

Untersuchungen der Rezeptoren Glykoprotein 130 und  
Interleukin-6 Rezeptor in Hinblick auf deren Komplexbildung,  
Signalwege und Präformation

Inaugural-Dissertation

Zur Erlangung des Doktorgrades  
Der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
Der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Vorgelegt von

**Christiane Seibel**

Düsseldorf, 11. April 2024  
Aus dem Institut für Molekularbiologie und Biochemie II  
Der Heinrich-Heine- Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. rer. nat. Jürgen Scheller  
Korreferent: Prof. Dr. rer. nat. Matias Zurbriggen

Tag der mündlichen Prüfung:

*Es ist dein Hirn, du dummer Vogel*

*Es ist verheert, verzerrt, verstört*

*Verstehe deine Vorurteile*

*Und sei über dich selbst empört*

*Erleuchtung kommt von neuem Wissen*

*Und nicht von Stolz und Fahnen hissen*

Der Taubenkönig

## Inhaltsverzeichnis

I. Abkürzungsverzeichnis .....	I
II. Abbildungsverzeichnis .....	III
III. Tabellenverzeichnis .....	V
IV. Formelverzeichnis .....	V
1. Einleitung .....	1
1.1 Zytokine.....	1
1.2 Interleukin-6 .....	1
1.3 Die IL-6 vermittelte Signaltransduktion.....	4
1.3.1 Formierung des signaltransduzierenden Komplex.....	5
1.3.2 Präformierte Komplexe auf der Zellmembran und die Beteiligung der TMD .....	7
1.3.3 Klassischer Signalweg .....	8
1.3.4 <i>Trans</i> -Signalweg .....	8
1.3.5 <i>Cluster</i> -Signalweg .....	9
1.4 Die IL-6 induzierte intrazelluläre Signaltransduktion.....	10
1.5 Die Rolle synthetischer Rezeptorsysteme in der Wissenschaft .....	11
2. Ziel der Arbeit .....	13
3. Material.....	14
3.1 Antibiotika .....	14
3.2 Antikörper.....	14
3.3 Chemikalien .....	15
3.4 Geräte.....	15
3.5 Kits.....	16
3.6 Kulturmedien .....	17
3.7 Oligonukleotide .....	17
3.8 Plasmide .....	19
3.9 Puffer und Lösungen.....	19
3.10 Verbrauchsmaterialen .....	21
3.11 Zelllinien und Bakterienstämme .....	22
3.12 Zytokine und Proteine .....	22
4. Methoden .....	24
4.1. Molekularbiologische Methoden .....	24
4.1.1 DNA-Gelelektrophorese.....	24
4.1.2 DNA-Extraktion aus Agarosegelen.....	24
4.1.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren und Proteinen .....	24

4.1.4	Restriktion von DNA .....	25
4.1.5	Dephosphorylierung von DNA.....	25
4.1.6	Phosphorylierung von DNA .....	25
4.1.7	Ligation von DNA-Fragmenten .....	26
4.1.8	Transformation von chemisch kompetenten <i>E.coli</i> Bakterien mit Plasmid DNA .....	26
4.1.9	Mini-Präparation von Plasmid-DNA.....	26
4.1.10	Midi-Präparation von Plasmid-DNA.....	27
4.1.11	mRNA-Isolation .....	27
4.1.12	Transkriptomanalyse .....	27
4.1.13	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	28
4.1.13.1	<i>Colony</i> Polymerase-Kettenreaktion (cPCR).....	29
4.1.13.2	<i>Splicing by Overlapping Extension</i> Polymerase-Kettenreaktion (SOE-PCR) .....	30
4.1.13.3	Real-Time Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) .....	31
4.1.14	DNA-Sequenzierung .....	32
4.2	Proteinbiochemische Methoden.....	33
4.2.1	Lyse von Ba/F3 Zellen .....	33
4.2.2	Bestimmung der Proteinkonzentration mittels <i>bicinchoninic acid</i> (BCA) .....	33
4.2.3	<i>Sodium dodecyl sulphate</i> -Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	33
4.2.4	Western Blot .....	34
4.2.5	Coomassie Färbung von SDS-Polyacrylamidgelen.....	35
4.2.6	Protein A-Affinitätschromatografie .....	35
4.2.7	StrepTactinXT Affinitätschromatografie .....	36
4.2.8	Co-Immunopräzipitation .....	37
4.3	Zellbiologische Methoden .....	37
4.3.1	Kultivierung von eukaryotischen Zellen .....	37
4.3.2	Transiente Transfektion von HEK293T Zellen .....	37
4.3.3	Retrovirale Transduktion .....	38
4.3.4	Durchflusszytometrie.....	38
4.3.5	Proliferationsexperiment .....	39
4.3.6	Stimulationsexperiment .....	39
4.3.7	Expression rekombinanter Proteine in Expi293 Zellen.....	40
4.3.8	Co-Immunopräzipitation mit Zellen.....	40
5.	Ergebnisse .....	41
5.1	Nachweis des hexameren Komplexes aus IL-6, IL-6R und gp130.....	41
5.2	Design der Rezeptorchimäre IL-6R <sub>EZD</sub> -gp130 <sub>TMD,IZD</sub> .....	48

5.2 Expression und Oberflächenpräsentation der Rezeptoren IL-6R <sup>EZD</sup> -gp130 <sup>TMD,IZD</sup> und gp130 <sub>10AS</sub> .....	51
5.3 Charakterisierung der IL-6R <sup>EZD</sup> -gp130 <sup>TMD,IZD</sup> .....	57
5.3.1 IL-6R <sup>EZD</sup> -gp130 <sup>TMD,IZD</sup> Rezeptorchimäre zeigt nur in Kombination mit dem WT gp130 eine biologische Aktivität .....	57
5.3.2 Die IZD des IL-6R <sup>EZD</sup> -gp130 <sup>TMD,IZD</sup> ist aktiv, das Transkriptionsmuster unterscheidet sich jedoch deutlich von der Zelllinie Ba/F3:gp130:IL-6R .....	64
5.4 Die Signaltransduktion eines synthetischen, trimeren IL-6-Rezeptorkomplexes deutet auf einen hexameren Rezeptoraufbau hin. ....	77
5.4 Die Transmembrandomäne von gp130 und IL-6R ist nachweislich nicht von Rezeptorhomo-/heterodimeren beteiligt .....	87
5.4.1 Die präformierten Rezeptorkomplexe aus IL-6R-und gp130 Rezeptormutanten können sich nur auf der Zelloberfläche, jedoch nicht im Zelllysate bilden. ....	88
5.4.2 Die präformierten Komplexe aus IL-6R-und gp130 Varianten bilden sich stimulationsunabhängig auf der Membran. ....	91
5.4.3 Unabhängig von der TMD kann der IL-6R präformierte Homodimere auf der Zellmembran bilden. ....	93
5.4.4 Die EZD der Rezeptoren IL-6R und gp130 bindet nicht unspezifisch .....	94
5.4.5 Die Domänen D1-D3 des gp130 sind für die Formierung der Dimere relevant. ....	95
Diskussion.....	99
6.1 Nachweis des hexameren Komplex (IL-6:IL-6R:gp130) durch lösliche Proteine .....	99
6.2 Nachweis neuartiger Phosphorylierungsmöglichkeiten der Januskinasen, sowie eine veränderte Signaltransduktion durch synthetische Rezeptoren. ....	101
6.3 Der Bindungsmodus des IL-6:IL-6R:gp130 Komplex unterliegt einer definierten Reihenfolge .....	106
6.4 EZD der IL-6R und gp130 Rezeptoren ist essentiell für die Bildung präformierter Komplexe auf der Zelloberfläche.....	107
7. Ausblick.....	109
8. Zusammenfassung .....	111
9. Summary .....	112
10. Literaturverzeichnis.....	113
11. Anhang.....	121
11.1 Klonierungen und Aminosäuresequenzen.....	121
11.1.1 IL-6R <sup>EZD</sup> -gp130 <sup>TMD,IZD</sup> .....	122
11.1.2 gp130 <sub>10AS</sub> .....	123
11.1.3. IL-6R <sup>EZD</sup> -gp130 <sup>TMD,IZD</sup> _P3V3.....	125
11.1.4 gp130_Box1,2 Rezeptors .....	127
11.1.5 gp130 <sup>Y190K,F191E</sup> .....	129
11.1.6 gp130 <sup>ΔD1</sup> .....	131

11.1.7 IL-6R <sub>Endo</sub> .....	132
11.1.8 IL-6R <sub>GPI</sub> .....	134
11.1.9 gp130 <sub>D1-3</sub> Myc .....	136
11.1.10 gp130 <sub>D2-3</sub> .....	137
11.1.11 gp130 <sub>D1</sub> .....	138
12. Eidesstattliche Versicherung .....	140
11. Danksagung .....	141

## I. Abkürzungsverzeichnis

(v/w) Volumen/Gewicht	Ig Immunglobulin
µg Mikrogramm	IL Interleukin
ADAM <i>A disintegrin and metalloprotease</i>	IL-6R Interleukin-6 Rezeptor
APS Ammoniumperoxodisulfat	IZD intrazelluläre Domäne
AS Aminosäure	Jak Januskinase
BiFC <i>bimolecular fluorescence complementation</i>	K <sub>d</sub> Dissoziationskonstante
BMFZ Biologisch-Medizinisches Forschungszentrum	kDa Kilodalton
bp Basenpaare	LIF <i>Leukemia inhibitory factor</i>
ca. circa	MAP <i>mitogen-activated protein</i>
CHR <i>cytokine-binding homology region</i>	MAPK <i>mitogen-activated protein kinase</i>
CLCF <i>Cardiotrophin-like cytokine factor 1</i>	mg/ml Milligramm/Milliliter
CNTF <i>Ciliary neurotrophic factor</i>	mIL-6R membranständiger Interleukin-6 Rezeptor
Co-IP Co-Immunopräzipitation	min Minuten
Csrp3 <i>Cysteine and glycine-rich protein 3</i>	ml Milliliter
CT-1 <i>Cardiotrophin 1</i>	mRNA <i>massanger RNA</i>
DMEM <i>Dulbeccos's modified eagel medium</i>	ng Nanogramm
DMSO <i>Dimethylsulfoxid</i>	nM Nanomol
DNA Desoxyribonukleinsäure	OSM <i>Oncostatin M</i>
<i>E. coli</i> <i>Escherichia coli</i>	PCR <i>polymerase chain reaction</i>
EpoR Erythropoetin Rezeptor	pDNA Plasmid-DNA
EZD extrazelluläre Domäne	pg Pikogramm
FACS <i>Fluorescence-activated cell sorting</i>	PHX partielle Hepatektomie
FBS Fetales Kälberserum	PI3K Phosphoinositid-3-Kinasen
Fc <i>fragment crystallizable region</i>	PIAS <i>Protein inhibitor of activated STAT</i>
FC <i>Fold Change</i>	PNK T4-Polynukleotidkinase
FnIII <i>Fibronectin type III</i>	PTP <i>Protein-tyrosine-phosphatase</i>
Fosb <i>FosB proto-oncogenic</i>	RT Raumtemperatur
FRET <i>fluorescence resonance energy transfer</i>	SDS-Gel <i>Sodium dodecyl sulfate polacrylamide gel electrophoresis</i>
gp130 Glykoprotein 130	sec Sekunden
Grb <i>Growth factor-receptor-bound protein</i>	SEC <i>size exlusion chromatography</i>
h Stunde	SHP2 <i>Src homology region 2 domain-containing phosphatase 2</i>

**sIL-6R** *soluble Interleukin-6 receptor*

**SOE-PCR** *Overlap extension polymerase chain reaction*

**SOS** *Son of sevenless*

**STAT** *signal transducers and activators of transcription*

**TMD** *Transmembrandomäne*

**Ts** *Twin-strep-tag*

**U** *Unit*

**Üs** *Überstand*

**ZBD** *Zytokin-bindende Domäne*

## II. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Übersicht der pathophysiologischen Wirkung von IL-6.....	2
Abbildung 2: Struktureller Aufbau des IL-6. ....	3
Abbildung 3: Übersicht über die zwei Entstehungshypothesen des Hexamers aus 2xIL-6:2xIL-6R:2xgp130.....	7
Abbildung 4: Schematische Abbildung des Klassischen-, Trans- und Cluster- Signalweg als signaltransduzierenden, hexameren Komplex dargestellt. ....	10
Abbildung 5: Schematische Übersicht über die IL-6 vermittelten Signaltransduktionswege.....	11
Abbildung 6: Schematische Darstellung des hexameren Komplex mit den Proteinen 2xIL-6 <sub>Flag/Myc-Ts</sub> :2xIL-6R <sub>Myc-Ts</sub> :2xsgp130. ....	42
Abbildung 7: Proteinreinigung von IL-6 <sub>Flag-Ts</sub> , IL-6 <sub>Myc-Ts</sub> , sIL-6R <sub>Myc-Ts</sub> und sIL-6R <sub>Myc-Fc</sub> . ....	43
Abbildung 8: Die gereinigten Proteine IL-6 Flag Ts, IL-6 Myc Ts und sIL-6R Myc Ts sind aktiv. ....	44
Abbildung 9: Der sIL-6R <sub>Myc-Fc</sub> zeigt eine geringe Aktivität. ....	45
Abbildung 10: Nachweis des hexameren Komplex mit den Proteinen 2xIL-6 <sub>Flag/Myc-Ts</sub> :2xIL-6R <sub>Myc-Ts</sub> :2xsgp130.....	47
Abbildung 11: Übersicht über die Klonierungsfragmente, welche zum IL-6R <sub>EZD-gp130</sub> <sub>TMD,IZD</sub> Fragment mittels PCR fusioniert wurde. ....	49
Abbildung 12: Die Ligation des IL-6R <sub>EZD-gp130</sub> <sub>TMD,IZD</sub> in einen pcDNA3.1(+) <sub>3xHA</sub> Vektor war erfolgreich. ....	50
Abbildung 13: Der IL-6R <sub>EZD-gp130</sub> <sub>TMD,IZD</sub> kann in HEK293T exprimiert werden. ....	50
Abbildung 14: Die Insertion des IL-6R <sub>EZD-gp130</sub> <sub>TMD,IZD</sub> in den pMOWS-(puro) Vektor war erfolgreich. ....	51
Abbildung 15: Schematische Darstellung des IL-6R <sub>EZD-gp130</sub> <sub>TMD,IZD</sub> . ....	52
Abbildung 16: Schematische Darstellung der tetrameren und hexameren Komplexbildung zwischen IL-6R <sub>EZD-gp130</sub> <sub>TMD,IZD</sub> und den gp130 Mutanten gp130 WT, gp130 <sub>GPI</sub> und gp130 <sub>10AS</sub> . ....	54
Abbildung 17: Ba/F3 Zellen exprimieren sowohl den IL-6R <sub>EZD-gp130</sub> <sub>TMD,IZD</sub> als auch den gp130 <sub>10AS</sub> Rezeptor auf der Zelloberfläche. ....	56
Abbildung 18: Der IL-6R <sub>EZD-gp130</sub> <sub>TMD,IZD</sub> Rezeptor kann ohne WT gp130 kein Signal transduzieren. ....	58
Abbildung 19: Schematische Abbildung der VHH6-(EAAAK) <sub>n</sub> -Fc Fusionsproteine und des forcierten Tetramers aus 2xIL-6:2:IL-6R <sub>EZD-gp130</sub> <sub>TMD,IZD</sub> . ....	60
Abbildung 20: Proteinreinigung der VHH6-(EAAAK) <sub>n</sub> -Fc Varianten ....	61
Abbildung 21: Die gereinigten VHH6-(EAAAK) <sub>n</sub> -Fc Fusionsproteine sind biologisch aktiv. ....	62
Abbildung 22: Mit Hilfe der VHH6-(EAAAK) <sub>n</sub> -Fc Fusionsproteine konnte keine Signaltransduktion durch den IL-6R <sub>EZD-gp130</sub> <sub>TMD,IZD</sub> Rezeptor induziert werden. ....	63
Abbildung 23: Schematische Abbildung der möglichen Rezeptorkonstellation aus IL-6R <sub>EZD-gp130</sub> <sub>TMD,IZD</sub> _P3V3 und gp130 <sub>Box1,2</sub> und einer möglichen Signaltransduktion. ....	66
Abbildung 24: Ba/F3 Zellen exprimieren IL-6R <sub>EZD-gp130</sub> <sub>TMD,IZD</sub> _P3V3 und gp130 <sub>Box1,2</sub> auf der Oberfläche. ....	68
Abbildung 25: Die IZD der Rezeptorchimäre IL-6R <sub>EZD-gp130</sub> <sub>TMD,IZD</sub> _P3V3 ist in Kombination mit gp130 <sub>Box1,2</sub> durch IL-6 aktiv. ....	71
Abbildung 26: Ba/F3:gp130 <sub>Box1,2</sub> :IL-6R <sub>EZD-gp130</sub> <sub>TMD,IZD</sub> _P3V3 zeigt im zeitlichen Verlauf einer IL-6 induzierten Stimulation ein abgeschwächtes Expressions- und Transkriptionsmuster im Vergleich zur Ba/F3:gp130:IL-6R Zelllinie. ....	73
Abbildung 27: Ba/F3:gp130 <sub>Box1,2</sub> :IL-6R <sub>EZD-gp130</sub> <sub>TMD,IZD</sub> _P3V3 Zellen zeigen während der Stimulation mit IL-6 ein eingeschränktes Transkriptionsmuster im Vergleich zur Kontrollzelllinie Ba/F3:gp130:IL-6R. ....	76

