

Aus dem Institut für Biochemie und Molekularbiologie II

Direktor: Univ.-Prof. Dr. Jürgen Scheller

Untersuchungen zur Effektivität des IL-6 classic-  
und trans-signalings

Dissertation

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

vorgelegt von

Julian Philipp Kionke

2023

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. Jürgen Scheller

Zweitgutachterin: Prof. Dr. Martina Krüger

## Zusammenfassung

Zytokine der IL-6 Familie sind wichtige Signalmoleküle, die an der Regulation des Immunsystems beteiligt sind. Fehlregulationen der IL-6 Signaltransduktion spielen eine entscheidende Rolle bei der Entstehung von verschiedenen Krankheitsbildern wie z.B. rheumatoider Arthritis oder Krebs. Zur Therapie der rheumatoiden Arthritis können folglich auch Moleküle, die die IL-6 Signaltransduktion hemmen, wie z.B. der monoklonale Antikörper Tocilizumab, eingesetzt werden. IL-6 wirkt über einen IL-6-spezifischen  $\alpha$ -Rezeptor (IL-6R) in Kombination mit einem  $\beta$ -Rezeptor, dem ubiquitär exprimierten Glykoprotein 130 (gp130). Der IL-6-Rezeptor kommt im Gegensatz zum gp130 nur auf spezifischen Zellen, wie beispielsweise Leukozyten oder Hepatozyten, vor. Nach Bindung des IL-6R durch IL-6 erfährt IL-6 eine Konformationsänderung, die eine Affinität zu gp130 schafft. Infolgedessen kommt es zu einer Rekrutierung von zwei gp130-Molekülen an den IL-6/IL-6R Komplex. Die Komplexierung von gp130 durch IL-6 bedingt dann eine Aktivierung von Januskinasen, die durch die Phosphorylierung von gp130 Tyrosinseitenketten die Aktivität von Transkriptionsfaktoren wie z.B. STAT3 regulieren. Eine Aktivierung des IL-6 Signalweges über den membranständigen IL-6R bezeichnet man dabei als *classic-signaling*. Zusätzlich können durch eine lösliche Form des IL-6R auch Zellen durch IL-6 aktiviert werden, die keinen membranständigen IL-6R exprimieren. Dies wird als IL-6 *trans-signaling* bezeichnet. Die physiologischen Auswirkungen von IL-6 *classic-* und *trans-signaling* unterscheiden sich interessanterweise deutlich. So wird *classic-signaling* eher mit regenerativen Prozessen, *trans-signaling* dagegen eher mit chronisch entzündlichen Prozessen assoziiert.

Diese Arbeit beschäftigt sich mit vergleichenden Aspekten von IL-6 *classic-* und *trans-signaling*. Vorausgegangene Studien haben gezeigt, dass unter physiologischen Konzentrationen von IL-6 und sIL-6R nur ein sehr geringer Teil des IL-6 als IL-6/sIL-6R-Komplex vorliegt. Weiterhin ist bekannt, dass die Gleichgewichtsdissoziationskonstante ( $K_D$ ) des IL-6/IL-6R Komplexes circa zehnfach geringer ist, als die  $K_D$  des IL-6/IL-6R/gp130 Komplexes. Dies legt den Schluss nahe, dass unter physiologischen Bedingungen IL-6 *classic-signaling* bevorzugt ablaufen könnte, da hierfür eine Bindung von IL-6 an den IL-6R auf der Membran sofort durch die Bindung von gp130 stabilisiert und Signaltransduktion eingeleitet werden könnte. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde in dieser Arbeit anhand von Zellkulturmodellen untersucht, ob und in welchem Ausmaß diese beiden Prozesse in Ko-Kulturen von Zellen, die entsprechend responsiv für *classic-* oder *trans-signaling* sind, ablaufen können. Zu diesem Zweck wurde ein durchflusszytometrie- und fluoreszenzmikroskopiebasiertes Assaysystem etabliert,

welches die Analyse einzelner Zellpopulationen in Ko-Kultur erlaubt. Mit Hilfe dieses Assaysystems konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass bei geringen IL-6 Konzentrationen *classic-signaling* überwiegt. Schon bei moderaten IL-6 Konzentrationen können *classic-* und *trans-signaling* gleichberechtigt ablaufen. Zudem lässt sich aus diesen Daten ein Wendepunkt ablesen, ab welchem *classic-signaling* nicht mehr überwiegt. Des Weiteren konnte festgestellt werden, dass der membranständige IL-6R die Sensitivität zu Hyper-IL-6 limitiert. Diese neuen Erkenntnisse tragen zu einem besseren Verständnis des IL-6 *signalings* bei und liefern Konzentrationsbereiche, in denen IL-6 *classic-* und *trans-signaling* koexistieren.

## **Summary**

Cytokines of the IL-6 family are important signaling molecules involved in the regulation of the immune system. Misregulation of IL-6 signal transduction plays a crucial role in the development of various diseases such as rheumatoid arthritis or cancer. Consequently, molecules that inhibit IL-6 signal transduction, such as the monoclonal antibody tocilizumab, can be used to treat rheumatoid arthritis. IL-6 operates through an IL-6 specific  $\alpha$  receptor (IL-6R) in combination with a  $\beta$  receptor, the ubiquitously expressed glycoprotein 130 (gp130). In contrast to gp130, the IL-6 receptor is only found on some cells, such as leukocytes or hepatocytes. Upon the binding of IL-6R by IL-6, IL-6 undergoes a conformational change that creates an affinity for gp130. As a result, recruitment of two gp130 molecules to the IL-6/IL-6R complex occurs. Complexation of gp130 by IL-6 induces the activation of Janus kinases, which regulate the activity of transcription factors such as STAT3 through phosphorylation of gp130 tyrosine side chains. In this context, the activation of the IL-6 signaling pathway via the membrane-bound IL-6R is referred to as classic-signaling. In addition, a soluble form of IL-6R can also activate cells by IL-6 that do not express membrane bound IL-6R. This is referred to as IL-6 trans-signaling. Interestingly, the physiological effects of IL-6 classic- and trans-signaling differ significantly. Thus, classic-signaling is more associated with regenerative processes, whereas trans-signaling is more associated with chronic inflammatory processes.

This work focuses on comparative aspects of IL-6 classic- and trans-signaling. Previous studies have shown that under physiological concentrations of IL-6 and sIL-6R only a very small fraction of IL-6 is present in IL-6/sIL-6R complexes. Furthermore, it is known that the equilibrium dissociation constant ( $K_D$ ) of the IL-6/IL-6R complex is approximately tenfold lower than the  $K_D$  of the IL-6/IL-6R/gp130 complex. This suggests that IL-6 classic-signaling might proceed preferentially under physiological conditions. Since for this purpose binding of IL-6 to the IL-6R on the membrane could be immediately stabilized by binding of gp130 and signal transduction could be initiated. To test this hypothesis, this work used cell culture models to investigate whether and to what extent these two processes can occur in co-cultures of cells that are appropriately responsive to classic- or trans-signaling. For this purpose, a new flow cytometry and fluorescence microscopy based assay system was established, which allows the analysis of single cell populations in co-cultures. By means of this assay system, it was revealed that classic-signaling predominates at low IL-6 concentrations. Even at moderate IL-6 concentrations, classic- and trans-signaling can occur equally. In addition, this data indicates a turning point from which classic-signaling no longer

predominates. Furthermore, membrane-bound IL-6R was found to limit sensitivity to Hyper-IL-6. These new findings contribute to a better understanding of IL-6 signaling and provide concentration ranges in which IL-6 classic- and trans-signaling coexist.

## Abkürzungsverzeichnis

A	Amper
ADAM	<i>A Desintegrin and Metalloprotease</i>
AK	Antikörper
AKT	Proteinkinase B
Ala	Alanin
ARDS	<i>Acute Respiratory Distress Syndrom</i>
Asp	Aspartat
bp	Basenpaare
BSF-2	B-Zellstimulierender Faktor-2
CC	CC Chemokine
CLCF-1	<i>Cardiotrophin-like cytokine factor 1</i>
cm	Zentimeter
CNTF	<i>Ciliary Neurotrophic Factor</i>
COVID-19	<i>coronavirus disease 2019</i>
CRP	C-reaktives Protein
CRS	<i>Cytokine Release Syndrom</i>
CT-1	Cardiotrophin-1
CXC	CXC Chemokine
dH <sub>2</sub> O	destilliertes Wasser
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's Medium</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ERK	<i>extracellular signal-regulated kinases</i>
FACS	<i>fluorescence-activated cell sorting</i>
FCS	fötales Kälberserum
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
gp130	Glykoprotein 130
h	Stunden
HGF	<i>hepatocytes growth factor</i>
hIL-6	humanes Interleukin-6
H-IL-6	Hyper-Interleukin-6
IL	Interleukin
IL-6R	Interleukin-6 Rezeptor
JAK	Januskinasen

kb	Kilobasen
$K_D$	Gleichgewichtsdissoziationskonstante
KSHV	Kaposisarkom-assoziierte Herpesviren
LB-Medium	Lysogeny-Broth-Medium
LIF	Leukämie inhibierender Faktor
MEK	<i>Mitogen-activated protein kinase kinase</i>
$MgCl_2$	Magnesiumchlorid
IL-6R	membrangebundener Interleukin-6 Rezeptor
min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimol
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
m/v	Masse pro Volumen
NF- $\kappa$ B	<i>nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells</i>
ng	Nanogramm
OSM	Onkostatin M
PBS-T	<i>Phosphate Buffered Saline with Tween20</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PFA	Paraformaldehyd
PI3K	<i>Phosphoinositide 3-kinases</i>
PROM	<i>premature rupture of the membranes</i>
RFP	<i>red fluorescent protein</i>
rpm	<i>rounds per minute</i>
SARS-CoV-2	<i>severe acute respiratory syndrome coronavirus type 2</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat
sgp130	lösliche Variante (soluble) des Glykoprotein 130
sIL-6R	löslicher (soluble) Interleukin-6 Rezeptor
SLE	Systemischer Lupus Erythematosus
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphismus</i>
SOCS	<i>Supressors of cytokine signaling</i>
STAT	<i>Signal Transducers and Activators of Transcription</i>
TAE	TRIS-Acetat-EDTA
TBS-T	<i>Tris-buffered saline with Tween20</i>
TEMED	Tetramethylethylendiamin
U	<i>Units</i>

µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
V	Volt
vIL-6	virales Interleukin-6

# Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung .....	1
1.1	Vom BSF-2 zum pleiotropen Zytokin IL-6 – eine historische Einordnung mit Ausblick .....	1
1.2	Classic-Signaling .....	5
1.3	Trans-Signaling .....	6
1.3.1	Rolle des sIL-6R.....	7
1.4	Klinische Relevanz – Therapieansätze .....	9
1.5	Zielsetzung dieser Arbeit.....	11
2	Material und Methoden.....	12
2.1	Material .....	12
2.1.1	Antibiotika .....	12
2.1.2	Antikörper.....	12
2.1.3	Chemikalien.....	13
2.1.4	Enzyme.....	14
2.1.5	Geräte .....	14
2.1.6	Größenmarker .....	16
2.1.7	Kits .....	16
2.1.8	Kulturmedien.....	16
2.1.9	Oligonukleotide .....	17
2.1.10	Plasmide .....	18
2.1.11	Programme und Internetseiten .....	18
2.1.12	Puffer und Lösungen.....	19
2.1.13	Rekombinante Proteine.....	21
2.1.14	Verbrauchsmaterial .....	21
2.1.15	Zelllinien .....	22
2.2	Methoden .....	23
2.2.1	Molekularbiologische Methoden.....	23
2.2.2	Proteinbiochemische Methoden .....	28

2.2.3	Zellbiologische Methoden.....	33
3	Ergebnisse .....	36
3.1	Wie ist die Balance zwischen <i>classic-</i> und <i>trans-signaling</i> ? .....	36
3.2	Mono-Kulturansatz zum Vergleich von <i>classic-</i> und <i>trans-signaling</i> .....	36
3.2.1	Klonierung von IL-6-GFP-Fc.....	37
3.2.2	Klonierung von sIL-6R-miRFP670-Fc.....	38
3.2.3	Produktion des Proteins IL-6-GFP.....	38
3.2.4	IL-6-GFP-Tev-Fc wird nicht von Ba/F3-gp130-IL-6R Zellen internalisiert.....	39
3.2.5	Produktion des Proteins sIL-6R-miRFP670.....	40
3.3	Etablierung eines neuen Assaysystems für Einzelzellanalyse mit Vergleich von <i>classic-</i> und <i>trans-signaling</i> .....	40
3.4	Keine Dominanz des <i>classic-signaling</i> über das <i>trans-signaling</i> bei moderaten Konzentrationen von IL-6 und dem sIL-6R .....	43
3.4.1	Auswertung der Fluoreszenzmikroskopie.....	43
3.4.2	Auswertung der Durchflusszytometrie.....	44
3.4.3	IL-6 Konzentrationen über 5 ng/ml führen zu maximalem <i>trans-</i> <i>signaling</i> .....	46
3.4.4	Membrangebundener IL-6R limitiert die Sensitivität zu Hyper-IL-6.48	
4	Diskussion.....	51
5	Literatur- und Quellverzeichnis .....	58
6	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....	67
6.1	Abbildungsverzeichnis .....	67
6.2	Tabellenverzeichnis.....	67

# 1 Einleitung

## 1.1 Vom BSF-2 zum pleiotropen Zytokin IL-6 – eine historische Einordnung mit Ausblick

1984 wurde ein Faktor entdeckt, welcher die finale Reifung von B-Zellen in Immunglobulin-sekretierende Zellen induziert (Butler *et al.* 1984). Die cDNA für dieses zunächst als B-Zellstimulierenden Faktor-2 (BSF-2) benanntes Protein wurde 1986 entschlüsselt (Hirano *et al.* 1986). Nachdem man festgestellt hatte, dass es sich bei BSF-2 um dasselbe Protein handelt, wurde als neue Bezeichnung Interleukin-6 (IL-6) gewählt (Tosato *et al.* 1988). Im selben Jahr wurde auch die cDNA für den humanen Interleukin-6 Rezeptor (IL-6R) entschlüsselt, welcher als spezifischer Rezeptor für IL-6 identifiziert werden konnte (Yamasaki *et al.* 1988) und nur auf Hepatozyten, Leukozyten und Megakaryozyten exprimiert wird (Jones *et al.* 2011). Für die Signaltransduktion von IL-6 wird noch ein weiterer Rezeptor benötigt, das ubiquitär exprimierte Glykoprotein 130 (gp130), dessen cDNA 1990 entschlüsselt werden konnte (Hibi *et al.* 1990). Erst nach der Bindung von IL-6 an den IL-6R kann die Bindung an gp130 stattfinden, woraufhin es zu einer Dimerisierung zweier gp130 Moleküle mit darauffolgendem intrazellulären Signal kommt. Die intrazelluläre Domäne des IL-6R ist nicht an der intrazellulären Signalweitergabe beteiligt, sondern sichert nur die Bindung zu IL-6. Gp130 nimmt also eine Schlüsselrolle bei der Signalverarbeitung von IL-6 ein. Zum einen stabilisiert es die Bindung zwischen IL-6 und dem IL-6R, zum anderen wirkt es als Mediator für Rezeptoren, welche keine signalverarbeitende intrazelluläre Domäne besitzen (Taga *et al.* 1989, Hibi *et al.* 1990). Da gp130 auf fast allen Zellen im menschlichen Organismus exprimiert ist, besteht eine gewisse funktionelle Redundanz von IL-6 und weiteren Zytokinen, die gp130 als Signalübermittler nutzen (Hibi *et al.* 1990, Oberg *et al.* 2006).

Aufgrund der Tatsache, dass sich verschiedene Zytokine gp130 als Rezeptor teilen, wurde schließlich eine Gruppierung gebildet, die den Namen IL-6-Familie trägt. Zu ihr zählen IL-6 als Namensgeber, Interleukin-11 (IL-11), der Leukämie inhibierende Faktor (LIF), Onkostatine M (OSM), Cardiotrophin-1 (CT-1), *Ciliary Neurotrophic Factor* (CNTF) und *Cardiotrophin-like cytokine factor 1* (CLCF1) (Taga *et al.* 1997). Über die Jahre wuchs die Zahl der Mitglieder um Interleukin-27 (IL-27), Interleukin-35 (IL-35) und Interleukin-39 (IL-39) auf mittlerweile zehn an (Zegeye *et al.* 2018).

Noch im Laufe der 1980er Jahre wurden weitere Funktionen von IL-6 im Organismus neben der ursprünglichen Induktion der finalen Reifung von B-Zellen zu Immunglobulin-

sekretierenden Zellen (Butler *et al.* 1984) beschrieben. Zu diesen zählen unter anderem die Induktion der Proliferation von Hybridom-, Plasmazytom- und Myelomzellen (Van Sniek *et al.* 1986, Nordan *et al.* 1986, Van Sniek *et al.* 1987, Kawano *et al.* 1988), die Induktion der Interleukin-2 (IL-2) Produktion, das Zellwachstum, die Differenzierung von zytotoxischen T-Zellen (Garman *et al.* 1987, Lotz *et al.* 1988, Okada *et al.* 1988), die Regulation der Akut-Phase-Reaktion (Andus *et al.* 1987, Gauldie *et al.* 1987), die Wachstumsinhibition und Differenzierung von Myeloisch-leukämischen Zelllinien (Miyaura *et al.* 1988) und die Induktion der Nervenzelldifferenzierung (Satoh *et al.* 1988). IL-6 nimmt somit eine essentielle Rolle bei der Immunantwort, dem Zellüberleben, der Apoptose und der Proliferation von Zellen, welche die Immunantwort regulieren, ein (Kishimoto *et al.* 2005).

Einige dieser Funktionen beispielsweise der antiapoptotischen Wirkung machen sich pathogene Erreger zu Nutze. So wurde ein von Kaposisarkom-assoziierten Herpesviren (KSHV) codiertes IL-6 (vIL-6) entdeckt, welches imstande ist, gp130 ohne vorherige Bindung an den IL-6R zu aktivieren (Molden *et al.* 1997). Das vIL-6 weist 24,8% homologe Aminosäuresequenzen zum humanen IL-6 (hIL-6) auf und ermöglicht einer infizierten Zelle ein verlängertes Überleben (Molden *et al.* 1997, Suthaus *et al.* 2011, Rose-John *et al.* 2018). Schon früh wurde festgestellt, dass bei Patienten mit chronisch-entzündlichen oder infektiösen Erkrankungen, wie beispielsweise Rheumatoider Arthritis, Systemischem Lupus Erythematosus oder AIDS, erhöhte IL-6 Spiegel im Blut nachweisbar sind (Mackiewicz *et al.* 1992).

Anfang der 1990er Jahre wurde festgestellt, dass es auch eine lösliche Variante des IL-6R (sIL-6R) gibt. Dieser sIL-6R ist in der Lage, Zellen zu stimulieren, welche keinen IL-6R auf ihrer Oberfläche tragen (Mackiewicz *et al.* 1992). Da gp130 nicht alleine durch ein Zytokin der IL-6 Familie aktiviert werden kann, bestimmt demnach der  $\alpha$ -Rezeptor, wie beispielsweise der IL-6R, welche Zellen durch welches Zytokin stimuliert werden können. Die lösliche Variante des IL-6R erweitert somit das Spektrum der potentiellen Zielzellen enorm, dient als Puffer für zu hohe Konzentrationen von Zytokinen und verlängert zudem noch die Halbwertszeit von IL-6 (Jones *et al.* 2002). Die Stimulation von IL-6 über den membrangebundenen IL-6R wird als *classic-signaling* und die Stimulation über den sIL-6R wird als *trans-signaling* bezeichnet. Erstaunlicherweise scheinen diese beiden Signalarten entgegengesetzte Effekte zu haben. So werden *classic-signaling* eher antiinflammatorische Effekte, wie etwa die Abwehr gegenüber bakteriellen Erregern oder die Inhibierung von Epithelialzellapoptose zugeschrieben, *trans-signaling* hingegen wird mit proinflammatorischen Effekten, wie zum Beispiel der

Rekrutierung von Monozyten im Entzündungsgeschehen oder der Inhibierung der T-Zellapoptose assoziiert (Jones *et al.* 2011, Rose-John *et al.* 2012, Calabrese *et al.* 2014, Schmidt-Arras *et al.* 2016). Laut Reeh *et al.* ist dies mit dem unterschiedlichen Expressionslevel der einzelnen Komponenten des Rezeptorkomplexes zu begründen. Dabei kommt es hauptsächlich auf das Verhältnis von gp130 zu dem membrangebundenen IL-6R (IL-6R) auf der Zelloberfläche an. Beim *classic-signaling* ist die Signalstärke durch die Menge der exprimierten IL-6R begrenzt. Eine solche Begrenzung gibt es beim *trans-signaling* potentiell nicht, da die Konzentration des sIL-6R im Serum sehr viel stärker gesteigert werden kann (Reeh *et al.* 2019). Im Abschnitt 1.2 und 1.3 wird erneut genauer auf diese beiden Arten des *IL-6-signaling* für ein besseres Verständnis eingegangen.

In jüngster Zeit wurde zudem noch eine dritte Variante des *IL-6-signaling* entdeckt, bei der IL-6, welches an den IL-6R auf gp130 defizienten dendritischen Zellen gebunden ist, an auf T-Zellen exprimiertes gp130 präsentiert wird. Dieser IL-6 abhängige Signaltransduktionsmechanismus wird *trans-presentation* genannt (Heink *et al.* 2017). Im Rahmen dieser Dissertation spielt diese Signalart allerdings keine entscheidende Rolle und wird daher nicht weiter beschrieben.

Die intrazelluläre Signaltransduktion von IL-6 erfolgt durch Transphosphorylierung und Aktivierung von Januskinasen (JAKs), welche wiederum Tyrosin in der intrazellulären Domäne von gp130 phosphorylieren. Dies löst die Rekrutierung von *Signal Transducers and Activators of Transcription* (STAT) durch *Src-homologe-2* Domänen aus, welche daraufhin phosphoryliert werden. Die phosphorylierten und dimerisierten STAT-Moleküle können nun in den Zellkern gelangen und dort in die Transkription der DNA der jeweiligen Zelle eingreifen (Levy *et al.* 2002, Tanaka *et al.* 2018).

Um spezifische Effekte des IL-6 *trans-signaling* zu untersuchen, wurde das Designerprotein Hyper-IL-6 (H-IL-6) entwickelt (Fischer *et al.* 1997). Es handelt sich um ein Fusionsprotein bestehend aus IL-6 und dem sIL-6R, die durch einen flexiblen Peptidlinker kovalent miteinander verbunden sind. H-IL-6 imitiert somit das *trans-signaling* und ist zudem noch 100-1000-fach aktiver als der IL-6—sIL-6R Komplex im menschlichen Serum, da die Bindung zwischen IL-6 und dem sIL-6R mit einer Gleichgewichtsdissoziationskonstante ( $K_D$ ) von 9 nM (Boulanger *et al.* 2003) viel schwächer ist als die kovalente Bindung des H-IL-6 (Fischer *et al.* 1997). Anhand von Versuchen mit H-IL-6 wurde deutlich, dass *trans-signaling* in erheblichem Maße an der Regeneration der Leber beteiligt ist (Galun *et al.* 2000, Peters *et al.* 2000). Diese Erkenntnis und viele weitere jüngeren Datums, wie zum Beispiel, dass *trans-signaling*

das Gewebe im Entzündungsprozess vor Schäden von Proteasen und reaktiven O<sub>2</sub>-Spezies schützt, indem es den Wechsel von Neutrophilen Granulozyten zu Monozyten steuert (Scheller *et al.* 2011(b)), tragen zu einer vielschichtigeren Blickweise auf die Rolle des *trans-signaling* bei. So werden dem *trans-signaling* nicht mehr ausschließlich Eigenschaften zugeschrieben, die dem Organismus schaden.

Mittlerweile hat sich ein sehr viel differenzierteres Bild etabliert: Es wird vermutet, dass *trans-signaling* als Booster fungiert, um kritische Situationen zu beherrschen. Bei Fehlregulation oder Überstimulation kann dies allerdings schnell zu unkontrollierbaren Zuständen, wie zum Beispiel Autoimmunerkrankungen oder einem Septischen Schock, führen (Scheller *et al.* 2014). *Trans-signaling* scheint also eher ein Kontrollmechanismus kritischer Situationen zu sein, der den Organismus vor Schäden bewahren soll (Nowell *et al.* 2009). Erst die Fehlregulation des *trans-signaling* führt zu nicht beherrschbaren proinflammatorischen Zuständen, welche die Grundlage von Autoimmunität bilden.

Zudem wurde festgestellt, dass der größte Anteil an IL-6 frei im Serum vorliegt und nicht, wie bisher angenommen, in einem Komplex mit dem sIL-6R oder der löslichen Variante des gp130 (sgp130), welches *trans-signaling* blockiert (Calabrese *et al.* 2014). Nachgewiesen wurde hier eine sehr große Diskrepanz zwischen der theoretisch berechneten und der praktisch nachgewiesenen Komplexbildung. Selbst sehr hohe Konzentrationen von endogenem sgp130 scheinen nicht auszureichen, um *trans-signaling* vollständig zu blockieren. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass *classic-* und *trans-signaling* simultan ablaufen können (Baran *et al.* 2018).

Das sich stetig verbessernde Verständnis von der IL-6 Signaltransduktion und die Interaktion von IL-6 zu anderen sich im Blut befindlichen Komponenten lassen neue Möglichkeiten zu, fehlgeleitete Prozesse therapeutisch zu beheben. Im Jahr 2022 gelang es Cao *et al.* bereits mittels hochauflösenden Strukturanalysen von Rezeptorkomplexen Designerproteine zu erzeugen, welche mit hoher Affinität an diese binden. Dabei wurde nicht mehr als die dreidimensionale Struktur des Proteins benötigt, an welche das Designerprotein binden sollte (Murakami *et al.* 2019, Cao *et al.* 2022).

