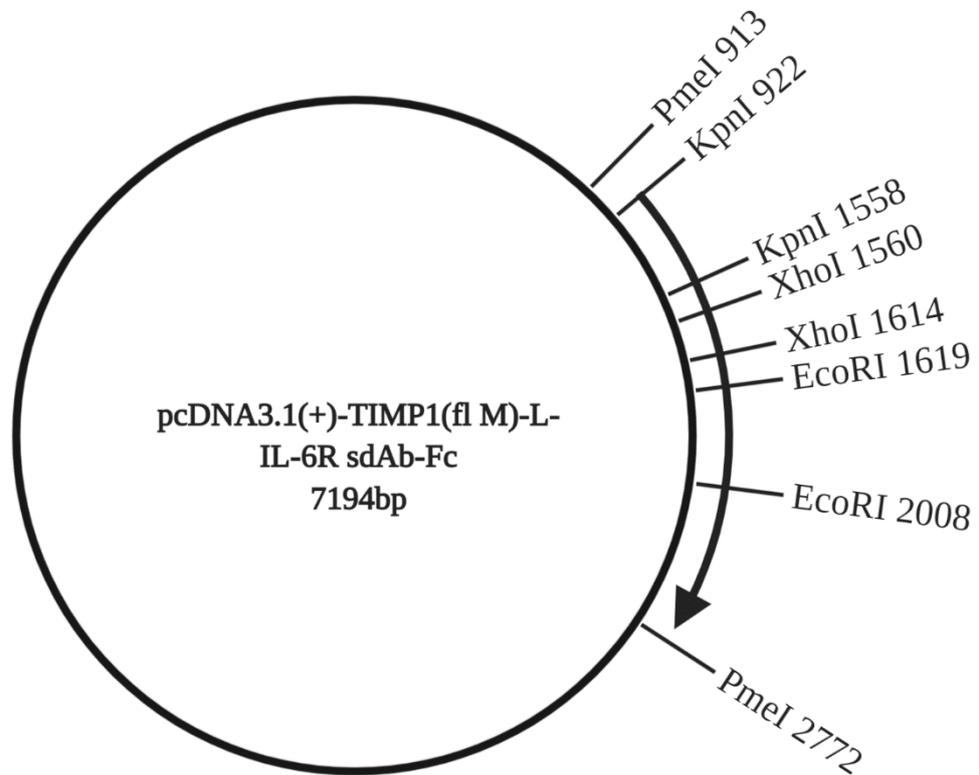
MAPFEPLASGILLLLWLIAPSRACCTCSPPHQPQTAF CNSDLVIRAKFVGT  50
EVNQGPFQGTQRYEIKMTKMYKGFQALGDAADIRFVYTPAMESLTCGYFHRS 100
HNRSEEFLLIAGKLDGLLHITLCSFVAPWNSLSLAQRRGFTKTYTVGCEE 150
CTVFPCLSI PCKLQSGTHCLWTDQLLQSGSEKGFQSRHLACLPREPGLCTW 200
QSLRSQIAGTLEGGGSGGGGSGGGG SVLENSAAAEFRSCDKTHTCPPCP 250
APEAEGAPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVD 300
GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA 350
PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE 400
WESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCVMHE 450
ALHNHYTQKSLSLSPGK

```

**Abbildung 46: Schematische Darstellung von pcDNA3.1-TIMP1(fl M)-L-Fc**

Schematische Darstellung des Plasmides pcDNA3.1-TIMP1(fl M)-L-Fc mit ausgewählten Restriktionsschnittstellen und dem offenen Leserahmen von T1(fl M) (schwarzer Pfeil) sowie der Aminosäuresequenz von T1(fl M).