<b>Abbildung 28: Schematische Darstellung der Rezeptorkomplexe IL-6:IL-6R<sub>EZD</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub>:gp130<sub>Y190K,F191E</sub>, IL-6:IL-6R<sub>EZD</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub>:gp130<sub>AD1</sub> und HIL-6: gp130<sub>Y190K,F191E</sub>: gp130<sub>AD1</sub>.</b>	79
<b>Abbildung 29: Ba/F3 und Ba/F3:IL-6R<sub>EZD</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub> Zellen exprimieren sowohl den gp130<sub>Y190K,F191E</sub> als auch den gp130<sub>AD1</sub> Rezeptor auf der Zelloberfläche.</b>	81
<b>Abbildung 30: Nachweis der Rezeptoren gp130<sub>Y190K,F191E</sub> HA und gp130<sub>AD1</sub> Flag, welche von der Zelllinie Ba/F3:gp130<sub>Y190K,F191E</sub>:gp130<sub>AD1</sub> exprimiert werden.</b>	82
<b>Abbildung 31: Die Zelllinie Ba/F3:IL-6R<sub>EZD</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub>:gp130<sub>AD1</sub> zeigt eine stärkere Phosphorylierung der Signalproteine durch IL-6 als Ba/F3:IL-6R<sub>EZD</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub>:gp130<sub>Y190K,F191E</sub>.</b>	84
<b>Abbildung 32: Die Rezeptoren gp130<sub>Y190K,F191E</sub> und gp130<sub>AD1</sub> können ihr jeweiliges Defizit durch den anderen Rezeptor nicht ausgleichen.</b>	86
<b>Abbildung 33: Schematische Übersicht der Rezeptoren IL-6R<sub>wt</sub>, IL-6R<sub>Endo</sub> und IL-6R<sub>GPI</sub>, sowie gp130<sub>wt</sub>, gp130<sub>Endo</sub> und gp130<sub>GPI</sub>.</b>	88
<b>Abbildung 34: Die Rezeptoren können nur auf der Zelloberfläche, nicht aber im Lysat dimerisieren.</b>	90
<b>Abbildung 35: Die Heterodimere aus IL-6R und gp130 Rezeptormutanten bilden sich ohne IL-6 Stimulation auf der Zelloberfläche.</b>	92
<b>Abbildung 36: Die Transmembrandomäne ist nachweislich nicht in die Präformation der IL-6R:IL-6R Homodimere involviert.</b>	93
<b>Abbildung 37: Die extrazelluläre Domäne der Rezeptoren IL-6R und gp130 bindet nicht unspezifisch an Myc-GFP-nb-gp130.</b>	95
<b>Abbildung 38: Schematische Übersicht der gp130 Deletionsmutanten gp130<sub>D1-3</sub>, gp130<sub>D2-3</sub> und gp130<sub>D1</sub>.</b>	96
<b>Abbildung 39: Die Domänen D4-6 des gp130 haben keinen nachweisbaren Einfluss auf die Homodimerisierung zwischen gp130:gp130, wohl aber auf die Heterodimerisierung von IL-6R und gp130.</b>	97
<b>Abbildung 40: Die gp130 Domänen D1-3 können jeweils für sich mit den Domänen D1-3 des anderen gp130 interagieren.</b>	98
<b>Abbildung 41: Schematische Darstellung eines gp130:gp130 Komplex mit der Proteinstruktur der aktivierten Januskinasen.</b>	102
<b>Abbildung 42: Schematische Abbildung des signaltransduzierenden Komplex aus IL-6:IL-6R<sub>D1-3</sub>-gp130<sub>D4-6TMD,IZD</sub>, forciert über ein VHH6-Fusionsprotein.</b>	103
<b>Abbildung 43: Schematische Darstellung der AKT und ERK Aktivierung.</b>	105
<b>Abbildung 44: Klonierungsübersicht der Chimäre IL-6R<sub>EZD</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub>.</b>	122
<b>Abbildung 45: Klonierung des Expresssionsvektors gp130_10AS-pMOWS-(hygro).</b>	124
<b>Abbildung 46: Klonierungsstrategie des IL-6R<sub>EZD</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub>_P3V3.</b>	126
<b>Abbildung 47: Klonierungsschema des gp130_Box1,2.</b>	128
<b>Abbildung 48: Klonierungsschema des gp130<sub>Y190K,F191E</sub>.</b>	130
<b>Abbildung 49: Klonierungsschema des gp130<sub>AD1</sub>.</b>	131
<b>Abbildung 50: Klonierungsschema des IL-6R<sub>Endo</sub>.</b>	133
<b>Abbildung 51: Schematische Klonierungsübersicht.</b>	135
<b>Abbildung 52: Schematische Übersicht über das Klonierungsschema des gp130<sub>D1-3</sub>.</b>	137
<b>Abbildung 53: Schematische Übersicht das Klonierungsschema des gp130<sub>D2-3</sub>.</b>	138
<b>Abbildung 54: Schematische Übersicht das Klonierungsschema des gp130<sub>D2-3</sub>.</b>	139

### III. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Übersicht der verwendeten Antibiotika .....	14
Tabelle 2. Liste der in dieser Arbeit verwendeten Antikörper .....	14
Tabelle 3 Liste der verwendeten Chemikalien.....	15
Tabelle 4: Übersicht aller Geräte, welche in dieser Arbeit verwendet wurden. ....	16
Tabelle 5: Während der Arbeit verwendete Kits .....	17
Tabelle 6: Die untere Tabelle zeigt eine Auflistung aller verwendeten Medien während dieser Arbeit. ....	17
Tabelle 7: Sequenzen der Oligonukleotide welche in dieser Arbeit für die Sequenzierung und Klonierung der Plasmid DNA (pDNA) und Genfragmente verwendet wurden. ....	17
Tabelle 8: Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten oder klonierten Plasmide.....	19
Tabelle 9: Während der Arbeit verwendete Puffer und Lösungen. ....	19
Tabelle 10 Während der Arbeit verwendetes Verbrauchsmaterial.....	21
Tabelle 11 Auflistung der Zelllinien, welche in dieser Arbeit verwendet wurden. ....	22
Tabelle 12: Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten Zytokine und Proteine.....	22
Tabelle 13: Reaktionsansatz einer PCR mit der Phusion DNA-Polymerase.....	28
Tabelle 14: Beispiel eines PCR-Programms zur Amplifikation bestimmter DNA-Regionen mit der Phusion DNA-Polymerase.....	29
Tabelle 15: Reaktionsansatz für eine colony PCR.....	30
Tabelle 16: PCR-Programm für eine colony PCR.....	30
Tabelle 17: Programm zur Synthese von mRNA zu cDNA .....	32
Tabelle 18: Übersicht über die EC <sub>50</sub> -Werte des IL-6 ohne und in Kombination mit den VHH6-(EAAAK) <sub>n</sub> -Fc Fusionsproteinen .....	62

### IV. Formelverzeichnis

Formel 1: Lamert-Beersches Gesetz.....	24
Formel 2: Formel für den $\Delta C_t$ -Wert.....	32
Formel 3: Formel für den $\Delta\Delta C_t$ -Wert. ....	32

# 1. Einleitung

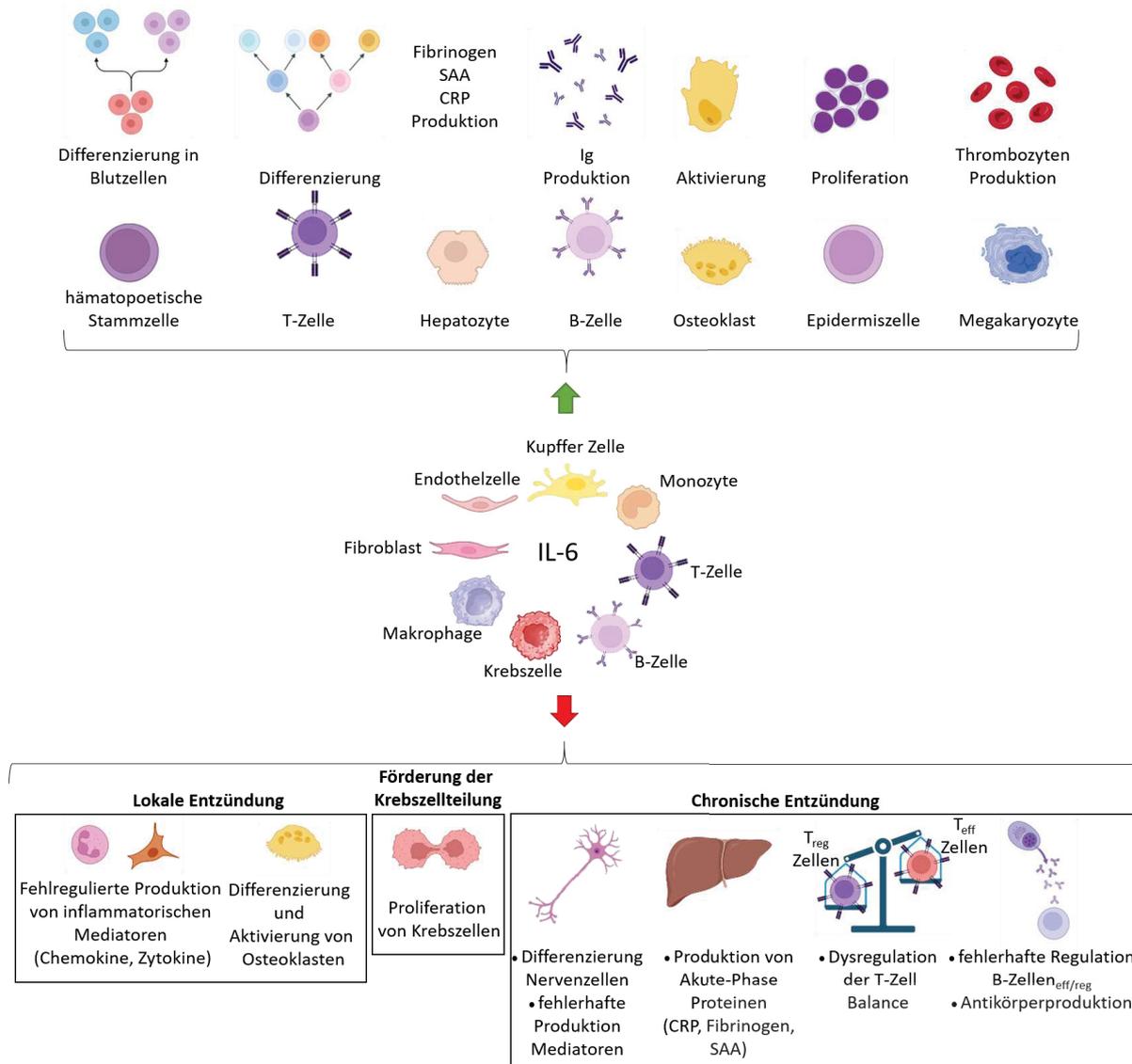
## 1.1 Zytokine

Zytokine weisen eine sehr hohe biologische Aktivität auf, sodass sie autokrin, parakrin und/oder endokrin wirken können. Im Allgemeinen sind es glykosylierte Polypeptide (15-25 kDa). Ein wichtiges Merkmal der Zytokine ist ihre Pleiotropie. Dies bedeutet, dass ein Zytokin an verschiedenen Zielorten unterschiedliche physiologische Effekte auslösen kann (Gordon *et al.* 1992). Eine Dysregulation der Zytokine kann daher zu pathologischen Veränderungen führen. So vermag ein Überschuss an pro-inflammatorischen Zytokinen zu Gewebeschäden sowie an der Entstehung von Autoimmunerkrankungen beteiligt sein (Arend 2001). Ein Überschuss an anti-inflammatorischen Zytokinen kann, wenn auch nur indirekt, zum Tumorwachstum beitragen (Sato *et al.* 1993).