IL-6 hat sich über die Jahrzehnte der Forschung von einem monofunktionellen Faktor zu einem multifunktionalen, pleiotropen Zytokin innerhalb eines immer komplexer werdenden und extrem fein abgestimmten Systems entwickelt. Um neuartige Therapiemöglichkeiten für zum Beispiel Morbus Crohn oder Rheumatoide Arthritis zu entwickeln, bedarf es unter anderem einer genauen Kenntnis über die grundlegenden Prozesse der IL-6 Signalwege, zu welchen *classic-signaling*, *trans-signaling* und seit

neustem auch *trans-presentation* zählen. Erstere beiden sind wesentlicher Bestandteil dieser Dissertation und werden daher im Folgenden noch genauer beleuchtet.

## 1.2 Classic-Signaling

An der klassischen Signaltransduktion durch IL-6 sind der membranständige IL-6  $\alpha$ -Rezeptor (IL-6R oder gp80) und gp130 als  $\beta$ -Rezeptor beteiligt. Zuerst muss die niederaffine Bindung zwischen IL-6 und dem IL-6R ( $K_D$  9 nM) stattfinden, damit dieser entstandene Komplex im nächsten Schritt an gp130 binden kann. Gp130 stabilisiert zum einen die Bindung zwischen IL-6 und dem IL-6R ( $K_D$  0,8 nM) und führt zum anderen die Signalübertragung ins Zellinnere aus (Taga *et al.* 1989, Hibi *et al.* 1990, Boulanger *et al.* 2003). Nachdem die Dimerisierung von zwei Molekülen gp130 stattgefunden hat, kann der Januskinase (JAK)/STAT Signalweg ablaufen (s. Abschnitt 1.1) (Levy *et al.* 2002).

Im Vergleich zu IL-6, welches gp130-Homodimere induziert und dadurch wiederum in einer Phosphorylierung von STAT3 resultiert, erzeugen andere Zytokine der IL-6 Familie Heterodimere aus gp130 und WSX-1 im Falle von beispielsweise IL-27. Heterodimere hingegen aktivieren daraufhin STAT1 (Pflanz *et al.* 2004, Garbers *et al.* 2013). Dies ist eine Art der unterschiedlichen Modulation verschiedener *Outcomes* innerhalb der Signalvermittlung von Zytokinen der IL-6 Familie. Andere Möglichkeiten der Modulation bezüglich des *Outcomes* sind beispielsweise die Art des Signalwegs, die Konzentration der Zytokine oder das Rezeptordichteverhältnis vom  $\alpha$ - zum  $\beta$ -Rezeptor auf der Zelloberfläche (Murakami *et al.* 2019, Reeh *et al.* 2019).

IL-6 hat eine zentrale Rolle innerhalb des Immunsystems. Dazu ist eine strenge Regulation der IL-6 Konzentration im Serum vonnöten. Unter physiologischen Bedingungen liegen diese Konzentrationen bei 1-10 pg/ml. Unter entzündlichen Bedingungen, Infektionen oder Krebs kann das IL-6 Level im Blut um den Faktor 1000 auf 1-10 ng/ml ansteigen. Bei einer lebensgefährlichen Sepsis lassen sich sogar IL-6 Konzentrationen im Bereich von 100-1000 ng/ml nachweisen (Rose-John *et al.* 2015, Baran *et al.* 2018).

Während eines Entzündungsprozesses sorgt IL-6 für die Rekrutierung von Immunzellen, indem es Endothel- und Muskelzellen dazu anregt, Chemokine zu produzieren. Des Weiteren induziert IL-6 die Differenzierung von B-Zellen und T-Helferzellen und sorgt dafür, dass Hepatozyten Akute-Phase-Proteine produzieren. Außerdem ist IL-6 an der Abwehr verschiedenster pathogener Keime beteiligt (Calabrese *et al.* 2014). Welche Wirkung IL-6 im Organismus entfaltet, hängt letztendlich von der Zellart ab, die es

stimuliert. Da der IL-6R ausschließlich auf Hepatozyten, Neutrophilen Granulozyten, Monozyten/Makrophagen und einigen Lymphozyten exprimiert ist, beschränkt sich der Wirkungsbereich des *classic-signaling* auf diese Zellen (Scheller *et al.* 2014). So werden dem *classic-signaling* eher antiinflammatorische Eigenschaften, wie zum Beispiel die regenerativen Funktionen im Pankreas (Zhang *et al.* 2013), der Leber (Fazel Modares *et al.* 2019), dem Darmepithel (Jones *et al.* 2011) und der Nieren (Luig *et al.* 2015) sowie die Induktion der Akute-Phase-Reaktion (Schmidt-Arras *et al.* 2016) und die Regulation der Insulinsensitivität und Glukosetoleranz der Leber (Scheller *et al.* 2011(b)), zugeschrieben.

Es wird vermutet, dass *classic-signaling* unter physiologischen Bedingungen im Verhältnis zu *trans-signaling* bevorzugt abläuft (Boulanger *et al.* 2003). Erklärt wird dies durch die räumliche Nähe des IL-6R zu gp130 auf der Zelloberfläche. Nachdem eine Bindung zwischen IL-6 und dem IL-6R stattgefunden hat, kann diese unmittelbar durch membrangebundenes gp130 stabilisiert werden. Im Falle des *trans-signaling* muss der Komplex aus IL-6 und dem sIL-6R in der Regel länger bestehen bis er auf eine Zelle mit gp130 auf der Oberfläche trifft, damit eine Bindung stattfinden kann. Die Bindung zwischen dem Komplex aus IL-6 und dem IL-6R mit gp130 weist mit 10 pM eine 100-fach höhere Affinität auf, als die einfache Bindung zwischen IL-6 und dem IL-6R mit 1 nM (Yamaguchi *et al.* 1992, Scheller *et al.* 2014). Um den Anteil an *trans-signaling* zu steigern, müssten die Konzentrationen von IL-6 und dem sIL-6R im Serum enorm gesteigert werden, so wie sie unter pathophysiologischen Bedingungen zu finden sind (Rose-John *et al.* 2015, Baran *et al.* 2018).

### 1.3 Trans-Signaling

Eine sich im Serum befindliche gelöste Form des IL-6R (sIL-6R) erweitert das Wirkungsspektrum von IL-6 enorm. Statt der bisher nur wenigen stimulierbaren Zelltypen, welche den IL-6R auf ihrer Oberfläche tragen, sind über den sIL-6R nahezu alle im menschlichen Organismus befindlichen Zellen erreichbar (Taga *et al.* 1989, Mackiewicz *et al.* 1992).

Der sIL-6R kann über zwei unterschiedliche Mechanismen erzeugt werden: Zu rund 90% wird er durch *Shedding* von ADAM-Proteasen (*A Disintegrin and Metalloprotease*) generiert. Dieser Prozess wird hauptsächlich durch die Protease ADAM17 vollzogen. Zu einem weitaus kleineren Anteil an der IL-6R Produktion trägt das alternative *Splicen* der IL-6R mRNA bei (Galun *et al.* 2000, Peters *et al.* 2000, Scheller *et al.* 2011(a), Garbers *et al.* 2014).

Bei Entzündungsprozessen oder Krebs lassen sich nicht nur höhere IL-6 Spiegel im Blut nachweisen, sondern auch die Konzentration des sIL-6R ist erhöht (Scheller *et al.* 2011(a)). Physiologische Konzentrationen des sIL-6R im Blut liegen bei 25-75 ng/ml, also wesentlich höher als physiologische Werte von IL-6 (s. Abschnitt 1.2). Unter pathophysiologischen Bedingungen lassen sich diese Werte allerdings nur um den Faktor zwei bis drei steigern und nicht wie bei IL-6 um das bis zu 1000-fache (Baran *et al.* 2018). Hauptsächlich findet *Shedding* des IL-6R durch die ADAM17-Protease statt, wodurch die Konzentration des sIL-6R im Serum steigt (Rabe *et al.* 2008, Scheller *et al.* 2011(a)).

Es wird vermutet, dass höhere sIL-6R Level im Blut den Anteil an *classic-signaling* sinken und den Anteil an *trans-signaling* steigen lassen (Garbers *et al.* 2014). Durch das nun vermehrt ablaufende *trans-signaling* werden Endothelzellen stimuliert, die einen Wechsel der Chemokinexpression von CXC (bspw. KC) hin zu CC (bspw. MCP-1) induzieren. Dadurch werden zunehmend Monozyten und T-Lymphozyten angezogen. *Trans-signaling* bewirkt nicht nur einen Wechsel von Neutrophilen Granulozyten hin zu Monozyten an Entzündungsstellen, sondern fördert zudem die weitere Differenzierung von Monozyten zu Makrophagen über die Hochregulierung der M-CSF Rezeptorexpression und induziert die T-Zelldifferenzierung (Scheller *et al.* 2011(b)).

Die intrazelluläre Signalverarbeitung des *trans-signaling* über den JAK/STAT Signalweg unterscheidet sich nicht von dem des *classic-signaling* (s. Abschnitt 1.1) (Reeh *et al.* 2019). Allerdings gibt es Hinweise auf Unterschiede in der intrazellulären Signalweiterleitung zwischen IL-6 *classic-* und *trans-signaling*. So berichten beispielsweise Zegeye *et al.*, dass im IL-6 *trans-signaling* im Gegensatz zu *classic-signaling* eine Aktivierung der *Phosphoinositide 3-kinase* (PI3K)/ Proteinkinase B (AKT) und der *Mitogen-activated protein kinase* (MEK)/ *extracellular signal-regulated kinases* (ERK) Signalweg bewirke (Zegeye *et al.* 2018).

### **1.3.1 Rolle des sIL-6R**

Das Verhältnis von *classic-* und *trans-signaling* wird maßgeblich vom sIL-6R beeinflusst. Wie in Abschnitt 1.3 bereits gezeigt, wird vermutet, dass hohe Konzentrationen vom sIL-6R den Anteil an *classic-signaling* sinken lassen (Garbers *et al.* 2014).

Rabe *et al.* machen deutlich, dass der sIL-6R für akute Entzündungszustände von großer Wichtigkeit sei (Rabe *et al.* 2008). In der Frühphase einer Entzündung steigt zunächst die IL-6 Konzentration, welche dann die Konzentration des sIL-6R in der Spätphase der Entzündung ansteigen lässt, wie schon detaillierter in Abschnitt 1.3

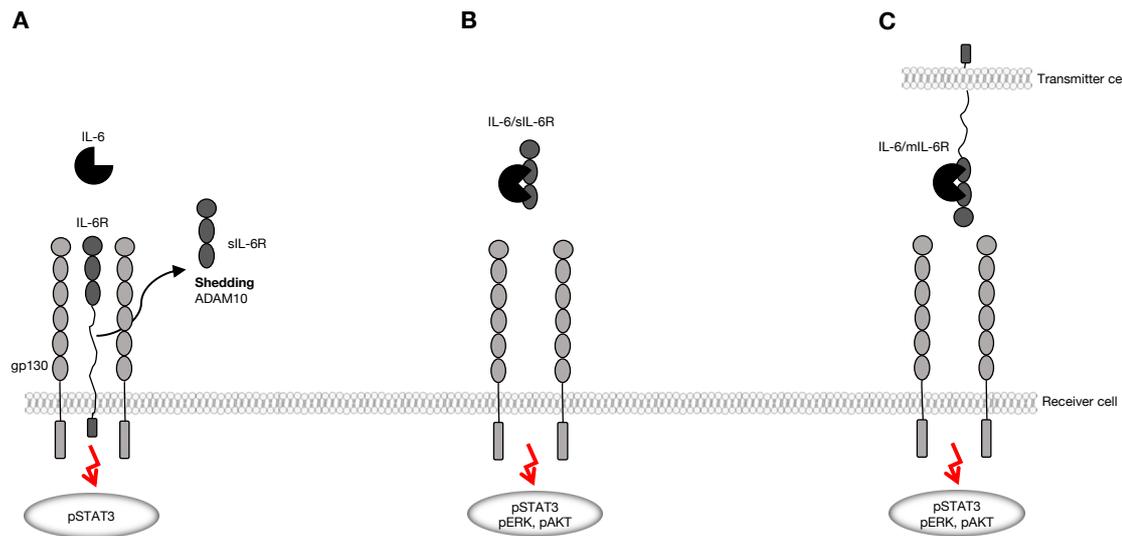
beschrieben. Dies erleichtert in der Frühphase der Entzündung zunächst das *classic-signaling*, in der Spätphase jedoch eher das *trans-signaling* (Rabe *et al.* 2008, Scheller *et al.* 2011(b), Braun *et al.* 2016). Bei Patienten mit Rheumatoider Arthritis, einer dauerhaften Entzündungserkrankung der Gelenke, konnten permanent erhöhte sIL-6R Spiegel im Blut nachgewiesen werden. Zudem konnte festgestellt werden, dass die Höhe der sIL-6R Konzentration im Blut mit dem Grad der Leukozyteninfiltration korreliert (Galun *et al.* 2000, Jones *et al.* 2002). Dies untermauert erneut den in Abschnitt 1.3 beschriebenen *Shedding*-Mechanismus, welcher bei Entzündungsprozessen gesteigert abläuft.

Doch wie ist es möglich, dass IL-6 und der sIL-6R eine Bindung eingehen, wenn deren Spiegel zu unterschiedlichen Zeitpunkten ansteigen? Da der sIL-6R das doppelte Molekulargewicht von IL-6 hat, ist auch noch in der späten Entzündungsphase die IL-6 Konzentration hoch genug, um zusammen mit dem sIL-6R eine Wirkung zu entfalten. Der sIL-6R ist in dieser Phase essentiell für die Transmigration von Monozyten. Er leitet nämlich einen Wechsel der Chemokinexpression von CXCL12 zu CXCL1 ein, indem er zusammen mit IL-6 Endothelzellen stimuliert. Ohne den sIL-6R wäre dieser Vorgang der Navigation von Monozyten hin zur Entzündungsstelle nicht möglich, da Endothelzellen keinen IL-6R haben und somit alleine durch IL-6 nicht stimulierbar sind (Rabe *et al.* 2008). Innerhalb dieses fein abgestimmten Netzwerkes ermöglicht der sIL-6R demzufolge während eines Entzündungsvorgangs, dass die benötigten Zellen zum richtigen Zeitpunkt am richtigen Ort sind.

Interessanterweise wurde ein *Single Nucleotide Polymorphismus* (SNP) im humanen IL-6R Gen ausfindig gemacht (rs2228145), bei dem Asp358 zu Ala358 ausgetauscht wird. Dies hat zur Folge, dass sich der IL-6R besser von ADAM17 Proteasen schneiden lässt und somit eine höhere sIL-6R Konzentration im Blut solcher Patienten nachzuweisen ist (Garbers *et al.* 2014). Erstaunlicherweise sind Individuen mit dieser SNP Variante des IL-6R weniger vulnerabel gegenüber kardiovaskulären und arthritischen Erkrankungen. Als Erklärung hierfür wird eine höhere Pufferkapazität vom sIL-6R für bei diesen Erkrankungen typisch erhöhten IL-6 Spiegel im Blut angenommen (Ferreira *et al.* 2013). Zusammen mit sgp130 wird auf diese Weise eine Überstimulation der Zellen verhindert oder zumindest abgeschwächt (Calabrese *et al.* 2014, Schaper *et al.* 2015). Weiterhin ist bekannt, dass der sIL-6R die Halbwertszeit und die Signalaktivität von IL-6 maßgeblich verlängert (Jones *et al.* 2011).

Der sIL-6R bildet die Schnittstelle zwischen *classic*- und *trans-signaling* und hat einen protektiven Effekt auf die Überstimulation durch zu viel IL-6. Zugleich verlängert er auch

dessen Signalaktivität. Viele weitere Fragen sind allerdings noch offen, beispielsweise warum die Konzentrationen des sIL-6R in der Schlafphase um 70% ansteigen (Scheller *et al.* 2014) oder warum die Komplexbildung zwischen IL-6 und dem sIL-6R *in vivo* viel geringer ist, als bisher in theoretischen Modellen erwartet (Baran *et al.* 2018).



**Abbildung 1.1: Schematische Darstellung der Signalarten, die durch Interleukin-6 induziert werden.** (A) Darstellung des *classic-signaling*. IL-6 (schwarzer  $\frac{3}{4}$  Kreis) bindet an einen auf der Zelle gebundenen Komplex aus zwei Molekülen gp130 (lange Kette aus hellgrauen Kreisen und Ovalen) und einem IL-6R (kurze Kette aus dunkelgrauen Kreisen und Ovalen). Nach Bindung an den Komplex erfolgt eine Signalübertragung ins Zellinnere, die eine Aktivierung von STAT3 zur Folge hat. Der IL-6R kann durch *Shedding* der Protease ADAM10 in seine lösliche Form (sIL-6R) übergehen. (B) Darstellung des *trans-signaling*. IL-6 bindet zuerst an den sIL-6R. Im zweiten Schritt folgt die Bindung an das Homodimer gp130. Daraufhin erfolgt eine Signalübertragung ins Zellinnere, die eine Aktivierung von STAT3, ERK und AKT zur Folge hat. (C) Darstellung des *trans-presentation*. IL-6 wird vom IL-6R auf Transmitterzellen gebunden und daraufhin an auf *Receiverzellen* exprimiertes gp130 präsentiert. Daraufhin erfolgt eine Signalübertragung ins Zellinnere, die eine Aktivierung von STAT3, ERK und AKT zur Folge hat.

#### 1.4 Klinische Relevanz – Therapieansätze

IL-6 spielt eine Schlüsselrolle bei der Entstehung einer Reihe von Krankheiten. So sind beispielsweise die IL-6 Spiegel im Blut von Patienten mit Autoimmunerkrankungen, wie chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (Seegert *et al.* 2001), dem Systemischem Lupus Erythematosus (SLE), der Rheumatoider Arthritis oder AIDS erhöht (Mackiewicz *et al.* 1992), ebenso wie bei der Entstehung verschiedener Krebsarten, wie beispielsweise eines Kolonkarzinoms (Scheller *et al.* 2014).

Weiterhin konnte festgestellt werden, dass bei übergewichtigen Menschen ebenfalls der IL-6 Spiegel im Blut dauerhaft erhöht ist. Mechanistisch ist IL-6 an der Senkung des Blutzuckers über die Aktivierung von  $\alpha$ -Zellen im Pankreas beteiligt (Ellingsgaard *et al.*

2011). Erhöhte IL-6 Spiegel im Blut konnten auch bei psychischen Krankheiten, wie Depressionen oder Schizophrenie, nachgewiesen werden (Kang *et al.* 2019). Dieses breite Spektrum an Krankheiten, die unter anderem durch zu hohe IL-6 Spiegel bedingt sind, zeigt die Relevanz dieses Zytokins bei der Steuerung unzähliger Prozesse innerhalb des Organismus. Dieses Wissen über die exakte Wirkung von IL-6 hat man sich zunutze gemacht, um an Stellen fehlgeleiteter Prozesse therapeutisch einzugreifen. Im Folgenden werden einige dieser Therapieoptionen genauer beleuchtet:

Einer der bekanntesten Hemmer von sowohl *classic-* als auch *trans-signaling* ist Tocilizumab. Dieser humanisierte monoklonale Antikörper, welcher sich gegen den IL-6R richtet, ist bereits für rheumatologische Erkrankungen wie der Rheumatoiden Arthritis, *Castleman's disease*, der Riesenzellerarteriitis und der systemischen juvenilen idiopathischen Arthritis zugelassen (Garbers *et al.* 2011, Kang *et al.* 2019). Allerdings zieht solch eine globale Blockade von IL-6 auch Nachteile mit sich, die es abzuwägen gilt. Zu dem Nebenwirkungsprofil von Tocilizumab gehören zum einen erhöhte Cholesterin- und Triglyceridspiegel, eine mögliche Gewichtszunahme (Febbraio *et al.* 2010, Rose-John *et al.* 2018) sowie eine erhöhte Wahrscheinlichkeit schwerwiegender Infektionen (Calabrese *et al.* 2014, Selmi *et al.* 2015) und Darmperforationen (Gout *et al.* 2011).

Ein weiteres therapeutisches Target stellt das sgp130Fc dar, welches ausschließlich *trans-signaling* blockiert (Jostock *et al.* 2001, Kang *et al.* 2019, Reeh *et al.* 2019). Dieses hat im Gegensatz zu Tocilizumab den potentiellen Vorteil, nicht die protektiven Funktionen des *classic-signaling* zu blockieren und dementsprechend auch ein geringeres Nebenwirkungsprofil aufweisen zu können (Scheller *et al.* 2014). Doch nicht überall im Körper kann sgp130Fc seine Wirkung entfalten. Dies liegt laut Garbers *et al.* daran, dass im Kolon beispielsweise hauptsächlich *trans-signaling*, in Leber und Lunge hingegen eher *classic-signaling* stattfindet. So kann sgp130Fc im Kolon die IL-6 induzierte STAT3 Phosphorylierung inhibieren, in Lunge und Leber allerdings nicht (Garbers *et al.* 2011). Gegenstand der Forschung ist es herauszufinden, bei welchen der zahlreichen durch *trans-signaling* ausgelösten Krankheiten es tatsächlich einen therapeutischen Nutzen gibt. Aktuell zeigen Phase II-Studien, dass sgp130Fc vielversprechende Ergebnisse bei der Behandlung von zum Beispiel Chronisch Entzündlichen Darmerkrankungen liefern (Schreiber *et al.* 2021).

Des Weiteren gibt es noch eine ganze Reihe anderer Methoden, therapeutisch in den IL-6 Stoffwechsel einzugreifen. Im Rahmen der Krebsforschung beispielsweise hat sich der *nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells* (NF- $\kappa$ B) als

entscheidende Zielstruktur für therapeutische *Targets* herausgestellt. IL-6, welches nämlich von NF- $\kappa$ B aktivierten intestinalen Myeloidzellen produziert wird, stimuliert die Proliferation von prämaligen intestinalen epithelialen Zellen während der Frühphase colitisassoziierter Karzinome. Die Blockade von NF- $\kappa$ B verhindert demnach diese Entartung durch Zytokine wie IL-6 während Entzündungsphasen und minimiert somit das Risiko der Entstehung eines Karzinoms (Grivennikov *et al.* 2009).

Weitere Angriffspunkte therapeutischer Mittel sind beispielsweise negative Regulatoren von STAT, wie Phosphatasen und *Supressors of cytokine signaling* (SOCS) (Levy *et al.* 2002), oder pharmakologische JAK Inhibitoren, wie Baricitinib oder Tofacitinib (Reeh *et al.* 2019).

## 1.5 Zielsetzung dieser Arbeit

Eine bisher noch nicht beantwortete Frage innerhalb der Forschung rund um IL-6 stellt die Balance zwischen *classic-* und *trans-signaling* dar (Rabe *et al.* 2008).

Anzunehmen ist, dass IL-6 *classic-signaling* unter physiologischen Bedingungen bevorzugt ablaufen könnte. Grundlage dafür ist zum einen, dass IL-6 den IL-6R mit einer rund 100-fach schwächeren Affinität bindet, als wenn gp130 diesen Komplex aus IL-6 und dem IL-6R stabilisiert (Boulanger *et al.* 2003, Scheller *et al.* 2014). Durch die räumliche Nähe des IL-6R zu dem membrangebundenen gp130 im Vergleich zu dem sIL-6R kommt man zu der Annahme, dass es eher zu einer Komplexbildung der membrangebundenen Formen des IL-6R und gp130 mit IL-6 kommt. Zum anderen konnte festgestellt werden, dass unter physiologischen Bedingungen wider Erwarten nur ein sehr kleiner Teil des IL-6 im Komplex mit dem sIL-6R vorliegt. Bei Konzentrationen von 10 ng/ml IL-6 und 50 ng/ml sIL-6R, welche physiologischen Bedingungen nahe kommen, ist gerademal 1% IL-6 im Komplex mit dem sIL-6R gebunden (Baran *et al.* 2018).

Um diese Hypothese zu überprüfen, wurde in dieser Arbeit anhand von Zellkulturmodellen untersucht, ob und in welchem Ausmaß diese beiden Prozesse in Ko-Kulturen von Zellen, die entsprechend responsiv für *classic-* oder *trans-signaling* sind, ablaufen können. Zu diesem Zweck wird angestrebt, ein neues durchflusszytometrie- und fluoreszenzmikroskopiebasiertes Assaysystem zu etablieren, welches die Analyse einzelner Zellpopulationen in Ko-Kultur erlaubt. Ziel ist es, genaue Konzentrationsbereiche auszumachen, in denen beide Signalarten koexistieren oder sich gegenseitig dominieren.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Antibiotika

Ampicillin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe f.c. 100 mg/ml
Hygromycin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe f.c. 1 mg/ml
Kanamycin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe f.c. 50 mg/ml
Penicillin/Streptomycin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe f.c. 100 mg/ml
Puromycin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe f.c. 1,5 mg/ml

#### 2.1.2 Antikörper

Die in dieser Arbeit verwendeten Antikörper sind in Tabelle 2.1 und Tabelle 2.2 aufgelistet.

**Tabelle 2.1 Primäre Antikörper**

<b>Antikörper</b>	<b>Hersteller</b>
$\alpha$ -humaner IL-6R (4-11)	Monoklonaler Antikörper aus der Maus, Bindung an ein Epitop der Domäne 1 des hIL-6R (Stocklösung 1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ). Verwendete Verdünnung 1:100 für Analyse des Rezeptorexpressionslevels mittels <i>Cell Sorter</i> und 1:500 für WesternBlot. Herstellung beschrieben in (Chalaris <i>et al.</i> 2007).
<i>Alexa-Fluor647 mouse anti-STAT3(pY705)</i>	Monoklonaler Antikörper aus der Maus, Verwendete Verdünnung 1:5 für die Analyse von STAT3 mittels Durchflusszytometrie. Hersteller: Fisher Scientific.