### 13.1.15. pcDNA3.1-TIMP1(fl M)-L-IL-6R sdAb-Fc



```

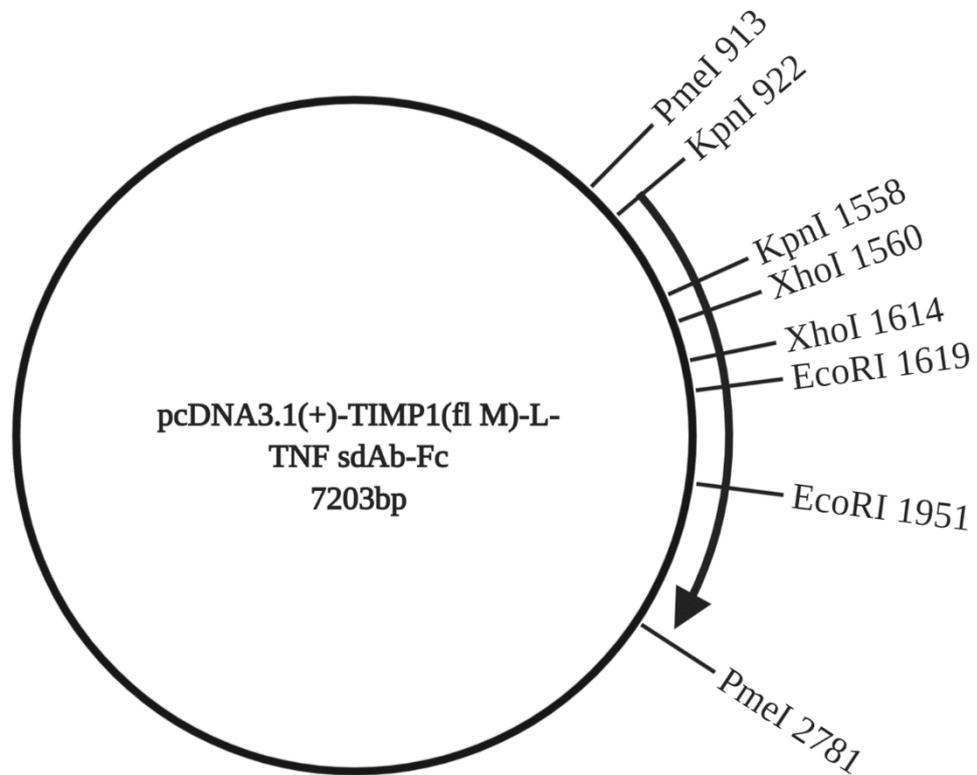
MAPFEPLASGILLLLWLIAPSRACCTCSPPHQPQTAFNCNSDLVIRAKFVGTGTP 50
EVNQGPFPGTQRYEIKMTKMYKGFQALGDAADIRFVYTPAMESLTCGYFHRSL 100
HNRSEEFLLIAGKLDGGLLHITLCSFVAPWNSLSLAQRRGFTKTYTVGCEE 150
CTVFPCLSIIPCKLQSGTHCLWTDQLLQSGSEKGFQSRHLACLPREPGLCTW 200
QSLRSQIAGTLEGGGGSGGGGSGGGGSVLENSVQLVESGGGLVQAGGSL 250
RLSCAASGFTFDDYDIGWFRQAPGKEREGVSGISSSDGNTYYADSVKGRF 300
TISSDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYCAAEPDSSWYLDGSPEFFKYWG 350
QGTQVTVSSGIPAAAEFRSCDKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKPKDT 400
LMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY 450
RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVY 500
LPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD 550
DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

```

**Abbildung 47: Schematische Darstellung von pcDNA3.1-TIMP1(fl M)-L-IL-6R sdAb-Fc**

Schematische Darstellung des Plasmides pcDNA3.1-TIMP1(fl M)-L-IL-6R sdAb-Fc mit ausgewählten Restriktionsschnittstellen und dem offenen Leserahmen von TIMP1(fl M) (schwarzer Pfeil) sowie der Aminosäuresequenz von TIMP1(fl M).