## 1.2 Interleukin-6

Interleukin (IL)-6 gilt als klassisches pro-inflammatorisches Zytokin und wird von einer Bandbreite von Zelltypen wie T-Lymphozyten, B-Lymphozyten, Endothelzellen, Fibroblasten, Monozyten, Makrophagen, Kupffer-Zellen sowie einigen Tumorzellen sezerniert (Ataie-Kachoie *et al.* 2013). Aufgrund seines starken pleiotropen Charakters weist es nicht nur pro- sondern auch anti-inflammatorische Eigenschaften auf. Es ist an der Produktion von Akute-Phase Proteinen wie Serum Amyloid A beteiligt, unterstützt die B-Zellreifung, die Produktion von Immunglobulinen (Ig) und die Differenzierung von Makrophagen (Muraguchi *et al.* 1988, Hassan and Drexler 1995, Ataie-Kachoie *et al.* 2014). Des Weiteren initiiert und fördert es Entzündungen, indem es ebenfalls an der Produktion von Zytokinen mitwirkt, die beispielsweise für die Infiltration von Neutrophilen und Granulozyten involviert sind (Hashizume *et al.* 2011). Dies führt wiederum zu einer Sekretion von weiteren inflammatorischen Mediatoren (Abbildung 1). Die Transkription von IL-6 wird durch eine Vielzahl von Faktoren wie bakterielle Lipopolysaccharide, Viren, Verletzungen und Zytokine induziert (Isshiki *et al.* 1990, Margulies and Sehgal 1993, Park *et al.* 2004). Unter homöostatischen Bedingungen beträgt die IL-6 Konzentration im menschlichen Organismus im Plasma 1-10 pg/ml (Akira *et al.* 1993). Bei Infektionen, Tumorwachstum und chronischen Entzündungen kann die IL-6 Konzentration im Blutserum bis in einen niedrigen ng/ml Bereich

ansteigen. IL-6 Konzentration von 100-1000 ng/ml können zu einer tödlichen Sepsis führen (Franco *et al.* 2019).

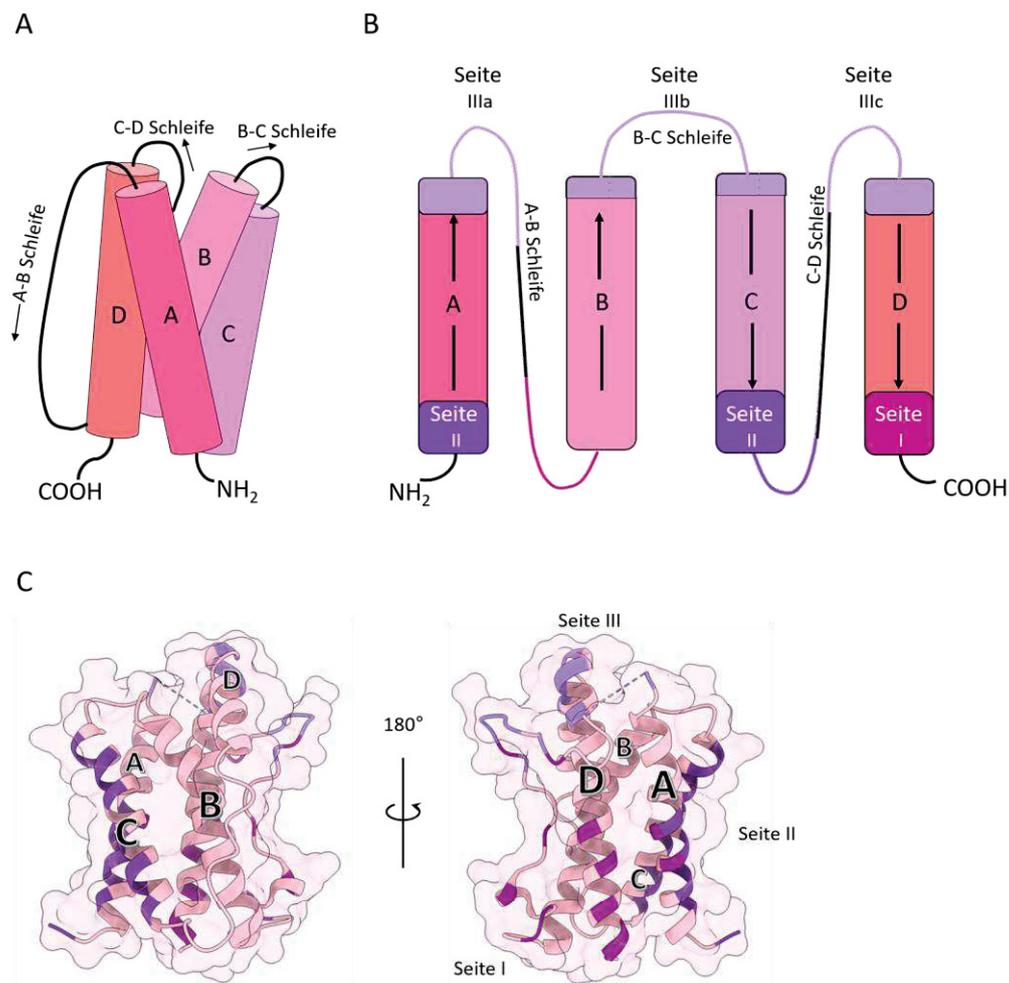


**Abbildung 1: Übersicht der pathophysiologischen Wirkung von IL-6.**

Schematische Darstellung von IL-6 produzierenden Zellen und welchen Einfluss IL-6 unter homöostatischen Bedingungen auf andere Zellen wie hämatopoetische Stammzellen (Differenzierung), T-Zellen (Differenzierung), Hepatozyten (Produktion von Serum Amyloid A (SAA), C-reaktives Protein (CRP) und Fibrinogen), B-Zellen (Ig Produktion), Osteoklasten (Aktivierung der Osteoklasten), Epidermiszellen (Proliferation) und Megakaryozyten (Produktion von Thrombozyten) ausübt. Des Weiteren sind die pro-inflammatorischen Eigenschaften wie lokale Entzündungen, sowie die pathologischen Folgen einer Dysregulation von IL-6 wie chronische Entzündungen aufgeführt. Für die Abbildungen wurden die Publikationen Naka, 2002 und Choy, 2020 als Vorlage verwendet (Naka *et al.* 2002, Choy *et al.* 2020). Erstellt mit BioRender.com.

IL-6 gehört zur Interleukin-6 Familie. Diese Familie umfasst die neun Zytokine IL-6, Interleukin-11 (IL-11), IL-27, IL-31, *Ciliary Neurotrophic Factor* (CNTF), *Oncostatin M* (OSM), *Leukemia Inhibitory Factor* (LIF), *Cardiotrophin 1* (CT-1) und *Cardiotrophin-like Cytokine Factor 1* (CLCF) (Gearing *et al.* 1987, Lin *et al.* 1989, Malik *et al.* 1989, Paul *et al.* 1990, Pennica *et al.* 1995). Zytokine wie IL-6 und IL-11 benötigen neben ihren alpha-( $\alpha$ ) Rezeptor, an welchen sie

zuerst binden um den ersten Schritt der Komplexbildung zu initiieren, mindestens einen signaltransduzierenden beta-( $\beta$ ) Rezeptor, Glykoprotein 130 (gp130), welcher für die Weiterleitung des Signals verantwortlich ist (Nakahara and Furue 2018). Aus struktureller Sicht ist IL-6 ein *single-chain* Glykoprotein mit einer charakteristischen vier-Helix-Bündel Struktur (A-D) in einer *up-up-down-down* Topologie (Abbildung 2 A, B).



**Abbildung 2: Struktureller Aufbau des IL-6.**

**A:** Schematische Darstellung des vier- $\alpha$ -Helix Bündels. (Vorlage (Rose-John 2020)) **B:** Schematische Darstellung des 4- $\alpha$ -Helix Bündels aufgefaltet. Gekennzeichnet sind die jeweiligen Bindestellen (Seite) von IL-6 an seine Rezeptoren IL-6R und gp130, Magenta Seite I, Violett Seite II, helles Lila Seite III. Diese Darstellung wurde nach Vorlage (Kallen *et al.* 1999) erstellt. **C:** Struktur des IL-6 (PDB:1P9M) in der semi-opaken Darstellung. Erstellt mit ChimeraX.

IL-6 besitzt insgesamt drei Bindestellen. Die Bindestelle I bindet an den IL-6 Rezeptor (IL-6R) und ist somit für die erste Initiierung eines dimeren Komplexes aus IL-6:IL-6R verantwortlich. Die Bindestelle II bindet an die D2/D3 Domäne des gp130 und Bindestelle III an die D1 Domäne des gp130 (Barton *et al.* 2000, Heinrich *et al.* 2003).

### 1.3 Die IL-6 vermittelte Signaltransduktion

IL-6 übermittelt sein Signal durch einen, auf der Zellmembran formierten Rezeptorkomplex. Dieser Komplex besteht aus dem ligandenbindenden IL-6R und dem signaltransduzierenden gp130.

Der ca. 80 kDa große IL-6R besteht extrazellulär aus drei Domänen (D1-3). Die D1 Domäne ist charakteristisch für eine *Ig-like* Domäne. Obwohl die D1 nachweislich nicht für die Erkennung des Liganden und die Initiierung des Signals benötigt wird, trägt sie zur Internalisierung des Rezeptors und zur Proteinstabilität bei (Yawata *et al.* 1993, Özbek *et al.* 1998). Ihr schließen sich die *fibronectin type III* (FnIII) Domänen (D2 und D3), welche die Zytokin bindenden Domänen (ZBD) sind, an. Der D3 Domäne schließt sich eine 52 Aminosäure (AS) lange *Stalk*-Region an. In dieser befinden sich Erkennungssequenzen für die proteolytische Spaltung und somit für das *shedding* des membranständigen Rezeptors (mIL-6R) zu einem löslichen Rezeptor (sIL-6R) (Rose-John *et al.* 1993, Riethmueller *et al.* 2017). Die *A Disintegrin and Metalloprotease 17* (ADAM17), sowie ADAM10 spalten den mIL-6R (Müllberg *et al.* 1994, Baran *et al.* 2013). Eine weitere Methode des Organismus sIL-6R zu generieren ist das alternative *splicing* der mRNA (Holub *et al.* 1999). Bei dieser alternativ kodierten mRNA ist das Exon für die Transmembrandomäne (TMD) und intrazelluläre Domäne (IZD) herausgeschnitten, sodass ein alternativer C-Terminus translatiert wird (Horiuchi *et al.* 1994). Die Konzentrationen von sIL-6R im menschlichen Serum befinden sich unter homöostatischen Bedingungen zwischen 25-145 ng/ml. Im Zuge einer Entzündung können diese Konzentrationen um das Zwei- bis Dreifache ansteigen (Mitsuyama *et al.* 1995, Montero-Julian 2001). Der IL-6R wird nur von wenigen Zelltypen wie Hepatozyten, Neutrophilen, Monozyten, Granulozyten und T-Zellen sezerniert (Simpson *et al.* 1997).

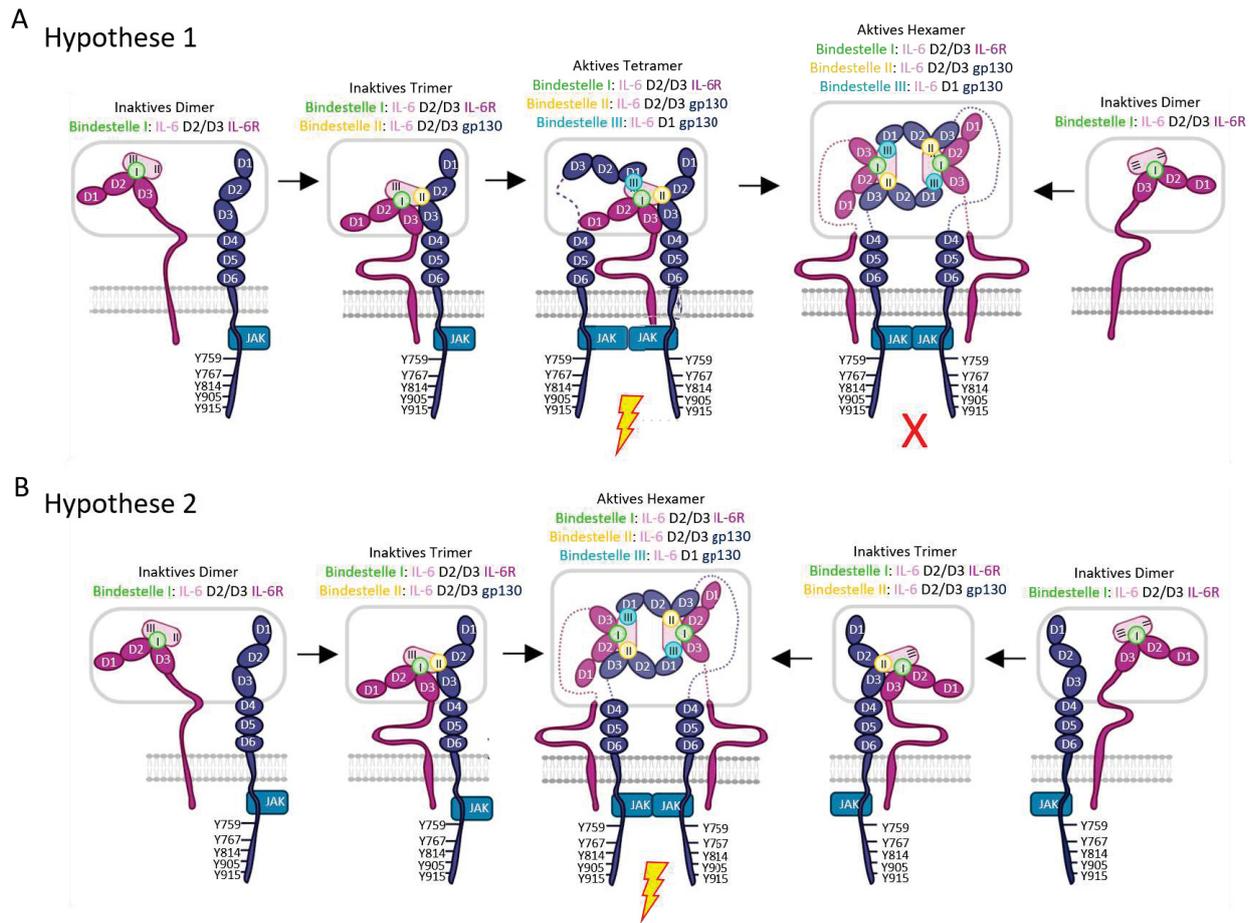
Der ungefähr 130 kDa große gp130 Rezeptor besteht extrazellulär aus insgesamt sechs Domänen. Die N-terminal gelegene D1 ist eine *Ig-like Domain* (Boulanger *et al.* 2003). Ihr schließen sich die *cytokine-binding homology region* (CHR) D2 und D3 an. Die Domänen D4-6 sind *FNIII-like* Domänen, welche für die Signalübertragung benötigt werden (Grötzingler *et al.* 1999, Muller-Newen 2003, Lorenzen *et al.* 2011). In der IZD befinden sich zwei hoch konservierte Motive. Die prolinreiche Sequenz Box1 (IWPNVDPDS) und die hydrophobe Sequenz Box2 (DVSVEIEAN), welche für die Signalweiterleitung essentiell sind (Murakami *et al.* 1991, Usacheva *et al.* 2002). Diese Motive bilden die Grundlage für die ligandeninduzierte

Phosphorylierung der insgesamt vier Tyrosinkinasen: Den Januskinasen (Jak1, Jak2, Jak3) und Tyk2 (Haan *et al.* 2006). Die Januskinasen selbst sind nicht kovalent an den Rezeptor gebunden, jedoch konstitutiv mit den Motiven Box1, beziehungsweise Box2 assoziiert (Muller-Newen 2003). In der IZD des gp130 Rezeptors befinden sich insgesamt fünf Tyrosine, Y759, Y767, Y814, Y905 und Y915, welche für die Signalweiterleitung essentiell sind. Diese Tyrosine, spielen eine wichtige Rolle für die Phosphorylierung von signalinduzierenden Proteinen und somit für die Weiterleitung des Signals (Schmitz *et al.* 2000). Bei der Initiierung der Komplexbildung von IL-6 und IL-6R bildet gp130 ein Homodimer. Gp130 wird ubiquitär auf der Zellmembran humaner Zellen exprimiert (Kishimoto and Kang 2022).