**Tabelle 2.2: Sekundäre Antikörper**

<b>Antikörper</b>	<b>Hersteller</b>
Anti-Fc	sek AK <i>anti-mouse</i> (FITC). Verwendete Verdünnung 1:100 für Analyse des Rezeptorexpressionslevels mittels <i>Cell Sorter</i> und 1:500 für Western Blot.
PE mouse anti-STAT3-AK	Monoklonaler Antikörper aus der Maus, Verwendete Verdünnung 1:5 für die Analyse von STAT3 mittels Durchflusszytometrie. Hersteller: Fisher Scientific.

### 2.1.3 Chemikalien

Die in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien sind in Tabelle 2.3 aufgelistet.

**Tabelle 2.3: Verwendete Chemikalien**

<b>Chemikalie</b>	<b>Hersteller</b>
Acrylamid-Mix 30%	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Agar	AppliChem GmbH, Darmstadt
Agarose	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf
Bromphenol-Blau	Sigma-Aldrich, Steinheim
Bovines Serum Albumin	Sigma-Aldrich, Steinheim
Complete Protease Inhibitor Cocktail	Roche Holding GmbH, Mannheim
Direkt PCR-Tail Lösung	Peqlab, Erlangen
DMEM	Life Technologies GmbH, Darmstadt
Essigsäure	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Ethanol	Merck KGaA, Darmstadt
Ethidiumbromid	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich, Steinheim
FBS	Invitrogen, Oregon, USA
Glukose	Merck KGaA, Darmstadt
Glycin	Merck KGaA, Darmstadt
HD Green	Intas Science Imaging Instruments, Göttingen

Isopropanol	AppliChem GmbH, Darmstadt
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Carl Roth GmbH, Darmstadt
LB-Medium	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Magermilchpulver	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Methanol	Merck KGaA, Darmstadt
Natriumchlorid	AppliChem GmbH, Darmstadt
Schwefelsäure	AppliChem GmbH, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Paraformaldehyd	Merck KGaA, Darmstadt
Penicillin/Streptomycin	GENAXXON Bioscience, Ulm
Polybren	Sigma-Aldrich, Steinheim
Protein A-Agarose Beads	Roche Holding GmbH, Mannheim
Surfactant P20	GE Healthcare, Freiburg
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Tris	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Triton X-100	Merck KGaA, Darmstadt
Trypan Blue Dye, 0,4%	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
TurboFect	Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA
Tween-20	Sigma-Aldrich, Steinheim

#### 2.1.4 Enzyme

Alle verwendeten Enzyme (Polymerasen, Restriktionsenzyme, Ligasen etc.) wurden von Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) hergestellt.

#### 2.1.5 Geräte

Die in dieser Arbeit verwendeten Geräte sind in Tabelle 2.4 aufgelistet.

**Tabelle 2.4: Verwendete Geräte**

Gerät	Hersteller
Biacore X100 Plus	GE Healthcare, Freiburg
BD FACS Canto II	Becton Dickson GmbH, Heidelberg

Binder CO2-Inkubator 150 (E2)- Brutschrank	Binder GmbH, Tuttlingen
Gelelektrophoresekammer	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Heizbad Julabo sw21	Julabo GmbH, Seelbach
Heizblock: Stuart Block Heater	Bibby Scientific, Staffordshire, England
Heracell VIOS 250i CO2 Inkubator	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Heraeus Function Line T6 Trockenschrank	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
INTAS ChemoCam Imager	INTAS Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen
INTAS iX Imager	INTAS Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen
Kühlschrank	Liebherr GmbH, Rostock
Mini-PROTEAN Tetra System	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Neubauer Zählkammer	LO-Laboroptik, Lancing, England
NanoDrop ND-2000	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Olympus BX61 Mikroskope	Olympus Corporation, Tokio, Japan
Peqstar 2x Twin Block Thermal Cycler	PEQLAB Ltd, Crableck Lane, UK
pH-Meter	WTW, Weilheim
Pipetus®-Akku	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Pipetten	Eppendorf GmbH, Hamburg
Pumpe für die Sterilbank	HLC BioTech, Göttingen
Roller: Stuart roller mixer SRT 9D	Bibby Scientific, Staffordshire, England
Schüttler CH-4103	INFORS AG, Bottmingen
Spannungsquelle Western Blot: Hercules, Power Pac 300	BioRad Laboratories GmbH, Hercules, USA
Scanlaf Mars Safety Class 2	Weiss Labortechnik GmbH, Heroldsberg
Tecan Infinite M200 PRO reader	Tecan GmbH, Maennedorf, Schweiz
TC10 Automated Cell Counter	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Trans-Blot Turbo System	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Thermoblock	Eppendorf GmbH, Hamburg
UV-Tisch	Bio-Budget Technologies GmbH, Krefeld
Vortexer	IKA Labortechnik GmbH, Staufen
Waage Precisa 100M-300C	Hartenstein GmbH, Würzburg

Centrifuge 5417R  
Laborfuge 400R

Eppendorf AG, Hamburg  
Heraeus GmbH, Hanau

### 2.1.6 Größenmarker

Für die Größenbestimmung von Proteinen wurde der PageRuler Prestained Protein *Ladder* (10-180 kDa) und für die Größenbestimmung von DNA wurde der GeneRuler Express DNA *Ladder* (100-5000 bp) und der GeneRuler 1 kb DNA *Ladder* (250-10.000 bp) von Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) verwendet.

### 2.1.7 Kits

Die in dieser Arbeit verwendeten Kits sind in Tabelle 2.5 aufgelistet.

**Tabelle 2.5: Verwendete Kits**

<b>Funktion</b>	<b>Hersteller</b>
Detektion von Chemilumineszenz	Immobilion Western Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore Corporation, Billerica, MA, USA)
DNA-Extraktion aus Agarosegelen, Reinigung von PCR-Produkten, Entfernung von Enzymen aus Reaktionsansätzen	NucleoSpin Extract II (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren)
Midi-Präparation von Plasmid DNA	NucleoBond Xtra Midi (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren)
Zellviabilitätsassay	CellTiter-Blue Cell Viability Assay, Promega GmbH, Mannheim

### 2.1.8 Kulturmedien

#### **Medien zur Kultivierung von *E.coli*:**

Lysogeny-Broth-(LB)-Medium:

10 g NaCl

10 g Pepton

5 g Hefeextrakt

Ad 1000 ml dH<sub>2</sub>O

Zur Selektion von Ampicillin resistenten *E.coli*-Zellen wurde den Medien 100 µg/ml Ampicillin nach dem Autoklavieren zugesetzt. Die Zusammensetzung der Medien wurde (Bertani 1951) entnommen.

### Medien zur Kultivierung in der Zellkultur:

DMEM (-/-) → Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM) High Glucose (4,5 g/l), with stable Glutamine (als klares und rotgefärbtes Medium)

DMEM (+/+) → Dulbecco's modified Eagle's Medium (DMEM) High Glucose (4,5 g/l), with stable Glutamine, versetzt mit 10% fötales Kälberserum (FCS) und 1% Penicillin/Streptomycin

Das verwendete DMEM Medium und FCS stammen von Life Technologies, Darmstadt. Trypsin/EDTA und Penicillin/Streptomycin wurden von Genaxxon Bioscience GmbH, Ulm bezogen.

### 2.1.9 Oligonukleotide

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von Eurofins MWG Operon GmbH, Ebersberg bezogen und sind in Tabelle 2.6 aufgelistet.

**Tabelle 2.6: Verwendete Oligonukleotide**

Primer	Sequenz (5'→3')
IL-6-GFP_fw_mut	TGGACGAGCTGTACAAGAATTCGGCCAAACTTGAAAATCTG TATTTTCAG
IL-6-GFP_rv_mut	CTGAAAATACAGATTTTCAAGTTTGGCCGAATTCTTGTACAG CTCGTCCA
miRFP_age1_fw	GTTTAAACACCGGTGGTGGCCGGCCACGCCAGCG
miRFP_Not1_rev	GTTTAAACTTATGCGGCCGCTG
Not1-TEV-Not1_fw	GGCCGCACGTGAAAATCTGTATTTTCAGTCAGC
Not1-TEV-Not1_rv	GGCCGCTGACTGAAAATACAGATTTTCACGTGC
pcDNA 3.1_fw	AAATTAATACGACTCACTATAGG
pcDNA 3.1_rv	AGGCACAGTCGAGGCTG
pMOWs_fw (DF85)	AGCCCTTTGTACACCCTAAGC
pMOWs_rv	AGCAATAGCATGATACAAAGG
STAT3Rep_fw (371)	TATCGATCAC GAGACTAGCC

STAT3Rep_fw (452)	TGCCCTGCAGGGTTCC
STAT3Rep_rv	CTAGAGTCGCGGCCGCTTTA
TEV-Fc_fw	GCGGCCGCAGAGTTCAG
TEV-Fc_rv	GCGGCCGCTCACTTGCCAGGAGACAGAGAC
T7	TAATACGACTCACTATAGGG

### 2.1.10 Plasmide

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Plasmide sind in Tabelle 2.7 aufgelistet.

**Tabelle 2.7: Verwendete Plasmide**

Name	Beschreibung	Referenz
pcDNA3.1(+)	Expressionsvektor für transiente und stabile Proteinexpression in Säugerkellen	Diese Arbeitsgruppe
pMOWS-(puro)-GFP	Expressionsplasmid für retrovirale Transduktion von Säugerkellen. Enthält Resistenzgene für die Selektion mittels Ampicillin und Puromycin	Diese Arbeitsgruppe
pMOWS-(hygro)-GFP	Expressionsplasmid für retrovirale Transduktion von Säugerkellen. Enthält Resistenzgene für die Selektion mittels Ampicillin und Hygromycin	Diese Arbeitsgruppe

### 2.1.11 Programme und Internetseiten

Für diese Arbeit wurden folgende Programme und Internetseiten verwendet:

ChemoStar Professional (INTAS, Göttingen)

EndNote X9 (Thomas Reuter, Carlsbad, CA, USA)

FlowJo v10 Software (BD Biosciences, Franklin Lakes, USA)

Microsoft Excel (Redmond, Washington, USA)

Microsoft Powerpoint (Redmond, Washington, USA)

pDRAW32 DNA Analysis Software

Pubmed.com

### 2.1.12 Puffer und Lösungen

In dieser Arbeit wurden folgende Puffer und Lösungen verwendet:

Blocking Puffer, Milch (Western Blot)	5% Milchpulver in TBS-T
Blocking Puffer, BSA (Western Blot)	5% BSA in TBS-T
DNA-Probenpuffer 6x für Agarosegele	30% (m/V) Glycerol in TAE-Puffer 50 mM EDTA 0,25% Organge-G
FACS-Puffer	0,5% BSA in TBS-T / 0,5% 7AAD in PBS
Lämmli-Puffer 5x	10% (m/V) SDS
HBS-P <sup>+</sup> Puffer	10 mM HEPES (pH 7,4) 150 mM NaCl 0,05% (V/V) <i>surfactant</i> P20
Mild Lysis Puffer	150 mM NaCl 2 mM EDTA 50 mM Tris-HCl (pH 7,4) 1% (m/V) Triton X-100 1% (m/V) NP-40 1 mM Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> 1 mM NaF 1 Tablette Complete Protease Inhibitor Cocktail
Paraformaldehyd (PFA)	1% (m/V) Paraformaldehyd in PBS
Phosphate Buffered Saline (PBS)	1,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 2,7 mM KCl

	8,1 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 137 mM NaCl (pH 7,4)
Phospho-STAT3 Lysis Puffer	50 mM Tris-HCl 150 mM NaCl 2 mM EDTA 1 mM Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> 1% (V/V) NP-40 1% Triton X-100
PBS-T	0,05% (V/V) Tween-20 in PBS
Sammelgelpuffer	0,5 M Tris-HCl (pH 6,8) 0,4% (m/V) SDS
SDS-Laufpuffer (SDS-PAGE)	25 mM Tris-HCl (pH 8,3) 192 mM Glycin 0,1 % (m/V) SDS
S1-Puffer (DNA Mini-Präparation)	50 mM Glukose 25 mM Tris-HCl (pH 8,0) 100 mM EDTA (pH 8,0) 100 mM RNase (Gelagert bei 4°C)
S2-Puffer (DNA Mini-Präparation)	200 mM NaOH 1% (m/V) SDS
S3-Puffer (DNA Mini-Präparation)	60 ml 5 M Kaliumacetat 11,5 ml 99,9%ige Essigsäure 28,5 ml H <sub>2</sub> O (Gelagert bei 4°C)
TAE-Puffer	40 mM Tris-HCl (pH 8,0) 10 mM EDTA

	0,2 M Essigsäure ad 1000 ml H <sub>2</sub> O
Transferpuffer	250 mM Tris-HCl (pH 8,0) 192 mM Glycerin 0,01% (m/V) SDS 20% Methanol
Trenngelpuffer	1,5 M Tris-HCl (pH 8,0) 0,4% SDS
Tris Buffered Saline (TBS)	10 mM Tris-HCl (pH 8,0) 150 mM NaCl
TBS-T	0,05% (V/V) Tween-20 in PBS

### 2.1.13 Rekombinante Proteine

Die in dieser Arbeit verwendeten rekombinanten Proteine sind in Tabelle 2.8 aufgelistet.

**Tabelle 2.8: Verwendete rekombinante Proteine**

<b>Proteine</b>	<b>Herkunft</b>
IL-6	Diese Arbeitsgruppe
IL-6-GFP	Diese Arbeit
sIL-6R	Conaris Research Institute AG, Kiel
Hyper-IL-6	Diese Arbeitsgruppe
Sgp130Fc	Diese Arbeitsgruppe
GFP	Diese Arbeitsgruppe
miRFP670	Biocat (Heidelberg)

### 2.1.14 Verbrauchsmaterial

Die in dieser Arbeit verwendeten Verbrauchsmaterialien sind in Tabelle 2.9 aufgelistet.

**Tabelle 2.9: Verwendete Verbrauchsmaterialien**

<b>Verbrauchsmaterial</b>	<b>Hersteller</b>
Aldehyde/Sulfate Latex-Beads 20 nm, 100 nm und 4 µm Durchmesser (4% w/v)	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
BD Falcon 5ml Polystyrene Round-Bottom Tube	BD Bioscience Discovery Labware, Bedford, MA, USA
BD-Falcon Cell Strainer (Nylonsieb mit 40 µm Siebdurchmesser)	BD Biosciences, Franklin Lakes, USA
BD Vacutainer 6 ml Serum/CAT Blood Collection Tubes (13 x 100 mm)	BD Bioscience Discovery Labware, Bedford, MA, USA
Biacore Sensor Chip CM5	GE Healthcare, Freiburg
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
Kryoröhrchen	VWR, Randor, USA
Mikrotiterplatte ELISA (96-Well)	Nunc A/S, Roskilde, Dänemark
PCR-Reaktionsgefäße	Eppendorf AG, Hamburg
PVDF-Membran (Porengröße 0,45 µm)	Carl Roth GmbH + Co, KG, Karlsruhe
Safety-Multifly-Kanüle (0,8 x 19 mm)	Sarstedt AG & Co, KG, Nümbrecht
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

### 2.1.15 Zelllinien

Der in dieser Arbeit verwendete *E.coli*-Stamm ist in Tabelle 2.10 aufgelistet.

**Tabelle 2.10: Verwendeter *E.coli*-Stamm**

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

Die in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien sind in Tabelle 2.11 aufgelistet.

**Tabelle 2.11: Verwendete Zelllinien**

<b>Zelllinie</b>	<b>Ursprung</b>
Ba/F3-gp130	Diese Arbeitsgruppe
Ba/F3-gp130-GFP	Diese Arbeit
Ba/F3-gp130-miRFP670	Diese Arbeit
Ba/F3-gp130-IL-6R	Diese Arbeitsgruppe
CHO-K1	Diese Arbeitsgruppe
CHO-K1-H-IL-6	Diese Arbeit
CHO-K1-IL-6-GFP	Diese Arbeit
CHO-K1-sIL-6R-miRFP670	Diese Arbeit
HEK293T	Diese Arbeitsgruppe
Phönix-Eco (Verpackungszelllinie HEK293T)	Diese Arbeitsgruppe

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Molekularbiologische Methoden

#### 2.2.1.1 Bakterienkultivierung

Die Kultivierung der Bakterien erfolgte bei 37°C auf LB-Agar oder in LB-Medium. 100 µg/ml Ampicillin bzw. Kanamycin wurde dem LB-Medium bzw. dem LB-Agar zur Selektion zugesetzt. Die Kultivierung der Bakterien erfolgte im Falle der LB-Agarplatten über Nacht im Inkubator, das flüssige LB-Medium hingegen wurde auf einem Schüttler über Nacht kultiviert, um die nötige Sauerstoffversorgung zu gewährleisten.

#### 2.2.1.2 Bestimmung von DNA-Konzentrationen

DNA-Konzentrationen wurden mittels eines NanoDrop ND-2000 gemessen. Zur Überprüfung der Reinheit wurden zusätzlich die Absorptionsverhältnisse A260/280 und A260/230 bestimmt. Dabei galten Werte zwischen 1,8 und 2,0 als ausreichend sauber.

#### 2.2.1.3 DNA-Gelelektrophorese

Für den Nachweis von DNA-Fragmenten wurden die Proben in 1%ige Agarosegele in horizontalen Elektrophoresekammern geladen und nach Anlegen einer Stromspannung der Länge nach voneinander getrennt. Zuvor wurden 4 g Agarose in 400 ml TAE-Puffer

gelöst und in der Mikrowelle aufgeköcht. Der Größe des Schlittens angepasst, wurde zwischen 1 und 10 µl HD Green auf den Schlitten aufgetragen. Darauf gegossen wurde die dem Schlitten angepasste flüssige 1%ige Agaroselösung. Während des Erkaltens wurden die DNA-Proben mit dem 6x Ladepuffer Orange G versetzt und anschließend in die Geltaschen gegeben. Anschließend wurde eine Spannung von 120 V angelegt. Die Auswertung erfolgte unter Verwendung des INTAS iX Imager.

#### **2.2.1.4 DNA-Extraktion aus Agarosegelen**

Nach der Größentrennung der durch die Restriktionsenzyme geschnittenen DNA-Fragmente mittels obig beschriebener DNA-Gelelektrophorese fand die Analyse auf einem UV-Tisch bei einer Wellenlänge von 365 nm statt. Die identifizierten Fragmente wurden mit einem Skalpell aus dem Gel herausgeschnitten und in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Anschließend erfolgte die Reinigung mit dem NucleoSpin Extract II.

#### **2.2.1.5 Dephosphorylierung von Plasmid-DNA**

Der linearisierten Plasmid-DNA wurde 1 µl Fast-AP im entsprechenden Puffer zugegeben, damit eine Ligation der 5'- und 3'-Enden vermieden wurde. Die Dephosphorylierung der Plasmid-DNA erfolgte bei 37°C für 1 h. Die Reaktion wurde durch Zugabe des 6-fach DNA-Probenpuffer gestoppt.

#### **2.2.1.6 Enzymatische Spaltung von DNA**

Für die enzymatische Spaltung von DNA wurden Restriktionsenzyme benutzt. Für die Klonierung wurden 10 µg Plasmid-DNA mit 10 U des entsprechenden Restriktionsenzym im vorgegebenen Restriktionspuffer versetzt und auf ein Gesamtvolumen von 20 µl mit dH<sub>2</sub>O aufgefüllt. Die Spaltung erfolgte nach adäquater Durchmischung der Komponenten über Nacht bei 37°C. Am Folgetag wurden die Restriktionsenzyme durch Erhitzen bis zu einer dem Restriktionsenzym spezifischen Denaturierungstemperatur, die für 20 Minuten aufrechterhalten wurde, inaktiviert. Die Größentrennung der Fragmente erfolgte wie oben beschrieben mittels der DNA-Gelelektrophorese.

#### **2.2.1.7 Herstellung eines pMOWs-Vektors für retrovirale Transduktion**

Für alle retroviralen Transduktionen von Ba/F3-gp130-Zellen mussten die entsprechenden cDNAs in pMOWs-Vektoren subkloniert werden. Hierzu wurden 10 µg Plasmid-DNA pMOWs- (Puromycin)-GFP oder pMOWs-(Hygromycin)-GFP (Ketteler et

al. 2002) verwendet und mit 5 U BamHI und 5 U EcoNI sowie mit der entsprechenden Menge BamHI-Puffer versetzt und über Nacht bei 37°C inkubiert. Dieser Schritt war notwendig, um die in den Plasmiden enthaltene cDNA für GFP herauszuschneiden. Die Restriktionsenzyme wurden im Anschluss für 20 min bei 95°C hitzeinaktiviert. Die Spaltprodukte wurden mittels Gelelektrophorese (s. Abschnitt 2.2.1.3) auf einem 1%igen Agarosegel der Größe nach voneinander getrennt und von den beiden visualisierten Fragmenten wurde das mit der Größe von 6088 bp isoliert und gereinigt. Darauffolgend wurde vom isolierten Fragment 25 µl mit 3 µl 10x Klenow-Puffer, 0,5 µl 2 mM dNTP-Mix und 5 U Klenow-Fragment versetzt und auf ein Gesamtvolumen von 30 µl mit dH<sub>2</sub>O aufgefüllt. Die Reaktion mit dem Klenow-Fragment erfolgte für 10 min bei 37°C und anschließend erfolgte eine Hitzeinaktivierung für 10 min bei 95°C. Um eine Religation des Fragmentes zu verhindern, wurde eine Dephosphorylierung der 5'- und 3'-DNA-Enden durchgeführt (s. Abschnitt 2.2.1.5). Die für die Subklonierung entsprechenden Inserts wurden mittels PmeI (MssI) Behandlung enzymatisch gespalten. Dieser Vorgang sowie die Verwendung des Klenow-Fragmentes für die linearisierten pMOWs-Vektoren führt zu glatten Enden der DNA, sogenannte *blunt ends*, wodurch eine Ligation des Inserts in die pMOWs Vektoren ermöglicht wird (s. Abschnitt 2.2.1.8). Im Anschluss wurde eine Testspaltung mit einem Restriktionsenzym durchgeführt, damit die richtige Orientierung des Inserts überprüft werden konnte. Um abschließende Sicherheit einer erfolgreichen Ligation zu gewährleisten, erfolgte die Sequenzierung der Plasmide bei SeqLab-Sequence Laboratories Göttingen GmbH. Hierzu wurden die Primer pMOWS fwd/rev verwendet (s. Abschnitt 2.1.9, Tabelle 2.6). Abschließend erfolgte die Midi-Präparation der neu gewonnenen Plasmid-DNA (s. Abschnitt 2.2.1.8).

### **2.2.1.8 Ligation von DNA-Fragmenten**

Um eine Ligation von *blunt-end*-Klonierungen durchzuführen, wurde das enzymatisch gespaltene Insert in einem 3:1 und einem 5:1 Verhältnis zum linearisierten und dephosphorylierten Zielvektor eingesetzt, zusammen mit 2 U T4 Ligase im entsprechenden Reaktionspuffer, 2 µl einer 50%igen (m/v) PEG4000-Lösung und mit dH<sub>2</sub>O auf 20 µl aufgefüllt. Als Negativkontrolle wurde ein Gemisch ohne das Insert erstellt. Die Inkubation der Ligation erfolgte über Nacht bei Raumtemperatur.

### **2.2.1.9 Midi-Präparation von Plasmid-DNA**

Für die Isolierung von größeren Mengen an Plasmid-DNA wurden 100 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzt und mit einer Einzelkolonie von einer LB-Agarplatte angeimpft. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37°C bei 120 rpm in einem Schüttler. Am darauffolgenden Tag wurde die Bakterienkultur bei 4000 rpm, 4°C für 15 min pelletiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen und es erfolgte die Isolation der Plasmid-DNA unter Verwendung des Kits NucleoBond Xtra Midi nach Herstellerangaben. Abschließend wurde die Plasmid-DNA in 100 µl dH<sub>2</sub>O gelöst (für 15 min bei 37°C auf einem Schüttler) und die DNA-Konzentration wurde, wie in Abschnitt 2.2.1.2 beschrieben, bestimmt.

### **2.2.1.10 Mini-Präparation von Plasmid-DNA**

Für die Isolierung von kleineren Mengen von Plasmid-DNA wurden 2 ml LB-Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum versetzt und mit einer Einzelkolonie von einer LB-Agar-Platte angeimpft. Die Inkubation erfolgte bei 900-1000 rpm über Nacht bei 37°C in einem Schüttler. Am darauffolgenden Tag wurde die Bakterienkultur bei 13000 rpm und Raumtemperatur für 5 min zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Das Bakterienpellet wurde im Anschluss in 100 µl S1-Puffer resuspendiert und im Anschluss wurden 200 µl S2 Puffer zugegeben. Nach fünfmaligem Invertieren des Reaktionsgefäßes erfolgte die Zugabe nach maximal 5 min Wartezeit von 150 µl eiskaltem S3-Puffer. Darauf folgte ein erneutes fünfmaliges Invertieren und eine Inkubation der Suspension für 10 min auf Eis. Die Suspension wurde im Anschluss bei 13000 rpm für 10 min und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues 2 ml Reaktionsgefäß überführt, mit 900 µl eiskaltem 100%igen Ethanol versetzt, gevortext und anschließend erneut für 5 min auf Eis gesetzt. Nach anschließender Zentrifugation (13000 rpm, 15 min, 4°C) wurde der Überstand dekantiert, die pelletierte DNA mit 500 µl 70%igen Ethanol gewaschen (13000 rpm, 5 min, 4°C) und der Überstand im Anschluss vollständig abgesaugt. Das DNA-Pellet wurde bei 37°C für 10 min getrocknet und zum Abschluss in 30 µl dH<sub>2</sub>O für 15 min auf einem Schüttler gelöst. Die DNA-Konzentration wurde, wie in Abschnitt 2.2.1.2 beschrieben, bestimmt.