### 13.1.16. pcDNA3.1-TIMP1(fl M)-L-TNF sdAb-Fc



```

MAPFEPLASGILLLLWLIAPSRACCTCSPPHQPQAFNCNSDLVIRAKFVGTGTP 50
EVNQGPFPGTQRYEIKMTKMYKGFQALGDAADIRFVYTPAMESLTCGYFHRS 100
HNRSEEFLLIAGKLDGGLLHITLCSFVAPWNSLSLAQRRGFTKTYTVGCEE 150
CTVFPCLSIIPCKLQSGTHCLWTDQLLQSGSEKGFQSRHLACLPREPGLCTW 200
QSLRSQIAGTLEGGGGSGGGGSGGGGSVLENSAAAQVQLQESGGGLVQPG 250
GSLRLSCAASGRTFSDHSGYTYTIGWFRQAPGKEREFFVARIYWSSGNTYY 300
ADSVKGRFAISRDIKNTVDLTMNNLEPEDTAVYYCAARDGIPTSRSVES 350
YNYWGQGTQVTVSSAAADEFRSCDKTHTCPPCPAPEAEGAPSVFLFPPKP 400
KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN 450
STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ 500
VYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPV 550
LDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVDFCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK 600

```

**Abbildung 48: Schematische Darstellung von pcDNA3.1-TIMP1(fl M)-L-TNF sdAb-Fc**  
Schematische Darstellung des Plasmides pcDNA3.1-TIMP1(fl M)-L-TNF sdAb-Fc mit ausgewählten Restriktionsschnittstellen und dem offenen Leserahmen von T1T(fl M) (schwarzer Pfeil) sowie der Aminosäuresequenz von T1T(fl M).

## 14. Danksagung

An erster Stelle möchte ich Prof. Dr. Jürgen Scheller danken, der mir die Möglichkeit gegeben hat meine Dissertation an seinem Institut zu schreiben. Vielen Dank für die engmaschige Betreuung und die Übernahme der Erstkorrektur meiner Arbeit.

Ich danke Prof. Dr. Walter Däubener für die Übernahme der Zweitkorrektur meiner Arbeit und seine große Geduld bei der Terminfindung sowie Dr. Doreen Floß für den Beisitz bei der Disputatio.

Mein besonderer Dank gebührt Dr. Jens Moll, der mir unermüdlich mit Rat und Tat zur Seite stand. Vielen Dank für die fantastische Begleitung meiner Laborzeit, dafür, dass Du immer ein offenes Ohr und eine offene Tür für mich hattest und für dein fortgesetztes Engagement für meine Belange auch lange über die Laborzeit hinaus.

Ohne die herzliche Aufnahme in die AG Scheller, das kollegiale Miteinander und die ständige Hilfsbereitschaft wäre es mir sicher nicht möglich gewesen diese Arbeit zu schreiben. Ich danke deshalb allen Mitarbeitenden der Arbeitsgruppe, insbesondere: Petra Oprea (ohne dich geht gar nichts!), Dr. Doreen Floß, Dr. Manuel Franke, Dr. Erika Engelowski, Dr. Larissa Lammertz, Dr. Robin Polz, Feresteh Kamrani, Dr. Sofie Moßner, Marco Schönberg und Arthur Schneider.

Auch allen meinen Freunden möchte ich an dieser Stelle danken. Ich schätze mich glücklich, Freunde zu haben auf die ich mich immer verlassen kann. Thilo, du kennst mich länger als jeder andere meiner Freunde. Ohne dich wäre ich nicht der, der ich heute bin. Marc & Fred, danke, dass ihr immer da seid, ihr seid Familie. Christian und Steffi, ihr seid die Besten. Bleibt, wie ihr seid! Hauke, danke für all die Ausflüge nach Aventurien, wenn die Realität anstrengend war.

Ich danke meiner Familie Petra, Armin, Christina, Adelheid und Josef für alles, was ihr mir ermöglicht habt. Ihr seid die wichtigsten Menschen in meinem Leben, ohne euch wäre das alles nicht möglich gewesen. Ich liebe euch.

Zuletzt danke ich Corinna, meiner großen Liebe. Du hast alle großen Schwierigkeiten meines Lebens mit mir durchgestanden und alle Höhepunkte mit mir gefeiert. Wir sind ein super Team und wir werden eine noch bessere Familie werden.