### 1.3.1 Formierung des signaltransduzierenden Komplex

Weder IL-6 noch IL-6R können alleine an gp130 binden (Adams *et al.* 2017). Mittels der Bindestelle I, welche durch die IL-6 AS F74, F78, L178, R179 und 182 charakterisiert ist, bindet IL-6 mit einer geringen Affinität (Dissoziationskonstante ( $K_d$ ) 22 nM)) zuerst an die ZBD (D2/D3) des IL-6R, welche durch die AS F229, Y230, E277, E278 und F279 definiert ist (Boulanger *et al.* 2003, Baran *et al.* 2018). Mittels dieser Interaktion formt sich ein IL-6:IL-6R Heterodimer, wodurch sich die zuvor in zwei räumlich getrennte Bereiche (Helix A und C) zusammengesetzte Bindestelle II des IL-6 mit dem IL-6R bildet. Bis heute konnten 14 AS, welche an der Bildung des *binding interface* beteiligt sind, identifiziert werden (Martinez-Fabregas *et al.* 2019). Im Zuge dessen erhöht sich die Gesamtaffinität ( $K_d$  ca. 10 pM) des heterodimeren Komplexes und bindet an die D2/D3 des gp130, sodass sich ein inaktiver trimerer Komplex bildet (Adams *et al.* 2017). Um einen signaltransduzierenden Komplex bilden zu können, bindet IL-6 mittels der Bindestelle III, welche 20 AS umfasst, an die D1 des gp130. Bis heute konnte nicht hinreichend geklärt werden, ob es sich bei der IL-6 induzierten Komplexbildung um ein Tetramer aus 1xIL-6:1xIL-6R:2xgp130 oder ein Hexamer aus 2xIL-6:2xIL-6R:2xgp130 handelt. Frühe Strukturanalysen zeigten, dass es sich um ein Tetramer handeln müsse, während spätere Analysen auf einen hexameren Komplex hinwiesen (Horsten *et al.* 1997, Boulanger *et al.* 2003). Die Daten zeigen, dass beide Formen für einen aktiven Komplex möglich sind und sich konzentrationsabhängig bilden könnten (Paonessa *et al.* 1995, Veverka *et al.* 2012). Angenommen wird, dass geringe Konzentrationen von IL-6 zur Bildung tetramerer Komplexe führen, während hohe Zytokinkonzentrationen zur Formierung hexamerer Komplexe führen (Schroers *et al.* 2005). Auf Grund experimenteller Daten entwickelten sich zwei unterschiedliche Hypothesen.

Die erste Hypothese geht davon aus, dass das Heterodimer aus IL-6:IL-6R mit der Bindestelle II des IL-6 an die D2/3 des gp130 und direkt danach mit der Bindestelle III des IL-6 an die D1 eines zweiten gp130 Rezeptor bindet. Auf diese Weise hätte sich ein tetramerer Rezeptorkomplex gebildet, welcher die zelluläre Signalübertragung aktiviert. Anschließend würde ein weiteres IL-6:IL-6R Heterodimer an den tetrameren Komplex binden. Ob das Hexamer als molekularer Schalter dient, welcher bei hohen Konzentrationen entsteht um den Organismus vor einem Überschuss an IL-6 kurzfristig zu schützen, oder ob das zusätzliche Heterodimer den Komplex stabilisiert und somit Einfluss auf die Intensität und Qualität auf das Signal nimmt, bleibt bei dieser Hypothese ungeklärt (Abbildung 3 A) (Schroers *et al.* 2005). Die andere Hypothese beschreibt die Bildung eines aktiven hexameren Komplexes mittels inaktiver, auf der Zelloberfläche präformierter, trimerer Komplexe (IL-6:IL-6R:gp130). Hierbei könnten zwei Trimere durch die Bindestelle III des IL-6 an die D1 des gp130 zusammen kommen (Abbildung 3 B) (Paonessa *et al.* 1995, Boulanger *et al.* 2003). Der hexamere Komplex konnte bis heute nicht auf der Zelloberfläche nachgewiesen werden. Jegliche Daten, welche auf ihn hinweisen, wurden mittels Co-Immunopräzipitationsexperimente (Co-IPs), *size exclusion chromatography* (SEC) oder durch kristallographische Methoden nachgewiesen (Paonessa *et al.* 1995, Skiniotis *et al.* 2005). Beide Hypothesen gehen jedoch nicht auf die Möglichkeit ein, dass sich bereits präformierte Komplexe, Homomere (IL-6R:IL-6R, gp130:gp130) oder Heteromere (IL-6R:gp130) auf der Zellmembran bilden könnten und sich bei Ligandeninduktion zu einem Tetramer oder einem Hexamer formieren.



**Abbildung 3: Übersicht über die zwei Entstehungshypothesen des Hexamers aus 2xIL-6:2xIL-6R:2xgp130.**

**A:** IL-6 bindet über die Bindestelle I an die D2/3 des IL-6R. Über die Bindestelle II des IL-6 bindet das IL-6:IL-6R Heterodimer an die D2/D3 des gp130 ein Trimer. Darauf folgt die Rekrutierung des zweiten gp130. Mit der Bindestelle III bindet das IL-6 des Trimers an die D1 des zweiten gp130 und bildet einen tetrameren, signaltransduzierenden Komplex. Durch die Bindung eines zweiten IL-6:IL-6R Heterodimers wird der aktive tetramere Komplex zu einem inaktiven hexameren Komplex. **B:** Formierung eines aktiven hexameren Komplexes durch den Zusammenschluss zweier trimerer, präformierter Komplexe aus IL-6:IL-6R:gp130. Für die Formierung des trimeren Komplex bindet IL-6 mit der Bindestelle I an die D2/D2 des IL-6R. Dieses Dimer bindet durch die Bindestelle II an die D2/D3 des gp130. Über die Bindestelle III des IL-6 mit der D1 des gp130 erfolgt die Formation zum hexameren Komplex. Erstellt mit BioRender.com.

### 1.3.2 Präformierte Komplexe auf der Zellmembran und die Beteiligung der TMD

Über die Bildung von Rezeptorkomplexen existieren zwei Hypothesen. So wird bei einem davon ausgegangen, dass eine Ligandenbindung eine Dimerisierung der Rezeptoren und in Folge dessen eine Signalaktivierung ausgelöst wird (Maruyama 2015). Im Falle des zweiten Mechanismus erfolgt eine Rotation der TMD durch die Bindung des Liganden an dem präformierten dimeren Rezeptorkomplex, die Rezeptoren werden aktiviert und ein Signal weitergegeben (Maruyama 2015). Hierbei wird auf das „Rotationsmodell der TMD“ verwiesen, welches vor allem bei Rezeptoren mit intrazellulärer Kinaseaktivität angewendet wird (Maruyama 2015). Dieses Modell beschreibt, dass in Folge einer Bindung des Liganden an die EZD der Rezeptoren einer Konformationsänderung der Domänen erfolgt und das Dimer

stabilisiert wird. Hierbei wird das inaktive Kinasedimer der IZD im Zytosol neu angeordnet, sodass die intrazellulär gelegenen Kinasen phosphoryliert und das Signal weitergegeben wird (Moriki *et al.* 2001, Clayton *et al.* 2005). Es gibt Hinweise, dass die TMD nicht nur an der Aktivierung von Rezeptoren, sondern auch an der Entstehung präformierter Homo- oder Heterodimere beteiligt ist (Maruyama 2015). So wurde nachgewiesen, dass der p75-Neurotrophin Rezeptor (p75<sup>NTR</sup>) nur mittels seiner Cysteine innerhalb der TMD als Dimer auf der Zelloberfläche existiert (Vilar *et al.* 2009). Des Weiteren wurden Co-IP's mit dem Prolactinrezeptor PRLR durchgeführt, welche belegen, dass die TMD eine signifikante Rolle während der Dimerisierung spielt (Gadd and Clevenger 2006). Im Hinblick auf die Formierung eines hexameren Komplexes wird sich im Folgenden auf die Präformierung der Rezeptordimere IL-6R und gp130 fokussiert. Mittels *fluorescence resonance energy transfer* (FRET) und *bimolecular fluorescence complementation* (BiFC) wurde nachgewiesen, dass sich unstimulierte, vorübergehende gp130 Homodimere auf der Zellmembran bilden, welche durch Bindung eines IL-6:IL-6R Heterodimers stabilisiert werden (Giese *et al.* 2005). Gp130 kann jedoch nicht nur mit sich selbst, sondern auch mit anderen Rezeptoren präformierte Komplexe eingehen. So wurden präformierte, inaktive gp130:LIFR Dimere mittels FRET nachgewiesen (Tenhumberg *et al.* 2006). Des Weiteren wurde die dimere Struktur von IL-6R:IL-6R durch Kristallstrukturanalysen nachgewiesen (Varghese *et al.* 2002).

### 1.3.3 Klassischer Signalweg

Bei der klassischen Signaltransduktion werden die Rezeptoren IL-6R und gp130 als membrangebundene Proteine auf der Zelloberfläche exprimiert (Abbildung 4 A). Diese Art der Signalweiterleitung kann jedoch nur begrenzt stattfinden, da der IL-6R von wenigen Zelltypen exprimiert wird (Schaper and Rose-John 2015). Dem klassischen Signalweg werden tendenziell anti-inflammatorische und regenerative Eigenschaften zugeschrieben, da er an der Bildung von Akute-Phase-Proteinen während der Immunabwehr, der indirekten Antikörperbildung durch die Aktivierung von B-Zellen, sowie an der Regeneration der Epithelzellen und Fieberinduktion beteiligt ist (Rose-John *et al.* 2006).

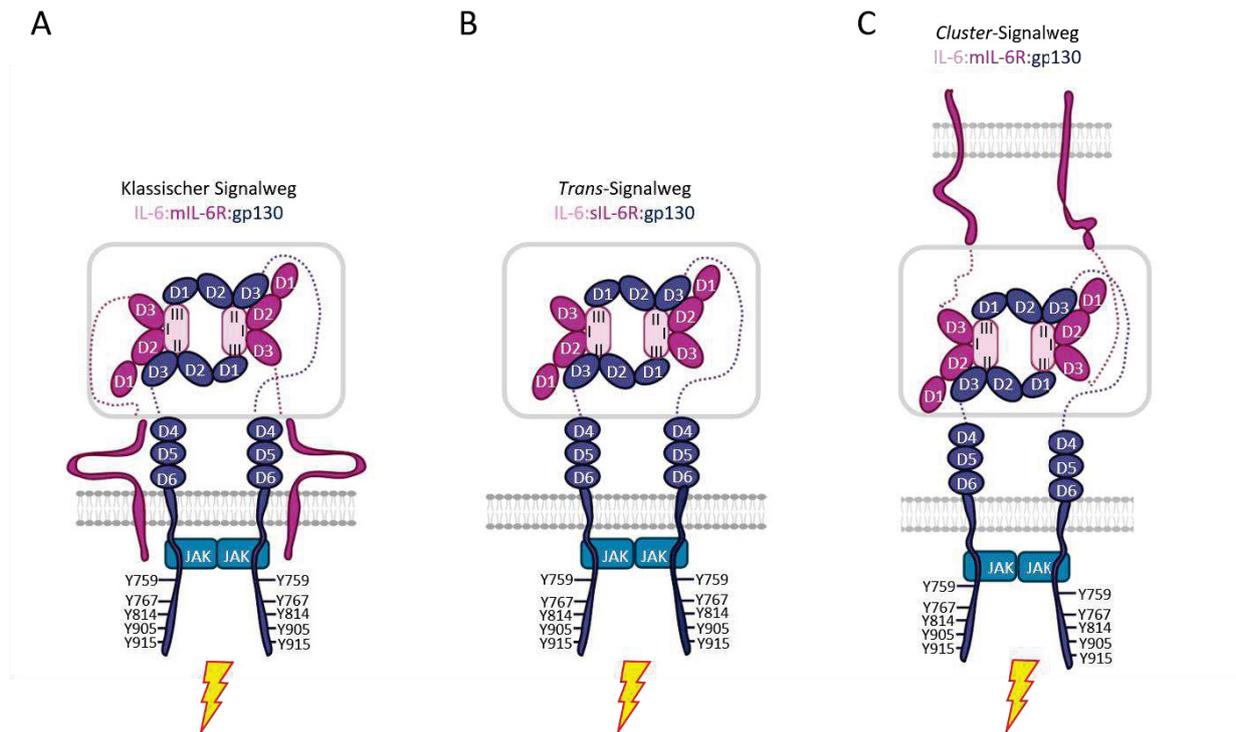
### 1.3.4 *Trans*-Signalweg

Bei dieser Form des Signalweges bindet IL-6 zuerst an den sIL-6R. Dieses nicht membrangebundene Dimer bindet im Anschluss an gp130 Rezeptoren (Abbildung 4 B). Bei Endothelzellen, embryonalen Stammzellen, glatten Muskelzellen und Zellen der

Hämatopoese erfolgt die IL-6 Signaltransduktion ausschließlich über das *Trans*-Signalweg (Romano *et al.* 1997, Klouche *et al.* 1999, Audet *et al.* 2001, Viswanathan *et al.* 2002). Der *Trans*-Signalweg wird tendenziell als pro-inflammatorisch angesehen, da er, unter anderem, an der Pathogenese verschiedener neurodegenerativer Erkrankungen des zentralen Nervensystems beteiligt ist (Campbell *et al.* 2014, Morieri *et al.* 2017). Des Weiteren stellte sich heraus, dass der *Trans*-Signalweg enormen Einfluss auf einen Myokardinfarkt hat. Studien im Rattenmodell erwiesen, dass eine Blockierung des *Trans*-Signalweges durch das sgp130Fc Fusionsprotein die Infiltration von Neutrophilen und Makrophagen in das Myokard reduziert und somit die Infarktgröße verringert (George *et al.* 2021). Der *Trans*-Signalweg besitzt jedoch nicht nur negative Eigenschaften. So ist er an der Leberregeneration nach einer partiellen Hepatektomie (PHX) beteiligt (Fazel Modares *et al.* 2019). Des Weiteren ist diese Art der Signaltransduktion, neben dem klassischen Signalweg, an der Regulation des angeborenen und adaptiven Immunsystems beteiligt (Rose-John 2017). Um den *Trans*-Signalweg genauer untersuchen zu können, wurde durch eine Fusion ein Hyper-Zytokin designt. Hyper IL-6 (HIL-6) besteht aus IL-6 und den ersten drei Domänen (D1-3) des IL-6R, welche über einen flexiblen Peptidlinker miteinander verbunden sind und somit bereits ein IL-6:IL-6R Heterodimer bilden. Dieses Hyper-Zytokin besitzt eine 100-1000-fache potentere Initiationsfähigkeit des *Trans*-Signalweges als der natürlich vorkommende IL-6:IL-6R Komplex (Fischer *et al.* 1997).