### **2.2.1.11 Polymerase-Kettenreaktion (PCR, polymerase chain reaction)**

Um DNA-Sequenzen spezifisch zu amplifizieren, wurde die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) verwendet. Dies wurde unter Verwendung eines PCR-Thermal Cyclers durchgeführt. Im Folgenden wird zunächst der Ablauf einer Colony-PCR auf XL-1blue

Klone skizziert: Die ausgewählten Bakterienkolonien, die Tags zuvor auf einem Festmedium kultiviert worden waren (s. Abschnitt 2.2.1.1), wurden markiert, dann mit einer Pipettenspitze angepickt und in ein PCR-Tube mit 20 µl H<sub>2</sub>O überführt. Die PCR-Tubes wurden dann für 5 min bei 95°C inkubiert. (Die Pipettenspitze wurde in ein mit 1,7 ml LB-Medium mit Ampicillin gefülltes 2 ml-Eppi für eine Übernachtskultur abgeworfen.) Anschließend wurde ein 50 µl PCR-Ansatz hergestellt bestehend aus 2,5 µl forward Primer, 2,5 µl reverse Primer, 4 µl MgCl<sub>2</sub>, 1 µl sNTPs (10 mM) und 1 µl Dream Taq Polymerase (1U/ µl) in entsprechend 5 µl Dream Taq Puffer. Mit 14 µl H<sub>2</sub>O wurde auf 50 µl Gesamtmenge aufgefüllt. Für die PCR wurde das folgende Programm verwendet:

Initiale Denaturierung (10 min, 95°C)  
    Denaturierung (30 sek, 95°C)  
    Annealing (30 sek, 50°C)  
    Elongation (2,5 min, 72°C) } 30 Zyklen  
Finale Elongation (10 min, 72°C)

Die Annealing-Temperatur sowie die Elongationszeit wurde entsprechend des GC-Gehaltes der Primer und nach Länge des Fragmentes angepasst.

Für die Mutagenese PCR wurden für jede Probe zwei 50 µl Ansätze erstellt mit 10 ng der Midi-Probe (s. Abschnitt 2.2.1.9), 1 µl Phusion Polymerase in entsprechend 10 µl HF-Puffer und 1 µl dNTPs (10 mM). In den einen Ansatz wurde zusätzlich 0,4 µl sense-Primer (100 pmol) pipettiert und mit H<sub>2</sub>O auf 50 µl aufgefüllt. Dem anderen Ansatz wurde 0,4 µl antisense-Primer (100 pmol) zugesetzt und ebenfalls bis 50 µl mit H<sub>2</sub>O aufgefüllt. Für die PCR wurde anschließend folgendes Programm verwendet:

Initiale Denaturierung (4 min, 98°C)  
    Denaturierung (1 min, 98°C)  
    Annealing (1 min, 55°C)  
    Elongation (15-30 sek/kb, 72°C) } 15 Zyklen  
Finale Elongation (12 min, 72°C)

Im Anschluss wurden diese beiden Reagenzien vermischt, erneut auf zwei PCR-Tubes verteilt und pro Ansatz 1 µl Phusion Polymerase hinzugegeben. Das oben beschriebene PCR-Programm wurde daraufhin erneut gestartet. Zum Schluss erfolgte noch die Überprüfung des Produktes mittels Gelelektrophorese (s. Abschnitt 2.2.1.3).

### **2.2.1.12 Sequenzierung von Plasmid-DNA**

Um zu gewährleisten, dass die DNA-Sequenz von selbst klonierten und amplifizierten Plasmiden vollständig mit der geplanten Sequenz übereinstimmt, wurde eine Sequenzierung bei der Firma SeqLab-Sequence Laboratories Göttingen GmbH durchgeführt. Hierzu wurde für pcDNA3.1-Plasmide die Primer „pcDNA3.1 fwd/rev“ und für pMOWs-Plasmide die Primer „pMOWs fwd/rev“ verwendet (s. Abschnitt 2.1.9, Tabelle 2.6).

### **2.2.1.13 Transformation von E.coli-Zellen mit Plasmid-DNA**

Für die Transformation von Plasmid-DNA wurden 30 µl chemisch kompetente XL-1 Blue *E.coli* Zellen verwendet. Das Auftauen der Zellen erfolgte für 15 min auf Eis, mit anschließender Zugabe von 1 µl Plasmid-DNA bei Retransformationen oder mit 1-5 µl bei Ligationsansätzen und 5 min Inkubation auf Eis. Darauf erfolgte ein Hitzeschock für 45 sek bei 42°C und erneuter Inkubation auf Eis für 5 min. Daraufhin wurden 500 µl LB-Medium (ohne Antibiotikum) hinzugegeben. Es folgte eine Inkubation von 1 h bei 37°C im Schüttler bei 900 rpm. Zuletzt wurden im Falle eines Ligationsansatzes 500 µl Bakteriensuspension und im Falle einer Retransformation 15 µl Bakteriensuspension auf eine LB-Agarplatte (mit entsprechendem Antibiotikum) ausplattiert und bei 37°C über Nacht inkubiert.

## **2.2.2 Proteinbiochemische Methoden**

### **2.2.2.1 Bestimmung des Gesamtproteingehalts mittels BCA**

Ein BCA Protein Assay Kit von Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) wurde laut Herstellerangaben für die Bestimmung des Gesamtproteingehalts von Zelllysaten oder Zellkulturüberständen verwendet. Dies erfolgte durch eine Doppelbestimmung von Proben, die in einem 1:10 oder 1:20 Verhältnis mit Wasser verdünnt wurden. Jeweils 25 µl/Well Probe wurde auf eine 96-Well-Mikrotiterplatte aufgetragen. Verschiedene BSA-Konzentrationen wurden laut Herstellerangaben als Eichgerade verwendet. Nach Zugabe von Reagenz A und B, gemischt in einem 50:1 Verhältnis, erfolgte eine Inkubation für 30 min bei 37°C. Abschließend wurde die Absorption bei 562 nm mittels Infinite M200 PRO Reader bestimmt. Anhand der BSA Eichgerade wurde die Proteinkonzentration bestimmt.

### 2.2.2.2 Detektionen von Proteinen im Coomassiegel

Um die Reinheit der Proteine nach ihrer Reinigung zu überprüfen wurden die Proben mit definierter Proteinmenge von mindestens 2 µg und 5 µg auf ein SDS-Gel geladen. Nachdem die Lauffront das Ende des Trenngels erreicht hatte, wurde das SDS-Gel entnommen und mit Coomassie Brilliantblau R350 *Staining* Lösung (15 min, konstantes Schwenken) inkubiert. Eine Entfärbung des SDS-Gels erfolgte durch Coomassie *Destaining* Lösung über Nacht. Zur Dokumentation wurde das Gel mittels HP Scanjet G4010 Scanner archiviert.

### 2.2.2.3 Durchflusszytometrie

Um die Expression von Zelloberflächenproteinen sowie die Bindung bzw. Internalisierung von GFP oder miRFP670 nachzuweisen, wurde die Durchflusszytometrie verwendet. Der Nachweis der Oberflächenproteinexpression von Proteinen und der Bindung bzw. Internalisierung von GFP bzw. miRFP670 wurde mit transduzierten Ba/F3-gp130 Zellen (s. Abschnitt 2.2.3.4) und transfektierten HEK293T Zellen (s. Abschnitt 2.2.3.3) durchgeführt.

Ba/F3-gp130 Zellen wurden zentrifugiert (1200 rpm, Raumtemperatur, 5 min), der Überstand abgesaugt und anschließend in 10 ml PBS resuspendiert. Dieser Waschvorgang wurde dreimal wiederholt. Daraufhin wurde die Zellzahl pro ml bestimmt (s. Abschnitt 2.2.3.6). Analog dazu mussten die adhärenen HEK293T Zellen zunächst von deren Untergrund durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren gelöst werden. Daraufhin wurde genauso wie mit den Ba/F3-gp130 Zellen verfahren.

Um die Bindung bzw. Internalisierung von GFP zu untersuchen, wurden  $1 \times 10^6$  Zellen mit 1 µg/ml GFP zwischen 5-180 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurden die Proben zentrifugiert (300 g, 5 min, 4°C) und dreimal mit eiskaltem FACS-Puffer gewaschen. Das Zellpellet wurde in 500 µl FACS Puffer aufgenommen und in FACS-Röhrchen überführt. Die Analyse der Zellen wurde mit einem BD FACS Canto II durchgeführt und die Auswertung der Daten erfolgte mit der FlowJo v10 software.

Für den Vergleich von *classic*- und *trans-signaling* wurde ebenfalls als eine der Messmethoden die Durchflusszytometrie verwendet. Dafür wurden 72 h zuvor auf einer 24-well-Platte  $1 \times 10^5$  Zellen der Ba/F3-gp130-hygroGFP Zelllinie und  $1 \times 10^5$  Zellen der Ba/F3-gp130-IL-6R Zelllinie ausgesät, sodass sich ein Ko-Kultur Ansatz in jedem Well von insgesamt  $2 \times 10^5$  Zellen in 500 µl Medium ergab. Anschließend wurde eine Stimulation mit IL-6 und sIL-6R in folgendem Pipettierschema angewandt:

**Tabelle 2.12: Pipettierschema des in Abschnitt 3.2 skizzierten Assaysystems**

	-	10 ng/ml	25 ng/ml	50 ng/ml	100 ng/ml	200 ng/ml
-						
1 ng/ml						
10 ng/ml						
100 ng/ml						

Nach 72 h Inkubationszeit wurden die Zellen für die FACS-Messung vorbereitet. Dafür wurde der Inhalt jedes Wells in ein eigenes Eppi überführt und bei 250 rcf für 5 min zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurde das Pellet in 100 µl PBS resuspendiert und anschließend in ein FACS Tube überführt. Die Analyse der Zellen wurde ebenfalls mit einem BD FACS Canto II durchgeführt und die Auswertung der Daten erfolgte mit der FlowJo v10 software.

#### **2.2.2.4 Einzelklonselektion von CHO-K1 Zellen**

Nach erfolgter Transfektion wurde dieses Verfahren angewandt, um die Klone zu selektieren, die am meisten EGFP bzw. IL-6-GFP-TEV-Fc bzw. sIL-6R-miRFP670-TEV-Fc produzieren. Zuerst wurden die transfektierten Zellen zweimal gesplittet und in Anwesenheit von 225 µl G418 auf einer 10 cm Petrieschale konfluent wachsen gelassen. Nach ausreichendem Wachstum wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und anschließend durch kurze Zugabe von 2 ml TIE vom Untergrund der Petrieschale abgelöst. Daraufhin wurden die Zellen zentrifugiert, gezählt und auf 5 Zellen/ml DMEM, welches mit 22,5 µl G418/1 ml Medium versetzt wurde, eingestellt. Je 200 µl dieser Zellsuspension wurde dann in jedes Well einer 96-Wellplatte pipettiert. Es wurde nun solange inkubiert, bis ein Einzelklonwachstum unter dem Mikroskop zu sehen war. Nach ausreichendem Wachstum wurden die selektierten Klone auf 6-Wellplatten überführt und per Western Blotting (s. Abschnitt 2.2.2.5) auf Proteinexpression getestet. Klone, die laut Western Blot Ergebnis das passende Protein exprimierten, wurden Kryokonserviert und auf eine 10 cm Petrischale überführt. Der am meisten produzierende Klon konnte dann wiederum für die Herstellung des gewünschten Proteins in größeren Mengen in *Rollerbottles* dienen.

#### **2.2.2.5 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)**

Eine diskontinuierliche SDS-PAGE wurde für die Trennung von Proteinen anhand ihres Molekulargewichtes verwendet. Hierzu wurden den 50 µl Proben 25 µl 5 x Lämmli

zugemischt. Bei 95°C für 10 min wurden die enthaltenen Proteine denaturiert. In dieser Arbeit wurden selbst gegossene Gele (Sammelgel, 10%iges Trenngel und am Grund ein 0,5%iger Agarosefuß) mit einer Dicke von 1,5 mm und 10 bzw. 15 Probenkammern verwendet. Über das Mini-PROTEAN Tetra System erfolgte die Größentrennung der Proteine bei einer Spannung zwischen 80-120 V und einem konstanten Amperewert, bis die Lauffront das untere Ende des Trenngels erreicht hat. Als Größenmarker wurden 2 µl des PageRuler Prestained Protein Ladder verwendet.

#### **2.2.2.6 Proteinreinigung von CHO-K1 Zellüberständen**

Für die Reinigung der in dieser Arbeit vorgestellten Proteine wurden jeweils 1,2 l Zellkulturüberstand aus einer *Rollerbottle* generiert. Um den aufgetauten Zellkulturüberstand von weiteren Zellresten zu befreien, wurde dieser mit einem Bottle top Filter Nalgene™ Rapid-Flow™ (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) mit einer Porengröße von 45 µm gefiltert. Im Anschluss wurde der gefilterte Zellkulturüberstand über eine ÄKTATM Start (GE-Lifesciences) auf eine Protein A HiTrap Säule 1 ml (GE-Lifesciences) geladen. Mit einer Säulenbindungskapazität von 20 mg IgG/ml kann die Protein A HiTrap Säule alle mit einem Fc-Tag versehenen Proteine binden. Nach Äquibrierung der Säule mit PBS (10 cv; 1ml/min) wurde der Zellkulturüberstand aufgeladen und die darin enthaltenen Proteine an die Säule gebunden. Anschließend wurde die Säule mit PBS (40 Säulenvolumen) gewaschen. Um das an der Protein A Säule gebundene Protein zu eluieren, wurde ein pH-Wechsel mit einem Citratpuffer A (50 mM, pH 5,5) sowie einem Citratpuffer B (50mM, pH 3,2) durchgeführt. In einem Verhältnis von 30:70 wurde das Protein von der Säule eluiert und in 15 ml Reaktionsgefäße mit 1 M Tris pH 11 neutralisiert. Im späteren Verlauf wurden durch erneuten Pufferwechsel mit Einsatz von Citratpuffer B (50 mM, pH 3,25) auch die restlichen Bestandteile eluiert und ebenfalls in 15 ml Reaktionsgefäße mit 1 M Tris pH 11 neutralisiert. Eine Konzentrierung des Proteins erfolgte über einen mit PBS äquilibrierten 20 ml 10 K Konzentratoren (Macrosep® Advance Centrifugal Filter, Pall Laboratory, USA). Ein Pufferwechsel von Tris auf PBS erfolgte durch eine NAP 25 Säule (GE Healthcare, München, Deutschland). Entsprechend Herstellerprotokoll wurde das Protein an die NAP 25 Säule gebunden, das im Eluat befindliche Tris entfernt und mit PBS von der Säule gewaschen. Im NanoDrop2000 (Peqlab Biotechnologie GmbH Erlangen) wurde die Extinktion des Proteins bestimmt, das Protein in 1,5 ml Reaktionsgefäße aliquotiert und bei -80 °C schockgefroren.

### **2.2.2.7 Western Blot**

Der Nachweis von Proteinen, die mittels SDS-Page voneinander getrennt wurden, erfolgte mittels Western Blot. Hierzu wurden die Proteine vom SDS-Gel auf eine PVDF-Membran, unter Verwendung des Trans-Blot Turbo semidry Transfer Systems, übertragen. Im Vorfeld wurde die PVDF-Membran für 3-5 min in Methanol inkubiert und in Transferpuffer gewaschen. Parallel wurden drei Lagen Whatman-Papier für mindestens 5 min in Transferpuffer äquilibriert und anschließend in die Kammer gelegt. Darauf wurde zeitgerecht die inkubierte PVDF-Membran gelegt und darüber das in der SDS-Page gelaufene SDS-Gel. Abschließend wurden drei Lagen des Whatman-Papiers auf das SDS-Gel gelegt und Luftblasen ausgestrichen. Der elektrophoretische Transfer der Proteine erfolgte bei einer konstanten Spannung von 25 V, bei 1 A für 40 min. Nach dem Transfer wurde die PVDF-Membran zurechtgeschnitten und in ein 50 ml Falcon überführt, welches zuvor mit 5 ml Milch gefüllt wurde. Nach einer Stunde Inkubation auf einem Roller wurde die Milch abgeschüttet und die PVDF-Membran anschließend dreimal mit ca. 10 ml TBS-T für je 5 min gewaschen, um Rückstände des Transferpuffers zu entfernen. Die Inkubation des jeweiligen Primärantikörpers erfolgte bei 4°C über Nacht gelöst in 3 ml BSA. Um nicht gebundene Primärantikörper am folgenden Tag zu entfernen, wurde die Membran dreimal für je 5 min mit TBS-T gewaschen. Die Inkubation des jeweiligen Sekundärantikörpers erfolgte anschließend für 1 h bei Raumtemperatur. Daraufhin wurde die Membran zweimal für je 5 min mit TBS-T und einmal für 5 min mit TBS gewaschen. Die Detektion der Proteine erfolgte mit Hilfe des Immobilion Western Chemiluminescent HRP Substrats nach Herstellerangaben.

### **2.2.2.8 Intrazelluläre Durchflusszytometrie (STAT3)**

Dieses Verfahren wurde angewandt, um die Aktivierung intrazellulärer Transkriptionsfaktoren, wie STAT3, nachzuweisen. Zu Beginn wurden die Zellen für 2 h gestarvt: Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurde die Zellzahl auf  $1 \times 10^6$  Zellen/1 ml DMEM<sup>-/-</sup> eingestellt. Hierbei handelt es sich um reines DMEM ohne jegliche Zusätze. Es folgte eine Inkubation von 2 h bei 37°C. Anschließend wurde mit 10 ng/ml Hyper-IL6 als Positivkontrolle und verschiedenen Konzentrationen von IL-6 und sIL-6R, sowie keine Stimulation als Negativkontrolle stimuliert. Die Zellen wurden im Anschluss für 15 min bei 37°C inkubiert und danach bei 250 rcf und 4°C für 5 min zentrifugiert. Die darauffolgende Fixierung erfolgte durch 1 ml je Ansatz mit 2%igem PFA gelöst in PBS. Erneut wurde für 15 min bei 37°C inkubiert. Es folgten zwei Waschvorgänge mit PBS

und das abschließende Resuspendieren in 100 µl PBS je Probe. Anschließend wurden durch Zugabe von 900 µl Methanol je Probe und die sofortige Kühlung auf Eis für 30 min die Zellen permeabilisiert. Gewaschen wurden die Zellen danach zweimal mit PBS (0,5% BSA versetzt) und in 30 µl 0,5%iger BSA-PBS-Lösung aufgenommen. Abschließend wurden 10 µl je Antikörper (Alexa-Fluor647 mouse anti-STAT3 (pY705) und PE mouse anti-STAT3-AK) zu jedem Ansatz hinzugegeben, sodass sich eine Gesamtmenge von 50 µl je Ansatz ergab. Jede Probe wurde dann in Alufolie eingepackt und über Nacht bei 4°C inkubiert.

Am darauffolgenden Tag erfolgte nach einmaligem Waschvorgang mit 0,5%iger BSA-PBS-Lösung die Aufnahme der Zellsuspension in FACS-Tubes. Die Analyse der Zellen wurde mit einem BD FACS Canto II durchgeführt und die Auswertung der Daten erfolgte mit der FlowJo v10 software.

## **2.2.3 Zellbiologische Methoden**

### **2.2.3.1 Kultivierung von eukaryotischen Zellen**

Alle adhärennten Zellen, die in dieser Arbeit verwendet wurden, sind in Abschnitt 2.1.15 beschrieben. Die Zelllinien wurden in 10 cm Kulturschalen mit 10 ml DMEM *High Glucose* (4,5 g/ml) mit 10% fötalem Kälberserum (FCS) und 1% Penicillin/Streptomycin bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> in einer gesättigten Wasserdampf-atmosphäre kultiviert. Dies erfolgte in einem CO<sub>2</sub> Inkubator 150 (E2) Brutschrank. Für die Subkultivierung wurden die adhärennten Zellen zweimal pro Woche im 1:100 Verhältnis gesplittet, indem zunächst das Medium entfernt und die Zellen einmal mit PBS gewaschen wurden. Die Ablösung der Zellen erfolgte durch Zugabe von 2 ml Trypsin/EDTA (5 min, 37°C). Die Wirkung von Trypsin/EDTA wurde anschließend durch Zugabe von 2 ml DMEM<sup>+/+</sup> neutralisiert und die Zellen wurden in einem 15 ml Falcon bei 1200 rpm für 5 min bei Raumtemperatur pelletiert. Das Zellpellet wurde in 1 ml DMEM<sup>+/+</sup> resuspendiert, um anschließend in einem entsprechenden Verhältnis auf eine neue 10 cm Schale mit 10 ml DMEM<sup>+/+</sup> überführt zu werden.

Analog zu den adhärennten Zellen wurden die Suspensionszellen Ba/F3-gp130 und die daraus generierten Zelllinien in 10 cm Kulturschalen mit 10 ml DMEM<sup>+/+</sup> kultiviert. Hierzu wurde 0,2 µl Zellsuspension auf eine neue 10 cm Schale mit 10 ml DMEM<sup>+/+</sup>, das mit 10 ng/ml Hyper-IL-6 versetzt wurde, überführt. Bei diesem Verdünnungsverhältnis war eine Woche später eine konfluente 10 cm Schale zu erwarten.

### 2.2.3.2 Transfektion von adhärenen Zellen

Im Falle der Transfektion von CHO-K1 Zellen wurden  $0,5 \times 10^6$  Zellen/10 cm Schale von HEK-293T Zellen  $2 \times 10^6$ /10 cm Schale am Vortag ausgesät. Am darauffolgenden Tag wurde 1 ml DMEM<sup>-/-</sup> in je ein 1,5 ml Reaktionsgefäß vorgelegt. Hinzugegeben wurden dann 5 µg der zu transfektierenden DNA (bei Kotransfektion je 2,5 µg/Plasmid) und 10 µl Turbofect. Nach vorsichtigem Mischen wurde für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend dieses Gemisch auf den Tags zuvor ausgesäten Zellen tropfenweise verteilt. Nach vorsichtigem Schwenken folgte eine Inkubation über 5 h bei 37°C im Inkubator und ein darauffolgender Mediumswechsel. Nach weiteren 48 h erfolgte entweder eine transiente Transfektion, bei der nach Einzelklonselektion verfahren wurde (s. Abschnitt 2.2.2.3), oder eine stabile Transfektion, bei der ebenfalls nach Einzelklonselektion verfahren wurde (s. Abschnitt 2.2.2.3), jedoch zu jedem Mediumswechsel 225 µl G418 zur Selektion gegeben wurde.

Für die Transfektion von Phoenix-Eco Zellen wurde  $8 \times 10^5$  Zellen in eine 6-Well Kulturschale in 2 ml DMEM<sup>+/+</sup> ausgesät. Nach 24 h wurde die Transfektion durchgeführt, indem 2 µl Turbofect mit 1 µg Plasmid DNA (pMOWS Plasmide, Abschnitt 2.1.10) in 200 µl ml DMEM<sup>-/-</sup> vermischt und für 30 sec gevortext wurde. Der Transfektionsansatz wurde nach 15 min auf die Zellen pipettiert. Nach einer Inkubation von 6 h bei 37°C im Zellinkubator wurde das Medium gegen 2 ml DMEM mit 30% FCS und 1% Penicillin/Streptomycin ausgetauscht. 24 h nach Transfektion wurde der Überstand für die retrovirale Transduktion von Ba/F3-gp130 Zellen verwendet (s. Abschnitt 2.2.3.3).

### 2.2.3.3 Retrovirale Transduktion von Ba/F3-gp130 Zellen

Die Überstände von Phoenix-Eco Zellen, die mit pMOWs Plasmiden transfiziert wurden (s. Abschnitt 2.2.3.2), wurden für die retrovirale Transduktion von Ba/F3-gp130 Zellen nach Ketteler *et al.* verwendet. Um Zellreste aus den Phoenix-Eco Überständen zu entfernen, wurden diese bei 5000 rpm für 5 min zentrifugiert. Anschließend wurden 250 µl Phoenix-Eco Überstand mit 3 µl Polybrene (Sigma Aldrich, 8 µg/ml) und 50 µl Ba/F3-gp130 Zellsuspension ( $1 \times 10^5$  Zellen) vermischt. Darauf wurden die Proben bei 1800 rpm für 4 h bei Raumtemperatur zentrifugiert und der Überstand im Anschluss verworfen. Das Zellpellet wurde in 1 ml DMEM<sup>+/+</sup> resuspendiert und in eine 6-Well Kulturschale mit 4 ml DMEM<sup>+/+</sup>/Well überführt. Anschließend wurde mit 10 ng/ml Hyper-IL-6 stimuliert. Die Selektion der stabil transduzierten Zellen erfolgte nach einer Kultivierung von 48 h bei 37°C im Zellinkubator. Hierzu wurden die Zellen für mindestens 2 Wochen in Anwesenheit von 1,5 µg/ml Puromycin selektiert. Die stabil transduzierten

Ba/F3-gp130 Zellen wurden in Anwesenheit von 10 ng/ml Hyper-IL-6 in 10 ml DMEM<sup>+/+</sup> kultiviert.