### 1.3.5 Cluster-Signalweg

Ein weiterer Mechanismus bei der IL-6 induzierten Signaltransduktion bildet der *Cluster*-Signalweg. Dabei bildet sich auf einer „Senderzelle“ zuerst ein Heterodimer aus IL-6:IL-6R, welches die gp130 Rezeptoren auf einer benachbarten „Empfängerzelle“ aktiviert (Abbildung 4 C) (Heink *et al.* 2017, Lamertz *et al.* 2018). Dieser Signalweg wird vor allem für das Konditionieren von pathogenen T-Helfer 17 (T<sub>H</sub>17) Zellen benötigt. Zudem steht die *Cluster*-Aktivierung in Verdacht, an der Entwicklung von zytotoxischen T-Zellen beteiligt zu sein (Böttcher *et al.* 2014, Heink *et al.* 2017). Es ist jedoch zu betonen, dass dieser Signalweg noch weitgehend unerforscht ist.

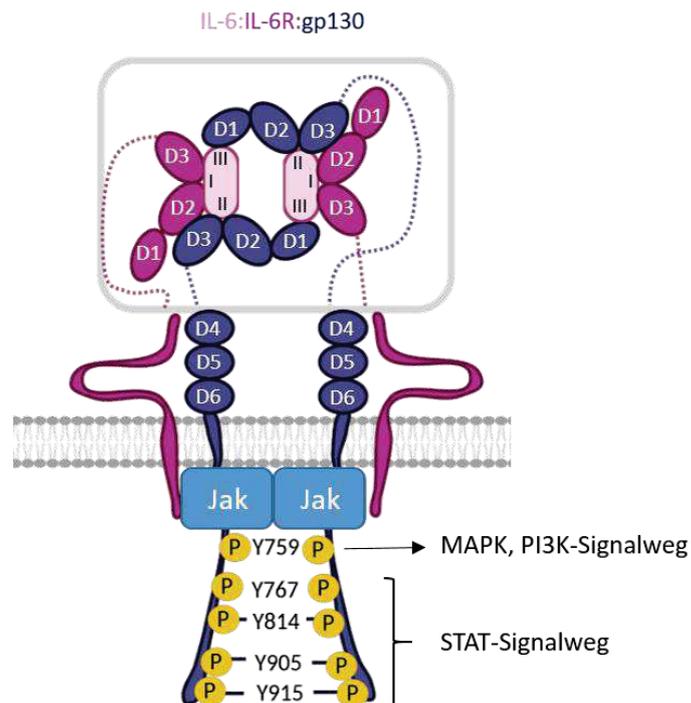


**Abbildung 4: Schematische Abbildung des Klassischen-, Trans- und Cluster- Signalweg als signaltransduzierenden, hexameren Komplex dargestellt.**

**A:** Klassischer Signalweg, die Rezeptoren IL-6R und gp130 befinden sich membranebunden auf der Membranoberfläche. **B:** Schematische Abbildung des *Trans*-Signalwegs mit zwei IL-6:sIL-6R Heterodimeren dargestellt. **C:** Schematische Darstellung des *Cluster*-Signalwegs mit zwei membranebundenen IL-6:IL-6R Heterodimeren auf der Senderzelle und zwei membranebundenen gp130 auf der Empfängerzelle. Erstellt mit BioRender.com.

#### 1.4 Die IL-6 induzierte intrazelluläre Signaltransduktion

Der Jak/STAT Signalweg ist der prominenteste unter den IL-6 induzierten Signalwegen. Er ist für eine Vielzahl von zellulären Prozessen wie Proliferation, Differenzierung, Migration, Zellüberleben und Apoptose (abhängig von der Intensität und Länge des Signals) verantwortlich, sowie in vielen weiteren physiologischen Prozessen wie der Hämatopoese, der Entwicklung von Immunzellen und der Reifung von Stammzellen beteiligt (Ghoreschi *et al.* 2009). Durch die Bildung des signaltransduzierenden Komplexes, ist es den intrazellulär gelegenen Januskinasen (Jak1, Jak2 und Tyk2) der gp130 Rezeptoren möglich, sich gegenseitig zu phosphorylieren. Dies führt zu einer Aktivierung der Signalkaskade (Stahl *et al.* 1994). Durch diese Phosphorylierung erfolgt die Aktivierung der Signalwege *signal transducers and activators of transcription* (STAT), Phosphoinosidid-3-Kinase (PI3K) sowie des *mitogen-activated protein-* (MAPK) Signalwegs (Abbildung 5) (Howlett *et al.* 2009).



**Abbildung 5: Schematische Übersicht über die IL-6 vermittelten Signaltransduktionswege**

Durch die Assemblierung eines hexameren Komplex sind die Januskinasen (Jak1, Jak2 und Tyk2) in der Lage sich gegenseitig zu phosphorylieren. In Folge dessen werden einige C-terminal gelegenen Tyrosine phosphoryliert und aktivieren die den MAPK- Signalweg, den STAT-Signalweg und den PI3K-Signalweg. Erstellt mit BioRender.com.

### 1.5 Die Rolle synthetischer Rezeptorsysteme in der Wissenschaft

Der Begriff „synthetische Biologie“ wurde von Barbara Hobom während ihrer Forschung an genetisch veränderter DNA in Bakterien geprägt (Hobom-Schnegg *et al.* 1970, Benner and Sismour 2005). Die synthetische Biologie dient der Erforschung molekularbiologischer Systeme auf zellulärer Basis (Cameron *et al.* 2014). Im Zuge der fortschreitenden Methoden wie Klonierungen mit Hilfe einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR) zur Optimierung und Analysierung von biologischen Systemen, wurden synthetische Rezeptoren entwickelt. Die Anwendungsgebiete sind vielseitig. So können diese Rezeptoren in der Forschung bei der Analyse und Entwicklung von Medikamenten verschiedener Krankheiten eingesetzt werden. Bereits 1996 ermöglichten synthetische Rezeptoren einen Teil des Signalwegs des gp130 Rezeptors zu untersuchen. Für diese Experimente wurden zum einen Punktmutationen am gp130 Rezeptor durchgeführt, zum anderen eine Rezeptorchimäre designt, welche extrazellulär aus dem Erythropoetin Rezeptor (EpoR) bestand, während die TMD und IZD zum gp130 Rezeptor gehörte (Hemmann *et al.* 1996). Diese Rezeptorchimäre wurde durch das natürlich vorkommende Zytokin Erythropoetin (Epo) aktiviert, wodurch zudem nachgewiesen wurde, dass der gp130 Signalweg unter artifiziiellen Bedingungen aktivierbar ist (Hemmann *et*

*al.* 1996). Nicht nur die Erforschung des Signalweges von gp130, sondern auch die Entstehung von Tumoren, wie dem entzündlichen hepatozellulären Adenom konnte mit gp130 Chimären untersucht werden. Dieser gutartige Lebertumor entsteht bei mehr als der Hälfte der Patienten durch eine *in-frame* Mutation. Als Folge dessen wird der gp130 Rezeptor konstitutiv aktiv (Rebouissou *et al.* 2009). Für die Untersuchung des konstitutiv aktiven gp130 und dessen Signalwege wurde eine Rezeptorchimäre deren EZD durch einen Leucin-Zipper ersetzt wurde (L-gp130) designt (Stuhlmann-Laeisz *et al.* 2006). Mit synthetisch entwickelten Rezeptorchimären kann nicht nur die Signaltransduktion von Rezeptoren oder die Auswirkungen von Mutationen untersucht werden, sondern auch im Detail analysiert werden, welche Domäne für welche Funktion verantwortlich ist oder welche Proteine an bestimmte Sequenzen binden. So wurde durch Generierung verschiedener IL-11R- und IL-6R-Chimären, welche die Domänen des jeweils anderen Rezeptors besaßen, nachgewiesen, dass IL-11R nicht nur durch die ADAM-Proteasen ADAM10 und ADAM17 gespalten wird, sondern dass es Hinweise auf die Beteiligung einer weiteren Protease gibt (Lokau and Garbers 2021).

## 2. Ziel der Arbeit

Das Zytokin Interleukin (IL-) 6 besitzt sowohl pro- als auch anti-inflammatorische Eigenschaften und steht im Mittelpunkt vieler immunologischer Erkrankungen. In welcher Reihenfolge sich jedoch der Komplex aus IL-6, IL-6 Rezeptor (IL-6R) und gp130 zusammensetzt ist physiologisch bislang ungeklärt. Theoretisch können Tetramere (1xIL-6:1xIL-6R:2xgp130), Hexamere (2xIL-6:2IL-6R:2xgp130) oder beide Formen in Abhängigkeit der IL-6 Konzentration vorkommen. Welchen Einfluss sie auf die Signaltransduktion haben, ist unbekannt. Untersuchungen zeigten, dass die Bindestelle I des IL-6 an die D2/D3 des IL-6R bindet. Anschließend bindet dieses Heterodimer durch die Bindestelle II des IL-6:IL-6R Komplex an die D2/D3 des gp130 Rezeptors und formt ein inaktives Trimer. Wie sich der aktive Komplex im Anschluss zusammensetzt, konnte bislang nur hypothetisch erklärt werden, jedoch bindet die Bindestelle III des IL-6 an die D1 eines weiteren gp130. Durch die Assemblierung dieses Komplexes werden verschiedene Signalwege aktiviert. Inwiefern präformierte Homo-/Heterodimere zwischen gp130 und IL-6R auf der Zellmembran an der Bildung eines Hexamers beteiligt sind und welchen Stellenwert die Transmembrandomäne (TMD) hierbei einnimmt, ist nicht hinreichend geklärt.

Um zuerst einen hexameren Komplex nachzuweisen sollen Co-Immunopräzipitationen (Co-IP) mit rekombinanten, gereinigten Proteinen durchgeführt und mittels Western Blot analysiert werden. Um ein hexameren Komplex auf der Zelloberfläche zu imitieren, welcher sich durch zwei IL-6R auszeichnet, soll eine Rezeptorchimäre, bestehend aus der extrazellulären Domäne (EZD) des IL-6R und der TMD und intrazellulären Domäne (IZD) des gp130 Rezeptors generiert (IL-6R<sub>EZD</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub>) und, in Kombination mit verschiedenen gp130 Mutanten, stabil auf der Zelloberfläche von Ba/F3 Zellen exprimiert und aktiviert werden. Für die Untersuchung der Bindungsabfolge sollen gp130 Mutanten generiert werden, welche jeweils nur eine Bindestelle für IL-6 aufweisen, um diese zusammen mit der Rezeptorchimäre detailliert zu untersuchen. Des Weiteren soll mittels Co-IP die Rolle der TMD bei der Assemblierung präformierter Homo-/Heterodimere auf der Zelloberfläche untersucht werden.

Ziel dieser Arbeit ist es, mittels des IL-6R<sub>EZD</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub> und gp130 Mutanten in Hinblick auf ihre Konformation eine detailliertere Charakterisierung im biologischen Kontext, sowie die damit korrelierende Signaltransduktion durchzuführen. Zum anderen soll die Rolle der TMD mittels spezifischer IL-6R und gp130 Mutanten, im Zusammenhang mit der Bildung präformierter Komplexe auf der Zellmembran untersucht werden.

### 3. Material

#### 3.1 Antibiotika

In Tabelle 1 sind alle Antibiotika aufgeführt, welche im Zuge dieser Arbeit verwendet wurden.

**Tabelle 1 Übersicht der verwendeten Antibiotika**

Antibiotika	Stammkonzentration	Arbeitskonzentration	Hersteller
Ampicilin	100 mg/ml	Agarplatten: 200 µg/ml Flüssigmedium: 100 µg/ml	Carl Roth, Karlsruhe
Hygromycin B	100 mg/ml	1 mg/ml	Carl Roth, Karlsruhe
Kanamycin	100 mg/ml	100 µg/ml	Carl Roth, Karlsruhe
Penicillin	10.000 U/ml	60 mg/L	Genaxxon, Ulm
Puromycin	1 mg/ml	1,4 µg/ml	Carl Roth, Karlsruhe
Streptomycin	10 mg/ml	100 mg/ml	Genaxxon, Ulm

#### 3.2 Antikörper

Die für die Arbeit verwendeten Primär- und Sekundärantikörper sind in Tabelle 2 aufgeführt.

**Tabelle 2. Liste der in dieser Arbeit verwendeten Antikörper**

Antikörper	Wirt	Verdünnung	Hersteller	Artikelnummer
STAT1	Kaninchen	1:1.000	Cell Signaling Technology, USA	9172S
pSTAT1	Kaninchen	1:1.000	Cell Signaling Technology, USA	9167S
STAT3	Maus	1:1.000	Cell Signaling Technology, USA	9139S
pSTAT3	Kaninchen	1:1.000	Cell Signaling Technology, USA	9145S
STAT5	Kaninchen	1:1.000	Cell Signaling Technology, USA	94205S
pSTAT5	Kaninchen	1:1.000	Cell Signaling Technology, USA	9359S
AKT	Kaninchen	1:1.000	Cell Signaling Technology, USA	9272S
pAKT	Kaninchen	1:1.000	Cell Signaling Technology, USA	4060S
ERK 1/2	Maus	1:1.000	Cell Signaling Technology, USA	4696S
pERK 1/2	Kaninchen	1:1.000	Cell Signaling Technology, USA	9106S
SOCS3	Kaninchen	1:1.000	IBL, Deutschland	IG-120
α-IL-6R	Maus	1:1.000	AG Scheller, Deutschland	
α-gp130	Maus	1:50 (B-P4)	Abcam, GB	188-372
JAK1	Kaninchen	1:1.000	Cell Signaling Technology, USA	3344S
pJAK1	Kaninchen	1:1.000	Cell Signaling Technology, USA	331S

### 3.3 Chemikalien

In Tabelle 3 sind alle Chemikalien aufgelistet, welche für diese Arbeit verwendet wurden.

**Tabelle 3** Liste der verwendeten Chemikalien

<b>Chemikalie</b>	<b>Hersteller</b>
Acrylamid	Carl Roth, Karlsruhe
Agar-Agar	Carl Roth, Karlsruhe
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Sigma-Aldrich, München
Biozym LE Agarose	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf
Bromphenolblau	Carl Roth, Karlsruhe
BSA	Carl Roth, Karlsruhe
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, München
Express DNA Ladder 100-5000 bp	Thermo Scientific, St. Leon-Rot
GeneRuler™ 1 Kb DNA Ladder	Thermo Scientific, St. Leon-Rot
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Glycin	Merk, Darmstadt
Isopropanol	AppliChem GmbH, Darmstadt
Loading-Dye Solution (6x)	Thermo Scientific, St. Leon Rot
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, München
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich, München
Tris	Bethesda Research Laboratories, USA
TriTrack DNA-Ladefarbstoff 6x	Thermo Scientific, St. Leon-Rot
Triton X-100	Sigma-Aldrich, München
Trypan Blue Dye 0,4%	Bio-Rad, München
Turbofect™ Transfektionsreagenz	Thermo Scientific, St. Leon Rot
Tween 20	Sigma-Aldrich, München
Complete Proteaseinhibitor	Roche, Severin, Schweiz
Dulbecco's Modified Egel Medium (DMEM)	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
HDGreen™ + DNA Stain	INTAS, Göttingen, Deutschland
Kaliumacetat	Merk, Darmstadt, Deutschland
Kaliumhydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Merk, Darmstadt, Deutschland
Natriumorthovanadat (Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub> )	Merk, Darmstadt, Deutschland
Natriumcitrat	Sigma-Aldrich, München
NP-40	Sigma-Aldrich, München
PageRuler™ Prestained Protein Ladder	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA
Phusion	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA
Dream-Taq	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA
Flag-affinity Gel Beads	Sigma-Aldrich, München

### 3.4 Geräte

In Tabelle 4 sind alle Geräte, welche während dieser Arbeit genutzt wurden, aufgelistet.

Tabelle 4: Übersicht aller Geräte, welche in dieser Arbeit verwendet wurden.

Geräte	Hersteller
Analysewaage Precisia 100M-300C	Precisia, Hartenstein
Autoklav Laboklav 25	SHP Steriltechnik AG, Detzel Schloss/Satuelle
Automatischer Zellzähler TC10	Bio-Rad, München
BD FACS Canto II	Becton Dickson GmbH, Heidelberg
CO <sub>2</sub> -Inkubator HERAcell 150	Thermo Scientific, St. Leon-Rot
Gefrierschrank Forma 900	Thermo Scientific, St. Leon-Rot
Geldokumentationssystem Odyssey XF Imager	LI-COR Biosciences GmbH, Lincoln
Gelelektrophoresekammer	Bio-Rad, München
ÄKTA Start	GE Healthcare, Chicago
Kühlschrank	Libherr GmbH, Rostock
Kühlzentrifuge 5417 R	Eppendorf, Hamburg
Kühlzentrifuge 5810 R	Eppendorf, Hamburg
Magnetrührer mit Heizung	Heidolph Instr. GmbH, Schwabach
Messpipetten	Hirschmann, Eberstadt
Mikropipetten Research	Eppendorf, Hamburg
Mikrowelle Optiquick	Moulinex (Krupps), Offenbach
Minizentrifuge	Axon, Kaiserslautern
NanoDrop ND-1.000	Thermo Scientific, St. Leon-Rot
PCR Thermozykler PeqStar	Peqlab, Erlangen
pH-Meter	Sartorius, Ratingen
Pipetus™-Akku	Hirschmann, Eberstadt
Sterilbank	Thermo Scientific, St. Leon-Rot
Sterilbankpumpe	HLC BioTech, Bovenden
Tischzentrifuge 5424	Eppendorf, Hamburg
Trans-Blot Turbo™	Bio-Rad, München
UV-Tisch	Bio-Budget Technologies GmbH, Krefeld
RT-PCR Cycler QuantStudio 3	Thermo Fischer Scientific, Waltham
Kulturschüttler Multiron HT	INFORS GmbH, Einsbach

### 3.5 Kits

In Tabelle 5 sind alle Kits aufgelistet, welche während dieser Arbeit verwendet wurden.

Tabelle 5: Während der Arbeit verwendete Kits

Kit	Hersteller
BCA Protein Assay	Thermo Scientific, Waltham, USA
CellTiter-Blue Cell Viability Assay	Promega GmbH, Mannheim
NucleoBond Xtra Midi/Maxi	Macherey-Nagel, Düren
SucleoSpin Gel and PCR Clean-up	Macherey-Nagel, Düren
NucleoSpin RNA	Macherey-Nagel, Düren
DreamTaq Polymerase	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA
iTaq™ Universal SYBR green One-Step Kit	BioRad, Hercules, USA
Phusion High-Fidelity DNA-Polymerase	Thermo Fischer Scientific, Waltham USA
NEBaseChanger Kit	New England BioLabs <sup>Inc.</sup>

### 3.6 Kulturmedien

Alle für diese Arbeit verwendeten Medien sind in Tabelle 6 aufgelistet.

Tabelle 6: Die untere Tabelle zeigt eine Auflistung aller verwendeten Medien während dieser Arbeit.

Kulturmedium	Zusammensetzung
DMEM <sup>-/-</sup>	Dulbeccos Modified Eagle Medium, Glukose (4,5 g/L), stabiles Glutamin
DMEM <sup>+/+</sup>	Dulbeccos Modified Eagle Medium, Glukose (4,5 g/L), stabiles Glutamin, FBS (10%), 1% (Penicillin/Streptomycin)
LB-Agar	0,5% Hefeextrakt, 1% NaCl, Trypton, 1,5% Agar-Agar
LB-Medium	0,5% Hefeextrakt, 1% NaCl, Trypton
Expi293 Medium	Thermo Scientific, Waltham, USA

### 3.7 Oligonukleotide

In der unten aufgeführten Tabelle 7 sind die Sequenzen der Oligonukleotide aufgelistet, welche während dieser Arbeit verwendet wurden.

Tabelle 7: Sequenzen der Oligonukleotide welche in dieser Arbeit für die Sequenzierung und Klonierung der Plasmid DNA (pDNA) und Genfragmente verwendet wurden.

Name	Bezeichnung	Sequenz (5'→3')
CS11	SOE IL-6R-gp130 1 FW	AGTACCACTGCCCGCCATCGTGGTGCCTGTGTGCCTGGCC
CS12	SOE IL-6R-gp130 1 REV	ACGGGCCCTCTAGAGATATCGGATCCTCCAAGCG

CS13	SOE IL-6R-gp130 3 FW	ACTCACTATAGGGAGACCCAAGCTGGCTAGCGTTTAAACG
CS14	SOE-IL-6R-gp130 4 REV	CACCACGATGGCGGGCAGTGGTACTGAAGAAGAATCTTGCACTGGGAG
CS40	FW für gp130 10 AS	CGTTTAAACGATATCTTAAGCTTGCCACCATGC
CS41	REV gp130 10 AS	AAGAAAGCTTGATGTGCTTCTTGATCAGGTCCCGC
CS46	pcDNA3.1 rev	CAGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGC
CS47	pcDNA3.1 fw	CGAAATTAATAGCACTCACTATAGGGAGACCCAAGCT
CS48	pMOWS fw	GTCAAGCCCTTTGTACACCCTAAGCCTCC
CS49	pMOWS rev	GCCATACGGGAAGCAATAGCATGATACAAAGGC
CS53	P1 zu V1 fw	AAGCACATCTGGGTCAACGTGCCCG
CS54	P1 zu V1 rev	TTCGTGTAGACCCAGTTGCACGGGC
CS55	P2 zu V2 fw	ACATCTGGGTCAACGTGTCGACCCCTCCA
CS56	P2 zu V2 rev	GGCTCTTGGAGGGTTCGACCACGTTGACC
CS57	P3 zu V3 fw	CGTGGTCGACGTCTCCAAGAGCC
CS58	P3 zu V3 rev	TTGACCCAGATGTGCTTC
CS 98	Rev Y190K, F191E	TAGTCCACGGTACAGCTG
CS99	FW Y190K, F191E	CAGCACCGTGAAGGAGGTGAACATCGAAGTGTG
CS101	FW ΔD1	ATCAGCGGCCTGCCCCCG
CS102	Rev ΔD1	CAGCAGCTCGCCGGTGCTCTCG
SOCS3	RT rev	GGGAAACTTGCTGTGGGTGA
SOCS3	RT fw	GGAGATTTTCGCTTCGGGACT
Hprt1	RT fw	TCAGTCAACGGGGGACATAAA
Hprt1	RT rev	GGGGCTGTACTGCTTAACGAG
CS30	fw Box1,2	GTTGGCTTCGATTTCCACCAC
CS31	rev Box1,2	AAGCTTGCCACCATGGCG
DF16	pcDNA3.1 fw	AAATTAATACGACTCACTATAGG
DF17	pcDNA3.1 rev	AGGCACAGTCGAGGCTG
DF54	pMOWS fw	AGCCCTTTGTACACCCTAAGC
DF55	pMOWS rev	AGCAATAGCATGATACAAAGG

### 3.8 Plasmide

In Tabelle 8 sind alle Plasmide, welche in dieser Arbeit verwendet wurden, aufgelistet.

**Tabelle 8: Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten oder klonierten Plasmide.**

Name	Referenz	Resistenz
pcDNA3.1	Invitrogen, Darmstadt, Deutschland	Ampicillin, Neomycin
pMOWS-puro-GFP	Ketteler <i>et al.</i> 2002	Puromycin
pMOWS-hygro-GFP	Suthaus <i>et al.</i> 2010	Hygromycin
peGFP	AG Scheller	Kanamycin, Neomycin
pcDNA3.1 IL-6R wt HA	In dieser Arbeit generiert	Ampicillin, Neomycin
pMOWS IL-6R wt HA	In dieser Arbeit generiert	Puromycin
pcDNA3.1 IL-6 FLAG	In dieser Arbeit generiert	Ampicillin, Neomycin
pcDNA3.1 IL-6 Myc	In dieser Arbeit generiert	Ampicillin, Neomycin
pcDNA3.1 IL-6R Ts	In dieser Arbeit generiert	Ampicillin, Neomycin
pcDNA3.1 IL-6R Fc	In dieser Arbeit generiert	Ampicillin, Neomycin
pcDNA3.1 gp130_GPI	AG Scheller	Ampicillin, Neomycin
pMOWS gp130_GPI	AG Scheller	Hygromycin
pMOWS gp130_10AS	In dieser Arbeit generiert	Hygromycin
pMOWS IL-6R <sub>ECD</sub> -gp130 <sub>TMD,ICD</sub>	In dieser Arbeit generiert	Puromycin
pMOWS IL-6R <sub>ECD</sub> -gp130 <sub>TMD,ICD</sub> _P3V3	In dieser Arbeit generiert	Puromycin
pMOWS gp130Y190K, F191E	In dieser Arbeit generiert	Puromycin
pMOWS gp130Y190K, F191E	In dieser Arbeit generiert	Hygromycin
pMOWS gp130ΔD1	In dieser Arbeit generiert	Hygromycin

### 3.9 Puffer und Lösungen

Sämtliche Puffer und Lösungen, die während dieser Arbeit verwendet wurden, sind in Tabelle 9 aufgelistet.

**Tabelle 9: Während der Arbeit verwendete Puffer und Lösungen.**

Lösungen/Puffer	Zusammensetzung/Hersteller
10x Standard Restriktionspuffer	Thermo Scientific, St. Leon-Rot
10x T4 DNA Ligasepuffer	Thermo Scientific, St. Leon-Rot
Ammoniumperoxidsulfat (APS)	10% (w/v) APS
Blockierlösung Intercept TBS	Li-Cor Biosciences GmbH
Ethanol (70%, 99%) (v/v)	Sigma-Aldrich, München
FACS-Puffer	1% BSA in 1x PBS
Gibco fötales bovines Serum (FCS)	Thermo Scientific, St. Leon-Rot
JAK-Lysis Puffer	10 mM Tris-HCl, pH 7,5 150 mM NaCl

	0,5 mM EDTA 0,5% (v/v) NP40 1 mM NaCO <sub>3</sub> 10 mM MgCl <sub>2</sub> 1 complete Protease Inhibitor Tablette auf 50 ml
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS, 10x)	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
SDS-Sammelgelpuffer	0,5 M Tris-HCl, pH 6,8 0,4% SDS
SDS-Trenngelpuffer	1,5 M Tris-HCl, pH 8,8
SDS-PAGE Laufpuffer	0,4 M Tris-HCl, pH 8,25 0,1 M Glycin 0,1% SDS
SDS-PAGE Probenpuffer (6x)	375 mM Tris-HCl, pH 6,8 9% (w/v) SDS 50% (v/v) Glycerol 9% β-Mercaptoethanol 0,03% (w/v) Bromphenolblau
Lösung 1 (S1) für DNA-Minipräparation	50 mM Glukose 25 mM Tris-HCl, pH 8,0 10 mM EDTA, pH 8,0 1:1.000 RNase
Lösung 2 (S2) für DNA-Minipräparation	200 mM NaOH 1% SDS
Lösung 3 (S3) für DNA-Minipräparation	3 M Kaliumacetat 11,5% (v/v) Essigsäure
TAE-Puffer	400 mM Tris-HCl, pH 8,8 10 mM EDTA 200 mM Essigsäure
TBS-T	5 M NaCl 200 mM Tris-HCl, pH 7,5 0,1% (v/v) Tween20
Transferpuffer	250 mM Tris-HCl, pH 8,0 2 M Glycerin 0,01% (w/v) SDS 5% (v/v) Methanol
<i>Tris buffered saline (10xTBS)</i>	5 M NaCl 200 mM Tris-HCl, pH 7,5
Trypsin/EDTA Lösung	1:10 Trypsin/EDTA (10x) in PBS
Citratpuffer pH 3,2	7,1 mM Natriumcitratdihydrat 42,9 mM Zitronensäure
Citratpuffer pH 5,5	35,2 mM Natriumcitratdihydrat

	14,8 mM Zitronensäure
Puffer W	100 mM Tris-HCl, pH 8,0 150 mM NaCl 1 mM EDTA
Puffer BXT	100 mM Tris-HCl, pH 8,0 150 mM NaCl 1 mM EDTA 50 mM Biotin
Puffer XT-R	3 M MgCl <sub>2</sub>
Coomassie-Färbelösung	35% (v/v) Ethanol 10% (v/v) Essigsäure 0,3% (w/v) Coomassie G250
Coomassie-Entfärbelösung	35% (v/v) Ethanol 10% (v/v) Essigsäure
Proteinase-Inhibitor Lösung	50 mM Tris-HCl, pH 7,5 150 mM NaCl 1 mM EDTA 1% (v/v) Triton X-100 1 cOmplete™, EDTA-freier Proteasehemmer-Cocktail
Co-IP für Zellen Lysis Puffer I	50 mM Tris-HCl pH 7.5 150 mM NaCl 1 mM EDTA 1% Triton 1 cOmplete™, EDTA-freier Proteasehemmer-Cocktail
Co-IP für Zellen Lysis Puffer II	50 mM Tris-HCl pH 7.5 150 mM NaCl 1 mM EDTA 1 cOmplete™, EDTA-freier Proteasehemmer-Cocktail

### 3.10 Verbrauchsmaterialien

Alle Materialien, welche für diese Arbeit verwendet wurden, sind in Tabelle 10 aufgelistet.