#### **2.2.3.4 Proliferationassay**

Retroviral transduzierte Ba/F3-gp130 oder Ba/F3-gp130-IL-6R Zellen (s. Abschnitt 2.2.3.3) wurden pelletiert (1500 rpm, 5 min, Raumtemperatur), dreimal mit PBS gewaschen, damit die enthaltenen Zytokine entfernt werden, und in 1 ml DMEM<sup>+/+</sup> resuspendiert. Anschließend wurde die Zellzahl bestimmt und eine Zellsuspension mit  $5 \times 10^3$  Zellen/100  $\mu$ l erstellt. Jeweils 100  $\mu$ l der Zellsuspension wurde in ein Well einer 96-Well Platte ausgesät, mit der entsprechenden Menge an Zytokinen (in dieser Arbeit IL-6, sIL-6R und Hyper-IL-6) versetzt (Negativkontrolle = ohne Zytokinzugabe) und für 72 h bei 37°C mit 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Anschließend erfolgte die Messung der Proliferation mit Hilfe des Kits CellTiter-Blue Cell Viability Assay. Hierzu wurden 20  $\mu$ l CellTiter-Blue pro Well hinzugefügt und die Proliferation an einem Tecan Infinite M200 PRO Reader (ex-Filter 530/25, em-Filter 590/35) gemessen. Der nach 60 min gemessene Wert wurde vom 0 min Wert subtrahiert und die Proliferation in *relative light units* (RLU) angegeben. Alle Messwerte wurden mit einer Dreifachbestimmung ermittelt.

#### **2.2.3.5 Zellzahlbestimmung**

Mit Hilfe des TC10 Automated Cell Counters wurde die Zellzahl von Zelllinien bestimmt. Dafür wurden 6  $\mu$ l Trypan Blue Dye zu 6  $\mu$ l Zellsuspension hinzugefügt und vermischt. Anschließend wurden 10  $\mu$ l des Gemischs in TC10 System Counting Slides Dual Chamber geladen, der die Zellzahl bestimmte.

## 3 Ergebnisse

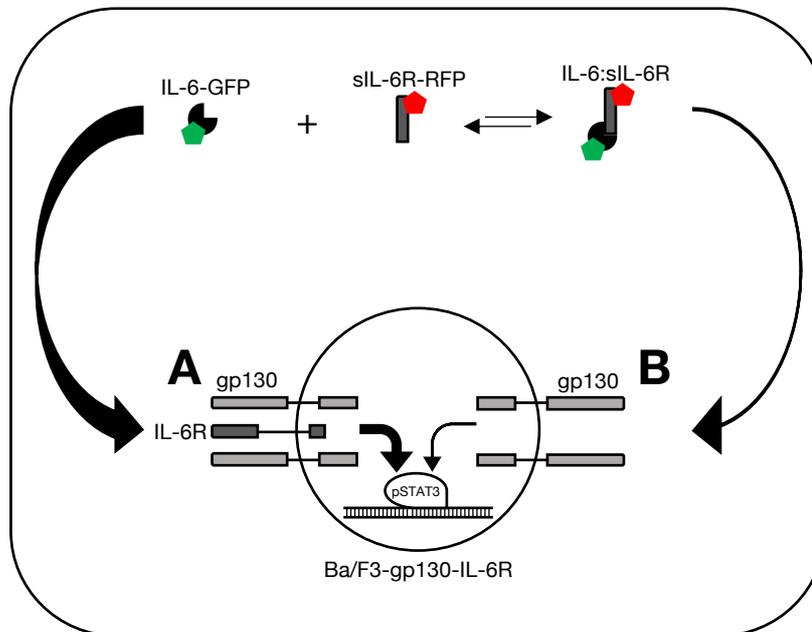
### 3.1 Wie ist die Balance zwischen *classic*- und *trans-signaling*?

Ziel dieser Arbeit ist es, Antworten bezüglich der Balance zwischen *classic*- und *trans-signaling* zu liefern. Wie schon eingangs erwähnt, wird vermutet, dass IL-6 *classic-signaling* unter physiologischen Bedingungen bevorzugt ablaufen könnte. Die Erklärung für diese Hypothese stellen die unterschiedlichen Bindungsaffinitäten zwischen den einzelnen Komponenten innerhalb des Komplexes aus IL-6, dem IL-6R und gp130 dar. So ist die Bindung zwischen IL-6 und dem IL-6R rund 100-fach schwächer im Vergleich zu der Bindung zwischen IL-6 und dem IL-6R, wenn sie von gp130 stabilisiert wird (Scheller *et al.* 2014). Zudem konnte festgestellt werden, dass nur ein verschwindend geringer Anteil an IL-6 im Komplex mit dem sIL-6R im Serum vorliegt (Baran *et al.* 2018). Gibt es also ein dominierendes *signaling* oder existieren beide Signalwege parallel und welchen Einfluss haben andere Variablen, wie zum Beispiel die Dichte des IL-6R, auf der Oberfläche der Zellen? Zur Beantwortung der Fragen nach der Balance zwischen *classic*- und *trans-signaling* werden im Folgenden die Ergebnisse dieser Arbeit präsentiert.

### 3.2 Mono-Kulturansatz zum Vergleich von *classic*- und *trans-signaling*

Es wurde ein Assaysystem (s. Abb. 3.1) etabliert, welches den Vergleich von *classic*- und *trans-signaling* in einem Mono-Kulturansatz erlaubt. Wie in Abbildung 3.1 schematisch gezeigt, werden dafür die Proteine IL-6-GFP und sIL-6R-miRFP benötigt. Die Klonierungsschemata der zugrundeliegenden DNA-Sequenz pcDNA3.1-IL-6-GFP-TEV-Fc und pcDNA3.1-sIL-6R-miRFP670-TEV-Fc werden in den folgenden Abschnitten 3.2.1 und 3.2.2 aufgeschlüsselt.

Im Rahmen dieses Versuchsansatzes macht man sich die unterschiedlich farbige Markierung der Proteine IL-6 und sIL-6R zur Unterscheidung von *classic*- und *trans-signaling* zunutze. Die Ba/F3-gp130-IL-6R Zellen selbst sind nicht permanent farblich markiert. Erst durch Bindung und eventuell Internalisierung eines oder beider Proteine an eine Zelle wird diese dadurch farblich markiert. Dieses Signal kann über ein Fluoreszenzmikroskop oder ein Durchflusszytometer detektiert werden.



**Abbildung 3.1: Schematische Darstellung des Mono-Kulturansatzes zur simultanen Messung von *classic-* und *trans-signaling*.** Einer Suspension mit Ba/F3-gp130-IL-6R Zellen (weißer Kreis), welche sowohl gp130 (hellgraue Rechtecke) als auch IL-6R (dunkelgraue Rechtecke) auf ihrer Oberfläche exprimiert haben, werden unterschiedliche Mengen von mit GFP markiertem IL-6 (schwarzer  $\frac{3}{4}$  Kreis mit grünem Fünfeck) und mit RFP markiertem sIL-6R (dunkelgraues Rechteck mit rotem Fünfeck) beigefügt. **(A)** Die Bindung von IL-6-GFP an eine Ba/F3-gp130-IL-6R Zelle löst eine intrazelluläre Signalkaskade aus, welche die Bindung von phosphoryliertem STAT3 an die DNA zur Folge hat. Die Menge an *classic-signaling* kann somit über die Stärke des GFP Signals detektiert werden. **(B)** Die Bindung von IL-6-GFP:sIL-6R-RFP an eine Ba/F3-gp130-IL-6R Zelle löst eine intrazelluläre Signalkaskade aus, welche die Bindung von pSTAT3, pERK oder pAKT an die DNA zur Folge hat. Die Menge an *trans-signaling* kann somit über die Stärke des RFP + GFP Signals detektiert werden. (Die Dicke der Pfeile symbolisiert mit welcher Wahrscheinlichkeit eine Bindung abläuft: dicker Pfeil = hohe Wahrscheinlichkeit, dünner Pfeil = niedrige Wahrscheinlichkeit)

### 3.2.1 Klonierung von IL-6-GFP-Fc

Das Plasmid pcDNA3.1-IL-6-GFP wurde zunächst durch eine Restriktion mit dem Enzym NotI linearisiert. Nach der darauffolgenden Gelextraktion (6800bp) wurde das Plasmid mit Klenow behandelt, um *blunt ends* zu erzeugen, und anschließend mit alkalischer Phosphatase dephosphoryliert. Parallel dazu wurde das Plasmid pcDNA3.1-TEV-Fc mit dem Enzym PmeI gespalten, bei 780 bp ein DNA-Fragment aus dem Gel extrahiert und ebenfalls Klenow behandelt, um *blunt ends* zu generieren. Nach einem PCR-Clean-up beider DNA-Sequenzen wurden diese miteinander ligiert. Die positiven Klone des entstandenen Plasmides pcDNA3.1-IL-6-GFP-Stop-TEV-Fc wurden mit Hilfe einer Testrestriktion mit dem Restriktionsenzym BamHI ermittelt (1600 bp + 6079 bp). Um abschließend das Stopp-Codon innerhalb des neu entstandenen Konstruktes zu deletieren, wurde eine Mutagenese-PCR mit den beiden Primern IL-6-GFP-fw\_mut und

IL-6-GFP-rv\_mut angewandt. Nach einem *PCR-Clean-up* wurde das Produkt pcDNA3.1-IL-6-GPF-TEV-Fc mittels Sanger Sequenzierung bestätigt.

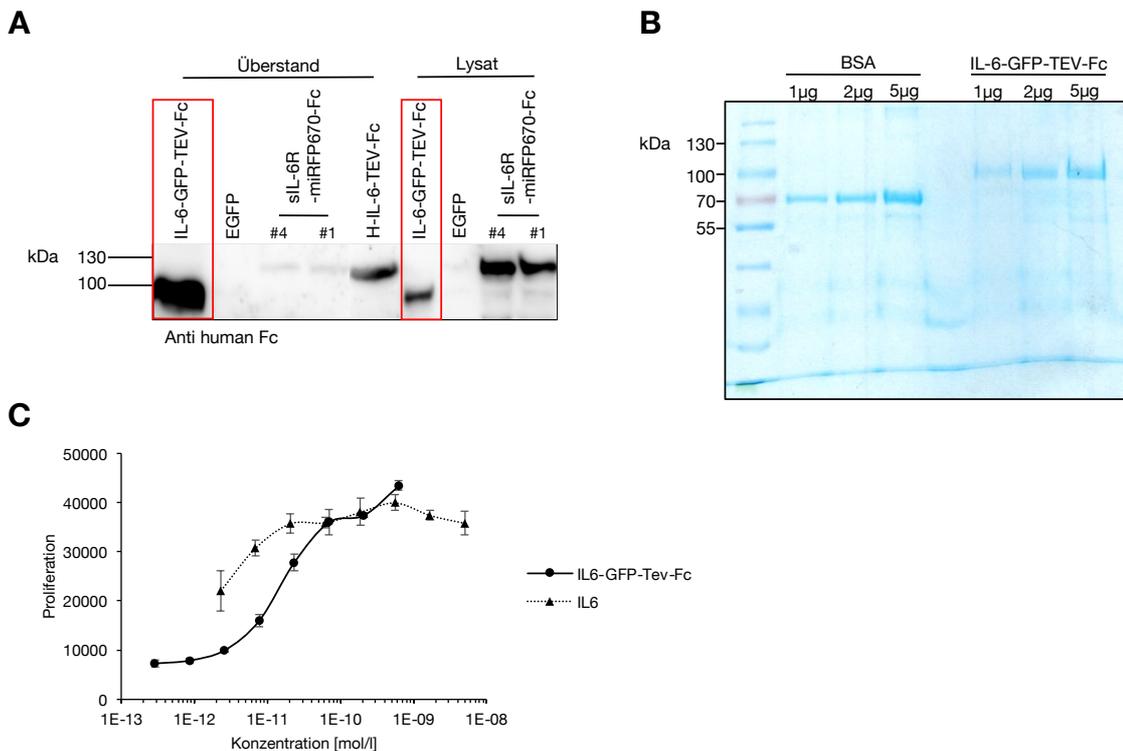
### **3.2.2 Klonierung von sIL-6R-miRFP670-Fc**

Als Ausgangssequenz für diese cDNA wurde das Plasmid pcDNA3.1-H-IL-6-Fc ausgewählt, welches im ersten Schritt mit dem Restriktionsenzym NotI geschnitten wurde. Daraufhin erfolgte eine Linker-Ligation mit einem TEV-Linker. Das entstandene Plasmid pcDNA3.1-H-IL-6-TEV-Fc wurde mit einer Restriktion mit PmlI bestätigt (703 bp + 7000 bp). Dieses und das Plasmid pcDNA3.1-miRFP670 wurden im Anschluss in einer Doppelrestriktion mit den Restriktionsenzymen AgeI und NotI geschnitten. Dies hat zur Folge, dass innerhalb der für Hyper-IL-6 kodierenden DNA genau zwischen den codierenden Sequenzen für IL-6 und dem sIL-6R geschnitten wird. Anschließend wurden pcDNA3.1-sIL-6R-TEV-Fc und pcDNA3.1-miRFP670 ligiert. Das entstandene Plasmid pcDNA3.1-sIL-6R-miRFP670-TEV-Fc wurde über eine Restriktion mit dem Restriktionsenzym PstI kontrolliert (177 bp + 957 bp + 2288 bp + 4677 bp). Eine exakte Bestätigung erfolgte ebenfalls durch Sanger Sequenzierung.

### **3.2.3 Produktion des Proteins IL-6-GFP**

Das Expressionsplasmid pcDNA3.1-IL-6-GFP-TEV-Fc (s. Abschnitt 3.2.1) wurde anschließend in HEK-293T Zellen transfektiert mit dem Ziel, die Produktion und Sekretion des Proteins IL-6-GFP-TEV-Fc zu untersuchen. Die erfolgreiche Produktion und Sekretion in den Überstand sowie der Nachweis mittels Coomassie Färbung können der Abbildung 3.2 entnommen werden.

Zur Überprüfung der Funktionsfähigkeit des IL-6-GFP Proteins wurde ein Proliferationsassay angesetzt. Es zeigt sich eine dem IL-6 ähnliche Aktivität des Proteins bei einer Konzentration von ungefähr  $10^{-10}$  mol/l bis  $10^{-9}$  mol/l (s. Abb. 3.2 **(C)**).



**Abbildung 3.2: Nachweis von IL-6-GFP-TEV-Fc.** **(A)** Zum Nachweis der gewünschten Proteine wurden im Vorfeld HEK-293T Zellen mit folgenden Konstrukten transfektiert: IL-6-GFP-TEV-Fc, sIL-6R-miRFP670-Fc, H-IL-6-TEV-Fc und EGFP. Die jeweils produzierten Proteine wurden sowohl aus dem Überstand als auch aus Lysaten der HEK-293T Zellen gewonnen. Der eigentliche Nachweis erfolgte anschließend mittels Western-Blot über die Bindung an den Anti human Fc Antikörper. EGFP diente hier als Negativkontrolle. Der Nachweis von IL-6-GFP-TEV-Fc konnte sowohl im Lysat als auch im Überstand gezeigt werden. **(B)** Nachweis von IL-6-GFP-TEV-Fc mittels Coomassie Färbung. Es wurden 1µg, 2µg und 5µg aufgetragen. Als Referenz diente BSA. **(C)** Messung des Aktivitätsgrades von IL-6-GFP-TEV-Fc im Vergleich zu IL-6. Dazu wurden Ba/F3-gp130-IL-6R Zellen in einem Proliferationsindex mit IL-6 und IL-6-GFP-TEV-Fc stimuliert und anschließend die Proliferation gemessen.

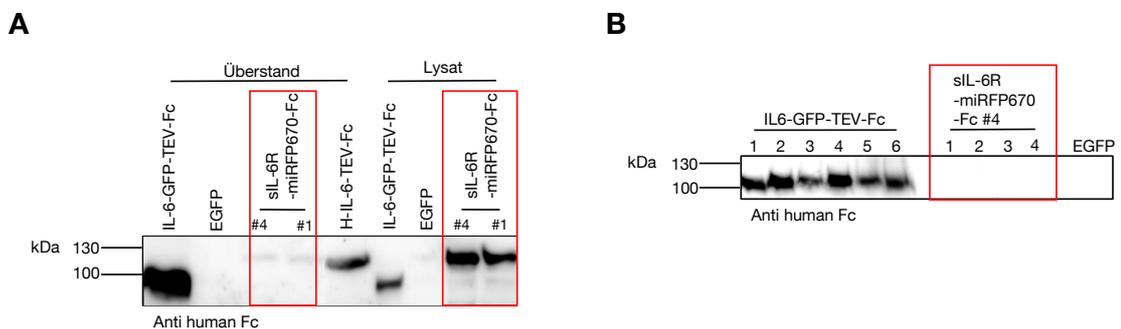
### 3.2.4 IL-6-GFP-Tev-Fc wird nicht von Ba/F3-gp130-IL-6R Zellen internalisiert

Nach erfolgreicher Aktivitätsmessung wurde versucht, ein GFP Signal nach Bindung an Ba/F3-gp130-IL-6R Zellen im FITC-A Kanal des Durchflusszytometers zu messen. Es wurde dafür zu vier unterschiedlichen Zeitpunkten nach Bindung gemessen. Die Stimulation dieser Zellen mit 1 µg/ml IL-6-GFP-Tev-Fc zeigte allerdings keinerlei Reaktion; ein GFP Signal konnte nicht detektiert werden. Selbst 120 min nach Stimulation konnte kein GFP Signal von den Messinstrumenten wahrgenommen werden, was die Schlussfolgerung zulässt, dass das Protein IL-6-GFP-Tev-Fc nicht messbar in die Zellen internalisiert wird.

### 3.2.5 Produktion des Proteins sIL-6R-miRFP670

Für die Produktion des Proteins sIL-6R-miRFP670 wurde die pcDNA3.1-sIL-6R-miRFP670-TEV-Fc (s. Abschnitt 3.2.2) ebenfalls in HEK-293T Zellen transfektiert. Wie in Abbildung 3.3 zu erkennen ist, konnte das Protein allerdings nur in sehr geringen Mengen im Überstand detektiert werden. Dieses befand sich hauptsächlich im Lysat der transfektierten HEK-293T Zellen.

Es wurde versucht, das Protein in CHO-K1 Zellen herzustellen und nach Transfektion Einzelklone mit erhöhter Sekretion von sIL-6R-miRFP670 zu identifizieren. Die Einzelklonselektion erbrachte allerdings kein zufriedenstellendes Ergebnis (s. Abb. 3.3 **(B)**). Keiner der transfektierten CHO-K1 Klone sezernierte das Protein sIL-6R-miRFP670 in ausreichender Menge in den Überstand.



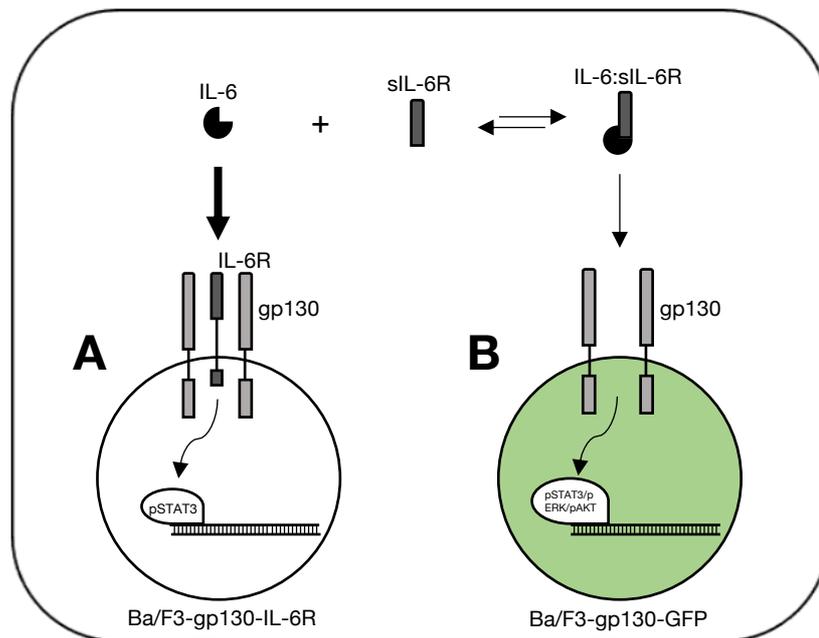
**Abbildung 3.3: Nachweis von sIL-6R-miRFP670-Fc mittels Western Blot. (A)** Zum Nachweis der gewünschten Proteine wurden im Vorfeld HEK-293T Zellen mit folgenden Konstrukten transfektiert: IL-6-GFP-TEV-Fc, sIL-6R-miRFP670-Fc, H-IL-6-TEV-Fc und EGFP. Die jeweils produzierten Proteine wurden sowohl aus dem Überstand als auch aus Lysaten der HEK-293T Zellen gewonnen. Der eigentliche Nachweis erfolgte anschließend mittels Western Blot über die Bindung an den human Fc-Antikörper. EGFP diente hier als Negativkontrolle. sIL-6R-miRFP670-Fc konnte nur im Lysat, nicht aber im Überstand, nachgewiesen werden. **(B)** Western Blot von Zellüberständen mehrerer Klone von CHO-K1 Zellen, in die zuvor die Plasmide pcDNA-IL-6-GFP-TEV-Fc und pcDNA-sIL-6R-miRFP670-Fc transfektiert wurden. EGFP fungiert wieder als Negativkontrolle.

### 3.3 Etablierung eines neuen Assaysystems für Einzelzellanalyse mit Vergleich von *classic*- und *trans*-signaling

Aufgrund nicht suffizienter Durchführbarkeit des mono-kulturellen Versuchsansatzes wurde ein neues Assaysystem im Ko-Kulturansatz entwickelt. Dafür mussten zunächst einmal, um *classic*- und *trans*-signaling in Form einer Einzelzellanalyse zuverlässig und praktikabel miteinander vergleichen zu können, die in Abbildung 3.4 skizzierten stabilen Zelllinien erzeugt werden. Dabei handelt es sich um Ba/F3-gp130-IL-6R Zellen und Ba/F3-gp130-GFP Zellen. Erstere tragen sowohl gp130 als auch den IL-6R auf ihrer Oberfläche und benötigen die Stimulation durch IL-6 zur Proliferation. Die Detektion

dieser Zellen setzt damit voraus, dass zuvor *classic-signaling* abgelaufen sein muss. Zweitere tragen nur gp130 auf ihrer Oberfläche und sind durch Integration eines GFP Expressionsplasmids permanent grün gefärbt. Diese Zellen können wiederum nur durch *trans-signaling* zur Proliferation angeregt werden. Eine Zunahme GFP positiver Zellen deutet also auf IL-6 *trans-signaling* hin.

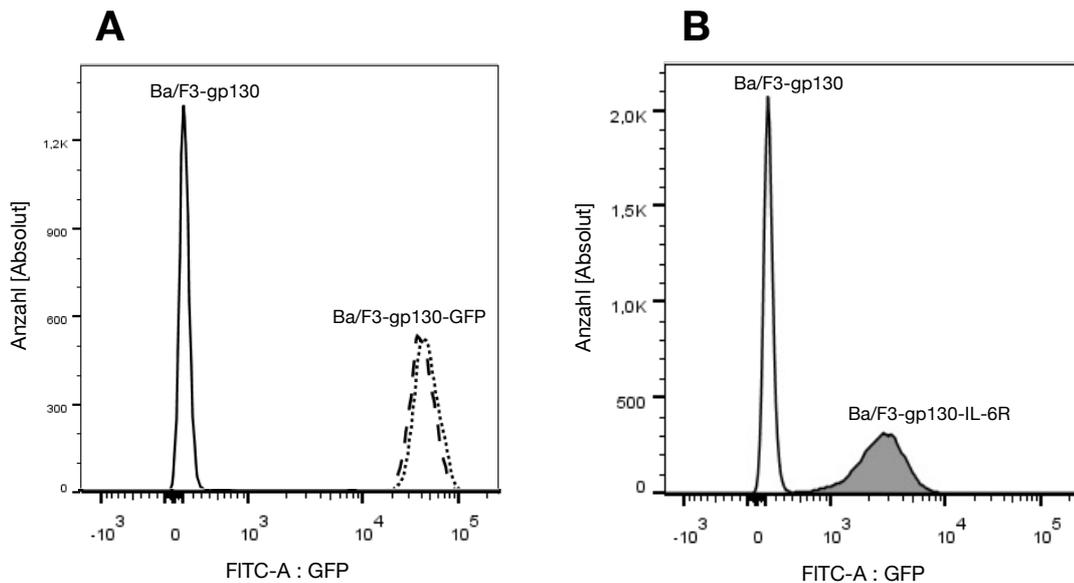
Dadurch wird deutlich, dass *classic-* und *trans-signaling* nur indirekt durch die Detektion der responsiv für diese stehenden Zelllinien gemessen werden.



**Abbildung 3.4: Schematische Darstellung des Ko-Kulturansatzes zur simultanen Messung von *classic-* und *trans-signaling*.** Einem Gemisch aus Ba/F3-gp130-IL-6R Zellen (weißer Kreis) und Ba/F3-gp130-GFP Zellen (grüner Kreis) werden unterschiedliche Mengen von IL-6 (schwarzer  $\frac{3}{4}$  Kreis) und dem sIL-6R (dunkelgraues Rechteck) beigelegt. **(A) Classic-signaling:** Nach erfolgter Bindung von IL-6 an Ba/F3-gp130-IL-6R Zellen läuft eine intrazelluläre Signalkaskade ab, an dessen Ende die Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors STAT3 steht. Dieser bindet an die DNA (schwarze Leiter) und löst die Proliferation dieser Zelle aus. **(B) Trans-signaling:** IL-6 bindet zuerst an den sIL-6R und dann an Ba/F3-gp130-GFP Zellen. Am Ende der darauffolgenden intrazellulären Signalkaskade steht die Phosphorylierung von STAT3, ERK oder AKT. Diese Transkriptionsfaktoren binden an die DNA und lösen die Proliferation dieser Zelle aus. (Die Dicke der Pfeile symbolisiert mit welcher Wahrscheinlichkeit eine Bindung abläuft: dicker Pfeil = hohe Wahrscheinlichkeit, dünner Pfeil = niedrige Wahrscheinlichkeit)

Zur Herstellung der Zelllinie Ba/F3-gp130-IL-6R wurde das Plasmid pMOWS-IL-6R in Ba/F3-gp130 Zellen retroviral transduziert. Um die Zelllinie Ba/F3-gp130-GFP herzustellen, wurde das Plasmid pMOWS-GFP in Ba/F3-gp130 Zellen retroviral transduziert. Die Zellen werden nach Transduktion und Antikörperselektion via

Durchflusszytometrie auf Expression von IL-6R beziehungsweise GFP untersucht (siehe Abb. 3.5).



**Abbildung 3.5: Nachweis von Ba/F3-gp130-GFP Zellen und Ba/F3-gp130-IL-6R Zellen mittels Durchflusszytometrie.** Mit dem im Durchflusszytometer eingestellten FITC-A Kanal lassen sich mit GFP markierte Zellen von nicht markierten Zellen unterscheiden. **(A)** Durchflusszytometrische Analyse der Oberflächenexpression von GFP in Ba/F3-gp130-GFP Zellen. Als Kontrollgruppe wurden Ba/F3-gp130 Zellen verwendet. Die erfolgreiche Klonierung von GFP in die DNA der Ba/F3-gp130 Zellen kann somit angenommen werden. **(B)** Durchflusszytometrische Analyse von GFP markierten Ba/F3-gp130-IL-6R Zellen. Die Bindung des IL-6R Antikörpers konnte über die Messung eines GFP Signals über den Anti-Fc Antikörper bestätigt werden. Ba/F3-gp130 Zellen ohne Markierung wurden erneut als Kontrollgruppe verwendet.

Nachdem die beiden oben genannten Zelllinien stabil transduziert waren, wurden Ko-Kulturen für 72 h mit steigenden IL-6 und sIL-6R Konzentrationen stimuliert.

Zur Analyse der Zellproliferation nach Stimulation mit IL-6 und dem sIL-6R wurden zwei Methoden verwendet: zum einen die Fluoreszenzmikroskopie und zum anderen die Durchflusszytometrie. Der Vorteil einer Detektion durch zwei unterschiedliche Messmethoden erlaubt eine gewisse Validierung über die Genauigkeit des neuen Verfahrens.

Wie genau sich *classic*- und *trans-signaling* anhand des neu entwickelten Assaysystems unterscheiden und vergleichen lassen, wird im Folgenden genauer erläutert: Grundvoraussetzung ist die farbliche Markierung mittels des *green fluorescent protein* (GFP) der Zelllinie Ba/F3-gp130 zu Ba/F3-gp130-GFP. Dadurch ist es möglich die beiden Zelllinien zuverlässig voneinander zu unterscheiden.

Im Falle der Messung durch das Fluoreszenzmikroskop wurden 5.000 Zellen / Zelllinie / Well angeimpft, sodass sich in jedem Well der 24 Well-Platte 10.000 Zellen zum Zeitpunkt  $t=0$  befanden. Für die Detektion durch die Durchflusszytometrie wurden wiederum 100.000 Zellen / Zelllinie / Well angeimpft. Somit befanden sich zum Zeitpunkt  $t=0$  in jedem Well der 24 Well-Platte 200.000 Zellen. Die nach 72 h von der jeweiligen Messmethode detektierten Zellen der Ba/F3-gp130-IL-6R Zelllinie entsprechen dem Anteil des *classic-signaling*. Detektierte Ba/F3-gp130-GFP Zellen stehen demnach für den Anteil des *trans-signaling*.

**Tabelle 3.1: Pipettierschema des in Abschnitt 3.5 skizzierten Assaysystems**

	-	10 ng/ml	25 ng/ml	50 ng/ml	100 ng/ml	200 ng/ml
-						
1 ng/ml						
10 ng/ml						
100 ng/ml						

### 3.4 Keine Dominanz des *classic-signaling* über das *trans-signaling* bei moderaten Konzentrationen von IL-6 und dem sIL-6R

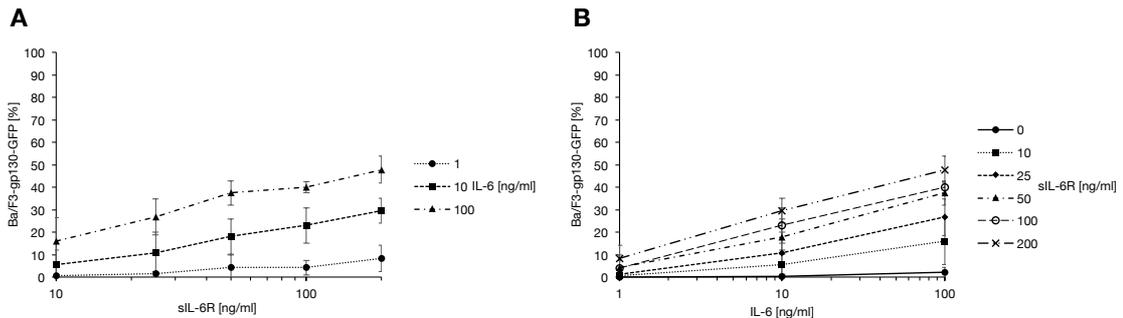
Das in Abschnitt 3.3 skizzierte Assaysystem hat zum Ziel, eine quantitative Aussage über das Verhältnis von *classic-* zu *trans-signaling* nach Stimulation mit IL-6 und dem sIL-6R in den in Tabelle 3.1 angegebenen Konzentrationen zu treffen. Im Folgenden werden zunächst die Ergebnisse der Messung des Fluoreszenzmikroskops und der Durchflusszytometrie präsentiert. Im Anschluss erfolgt ein kurzer Vergleich beider Methoden.

#### 3.4.1 Auswertung der Fluoreszenzmikroskopie

Wie in Abbildung 3.6 ersichtlich, ist schon bei Stimulation von nur 1 ng/ml IL-6 und 200 ng/ml sIL-6R eine anteilmäßige Proliferationsrate von rund 8% *trans-signaling* zu messen. Steigert man die Konzentration des IL-6 um den Faktor zehn, so erhält man sogar eine anteilmäßige Proliferationsrate von knapp 30% *trans-signaling*. Erhöht man erneut die IL-6 Konzentration um den Faktor zehn auf 100 ng/ml, finden *classic-* und *trans-signaling* zu gleichen Teilen statt.

Aber auch die Konzentration des sIL-6R scheint die Rate des *trans-signaling* zu limitieren, wie in Abbildung 3.6 **(B)** ersichtlich. Stimuliert man mit einer relativ hohen

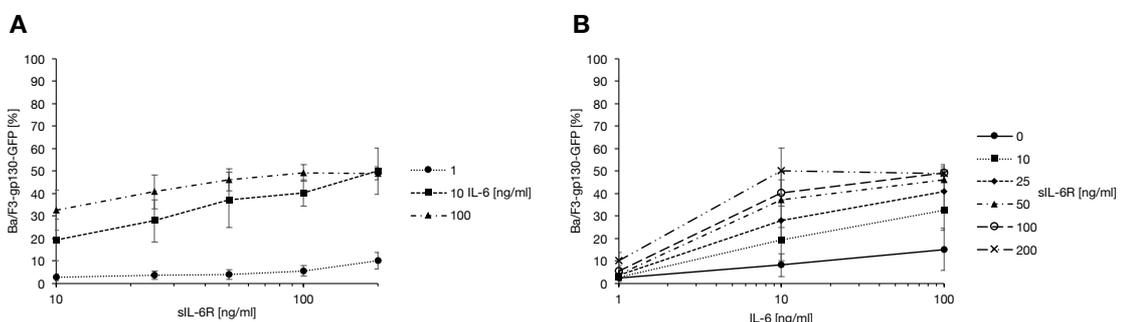
Konzentration von 100 ng/ml IL-6 und nur 10 ng/ml sIL-6R, lassen sich 16% *trans-signaling* messen. Steigert man die Konzentration des sIL-6R um den Faktor zehn auf 100 ng/ml, ist rund 40% *trans-signaling* nachweisbar.



**Abbildung 3.6: In Anwesenheit von IL-6 und sIL-6R können sowohl classic- als auch trans-signaling induziert werden. (A)** In Ko-Kulturansätzen wurden je 5000 Ba/F3-gp130-GFP Zellen mit 5000 Ba/F3-gp130-IL-6R Zellen kultiviert und anschließend mit den in der Abbildung zu sehenden Konzentrationen an IL-6 und sIL-6R für 72 Stunden inkubiert. Anschließend wurden GFP positive Zellen mit einem Fluoreszenzmikroskop gezählt. Pro Ansatz wurden dabei drei repräsentative Ausschnitte ausgewählt und händisch ausgezählt. Der jeweilige Wert gibt den prozentualen Anteil der Ba/F3-gp130-GFP Zellen an allen überlebenden Zellen an. Dargestellt sind Mittelwerte aus n=3 Experimenten mit ähnlichen Resultaten. **(B)** beinhaltet dieselben Daten. Zwecks optischer Darstellung ist in **(A)** die Konzentration des sIL-6R auf der Abszisse aufgetragen, in **(B)** hingegen ist die Konzentration von IL-6 auf der Abszisse zu sehen.

### 3.4.2 Auswertung der Durchflusszytometrie

Die Ergebnisse der Durchflusszytometrie zeigen ein sehr ähnliches Bild wie die der Fluoreszenzmikroskopie. Auch hier zeigt sich nach Stimulation mit 100 ng/ml IL-6 und 200 ng/ml sIL-6R, dass genauso viel *trans-signaling* abläuft wie *classic-signaling*. Zudem ist bei dieser Messmethode ein gewisser Sättigungseffekt erkennbar. Ab einer Stimulation von 100 ng/ml IL-6 und 50 ng/ml sIL-6R lässt sich keine Steigerung des *trans-signaling* mehr nachweisen.



**Abbildung 3.7: In Anwesenheit von IL-6 und sIL-6R können sowohl classic- als auch trans-signaling induziert werden. (A)** In Ko-Kulturansätzen wurden je 100.000 Ba/F3-gp130-GFP Zellen mit 100.000 Ba/F3-gp130-IL-6R Zellen kultiviert und anschließend mit den in der

Abbildung zu sehenden Konzentrationen an IL-6 und sIL-6R für 72 Stunden inkubiert. Anschließend wurden GFP positive Zellen mit einem Durchflusszytometer gezählt. Der jeweilige Wert gibt dabei den prozentualen Anteil der Ba/F3-gp130-GFP Zellen an allen überlebenden Zellen an. Dargestellt sind Mittelwerte aus n=3 Experimenten mit ähnlichen Resultaten. **(B)** beinhaltet dieselben Daten. Zwecks optischer Darstellung ist in **(A)** die Konzentration des sIL-6R auf der Abszisse aufgetragen, in **(B)** hingegen ist die Konzentration von IL-6 auf der Abszisse zu sehen.

Vergleicht man die Ergebnisse beider Messmethoden miteinander, wird ersichtlich, dass sie den gleichen Trend aufzeigen: *trans-signaling* läuft bei Konzentrationen von 100 ng/ml IL-6 und 200 ng/ml sIL-6R zu gleichen Teilen wie das *classic-signaling* ab. Zudem wird ersichtlich, dass sowohl IL-6 als auch der sIL-6R gleichermaßen an der Regulation beteiligt sind.

Unterschiede werden allerdings auch sehr deutlich, wenn man sich in Tabelle 3.2 die Gegenüberstellung der Ergebnisse beider Messmethoden anschaut. Es fällt auf, dass bei der Messung durch die Durchflusszytometrie bei niedriger Konzentration von IL-6 und dem sIL-6R höhere Werte für *trans-signaling* nachgewiesen wurden, als bei der Messung durch das Fluoreszenzmikroskop.

Ein Vergleichswert wäre zum Beispiel die Stimulation durch 10 ng/ml IL-6 und 10 ng/ml sIL-6R, welche in der Fluoreszenzmikroskopiemessung 5,7%, in der Durchflusszytometrie hingegen 19,4% *trans-signaling* aufweist. Vergleichbar hohe Werte lassen sich bei der Messung durch das Fluoreszenzmikroskop erst bei einer Stimulation von 10 ng/ml IL-6 und 50 ng/ml sIL-6R (→ 18,1% *trans-signaling*) oder 100 ng/ml IL-6 und 10 ng/ml sIL-6R (→ 16% *trans-signaling*) nachweisen.

Ein weiterer Unterschied der Ergebnisse wird deutlich beim Vergleich der IL-6 Isolinien (1 ng/ml, 10 ng/ml, 100 ng/ml). Bei der Fluoreszenzmikroskopiemessung haben diese IL-6 Isolinien den gleichen Abstand (s. Abbildung 3.6). Die Daten der Durchflusszytometrie zeigen hingegen einen weitaus größeren Abstand zwischen der 1 ng/ml IL-6 Isolinie zur 10 ng/ml IL-6 Isolinie als zwischen der 10 ng/ml IL-6 Isolinie zur 100 ng/ml IL-6 Isolinie. Aus diesen Daten lässt sich ein Sättigungsverhalten ableiten. Eine größere Auflösung in diesem Bereich zwischen der 1 ng/ml IL-6 Isolinie und der 10 ng/ml IL-6 Isolinie wurde als relevant befunden. Die zugehörigen Daten werden in Abschnitt 3.4.3 präsentiert.

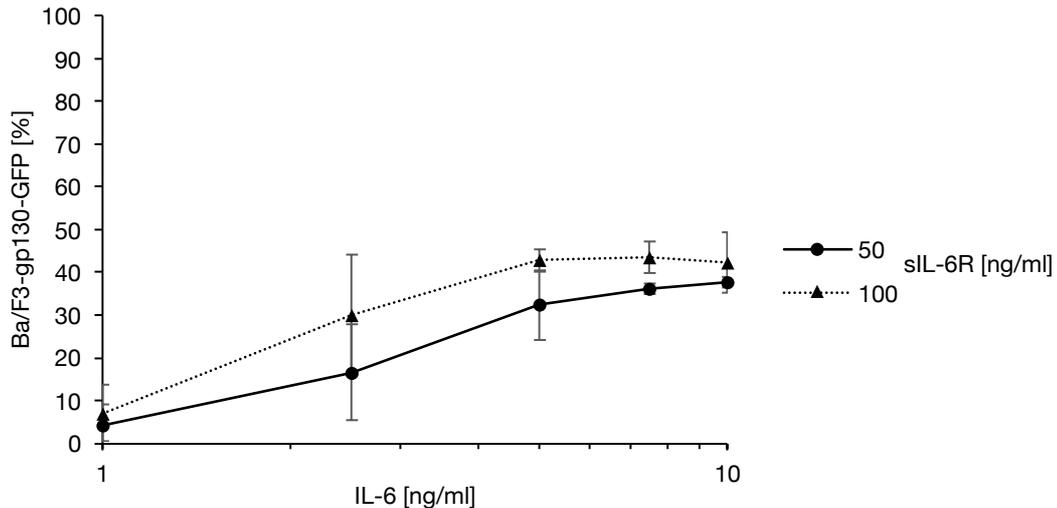
**Tabelle 3.2: Proliferationsraten von Ba/F3-gp130-hygro-GFP Zellen nach Stimulation mit IL-6 und sIL-6R im Ko-Kulturansatz (s. Abb. 3.1).** Zusammenfassung der Daten, welche bereits in Abbildung 3.7 und Abbildung 3.8 gezeigt wurden.

IL-6 [ng/ml]	Durchflusszytometrie [%]	Fluoreszenzmikroskopie [%]	sIL-6R [ng/ml]
1	2,6 ±1,5	0,3 ±0,3	0
10	8,2 ±5,1	0,5 ±0,3	0
100	15,1 ±9,3	2,2 ±2,2	0
1	2,8 ±1,5	0,7 ±0,6	10
10	19,4 ±9,3	5,7 ±6,3	10
100	32,6 ±8,9	16 ±10,5	10
1	3,6 ±1,8	1,5 ±1	25
10	27,9 ±9,4	10,8 ±9,3	25
100	40,7 ±7,5	26,8 ±8,1	25
1	4,1 ±2,1	4,4 ±5,6	50
10	37,1 ±12,3	18,1 ±8	50
100	46 ±5	37,5 ±5,4	50
1	5,6 ±2,4	4,2 ±3,4	100
10	40,3 ±6	23,1 ±7,9	100
100	49,2 ±3,6	40,1 ±2,5	100
1	10,1 ±3,8	8,3 ±5,9	200
10	50 ±10,4	29,6 ±5,6	200
100	49 ±2,9	47,9 ±6	200

### 3.4.3 IL-6 Konzentrationen über 5 ng/ml führen zu maximalem *trans-signaling*

Wie in Abschnitt 3.4.2 schon erwähnt, zeigen die Daten der Durchflusszytometrie, dass der Bereich der größten Zunahme an *trans-signaling* zwischen 1 ng/ml und 10 ng/ml IL-6 zu liegen scheint. Um diesen Bereich weiter aufzuschlüsseln, wurde im Anschluss eine kleinschrittigere Stufung vorgenommen. Im Detail bedeutet dies, dass der gleiche

Versuch (s. Abschnitt 3.3) mit 2,5 ng/ml, 5 ng/ml und 7,5 ng/ml IL-6 Zwischenschritten bei 50 ng/ml und 100 ng/ml sIL-6R durchgeführt und im Anschluss mit dem Durchflusszytometer gemessen wurde.



**Abbildung 3.8: Konzentration  $\geq 5$  ng/ml IL-6 ermöglichen maximales IL-6 *trans-signaling*.** In Ko-Kulturansätzen wurden je 100.000 Ba/F3-gp130-GFP Zellen mit 100.000 Ba/F3-gp130-IL-6R Zellen kultiviert und anschließend mit den in der Abbildung zu sehenden Konzentrationen an IL-6 und sIL-6R für 72 Stunden inkubiert. Anschließend wurden die GFP positiven Zellen mit einem Durchflusszytometer gezählt. Der jeweilige Wert gibt dabei den prozentualen Anteil der Ba/F3-gp130-GFP Zellen an allen überlebenden Zellen an. Dargestellt sind Mittelwerte aus n=3 Experimenten mit ähnlichen Resultaten.

In Abbildung 3.8 zeigt sich, dass eine Stimulation mit Konzentrationen über 5 ng/ml IL-6 bei Anwesenheit von hohen Konzentrationen des sIL-6R zu maximalem *trans-signaling* führt. Bis zu dieser Grenze von 5 ng/ml IL-6 scheint sich ein sehr fein abgestimmter Bereich zu befinden, in dem kleinste Veränderungen einen verhältnismäßig großen Effekt auf das *Outcome classic*- oder *trans-signaling* bewirken.

**Tabelle 3.3: Proliferationsraten von Ba/F3-gp130-GFP Zellen nach Stimulation mit IL-6 und sIL-6R im Ko-Kulturansatz (s. Abb. 3.5).** Zusammenfassung der Daten, welche bereits in Abbildung 3.9 gezeigt wurden.

IL-6 [ng/ml]	Durchflusszytometrie [%]	Fluoreszenzmikroskopie [%]	sIL-6R [ng/ml]
1	4,1 ± 2,1	4,4 ± 5,6	50
2,5	16,5 ± 11,3	-	50
5	32,4 ± 8,2	-	50

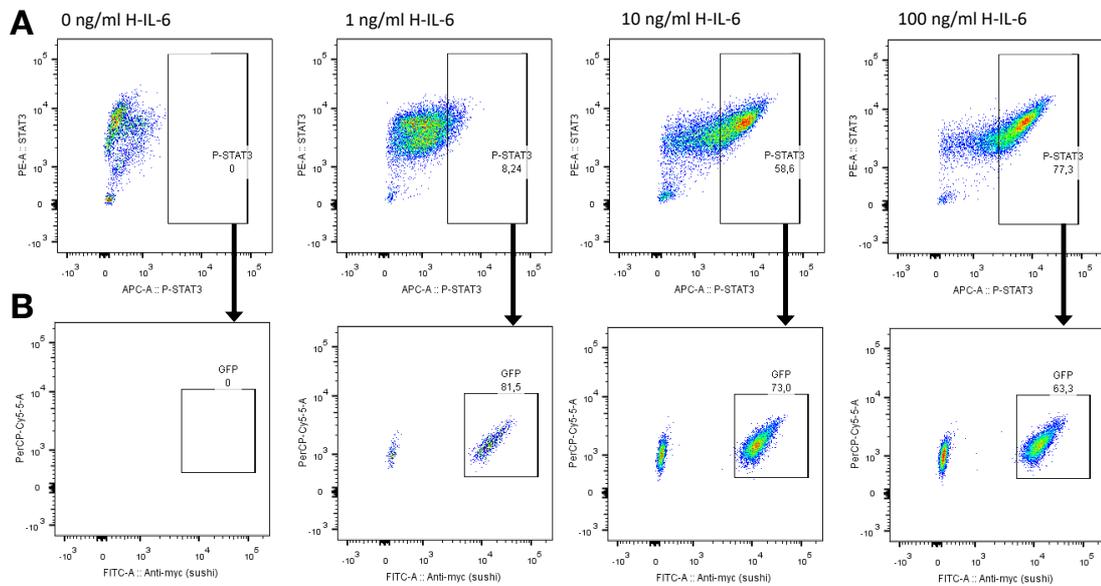
7,5	36 ±1,2	-	50
10	37,1 ±12,3	18,1 ±8	50
100	46 ±5	37,5 ±5,4	50
1	5,6 ± 2,4	4,2 ±3,4	100
2,5	30 ±14,2	-	100
5	42,8 ±2,5	-	100
7,5	43,6 ±3,7	-	100
10	40,3 ±6	23,1 ±7,9	100
100	49,2 ±3,6	40,1 ±2,5	100

#### 3.4.4 Membrangebundener IL-6R limitiert die Sensitivität zu Hyper-IL-6

Wie eingangs schon erwähnt, wird vermutet, dass die Stärke der STAT3 Aktivierung des *classic-signalings* durch den IL-6R limitiert wird. Beim *trans-signaling* hingegen gibt es keine potentielle Limitierung, da die Konzentration des sIL-6R adaptiv und spontan gesteigert werden kann. Dies erklärt die höhere Potenz des durch IL-6 induzierten *trans-signaling* gegenüber dem durch IL-6 induzierten *classic-signaling* (Reeh et al. 2019).

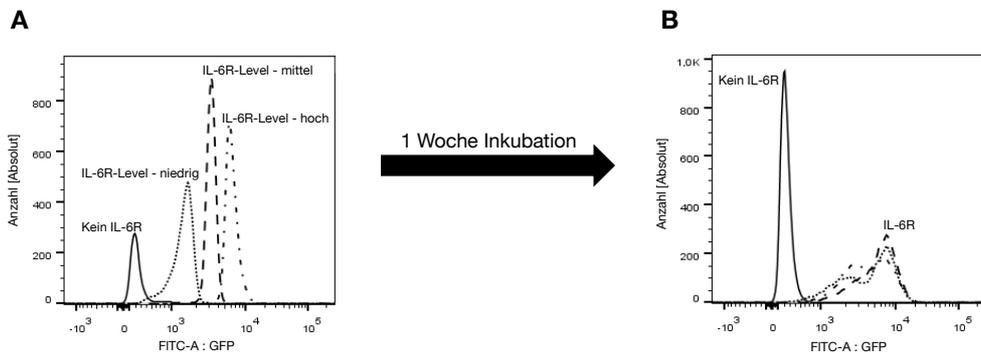
In einem weiteren Versuchsansatz wurde ermittelt, inwieweit der IL-6R die Signalkaskade beeinflusst (s. Abb. 3.9). Dafür wurde eine Ko-Kultur aus Ba/F3-gp130-GFP und Ba/F3-gp130-IL-6R Zellen angelegt. Nach ausreichendem *Starving* wurden die Zellen mit unterschiedlichen Mengen an H-IL-6 stimuliert und anschließend die STAT3-Phosphorylierung gemessen. Es zeigte sich eine Zunahme der STAT3-Phosphorylierung mit Anstieg der H-IL-6 Konzentration. Während nach Stimulation mit 1 ng/ml H-IL-6 8,24% der Zellen ein pSTAT3 Signal aufwiesen, waren es nach Stimulation mit 100 ng/ml H-IL-6 77,3%.

Im nächsten Schritt wurden nur die pSTAT3 positiven Zellen auf ein GFP Signal analysiert. Ziel war es dabei, den Anteil an Ba/F3-gp130 Zellen an allen pSTAT3 positiven Zellen zu ermitteln. Es zeigte sich, dass nach Stimulation mit niedrigeren Konzentrationen von H-IL-6 ein höherer Anteil an Ba/F3-gp130-GFP Zellen ein pSTAT3 Signal aufwiesen. Während der Anteil von Ba/F3-gp130-GFP Zellen nach Stimulation mit 1 ng/ml H-IL-6 bei 81,5% lag, war er nach Stimulation mit der zehnfachen Menge H-IL-6 bei 73% und nach Stimulation mit 100 ng/ml H-IL-6 bei 63,3%. Dies legt die Schlussfolgerung nahe, dass die Dichte des IL-6R Einfluss auf das Bindungsverhalten von H-IL-6 nimmt.