**Tabelle 10** Während der Arbeit verwendetes Verbrauchsmaterial

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
Reaktionsgefäße (15 mL, 50 mL )	Greiner Bio-one, Deutschland
Kryoröhrchen	VWR, Randor, USA
Reaktionsgefäß (1,5 mL, 2 mL)	Sarstedt, Deutschland
Nitrilhandschuhe	Ansell, Deutschland
PCR Kappen Gr. 125	StarLab, Deutschland
PCR Tubes 0,2 mL	StarLab, Deutschland
Pipettenspizen	StarLab, Deutschland
Nitrocellulosemembran	Cytiva, USA
Whatman-Papier	VWR, Randor
Roti PVDF (Porengröße 0,45 µm)	Roth, Deutschland
Zellkulturschale 10 cm <sup>2</sup>	Greiner bio-one, Deutschland

Zellkulturschale 6-Well	TPP, Schweiz
T75 Flaschen	Sarstedt AG & Co.KG, Deutschland
T175 Flaschen	Sarstedt AG & Co.KG, Deutschland
Strep-TactinXT 4 Flow	IBA Lifsciences GmbH, Deutschland
HiTrap MabSelect Prisma	Cytiva, USA
Einmal- Zählkammer	Peqlab, Erlangen, Deutschland

### 3.11 Zelllinien und Bakterienstämme

Für die Amplifikation von pDNA, sowie zur Klonierung wurde der Bakterienstamm *Escherichia coli* (E.coli) XL1-Blue (endA1 gyrA96(nalR) thi-1 recA1 lac glnV44 F' [: TN10 proAB+ lacIqΔ(lacZ)M15] hsdR17(rk-mK+)) verwendet (Agilent Technologies, Waldbronn). Sämtliche Zelllinien, welche für diese Arbeit verwendet wurden, sind in Tabelle 11 beschrieben.

**Tabelle 11** Auflistung der Zelllinien, welche in dieser Arbeit verwendet wurden.

Zelllinie	Herkunft	Zellart	Hersteller
Ba/F3	Murine prä B-Zelllinie	Suspensionszellen	Immunex, USA (Palacios <i>et al.</i> 1984)
Ba/F3:gp130	Murine prä B-Zelllinie mit stabil exprimierenden gp130 Rezeptor	Suspensionszellen	AG Scheller, Düsseldorf
Phönix-Eco	Humane embryonale Nierenzellen	adhärente Zellen	DKFZ, Ursula Klingmüller, Heidelberg (Pear <i>et al.</i> 1993)
HEK293T	Humane embryonale Nierenzellen	adhärente Zellen	ATCC (Nummer: CRL-1573)
Expi293F™	Humane embryonale Nierenzelle	Suspensionszellen	Thermo Scientific USA (Jain <i>et al.</i> 2017)

### 3.12 Zytokine und Proteine

Sämtliche Zytokine und Proteine, welche während dieser Arbeit verwendet wurden, sind in Tabelle 12 aufgelistet.

**Tabelle 12:** Übersicht der in dieser Arbeit verwendeten Zytokine und Proteine

Humane Zytokine	Herkunft
HIL-6 Twin-strep-tag (Ts)	Während dieser Arbeit hergestellt
IL-6	AG Scheller
IL-6 Myc Ts	Während dieser Arbeit hergestellt
IL-6 FLAG Ts	Während dieser Arbeit hergestellt
sIL-6R Myc Ts	Während dieser Arbeit hergestellt
sIL-6R Myc Fc Überstand	Während dieser Arbeit hergestellt

sgp130-Fc	AG Scheller
monomeres sgp130	R&D Systems, cat.nr. AVI11067
VHH6-(EAAAK) <sub>12</sub> -Fc	Während dieser Arbeit hergestellt
VHH6-(EAAAK) <sub>8</sub> -Fc	Während dieser Arbeit hergestellt
VHH6-(EAAAK) <sub>2</sub> -Fc	Während dieser Arbeit hergestellt

## 4. Methoden

### 4.1. Molekularbiologische Methoden

#### 4.1.1 DNA-Gelelektrophorese

Um die DNA-Fragmentlänge ermitteln zu können, wurden die Nukleinsäuren mittels einer Gelelektrophorese in einem Molekularsieb aus 1% (v/w) Agarosegel durch ein elektrisches Feld voneinander getrennt. Hierbei wandert die negativ geladene DNA zur Anode. Kleinere DNA-Fragmente wandern dabei schneller als größere Fragmente. Durch das HD Green können diese Fragmentlängen sichtbar gemacht werden, da es in die DNA interkaliert, wodurch es mittels UV-Licht fluoresziert. Hierfür wurde die Agaroselösung mit 0,0002% HD Green versetzt. Das Bandenmuster wurde durch das Geldokumentationssystem der Firma INTAS (Göttingen, Deutschland) dokumentiert.

#### 4.1.2 DNA-Extraktion aus Agarosegelen

Um die gewünschten, in der Gelelektrophorese voneinander getrennten, DNA-Fragmente isolieren zu können, wurden diese zuerst auf einem Transilluminator bei einer Wellenlänge von 470 nm angeregt und sichtbar gemacht. Das gewünschte Fragment wurde mittels eines Skalpell aus dem Agarosegel herausgeschnitten und in ein 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Anschließend wurde die Nukleinsäure gemäß den Herstellerangaben mittels *NucleoSpin Gel und PCR Clean-up* Kit extrahiert.

#### 4.1.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren und Proteinen

Die Konzentration von gereinigten Proteinen sowie Nukleinsäuren wurde mittels NanoDrop 2000 spektroskopisch bestimmt. Dabei wird die Konzentration von DNA und RNA bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen, sodass die Reinheit durch das Absorptionsverhältnis  $A_{260}/A_{280}$  bestimmt werden kann. Der daraus resultierende Quotient sollte dabei über 1,8 liegen. Die Konzentrationsmessung erfolgt über eine Absorptionsmessung von 280 nm, da bei dieser Wellenlänge die aromatischen Aminosäuren wie Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin absorbieren. Die Konzentration wurde mittels des Lambert-Beerschen Gesetzes berechnet (Formel 1).

$$\text{Konzentration} \frac{\text{mg}}{\text{ml}} = \frac{A_{280}}{\epsilon(M - 1\text{cm} - 1)} \times 1(\text{cm}) \times \text{Molekulargewicht (Da)}$$

Formel 1: Lambert-Beersches Gesetz

#### 4.1.4 Restriktion von DNA

Um ein bestimmtes DNA-Fragment für die weitere Klonierung verwenden zu können, wurde eine Restriktion durchgeführt. Dafür wurde das Plasmid mit Hilfe von Restriktionsenzymen (Thermo Fisher Scientific, USA) gespalten. Bei dieser Spaltung erkennen die Restriktionsenzyme spezifisch die DNA-Sequenz an der sie die Phosphodiesterbindung hydrolysieren. Dabei entstehen je nach Restriktionsenzym entweder DNA-Doppelstränge mit Überhang (*sticky ends*) oder ohne (*blunt ends*). Die Restriktion erfolgt mit 10 µg Plasmid und 10 U des benötigten Enzyms sowie mit dem vom Hersteller empfohlenen Puffer. Das Gesamtvolumen betrug hierbei 50 µl. Der Restriktionsansatz wurde anschließend für 2 h oder über Nacht bei 37°C inkubiert. Zur Kontrolle einer bereits durchgeführten Klonierung, wurde eine DNA-Menge von 3 µg verwendet. Für die noch zu verwendenden DNA-Fragmente wurde ein Ansatz von 30 µg gewählt. Im Anschluss wurde der Restriktionsansatz von 50 µl mit 10 µl TriTrack DNA-Ladepuffer versetzt, um eine analytische oder präparative Gelelektrophorese durchzuführen.

#### 4.1.5 Dephosphorylierung von DNA

Zur Vermeidung von Religationen des linearisierten Vektors nach der Restriktionsspaltung, wurde das 5'-Ende dephosphoryliert. Dazu wurde der hydrolysierte Restriktionsansatz mittels *NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Kit* gereinigt, um die Restriktionsenzyme mit dem entsprechenden Puffer zu entfernen. Im Anschluss wurde die gereinigte DNA mit 1 U FastAP (Thermo Fisher Scientific, Waltham) für 1 h bei 37°C inkubiert und im Anschluss nochmals gereinigt. Die Dephosphorylierung wurde jedoch nur bei *blunt end* geschnittenen Vektoren durchgeführt.

#### 4.1.6 Phosphorylierung von DNA

Im Falle eines durch PCR amplifizierten DNA-Fragmentes, musste dieses für die anschließende Ligation in den Vektor phosphoryliert werden. Dies geschieht, da die Amplifikate aus der PCR keine 5' Phosphatgruppen besitzen, welche für eine Ligation benötigt werden. Hierzu wurde eine T4-Polynukleotidkinase (PNK) verwendet, welche den Transfer einer Phosphatgruppe eines Adenosintriphosphates auf eine 5'-Hydroxygruppe der Nukleinsäure katalysiert. Die Reaktion wurde mit folgender Zusammensetzung angesetzt:

4 µl PCR Produkt  
5 µl Ligasepuffer  
1 µl PNK  
Auf 50 µl <sub>dd</sub>H<sub>2</sub>O auffüllen

Der Reaktionsansatz wurde für 30 min bei 37°C inkubiert. Im Anschluss wurde die PNK für 5 min bei 75°C inaktiviert.

#### 4.1.7 Ligation von DNA-Fragmenten

Um das gewünschte Insert mit dem Vektor zu ligieren, wurden diese durch die Bildung einer Phosphodiesterbindung zwischen dem 3'-Hydroxyende und dem 5'-Phosphatende miteinander ligiert. Wichtig hierbei war, dass das verwendete Insert, sowie der Vektor, zuvor mit dem gleichen Enzym geschnitten wurden. Für die Ligation wurden 100 ng Vektor DNA sowie ein molarer Überschuss im Verhältnis von 1:7 vom Insert eingesetzt. Zum Ligationsansatz wurden neben Insert und Vektor zusätzlich 2 µl T4-Ligasepuffer, 2 µl PEG4000 und 2 µl T4-Ligase (Thermo Fisher Scientific, Waltham) hinzugegeben. Das Gesamtvolumen von 20 µl wurde im Anschluss für 2 h bei RT oder über Nacht bei 4°C inkubiert.

#### 4.1.8 Transformation von chemisch kompetenten *E.coli* Bakterien mit Plasmid DNA

Zur Vervielfältigung von pDNA wurden chemisch kompetente *E.coli* XL1-blue Bakterien verwendet, welche in 30 µl Aliquots bei -80°C gelagert wurden. Für die Transformation wurden die Zellen für 5 min auf Eis aufgetaut. Anschließend wurden entweder 0,5 µl (bei einer Retransformation) der Plasmid-DNA oder 10 µl (bei einer Transformation) des Ligationsansatzes hinzugegeben. Dieser Transformationsansatz wurde für 5 min auf Eis inkubiert bevor der Hitzeschock bei 42°C für 1 min folgte. Im Anschluss wurde die Bakteriensuspension für 5 min auf Eis inkubiert und anschließend mit 500 µl antibiotikafreiem LB-Medium versetzt. Zur Regeneration wurden die Zellen 60 min bei 37°C und 1.000 rpm inkubiert. Im Anschluss wurde die gesamte Bakteriensuspension auf LB-Agarplatten ausplattiert und bei 37°C über Nacht in den Inkubator gelegt.

#### 4.1.9 Mini-Präparation von Plasmid-DNA

Um die Plasmid-DNA aus den transformierten *E.coli* zu extrahieren und zu analysieren, wurde jeweils eine Bakterienkolonie gepickt und in ein 2 ml Reaktionsgefäß, welches mit 1,8 ml LB-Medium gefüllt war, überführt. Dieses Reaktionsgefäß wurde im Anschluss über Nacht bei 37°C und 1.000 rpm inkubiert, damit sich die Bakterien vermehren. Durch das Prinzip der

alkalischen Lyse wurde die pDNA dann aus den Bakterien extrahiert. Hierfür wurde die Bakterienkultur zentrifugiert (15.000 g, 1 min, RT) und das Zellpellet mit 100 µl kaltem S1-Puffer resuspendiert. Danach wurden 200 µl S2-Puffer hinzugefügt und 5 min auf Eis inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Zugabe von 200 µl kaltem S3-Puffer, welcher die Lyse durch das im S3-Puffer enthaltenem Kaliumacetat neutralisierte. Nach der anschließenden Zentrifugation (17.000 g, 10 min, 4°C), wurde der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt und 500 µl kaltes Isopropanol hinzugegeben. Danach wurde nochmals zentrifugiert (17.000 g, 15 min, 4°C). Die nun präzipitierte pDNA wurde mit 500 µl 70%igem Ethanol (v/v) gewaschen und wieder zentrifugiert (17.000 g, 5 min, 4°C). Der Überstand wurde abgenommen und das DNA-Pellet, welches aus der präzipitierten pDNA bestand, getrocknet um sicher zu sein, dass kein Ethanol mehr vorhanden ist. Im Anschluss wurde die pDNA mit 50 µl  $\text{ddH}_2\text{O}$  gelöst.