**Abbildung 3.9: Messung von pSTAT3 mittels intrazellulärer Durchflusszytometrie.** Jedem Ansatz mit je  $1 \times 10^6$  Ba/F3-gp130-GFP Zellen und  $1 \times 10^6$  Ba/F3-gp130-IL-6R Zellen wurde nach zweistündigem *Starving* eine unterschiedliche Menge an H-IL-6 (1 ng/ml, 10 ng/ml, 100 ng/ml) zugesetzt. Nach dessen Inkubation erfolgte die Fixierung mit anschließender Permeabilisierung der Zellen. Anschließend erfolgte die Zugabe zweier Antikörper: Alexa-Fluor647 mouse anti-STAT3 (pY705) und PE mouse anti-STAT3-AK. Die obige Grafik zeigt das Ergebnis der am darauffolgenden Tag durchgeführten Durchflusszytometriemessung. **(A)** Zellen, in welchen STAT3 phosphoryliert wurde, befinden sich weiter rechts im jeweiligen Diagramm. Messung mittels APC-A Kanal im BD FACS Canto II. Mit zunehmender H-IL-6 Stimulation werden mehr Zellen aktiviert. (Punktwolke im Diagramm *shiftet* von links nach rechts). **(B)** Ein Ausschnitt der Reihe A wird gezeigt. Die pSTAT3 aktivierten Zellen werden erneut im FITC-A Kanal analysiert. Somit kann der Anteil an Ba/F3-gp130-GFP Zellen an allen pSTAT3 positiven Zellen ermittelt werden.

In einem weiteren Schritt wurde analysiert, inwieweit der IL-6R die Sensitivität zu H-IL-6 limitiert. Dafür wurden verschiedene Zellpopulationen von Ba/F3-gp130-IL-6R Zellen mit einem Cellsorter isoliert, die eine unterschiedlich hohe IL-6R Dichte auf ihrer Zelloberfläche tragen. Die drei isolierten Populationen (siehe Abb. 3.10) wurden anschließend kultiviert. Nach einer Woche Inkubation zeigte sich allerdings ein Angleichen der IL-6R Dichte aller drei Populationen an einen mittleren Wert. Eine permanente Trennung von Zellpopulationen mit unterschiedlicher Rezeptordichte scheint daher mit diesem Verfahren nicht möglich zu sein.



**Abbildung 3.10: Separation von Ba/F3-gp130-IL-6R Zellen mit unterschiedlichen IL-6R Leveln auf ihrer Zelloberfläche. (A)** Auftrennung einer Population von Ba/F3-gp130-IL-6R Zellen mittels eines Cellsorters in folgende drei Unterpopulationen: 1. niedrige IL-6R Dichte, 2. mittelgroße IL-6R Dichte und 3. hohe IL-6R Dichte. Anschließende Markierung der IL-6R mit GFP und Messung mittels Durchflusszytometrie im FITC-A Kanal. Ein starkes GFP-Signal ist äquivalent zu einer hohen IL-6R Dichte auf der Zelloberfläche. **(B)** Erneute Markierung der auf der Zelloberfläche befindlichen IL-6R mit GFP und Messung durch Durchflusszytometrie nach einer Woche Inkubationszeit. Keine Separation unterschiedlicher Populationen mit verschiedenen IL-6R Dichten nachweisbar.

## 4 Diskussion

IL-6 wird mittlerweile als multifunktionales, pleiotropes Zytokin angesehen, welches eine Schlüsselrolle innerhalb des Immunsystems eines Individuums einnimmt. Von besonderer Relevanz ist das Verständnis über die Funktion von IL-6 bei der Entstehung von Autoimmunerkrankungen, wie zum Beispiel chronisch entzündlichen Darm-erkrankungen (Seegert *et al.* 2001), der Systemischen Lupus Erythematosus (SLE), der Rheumatoider Arthritis oder AIDS (Mackiewicz *et al.* 1992), ebenso wie bei der Entstehung verschiedener Krebsarten, wie beispielsweise eines Kolonkarzinoms (Scheller *et al.* 2014). Ebenfalls Gegenstand der Forschung ist es, inwieweit sich die unterschiedlichen intrazellulären Signalkaskaden auf die Entstehung solcher Erkrankungen auswirken. Bisher ist auch die grundlegende Frage, wie das Verhältnis von *classic-* zu *trans-signaling* ist und ob ein solches bei Dominanz eines der beiden Signalwege im Rahmen der Entstehung von Autoimmunerkrankungen eine Rolle spielt, unzureichend geklärt.

In dieser Arbeit wird die Frage nach der Balance zwischen IL-6 *classic-* und *trans-signaling* aufgegriffen und diskutiert. Grundlage dafür ist eine zuletzt aufgefallene Unstimmigkeit bezüglich der Menge an Komplexbildung zwischen IL-6 und dem sIL-6R. Ein bislang theoretisches Modell beruhte auf der Annahme der Berechnung von Komplexmengen mit einer zuvor beschriebenen Affinität von 0,5 - 2,3 nM von IL-6 zum sIL-6R (Zohlhöfer *et al.* 1992, Gaillard *et al.* 1999). Dies würde bedeuten, dass während entzündlicher Prozesse mit IL-6 Konzentrationen von 10 ng/ml und physiologischen sIL-6R Werten von 50 ng/ml rund 60-65% des IL-6 gebunden im Komplex mit dem sIL-6R vorliegen sollten (Baran *et al.* 2018). Im Umkehrschluss würde dies bedeuten, dass unter solchen Bedingungen verstärkt das *trans-signaling* abliefe.

Weitere Studien zeigen andere  $K_D$ -Werte zwischen 5 nM (Ward *et al.* 1996), 9 nM (Boulanger *et al.* 2003), 14 nM und 34 nM (Adams *et al.* 2017) zwischen IL-6 und dem sIL-6R auf. Baran *et al.* ermittelte in seiner Arbeit eine  $K_D$  von 22 nM für IL-6 zum sIL-6R und liegt damit in dem Bereich, der durch die vorangegangenen Publikationen definiert wird. Daraufhin ließ sich für diese Affinität die Menge an Komplexbildung aus IL-6 und dem sIL-6R berechnen und dies konnte mit *in vitro* gemessenen Werten verglichen werden. Im Gegensatz zu dem bisherigen Modell von Gaillard *et al.* (Gaillard *et al.* 1999) belief sich nach der Berechnung nach Baran *et al.* die theoretische Komplexkonzentration bei Konzentrationen von beispielsweise 10 ng/ml IL-6 und 50 ng/ml sIL-6R auf rund 4% (Baran *et al.* 2018). Die tatsächlich *in vitro* gemessene Komplexbildung hingegen liegt bei nur etwa 1%. Dies zeigt auf, dass die bislang angenommene Menge

an gebildetem Komplex aus IL-6 und dem sIL-6R laut Baran *et al.* als zu hoch eingeschätzt wurde (Baran *et al.* 2018). Somit scheint der Großteil an IL-6 frei im Serum vorzuliegen, was über *classic-signaling* induzierte antiinflammatorische Prozesse begünstigen würde (Scheller *et al.* 2011(b)).

Doch es stellt sich die Frage, inwieweit man von einer Komplexbildung zwischen IL-6 und dem sIL-6R auf das tatsächliche Verhältnis von *classic-* zu *trans-signaling* schließen kann. Zudem muss die Tatsache bedacht werden, dass es sowohl Zellen gibt, welche zu *classic-* und *trans-signaling* fähig sind, wie zum Beispiel Hepatozyten, als auch Zellen, welche ausschließlich durch *trans-signaling* aktiviert werden. Die von Baran *et al.* produzierten Daten lassen die Schlussfolgerung zu, dass selbst unter septischen Bedingungen das *trans-signaling* nur einen geringen Anteil am gesamten IL-6 *signaling* ausmacht.

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob und in welchem Verhältnis IL-6 *classic-* und *trans-signaling* bei annähernd physiologischen Konzentrationen ablaufen können. So konnte gezeigt werden, dass bei IL-6 Konzentrationen von 1 ng/ml und 50 ng/ml sIL-6R, wie sie bei leichteren Infektionen oder Autoimmunerkrankungen erreicht werden, *classic-signaling* überwiegt. Dieses macht mit rund 96% gegenüber 4% *trans-signaling* den wesentlich größeren Anteil aus. Bei Konzentrationen von 10 ng/ml IL-6 und 100 ng/ml sIL-6R hingegen, welche bei stärkeren Infektionen gemessen werden können, schrumpfte der Anteil an *classic-signaling* auf rund 60%; das *trans-signaling* machte demnach einen Anteil von 40% aus. Bei weiterer Steigerung der Konzentrationen auf 100 ng/ml IL-6 und 200 ng/ml sIL-6R, welche nur bei Patienten in septischem Zustand zu finden sind, liegen *classic-* und *trans-signaling* zu gleichen Anteilen vor.

Diese Einteilung der Konzentrationen an IL-6 und sIL-6R im Zusammenhang mit der Infektionsstärke werden ebenfalls von Baran *et al.* beschrieben. Dort heißt es, dass IL-6 Konzentrationen von 1-10 pg/ml im Serum von gesunden Individuen zu finden sind. Bei Individuen mit entzündlichen Erkrankungen, leichten bis schwereren Infektionen und Krebserkrankungen konnten Serumkonzentrationen im Bereich von 1-10 ng/ml IL-6 nachgewiesen werden. Bei einer Sepsis, also einer schwerwiegenden lebensbedrohlichen systemischen Infektion, fanden sich Serumkonzentrationen von 100-1000 ng/ml IL-6. Die Serumkonzentration des sIL-6R lässt sich hingegen nur von physiologischen Werten, welche zwischen 25-75 ng/ml liegen, auf das 2-3 fache steigern (Baran *et al.* 2018).

Anzumerken ist, dass diese Daten nur für die Situation im Blut sprechen, jedoch keine Aussage über die Konstellationen im Gewebe getroffen werden können. Es ist

wahrscheinlich, dass lokale Konzentrationen im Gewebe deutlich höher sind, weshalb *trans-signaling* möglicherweise eine entscheidende Rolle bei der Leberregeneration spielt. Fazel-Modares *et al.* konnten nachweisen, dass IL-6 *trans-signaling* eine vermehrte Induktion von *hepatocytes growth factor* (HGF) in hepatischen Sternzellen erzeugt. Dies hat wiederum eine Induktion der Hepatozytenproliferation, respektive der Leberregeneration zur Folge (Fazel-Modares *et al.* 2019). Diese Daten lassen vermuten, dass mit erhöhten Konzentrationen von IL-6 und sIL-6R, wie sie im Serum von autoimmunerkrankten Patienten oder bei Infektionen zu finden sind (Jones *et al.* 2011), der Anteil von *classic-signaling* abnimmt, während das Ausmaß des *trans-signaling* zunimmt.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass sich bei Konzentrationen im Bereich zwischen 1-10 ng/ml IL-6 ein Gleichgewicht aus *classic-* und *trans-signaling* einstellt. Zur genaueren Analyse wurde dieser Bereich noch weiter untersucht, um eine höhere Auflösung zu erzielen. Dafür wurden weitere Zwischenschritte zwischen 1 ng/ml und 10 ng/ml IL-6 eingefügt. Die Daten lassen vermuten, dass ab einer Konzentration von 5 ng/ml IL-6 maximales *trans-signaling* induziert wird. Bis zu diesem Punkt haben kleinste Konzentrationsveränderungen sehr viel größere Effekte auf das *Outcome* bezüglich der Menge an *trans-signaling* als hinter diesem Punkt. Zu vermuten ist, dass es einen Kippunkt geben könnte, einen sogenannten „*turnover*“, welcher die Grenze des hochsensiblen zu dem weniger sensiblen Bereich darstellt. Nach diesem „*turnover*“ stellt sich der oben beschriebene Sättigungseffekt ein.

Die Frage ist nun, wie sich diese Daten im Kontext der geringen Komplexbildung von IL-6 und dem sIL-6R, welche von Baran *et al.* aufgezeigt wurde, erklären lassen. Es gibt unzählige Faktoren, die im Rahmen des komplexen IL-6 *signaling* zum Tragen kommen. Dabei gibt es Mechanismen, die eine absolute Dominanz des *classic-signaling* gegenüber dem *trans-signaling* erklären können und wiederum Andere, die Daten dieser Arbeit unterstützen. Einige bekannte Mechanismen und Effekte werden nun im Folgenden dargestellt:

Mögliche Erklärungen, warum IL-6 *classic-signaling* bei niedrigen Konzentrationen überwiegt, könnten darin bestehen, dass *classic-signaling* effizienter aktiviert wird als *trans-signaling*, obwohl IL-6 die gleiche Affinität zum IL-6R wie zum sIL-6R hat. Müller-Newen *et al.* wies für das *trans-signaling* eine halbmaximale Proliferation von Ba/F3-gp130 Zellen bei 3 ng/ml IL-6 und 10 ng/ml sIL-6R nach. Für das *classic-signaling* erzielte er eine halbmaximale Proliferation von Ba/F3-gp130-IL-6R Zellen schon bei 0,2 ng/ml IL-6 (Müller-Newen *et al.* 1996).

Für eine Dominanz des *classic-signaling* spricht ebenfalls das von Baran *et al.* hypothetisch konzipierte Bindungsschrittmodell. Demnach könnte es auf der Zelloberfläche von Zellen, die den IL-6R tragen, präformierte Komplexe aus dem IL-6R und gp130 geben. Dies begünstigt im Falle des *classic-signaling* einen enorm schnellen Bindungsablauf, sobald sich IL-6 der Zelle nähert. Baran *et al.* schlägt hier ein sogenanntes Ein-Bindungsschrittmodell für das *classic-signaling* vor. Durch die hypothetisch präformierten Komplexe findet die Bindung zwischen IL-6 und dem IL-6R zeitgleich mit der Bindung des IL-6R und gp130 statt. Für das *trans-signaling* schlägt Baran *et al.* hingegen ein sogenanntes Zwei-Bindungsschrittmodell vor. Dabei findet zuerst die Bindung zwischen IL-6 und dem sIL-6R statt und im Anschluss die Bindung zwischen dem sIL-6R und gp130 (Baran *et al.* 2018).

Hier wird deutlich, dass es schwierig zu bewerten ist, welche Effekte in welchem Maße Einfluss auf die physiologischen Effekte haben. Einerseits lässt die Annahme der langsamer ablaufenden Bindung vermuten, dass *classic-signaling* die dominierende Variante ist. Andererseits scheint dieser langsamere Vorgang zeitgleich den Effekt zu haben, die Zellen über längere Zeit zu stimulieren, das Gewicht demnach auf Seiten des *trans-signaling* zu verschieben. Hepatozyten tragen eine ca. sechsfach (Zohlhöfer *et al.* 1992) bis zehnfach höhere Menge an gp130 auf ihrer Zelloberfläche als IL-6R (Rose-John *et al.* 1990). Das *classic-signaling* ist somit durch die verhältnismäßig geringe Anzahl an IL-6R limitiert. Beim *trans-signaling* gibt es solch eine Limitierung nicht, da die Konzentration des sIL-6R dynamisch gesteigert werden kann. Durch diesen Effekt würde das *trans-signaling* mit steigender Konzentration an IL-6 im Verhältnis zum *classic-signaling*, welches ab einem gewissen Punkt eine Sättigung erfahren würde, immer stärker werden. Es scheint also auch einen Unterschied zwischen *classic-* und *trans-signaling* in der Stärke der Signalweiterleitung in die Zelle zu geben, welche abhängig von der IL-6 Konzentration ist (Rose-John *et al.* 2017).

Reeh *et al.* zeigen ebenfalls auf, dass das Verhältnis von IL-6R zu gp130 von enormer Wichtigkeit ist. Beim *classic-signaling* limitiert der IL-6R die Stärke der STAT3 Aktivierung. Außerdem sei durch IL-6 induziertes *trans-signaling* potenter als durch IL-6 induziertes *classic-signaling* (Reeh *et al.* 2019). Die Frage, inwieweit die von Baran *et al.* bestimmte niedrige Komplexbildung von maximal 10% aus IL-6:sIL-6R (Baran *et al.* 2018) den Effekt der Limitierung membrangebundener IL-6R wieder aufhebt, bleibt noch unbeantwortet.

Ebenfalls dem *trans-signaling* entgegengesetzt steht eine Hypothese Schroers *et al.*, welche besagt, dass hohe Konzentrationen von IL-6 im Serum zu hexameren IL-6<sub>2</sub>/sIL-

6R<sub>2</sub>/gp130<sub>2</sub> Komplexen führen könnten, welche biologisch inaktiv sind (Schroers *et al.* 2005). Dies würde allerdings bedeuten, dass unter entzündlichen oder sogar septischen Bedingungen das *trans-signaling* mit steigender IL-6 Konzentration immer unwahrscheinlicher werden würde. Faktisch gesehen bedingen jedoch höhere IL-6 Konzentrationen auch eine Steigerung der Konzentration an sIL-6R (Rabe *et al.* 2008, Scheller *et al.* 2011(b)). Diese erhöhten Konzentrationen wiederum treten bekanntlich bei pathophysiologischen Prozessen im Körper auf und führen vermutlich zu einer Steigerung des *trans-signaling* (Mackiewicz *et al.* 1992, Garbers *et al.* 2014, Scheller *et al.* 2014).

Zytokine der IL-6 Familie haben eine hohe klinische Relevanz. So konnte IL-6 beispielsweise als sensitiver und spezifischer diagnostischer Marker für die frühe Diagnose der Neonatalen Sepsis mit *PROM (premature rupture of the membranes)* identifiziert werden (Qui *et al.* 2018). Des Weiteren wurden Zytokine der IL-6 Familie als Biomarker für verschiedene Krebsarten identifiziert. Es gibt eine klare Korrelation von zu hohen Werten der jeweiligen Zytokine mit dem Auftreten einer Krebsdiagnose, dessen Prognose und dem Fortschreiten der Erkrankung (Unver *et al.* 2018).

Ein ganz aktuelles Beispiel, welches die hohe Relevanz von IL-6 als essentiellen Entzündungsmediator verdeutlicht, ist die globale COVID-19 (*coronavirus disease 2019*) Pandemie. Die durch das Coronavirus SARS-CoV-2 (*severe acute respiratory syndrome coronavirus type 2*) verursachte Infektionserkrankung wurde erstmals im Dezember 2019 in Wuhan beschrieben und kann schwere pulmonale Symptomatiken auslösen, die sogar bis zum Tod führen können. Innerhalb weniger Wochen verbreitete sich diese Erkrankung über den gesamten Globus und führte zu weitreichenden und einschränkenden Maßnahmen, um dieser Pandemie Einhalt zu gebieten. Als großes Problem stellte sich dabei die Hospitalisierung von Menschen mit durch SARS-CoV-2 verursachten Symptomen heraus (Shi *et al.* 2020).

Eine besonders aufwendige intensivmedizinische Behandlung bedarf dabei dem ARDS (*Acute Respiratory Distress Syndrom*), welches zusammen mit dem Multiorganversagen zu den häufigsten Todesursachen einer SARS-CoV-2 Infektion zählt (Liu *et al.* 2020). Der Ursprung dieser lebensbedrohlichen Zustände ist auf eine unkontrollierte Überreaktion von proinflammatorischen Mediatoren wie dem IL-6 *signaling* auf eingedrungene Erreger zurückzuführen. Diese Überreaktion kann sich in einem *Cytokine Release Syndrom (CRS)* bis hin zu der Maximalform dem *Cytokine Storm* äußern. Bei dieser Form werden so viele Zytokine im Organismus freigesetzt, dass es auch, nachdem der Erreger eliminiert wurde, nicht zu einem Abklingen der Immunreaktion

kommt. Die aktivierten Immunzellen bilden so noch nach einer abgeklungenen Infektion weiterhin Zytokine, Radikale und weitere Stoffe, die das Gewebe schädigen. Im schlimmsten Fall kommt es dann zu dem oben erwähnten ARDS oder einem Organversagen. Der IL-6 und sIL-6R Spiegel ist demnach durch solch eine inadäquate Überreaktion maßgeblich an der Sterblichkeit durch SARS-CoV-2 beteiligt (Lee *et al.* 2014, Liu *et al.* 2020).

Zudem wurde nachgewiesen, dass IL-6 bei Patienten mit einer SARS-CoV-2 Infektion signifikant erhöht ist und somit als Biomarker für die Schwere der Erkrankung eingesetzt werden kann (Liu *et al.* 2020). Diese Korrelation besteht nicht nur für SARS-CoV-2 Infektionen, sondern auch für andere SARS Erreger, wie bereits 2004 festgestellt wurde (Zhang *et al.* 2004).

Ähnlich wie bei einer Influenza A (H5N1) Infektion ist zu vermuten, dass die frühe Diagnosestellung eines CRS ebenfalls bei einer SARS-CoV-2 Infektion mit anschließender schneller Behandlung essentiell für ein positives *Outcome* ist (Henter *et al.* 2006). An dieser Stelle einer besonders frühen Detektion eines schweren Verlaufs durch einen Krankheitserreger nimmt IL-6 eine wichtige Rolle ein. Der IL-6 Spiegel im Blut ist nämlich schon wesentlich schneller nach einer Infektion erhöht als die klassischen Akute-Phase-Proteine, wie beispielsweise das C-reaktive Protein (CRP). Der IL-6 Spiegel kann also früher als das CRP oder andere Akute Phase Proteine auf eine Infektion hinweisen und beeinflusst dadurch das *Outcome* positiv. Allerdings ist davon auszugehen, dass IL-6 alleine nicht ausreichend für eine Vorhersage des Infektionsverlaufes ist (Noda-Nicolau *et al.* 2018). An dieser Stelle könnte eine Unterscheidung von IL-6 *classic*- und *trans-signaling* von entscheidender Bedeutung sein. Solch eine genauere Unterscheidung könnte eine spezifischere Differenzierung hinsichtlich der potentiellen Folgen einer Infektion sein.

Tocilizumab, ein monoklonaler Antikörper, der gegen den IL-6R gerichtet ist, ist bereits für die Behandlung von CAR-T induzierten CRS zugelassen (Tanaka *et al.* 2018). Durch die Neutralisation des IL-6R blockiert Tocilizumab gleichermaßen *classic*- und *trans-signaling*. Behandlungserfolge stellen sich dabei schon nach sehr kurzer Zeit ein. So konnte nach Gabe von 1-2 Dosen Tocilizumab ein positives Ansprechen bei 69% der Patienten innerhalb von 14 Tagen nachgewiesen werden. Den größten Nachteil dabei stellen Sekundärinfektionen bedingt durch die globale Hemmung des IL-6 *signaling* dar, welche eine prophylaktische Antibiotikagabe erforderlich machen (Lee *et al.* 2014). Um das Nebenwirkungsprofil zu minimieren, wäre es interessant zu sehen, ob auch ein spezifischer Hemmer des *trans-signaling*, wie beispielsweise das sich in der klinischen

Entwicklung befindliche Olamkicept (s. Abschnitt 1.4), eine Wirkung gegen die Symptome einer SARS-CoV-2 Infektion entfalten kann.

Dieses aktuelle Beispiel verdeutlicht die Relevanz der in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse. Die Unterscheidung zwischen IL-6 *classic-* und *trans-signaling* bringt nicht nur neue Erkenntnisse für das Grundverständnis der Wirkung von IL-6 im Organismus, sondern könnte auch zu einer genaueren Prognosefindung bei infektiösen Erkrankungen beitragen.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass mit steigendem IL-6 Spiegel die Rate an *trans-signaling* zunimmt und schon bei moderat erhöhter IL-6 Konzentration keine Dominanz des *classic-signaling* über das *trans-signaling* nachzuweisen ist. Mit der in dieser Arbeit generierten Assayplattform lassen sich konkrete Konzentrationsbereiche von IL-6 und dem sIL-6R ausmachen, in denen anteilmäßig *classic-* und *trans-signaling* unterschieden werden können. Im Kontext der zuvor präsentierten Daten lässt sich die Vermutung aufstellen, dass mit steigender Menge an IL-6 und sIL-6R das *trans-signaling* immer wahrscheinlicher wird.

## 5 Literatur- und Quellverzeichnis

- Adams, R., R. J. Burnley, C. R. Valenzano, O. Qureshi, C. Doyle, S. Lumb, M. Del Carmen Lopez, R. Griffin, D. McMillan, R. D. Taylor, C. Meier, P. Mori, L. M. Griffin, U. Wernery, J. Kinne, S. Rapecki, T. S. Baker, A. D. Lawson, M. Wright and A. Ettorre (2017). "Discovery of a junctional epitope antibody that stabilizes IL-6 and gp80 protein:protein interaction and modulates its downstream signaling." *Sci Rep* 7: 37716.
- Andus, T., T. Geiger, T. Hirano, H. Northoff, U. Ganter, J. Bauer, T. Kishimoto and P. C. Heinrich (1987). "Recombinant human B cell stimulatory factor 2 (BSF-2/IFN-beta 2) regulates beta-fibrinogen and albumin mRNA levels in Fao-9 cells." *FEBS Lett* 221(1): 18-22.
- Baran, P. (2018). "Quantifizierung von Interleukin-6/löslichen Interleukin-6 Rezeptorkomplexen und Etablierung eines Nanopartikel-Zelltracking Systems über synthetische Cargo-Internalisierungsrezeptoren". Dissertation
- Baran, P., S. Hansen, G. H. Waetzig, M. Akbarzadeh, L. Lamertz, H. J. Huber, M. R. Ahmadian, J. M. Moll and J. Scheller (2018). "The balance of interleukin (IL)-6, IL-6-soluble IL-6 receptor (sIL-6R), and IL-6·sIL-6R·sgp130 complexes allows simultaneous classic and trans-signaling." *J Biol Chem* 293(18): 6762-6775.
- 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.
- Braun, G. S., Y. Nagayama, Y. Maruta, F. Heymann, C. R. van Roeyen, B. M. Klinkhammer, P. Boor, L. Villa, D. J. Salant, U. Raffetseder, S. Rose-John, T. Ostendorf and J. Floege (2016). "IL-6 Trans-Signaling Drives Murine Crescentic GN." *J Am Soc Nephrol* 27(1): 132-142.
- Butler, J. L., R. J. Falkoff and A. S. Fauci (1984). "Development of a human T-cell hybridoma secreting separate B-cell growth and differentiation factors." *Proc Natl Acad Sci U S A* 81(8): 2475-2478.
- Calabrese, L. H. and S. Rose-John (2014). "IL-6 biology: implications for clinical targeting in rheumatic disease." *Nat Rev Rheumatol* 10(12): 720-727.
- Cao, L., B. Coventry, I. Goreshnik, B. Huang, W. Sheffler, J. S. Park, K. M. Jude, I. Marković, R. U. Kadam, K. H. G. Verschueren, K. Verstraete, S. T. R. Walsh, N. Bennett, A. Phal, A. Yang, L. Kozodoy, M. DeWitt, L. Picton, L. Miller, E. M. Strauch, N. D. DeBouver, A. Pires, A. K. Bera, S. Halabiya, B. Hammerson, W. Yang, S. Bernard, L. Stewart, I. A. Wilson, H. Ruohola-Baker, J. Schlessinger, S.

- Lee, S. N. Savvides, K. C. Garcia and D. Baker (2022). "Design of protein-binding proteins from the target structure alone." *Nature* 605(7910): 551-560.
- 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.
- Ellingsgaard, H., I. Hauselmann, B. Schuler, A. M. Habib, L. L. Baggio, D. T. Meier, E. Eppler, K. Bouzakri, S. Wueest, Y. D. Muller, A. M. Hansen, M. Reinecke, D. Konrad, M. Gassmann, F. Reimann, P. A. Halban, J. Gromada, D. J. Drucker, F. M. Gribble, J. A. Ehses and M. Y. Donath (2011). "Interleukin-6 enhances insulin secretion by increasing glucagon-like peptide-1 secretion from L cells and alpha cells." *Nat Med* 17(11): 1481-1489.
- Fazel Modares, N., R. Polz, F. Haghighi, L. Lamertz, K. Behnke, Y. Zhuang, C. Kordes, D. Häussinger, U. R. Sorg, K. Pfeffer, D. M. Floss, J. M. Moll, R. P. Piekorz, M. R. Ahmadian, P. A. Lang and J. Scheller (2019). "IL-6 Trans-signaling Controls Liver Regeneration After Partial Hepatectomy." *Hepatology* 70(6): 2075-2091.
- Febbraio, M. A., S. Rose-John and B. K. Pedersen (2010). "Is interleukin-6 receptor blockade the Holy Grail for inflammatory diseases?" *Clin Pharmacol Ther* 87(4): 396-398.
- Ferreira, R. C., D. F. Freitag, A. J. Cutler, J. M. Howson, D. B. Rainbow, D. J. Smyth, S. Kaptoge, P. Clarke, C. Boreham, R. M. Coulson, M. L. Pekalski, W. M. Chen, S. Onengut-Gumuscu, S. S. Rich, A. S. Butterworth, A. Malarstig, J. Danesh and J. A. Todd (2013). "Functional IL6R 358Ala allele impairs classical IL-6 receptor signaling and influences risk of diverse inflammatory diseases." *PLoS Genet* 9(4): e1003444.
- Fischer, M., J. Goldschmitt, C. Peschel, J. P. Brakenhoff, K. J. Kallen, A. Wollmer, J. Grötzinger and S. Rose-John (1997). "I. A bioactive designer cytokine for human hematopoietic progenitor cell expansion." *Nat Biotechnol* 15(2): 142-145.
- Gaillard, J., M. Pugnère, J. Tresca, J. Mani, B. Klein and J. Brochier (1999). "Interleukin-6 receptor signaling. II. Bio-availability of interleukin-6 in serum." *Eur Cytokine Netw* 10(3): 337-344.
- Galun, E., E. Zeira, O. Pappo, M. Peters and S. Rose-John (2000). "Liver regeneration induced by a designer human IL-6/sIL-6R fusion protein reverses severe hepatocellular injury." *Faseb j* 14(13): 1979-1987.

- Garbers, C., N. Monhasery, S. Aparicio-Siegmund, J. Lokau, P. Baran, M. A. Nowell, S. A. Jones, S. Rose-John and J. Scheller (2014). "The interleukin-6 receptor Asp358Ala single nucleotide polymorphism rs2228145 confers increased proteolytic conversion rates by ADAM proteases." *Biochim Biophys Acta* 1842(9): 1485-1494.
- Garbers, C., B. Spudy, S. Aparicio-Siegmund, G. H. Waetzig, J. Sommer, C. Hölscher, S. Rose-John, J. Grötzinger, I. Lorenzen and J. Scheller (2013). "An interleukin-6 receptor-dependent molecular switch mediates signal transduction of the IL-27 cytokine subunit p28 (IL-30) via a gp130 protein receptor homodimer." *J Biol Chem* 288(6): 4346-4354.
- Garbers, C., W. Thaiss, G. W. Jones, G. H. Waetzig, I. Lorenzen, F. Guilhot, R. Lissilaa, W. G. Ferlin, J. Grötzinger, S. A. Jones, S. Rose-John and J. Scheller (2011). "Inhibition of classic signaling is a novel function of soluble glycoprotein 130 (sgp130), which is controlled by the ratio of interleukin 6 and soluble interleukin 6 receptor." *J Biol Chem* 286(50): 42959-42970.
- Garman, R. D., K. A. Jacobs, S. C. Clark and D. H. Raulet (1987). "B-cell-stimulatory factor 2 (beta 2 interferon) functions as a second signal for interleukin 2 production by mature murine T cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* 84(21): 7629-7633.
- 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.
- Gout, T., A. J. Ostör and M. K. Nisar (2011). "Lower gastrointestinal perforation in rheumatoid arthritis patients treated with conventional DMARDs or tocilizumab: a systematic literature review." *Clin Rheumatol* 30(11): 1471-1474.
- 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.
- Heink, S., N. Yogev, C. Garbers, M. Herwerth, L. Aly, C. Gasperi, V. Husterer, A. L. Croxford, K. Möller-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 T(H)17 cells." *Nat Immunol* 18(1): 74-85.
- Henter, J. I., C. B. Chow, C. W. Leung and Y. L. Lau (2006). "Cytotoxic therapy for severe avian influenza A (H5N1) infection." *Lancet* 367(9513): 870-873.
- Hibi, M., M. Murakami, M. Saito, T. Hirano, T. Taga and T. Kishimoto (1990). "Molecular cloning and expression of an IL-6 signal transducer, gp130." *Cell* 63(6): 1149-1157.
- Hirano, T., K. Yasukawa, H. Harada, T. Taga, Y. Watanabe, T. Matsuda, S. Kashiwamura, K. Nakajima, K. Koyama, A. Iwamatsu and et al. (1986). "Complementary DNA for a novel human interleukin (BSF-2) that induces B lymphocytes to produce immunoglobulin." *Nature* 324(6092): 73-76.
- Jones, S. A., D. Novick, S. Horiuchi, N. Yamamoto, A. J. Szalai and G. M. Fuller (1999). "C-reactive protein: a physiological activator of interleukin 6 receptor shedding." *J Exp Med* 189(3): 599-604.
- Jones, S. A. and S. Rose-John (2002). "The role of soluble receptors in cytokine biology: the agonistic properties of the sIL-6R/IL-6 complex." *Biochim Biophys Acta* 1592(3): 251-263.
- Jones, S. A., J. Scheller and S. Rose-John (2011). "Therapeutic strategies for the clinical blockade of IL-6/gp130 signaling." *J Clin Invest* 121(9): 3375-3383.
- Jostock, T., J. Müllberg, S. Ozbek, R. Atreya, G. Blinn, N. Voltz, M. Fischer, M. F. Neurath and S. Rose-John (2001). "Soluble gp130 is the natural inhibitor of soluble interleukin-6 receptor transsignaling responses." *Eur J Biochem* 268(1): 160-167.
- Kang, S., T. Tanaka, M. Narazaki and T. Kishimoto (2019). "Targeting Interleukin-6 Signaling in Clinic." *Immunity* 50(4): 1007-1023.
- Kawano, M., T. Hirano, T. Matsuda, T. Taga, Y. Horii, K. Iwato, H. Asaoku, B. Tang, O. Tanabe, H. Tanaka and et al. (1988). "Autocrine generation and requirement of BSF-2/IL-6 for human multiple myelomas." *Nature* 332(6159): 83-85.
- Kishimoto, T. (2005). "Interleukin-6: from basic science to medicine--40 years in immunology." *Annu Rev Immunol* 23: 1-21.
- Lee, D. W., R. Gardner, D. L. Porter, C. U. Louis, N. Ahmed, M. Jensen, S. A. Grupp and C. L. Mackall (2014). "Current concepts in the diagnosis and management of cytokine release syndrome." *Blood* 124(2): 188-195.
- Levy, D. E. and J. E. Darnell, Jr. (2002). "Stats: transcriptional control and biological impact." *Nat Rev Mol Cell Biol* 3(9): 651-662.

- Liu, B., M. Li, Z. Zhou, X. Guan and Y. Xiang (2020). "Can we use interleukin-6 (IL-6) blockade for coronavirus disease 2019 (COVID-19)-induced cytokine release syndrome (CRS)?" *J Autoimmun* 111: 102452.
- Lotz, M., F. Jirik, P. Kabouridis, C. Tsoukas, T. Hirano, T. Kishimoto and D. A. Carson (1988). "B cell stimulating factor 2/interleukin 6 is a costimulant for human thymocytes and T lymphocytes." *J Exp Med* 167(3): 1253-1258.
- Luig, M., M. A. Kluger, B. Goerke, M. Meyer, A. Nosko, I. Yan, J. Scheller, H. W. Mittrücker, S. Rose-John, R. A. Stahl, U. Panzer and O. M. Steinmetz (2015). "Inflammation-Induced IL-6 Functions as a Natural Brake on Macrophages and Limits GN." *J Am Soc Nephrol* 26(7): 1597-1607.
- Mackiewicz, A., H. Schooltink, P. C. Heinrich and S. Rose-John (1992). "Complex of soluble human IL-6-receptor/IL-6 up-regulates expression of acute-phase proteins." *J Immunol* 149(6): 2021-2027.
- Miyaura, C., K. Onozaki, Y. Akiyama, T. Taniyama, T. Hirano, T. Kishimoto and T. Suda (1988). "Recombinant human interleukin 6 (B-cell stimulatory factor 2) is a potent inducer of differentiation of mouse myeloid leukemia cells (M1)." *FEBS Lett* 234(1): 17-21.
- Molden, J., Y. Chang, Y. You, P. S. Moore and M. A. Goldsmith (1997). "A Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus-encoded cytokine homolog (vIL-6) activates signaling through the shared gp130 receptor subunit." *J Biol Chem* 272(31): 19625-19631.
- Müller-Newen, G., C. Köhne, R. Keul, U. Hemmann, W. Müller-Esterl, J. Wijdenes, J. P. Brakenhoff, M. H. Hart and P. C. Heinrich (1996). "Purification and characterization of the soluble interleukin-6 receptor from human plasma and identification of an isoform generated through alternative splicing." *Eur J Biochem* 236(3): 837-842.
- Murakami, M., D. Kamimura and T. Hirano (2019). "Pleiotropy and Specificity: Insights from the Interleukin 6 Family of Cytokines." *Immunity* 50(4): 812-831.
- Noda-Nicolau, N. M., J. Poletini, M. G. da Silva, M. R. Peltier and R. Menon (2018). "Polybacterial stimulation suggests discrete IL-6/IL-6R signaling in human fetal membranes: Potential implications on IL-6 bioactivity." *J Reprod Immunol* 126: 60-68.
- Nordan, R. P. and M. Potter (1986). "A macrophage-derived factor required by plasmacytomas for survival and proliferation in vitro." *Science* 233(4763): 566-569.

- Nowell, M. A., A. S. Williams, S. A. Carty, J. Scheller, A. J. Hayes, G. W. Jones, P. J. Richards, S. Slinn, M. Ernst, B. J. Jenkins, N. Topley, S. Rose-John and S. A. Jones (2009). "Therapeutic targeting of IL-6 trans signaling counteracts STAT3 control of experimental inflammatory arthritis." *J Immunol* 182(1): 613-622.
- Oberg, H. H., D. Wesch, S. Grüssel, S. Rose-John and D. Kabelitz (2006). "Differential expression of CD126 and CD130 mediates different STAT-3 phosphorylation in CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> and CD25<sup>high</sup> regulatory T cells." *Int Immunol* 18(4): 555-563.
- 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.
- Peters, M., G. Blinn, T. Jostock, P. Schirmacher, K. H. Meyer zum Büschenfelde, P. R. Galle and S. Rose-John (2000). "Combined interleukin 6 and soluble interleukin 6 receptor accelerates murine liver regeneration." *Gastroenterology* 119(6): 1663-1671.
- Pflanz, S., L. Hibbert, J. Mattson, R. Rosales, E. Vaisberg, J. F. Bazan, J. H. Phillips, T. K. McClanahan, R. de Waal Malefyt and R. A. Kastelein (2004). "WSX-1 and glycoprotein 130 constitute a signal-transducing receptor for IL-27." *J Immunol* 172(4): 2225-2231.
- Qiu, X., L. Zhang, Y. Tong, Y. Qu, H. Wang and D. Mu (2018). "Interleukin-6 for early diagnosis of neonatal sepsis with premature rupture of the membranes: A meta-analysis." *Medicine (Baltimore)* 97(47): e13146.
- Rabe, B., A. Chalaris, U. May, G. H. Waetzig, D. Seegert, A. S. Williams, S. A. Jones, S. Rose-John and J. Scheller (2008). "Transgenic blockade of interleukin 6 transsignaling abrogates inflammation." *Blood* 111(3): 1021-1028.
- Reeh, H., N. Rudolph, U. Billing, H. Christen, S. Streif, E. Bullinger, M. Schliemann-Bullinger, R. Findeisen, F. Schaper, H. J. Huber and A. Dittrich (2019). "Response to IL-6 trans- and IL-6 classic signalling is determined by the ratio of the IL-6 receptor  $\alpha$  to gp130 expression: fusing experimental insights and dynamic modelling." *Cell Commun Signal* 17(1): 46.
- Ridker, P. M. (2009). "C-reactive protein: eighty years from discovery to emergence as a major risk marker for cardiovascular disease." *Clin Chem* 55(2): 209-215.
- 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. (2018). "Interleukin-6 Family Cytokines." *Cold Spring Harb Perspect Biol* 10(2).

- Rose-John, S., J. Scheller and F. Schaper (2015). "'Family reunion'--A structured view on the composition of the receptor complexes of interleukin-6-type and interleukin-12-type cytokines." *Cytokine Growth Factor Rev* 26(5): 471-474.
- Rose-John, S., H. Schooltink, D. Lenz, E. Hipp, G. Dufhues, H. Schmitz, X. Schiel, T. Hirano, T. Kishimoto and P. C. Heinrich (1990). "Studies on the structure and regulation of the human hepatic interleukin-6 receptor." *Eur J Biochem* 190(1): 79-83.
- Rose-John, S., K. Winthrop and L. Calabrese (2017). "The role of IL-6 in host defence against infections: immunobiology and clinical implications." *Nat Rev Rheumatol* 13(7): 399-409.
- Satoh, T., S. Nakamura, T. Taga, T. Matsuda, T. Hirano, T. Kishimoto and Y. Kaziro (1988). "Induction of neuronal differentiation in PC12 cells by B-cell stimulatory factor 2/interleukin 6." *Mol Cell Biol* 8(8): 3546-3549.
- Schaper, F. and S. Rose-John (2015). "Interleukin-6: Biology, signaling and strategies of blockade." *Cytokine Growth Factor Rev* 26(5): 475-487.
- Scheller, J., A. Chalaris, C. Garbers and S. Rose-John (2011(a)). "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(b)). "The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6." *Biochimica et biophysica acta* 1813(5): 878-888.
- Scheller, J., C. Garbers and S. Rose-John (2014). "Interleukin-6: from basic biology to selective blockade of pro-inflammatory activities." *Semin Immunol* 26(1): 2-12.
- Schmidt-Arras, D. and S. Rose-John (2016). "IL-6 pathway in the liver: From physiopathology to therapy." *J Hepatol* 64(6): 1403-1415.
- Schreiber, S., K. Aden, J. P. Bernardes, C. Conrad, F. Tran, H. Höper, V. Volk, N. Mishra, J. I. Blase, S. Nikolaus, J. Bethge, T. Kühbacher, C. Röcken, M. Chen, I. Cottingham, N. Petri, B. B. Rasmussen, J. Lokau, L. Lenk, C. Garbers, F. Feuerhake, S. Rose-John, G. H. Waetzig and P. Rosenstiel (2021). "Therapeutic Interleukin-6 Trans-signaling Inhibition by Olamkicept (sgp130Fc) in Patients With Active Inflammatory Bowel Disease." *Gastroenterology* 160(7): 2354-2366.e2311.
- Schroers, A., O. Hecht, K. J. Kallen, M. Pachta, S. Rose-John and J. Grötzinger (2005). "Dynamics of the gp130 cytokine complex: a model for assembly on the cellular membrane." *Protein Sci* 14(3): 783-790.

- Seegert, D., P. Rosenstiel, H. Pfahler, P. Pfefferkorn, S. Nikolaus and S. Schreiber (2001). "Increased expression of IL-16 in inflammatory bowel disease." *Gut* 48(3): 326-332.
- Selmi, C., A. Ceribelli, S. M. Naguwa, L. Cantarini and Y. Shoenfeld (2015). "Safety issues and concerns of new immunomodulators in rheumatology." *Expert Opin Drug Saf* 14(3): 389-399.
- Shi, Y., G. Wang, X. P. Cai, J. W. Deng, L. Zheng, H. H. Zhu, M. Zheng, B. Yang and Z. Chen (2020). "An overview of COVID-19." *J Zhejiang Univ Sci B* 21(5): 343-360.
- Suthaus, J., N. Adam, J. Grötzinger, J. Scheller and S. Rose-John (2011). "Viral Interleukin-6: Structure, pathophysiology and strategies of neutralization." *Eur J Cell Biol* 90(6-7): 495-504.
- Taga, T., M. Hibi, Y. Hirata, K. Yamasaki, K. Yasukawa, T. Matsuda, T. Hirano and T. Kishimoto (1989). "Interleukin-6 triggers the association of its receptor with a possible signal transducer, gp130." *Cell* 58(3): 573-581.
- Taga, T. and T. Kishimoto (1997). "Gp130 and the interleukin-6 family of cytokines." *Annu Rev Immunol* 15: 797-819.
- Tanaka, T., M. Narazaki and T. Kishimoto (2018). "Interleukin (IL-6) Immunotherapy." *Cold Spring Harb Perspect Biol* 10(8).
- Tosato, G., K. B. Seamon, N. D. Goldman, P. B. Sehgal, L. T. May, G. C. Washington, K. D. Jones and S. E. Pike (1988). "Monocyte-derived human B-cell growth factor identified as interferon-beta 2 (BSF-2, IL-6)." *Science* 239(4839): 502-504.
- Unver, N. and F. McAllister (2018). "IL-6 family cytokines: Key inflammatory mediators as biomarkers and potential therapeutic targets." *Cytokine Growth Factor Rev* 41: 10-17.
- Van Snick, J., S. Cayphas, A. Vink, C. Uyttenhove, P. G. Coulie, M. R. Rubira and R. J. Simpson (1986). "Purification and NH<sub>2</sub>-terminal amino acid sequence of a T-cell-derived lymphokine with growth factor activity for B-cell hybridomas." *Proc Natl Acad Sci U S A* 83(24): 9679-9683.
- Van Snick, J., A. Vink, S. Cayphas and C. Uyttenhove (1987). "Interleukin-HP1, a T cell-derived hybridoma growth factor that supports the in vitro growth of murine plasmacytomas." *J Exp Med* 165(3): 641-649.
- Yamaguchi, M., M. Michishita, K. Hirayoshi, K. Yasukawa, M. Okuma and K. Nagata (1992). "Down-regulation of interleukin 6 receptors of mouse myelomonocytic leukemic cells by leukemia inhibitory factor." *J Biol Chem* 267(31): 22035-22042.

- Yamasaki, K., T. Taga, Y. Hirata, H. Yawata, Y. Kawanishi, B. Seed, T. Taniguchi, T. Hirano and T. Kishimoto (1988). "Cloning and expression of the human interleukin-6 (BSF-2/IFN beta 2) receptor." *Science* 241(4867): 825-828.
- Zegeye, M. M., M. Lindkvist, K. Fälker, A. K. Kumawat, G. Paramel, M. Grenegård, A. Sirsjö and L. U. Ljungberg (2018). "Activation of the JAK/STAT3 and PI3K/AKT pathways are crucial for IL-6 trans-signaling-mediated pro-inflammatory response in human vascular endothelial cells." *Cell Commun Signal* 16(1): 55.
- Zhang, H., P. Neuhöfer, L. Song, B. Rabe, M. Lesina, M. U. Kurkowski, M. Treiber, T. Wartmann, S. Regnér, H. Thorlacijs, D. Saur, G. Weirich, A. Yoshimura, W. Halang, J. P. Mizgerd, R. M. Schmid, S. Rose-John and H. Algül (2013). "IL-6 trans-signaling promotes pancreatitis-associated lung injury and lethality." *J Clin Invest* 123(3): 1019-1031.
- Zhang, Y., J. Li, Y. Zhan, L. Wu, X. Yu, W. Zhang, L. Ye, S. Xu, R. Sun, Y. Wang and J. Lou (2004). "Analysis of serum cytokines in patients with severe acute respiratory syndrome." *Infect Immun* 72(8): 4410-4415.
- Zohlnhöfer, D., L. Graeve, S. Rose-John, H. Schooltink, E. Dittrich and P. C. Heinrich (1992). "The hepatic interleukin-6 receptor. Down-regulation of the interleukin-6 binding subunit (gp80) by its ligand." *FEBS Lett* 306(2-3): 219-222.

## 6 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

### 6.1 Abbildungsverzeichnis

**Abbildung 1.1:** Schematische Darstellung der Signalarten, die durch Interleukin-6 induziert werden.

**Abbildung 3.1:** Schematische Darstellung des Mono-Kulturansatzes zur simultanen Messung von *classic*- und *trans-signaling*.

**Abbildung 3.2:** Nachweis von IL-6-GFP-TEV-Fc.

**Abbildung 3.3:** Nachweis von sIL-6R-miRFP670-Fc mittels Western Blot.

**Abbildung 3.4:** Schematische Darstellung des Ko-Kulturansatzes zur simultanen Messung von *classic*- und *trans-signaling*.

**Abbildung 3.5:** Nachweis von Ba/F3-gp130-GFP Zellen und Ba/F3-gp130-IL-6R Zellen mittels Durchflusszytometrie.

**Abbildung 3.6:** In Anwesenheit von IL-6 und sIL-6R können sowohl *classic*- als auch *trans-signaling* induziert werden.

**Abbildung 3.7:** In Anwesenheit von IL-6 und sIL-6R können sowohl *classic*- als auch *trans-signaling* induziert werden.

**Abbildung 3.8:** Konzentration  $\geq 5$  ng/ml IL-6 ermöglichen maximales IL-6 *trans-signaling*.

**Abbildung 3.9:** Messung von pSTAT3 mittels intrazellulärer Durchflusszytometrie.

**Abbildung 3.10:** Separation von Ba/F3-gp130-IL-6R Zellen mit unterschiedlichen IL-6R Leveln auf ihrer Zelloberfläche.

### 6.2 Tabellenverzeichnis

**Tabelle 2.1:** Primäre Antikörper

**Tabelle 2.2:** Sekundäre Antikörper

**Tabelle 2.3:** Verwendete Chemikalien

**Tabelle 2.4:** Verwendete Geräte

**Tabelle 2.5:** Verwendete Kits

**Tabelle 2.6:** Verwendete Oligonukleotide

**Tabelle 2.7:** Verwendete Plasmide

**Tabelle 2.8:** Verwendete rekombinante Proteine

**Tabelle 2.9:** Verwendete Verbrauchsmaterialien

**Tabelle 2.10:** Verwendeter *E.coli*-Stamm

**Tabelle 2.11:** Verwendete Zelllinien

**Tabelle 2.12:** Pipettierschema des in Abschnitt 3.2 skizzierten Assaysystems

**Tabelle 3.1:** Pipettierschema des in Abschnitt 3.5 skizzierten Assaysystems

**Tabelle 3.2:** Proliferationsraten von Ba/F3-gp130-hygro-GFP Zellen nach Stimulation mit IL-6 und sIL-6R im Ko-Kulturansatz

**Tabelle 3.3:** Proliferationsraten von Ba/F3-gp130-GFP Zellen nach Stimulation mit IL-6 und sIL-6R im Ko-Kulturansatz

## **Danksagung**

Zuallererst möchte ich herzlich meinem Doktorvater Prof. Dr. Jürgen Scheller und meiner Co-Betreuerin Prof. Dr. Martina Krüger für das Ermöglichen meiner Dissertation danken.

Außerdem möchte ich besonders Dr. Jens Moll für die Betreuung meines Projektes danken. Sowohl fachkundig als auch menschlich war der Austausch eine große Bereicherung für mich.

Ein weiterer Dank gilt PD Dr. Doreen Floß, die mir ebenfalls zu jeder Zeit mit Rat und Tat zur Seite gestanden hat.

Selbstverständlich möchte ich mich auch bei der gesamten Arbeitsgruppe bedanken, die durch den ständigen Wissensaustausch und Hilfsbereitschaft diese Arbeit bereichert hat.

Vielen Dank natürlich auch an Benedikt Löhr und Felix Steup für anregende Diskussionsrunden.

Vor allem aber möchte ich meinen Großeltern, meinen Eltern, meiner Schwester und meiner Freundin Linda Milmann für ihre bedingungslose Unterstützung und Liebe in allen Lebensbereichen danken.