#### 4.1.10 Midi-Präparation von Plasmid-DNA

Um größere Mengen (500-1000 µg) pDNA zu isolieren, wurden Midi-Präparationen durchgeführt. Dafür wurden 100 ml  $\text{LB}_{\text{amp-}}/\text{LB}_{\text{kan}}$  Medium mit einer Bakterienkolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C und 150 rpm inkubiert. Im Anschluss wurde die Bakteriensuspension zentrifugiert (4.000 g, 30 min, 4°C) und die pDNA aus dem Zellpellet mit dem NucleoBond Xtra Midi Kit gemäß den Herstellerangaben isoliert. Die isolierte pDNA wurde mit 200 µl  $\text{ddH}_2\text{O}$  gelöst und die Konzentration mittels Nanodrop wie in Abschnitt 4.1.3 beschrieben, bestimmt.

#### 4.1.11 mRNA-Isolation

Die mRNA-Isolation erfolgte mittels NucleoSpin RNA Kit (Macherey-Nagel, Düren). Hierzu wurde die mRNA aus Ba/F3 Zellen verwendet und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Isolation erfolgte gemäß den Herstellerangaben. Die Elution wurde mit 40 µl  $\text{ddH}_2\text{O}$  durchgeführt. Die mRNA-Konzentration wurde, wie zuvor beschrieben (4.1.3) bestimmt. Bis zur Verwendung der mRNA für eine *Real-Time* PCR (RT-PCR) oder einer Transkriptomanalyse, wurde diese bei -80°C gelagert.

#### 4.1.12 Transkriptomanalyse

Die Transkriptomanalyse mittels RNA-Sequenzierung ist eine Genexpressionsanalyse, die es ermöglicht, das Transkriptom von Zellen zu untersuchen.

Um das Transkriptomprofil einer Zelllinie zu bestimmen, wurden die Zellen für 40 min mit 100 ng/ml IL-6 bei 37°C stimuliert. Anschließend wurde die mRNA der jeweiligen Proben

mittels NucleoSpin RNA Kit (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland) nach Protokoll isoliert. Die RNA-Konzentration wurde mit einem NanoDrop 2000c-Spektrophotometer (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA) gemessen und auf 100 ng/μl für alle Proben eingestellt. Im Anschluss wurden die Proben für die weitere Analyse an das Genomics & Transcriptomics Labor (BMFZ) der HHU übergeben. Die vom BMFZ generierten Daten wurden anschließend übermittelt und mittels statistischer Methoden ausgewertet. Dabei wurde die *False Discovery Rate* (FDR) angewendet, welche eine Korrekturmethode ist, um die Anzahl der falsch positiven Ergebnisse zu korrigieren. Desweiteren wurde ein P-Wert von  $\leq 0,05$  als signifikant betrachtet. Um die Unterschiede zwischen der WT und der generierten Zelllinie besser hervorzuheben, wurde der Schwellenwert *Fold Change* (FC) von auf einen Betrag von 2 gesetzt ( $|2|$ ). Dies bedeutet, dass für die statistische Auswertung die Transkriptdaten der Gene verwendet wurden, bei denen eine Hoch- / Herunterregulation um mindestens das Doppelte, abweichend vom WT, detektiert werden konnten. Mit den daraus resultierenden Daten wurde ein Venn-Diagramm (<https://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/venn>) erstellt.

#### 4.1.13 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Amplifikation bestimmter Regionen innerhalb einer Plasmid-DNA erfolgte über eine PCR. Für die Reaktion wurde eine thermostabile DNA-Polymerase, die Matrize (*template*), ein Polymerasepuffer, spezifische Oligonukleotide (*Primer*) und freie Desoxynukleotide (dNTP) in einem PCR-Ansatz vermengt.

Für die Amplifikation von DNA-Fragmenten zwecks anschließender Klonierung, wurde die Phusion *High-Fidelity* Polymerase (Thermo Fisher Scientific, Waltham) verwendet. Diese Polymerase besitzt eine 3'→5' Exonuklease-Aktivität (*proof reading*), welche eine 50x niedrigere Fehlerrate besitzt als eine Polymerase ohne *proof reading* Aktivität.

In der unten aufgeführten Tabelle 13 ist ein Reaktionsansatz zur Amplifikation von DNA-Fragmenten aufgeführt.

**Tabelle 13: Reaktionsansatz einer PCR mit der Phusion DNA-Polymerase.**

Komponente	Volumen	Endkonzentration
------------	---------	------------------

Template DNA	1 µl	>50 ng
5x Phusion HF-/ GC Puffer	10 µl	1x
dNTP's	1 µl	200 µM
<i>Forward</i> Primer	2,5 µl	0,5 µM
<i>Reverse</i> Primer	2,5 µl	0,5 µM
DMSO (optional)	1 µl	2%
Phusion DNA Polymerase	0,5 µl	1 U/50 µl Ansatz
ddH <sub>2</sub> O	Auffüllen auf 50 µl	-

Das zur PCR gehörige PCR-Programm ist in Tabelle 14 beschrieben.

**Tabelle 14: Beispiel eines PCR-Programms zur Amplifikation bestimmter DNA-Regionen mit der Phusion DNA-Polymerase**

Arbeitsschritt	Temperatur	Zeit
Initiale Denaturierung	98°C	30 sec.
Denaturierung	98°C	10 sec.
<i>Annealing</i>	~60°C	20 sec.                      30 Zyklen
Elongation	72°C	20 sec./kBp
Finale Elongation	72°C	5 min
Kühlung	4°C	∞

Die erfolgreiche Amplifikation wurde mittels Agarosegelelektrophorese analysiert. Im Anschluss wurde das PCR-Produkt mittels *NucleoSpin Gel und PCR Clean-up* gereinigt (4.1.11), phosphoryliert (4.1.6) und in die entsprechenden Vektoren ligiert (4.1.7).

#### 4.1.13.1 *Colony* Polymerase-Kettenreaktion (cPCR)

Zur Verifikation der korrekten Klonierung wurde eine cPCR durchgeführt. Hierbei wurde die PCR ohne vorherige Isolation der pDNA durchgeführt. Dabei fungierte die DNA im Cytosol der Bakteriensuspension als Vorlage. Die zu analysierende Bakterienkolonie wurde dazu in 20 µl ddH<sub>2</sub>O transferiert und anschließend für die PCR verwendet. Der Rest der Bakteriensuspension wurde aufgehoben, um bei einem positiven Ergebnis eine Midi-Präparation (4.1.10) durchzuführen. Für die Analyse wurde eine Dream Taq PCR Master Mix 2x verwendet. Zudem wurden ebenfalls *forward* und *reverse* Primer verwendet. Hierbei ist zu beachten, dass ein Primer spezifisch im Vektor der andere im Insert hybridisiert, da sonst falsch positive Ergebnisse entstehen könnten, zum Beispiel, wenn zwei Primer im Vektor binden würden und das Insert falsch herum ligiert wurde. Der Reaktionsansatz ist in der unten aufgeführten Tabelle 15 beschrieben.

Tabelle 15: Reaktionsansatz für eine *colony* PCR.

Komponente	Volumen
Template	20 µl
Dream Taq Puffer	5 µl
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	4 µl
Forward Primer	0,25 µl
Reverse Primer	0,25 µl
dNTP's	1 µl
Dream Taq	0,2 µl
H <sub>2</sub> O	Auffüllen auf 50 µl

Die unten aufgeführte Tabelle 16 zeigt beispielhaft ein PCR-Programm, welches während dieser Arbeit verwendet wurde.

Tabelle 16: PCR-Programm für eine *colony* PCR.

Arbeitsschritt	Temperatur	Zeit
Initiale Denaturierung	95°C	5 min
Denaturierung	95°C	1 min
<i>Annealing</i>	~60°C	1 min
Elongation	72°C	1 min/KBp
Finale Elongation	72°C	5 min
Kühlung	4°C	∞

#### 4.1.13.2 *Splicing by Overlapping Extension* Polymerase-Kettenreaktion (SOE-PCR)

Die SOE-PCR (*Splicing by Overlapping Extension Polymerase Chain Reaction*) ist eine Methode, die dazu dient, zwei separate DNA-Fragmente miteinander zu verbinden.

Der Prozess umfasst mehrere Schritte. Zuerst werden spezifische Primer für jedes der zu verbindenden DNA-Fragmente erstellt. Die 3'-Enden der Forward-Primer des ersten Fragments und der Reverse-Primer des zweiten Fragments weisen eine Homologie auf, die für die spätere Verbindung der Fragmente entscheidend ist. Im nächsten Schritt erfolgt die separate PCR-Amplifikation der beiden DNA-Fragmente unter Verwendung der entsprechenden Primer. Nach der Amplifikation werden die PCR-Produkte mit dem *NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Kit* gereinigt, um überschüssige Primer und Nukleotide zu entfernen. Die eigentliche Überlappungsverlängerung erfolgt in einer dritten PCR, in der die gereinigten PCR-Produkte mittels zweier spezifischer Primer (erster Primer bindet am Anfang des ersten Fragments und der zweite Primer bindet am Ende des zweiten Fragments) gemischt

werden. Das Endprodukt wird abschließend mit dem *NucleoSpin Gel and PCR Clean-up Kit* gereinigt.

#### 4.1.13.3 Real-Time Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR)

Bei der *Real-Time*-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) wird zunächst die aus den Proben isolierte mRNA mittels spezieller Primer in cDNA umgeschrieben. Die Quantifizierung dieser cDNA lässt Rückschlüsse auf die Aktivierung und Transkription der zu überprüfenden Gene ziehen. Das Prinzip dieser Methode beruht dabei darauf, dass PCR-Produkte in Abhängigkeit zur jeweilig eingesetzten Matrizenmenge stehen. Diese nehmen pro Zyklus exponentiell zu. Dies bedeutet, dass je mehr RNA von einem Transkript gebildet wird, desto früher wird dieses Transkript in einem PCR-Zyklus detektiert. Die Detektion der PCR-Produktzunahme ist durch den Fluoreszenzfarbstoff SYBR Green möglich, welcher im *iTaq™ Universal SYBR green One-Step Kit* (BioRad, USA) enthalten ist. Während der Amplifikation interkaliert SYBR Green in die neu synthetisierte DNA. Die Fluoreszenz wurde während jedes Zyklus in Echtzeit mittels des *AB175000 Real-Time PCR Systems* (Thermo Fisher Scientific, USA) gemessen. Sie steht in direkter Relation zum synthetisierten PCR-Produkt.

Im Folgenden ist ein Reaktionsansatz einer Real-Time PCR dargestellt:

2 µl mRNA (Template, 100 ng/µl)  
 5 µl Puffer iTaq SYBR  
 0,125 µl Primer *Forward*  
 0,125 µl Primer *Reverse*  
 0,125 µl Enzym Script reverse Transkriptase  
 Auf 10 µl <sub>dd</sub>H<sub>2</sub>O auffüllen

Die unten (Tabelle 17) aufgeführte Tabelle stellt ein beispielhaftes RT- Programm da, welches im Zuge dieser Arbeit verwendet wurde

Tabelle 17: Programm zur Synthese von mRNA zu cDNA

Arbeitsschritt	Temperatur	Zeit
reverse Transkription	50°C	10 min
Aktivierung Polymerase und DNA Denaturierung	95°C	10 min
Denaturierung	95°C	15 min
<i>Annealing</i>	60°C	1 min

Die detektierten Fluoreszenzdaten wurden durch die Software 75000 von Applied Biosystems (Foster City, USA) als  $C_t$ -Wert bestimmt und für die weitere Berechnung der relativen Transkriptmengen verwendet.

Hierfür wurden die errechneten  $C_t$ -Werte des zu untersuchenden Zielgens in Bezug auf das Referenzgen berechnet, welches in allen Zellkonditionen exprimiert wird. Der somit erhaltene  $\Delta C_t$ -Wert ermöglicht auf diese Weise Vergleiche zwischen der WT Zelllinie und der zu untersuchenden Zelllinie. Die Berechnung wurde mittels der folgenden Formel durchgeführt (Formel 2)

$$\text{Verhältnis} = \frac{\left( (\text{Effizienz}_{\text{Zielgen}} \times 0,01) + 1 \right) C_t^{\text{Zielgen}}}{\left( (\text{Effizienz}_{\text{Referenzgen}} \times 0,01) + 1 \right) C_t^{\text{Referenzgen}}}$$

**Formel 2: Formel für den  $\Delta C_t$ -Wert.**

Um jedoch die Unterschiede zwischen den jeweiligen Zeitpunkten zu ermitteln, wurde der  $\Delta\Delta C_t$ -Wert errechnet. Hierbei wird jeder  $\Delta C_t$ -Wert einer behandelten Probe minus den  $\Delta C_t$ -Wert der unbehandelten Probe gerechnet um somit die Differenz zu errechnen (Formel 3).

$$\Delta\Delta C_t = \Delta C_t (\text{behandelte Probe}) - \Delta C_t (\text{unbehandelte Probe})$$

**Formel 3: Formel für den  $\Delta\Delta C_t$ -Wert.**

#### 4.1.14 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung wurde von der Firma Microsnth SeqLab (Göttingen, Deutschland) durchgeführt. Die Proben wurden dafür mit den dafür vorgesehenen Oligonukleotiden verschickt.

## 4.2 Proteinbiochemische Methoden

### 4.2.1 Lyse von Ba/F3 Zellen

Für die Lyse der Ba/F3 Zellen wurden diese zuerst zentrifugiert (450 g, 5 min, RT) und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Danach konnte es entweder direkt lysiert, oder zuerst bei -20°C gelagert werden. Je nach Größe des Zellpellets, wurden diese in einem Volumen von 60-200 µl JAK-Lysepuffer resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen für 50 min bei 4°C unter Rotation lysiert. Danach erfolgte eine weitere Zentrifugation (17.000 g, 10 min, 4°C). Der Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und die Proteinkonzentration mittels *bicinchoninic acid (BCA)*-Assay bestimmt (siehe 4.2.2).

### 4.2.2 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels *bicinchoninic acid (BCA)*

Die Proteinkonzentration der Zelllysate wurde nach den Herstellerangaben mit dem *BCA Protein Assay Kit* (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) ermittelt. Hierbei reagiert das Natriumsalz der Bicinchoninsäure unter alkalischen Bedingungen mit dem, durch die Biuret-Reaktion erzeugtem Kupfer(I)-Ion. Einige Aminosäuren wie Cystein, Tryptophan und Tyrosin sind in der Lage Kupfer(II)-Ionen ( $\text{Cu}^{2+}$ ) zu Kupfer-Ionen ( $\text{Cu}^+$ ) zu reduzieren. Der Bicinchoninsäure-Kupfer-Komplex bildet eine violette Farbe. Die Absorption wurde im Fluorometer bei 562 nm gemessen. Zur Bestimmung der Proteinkonzentration der Zelllysate wurde eine Standardgerade durch eine *bovin serum albumin (BSA)*-Verdünnungsreihe erstellt und gemessen. Um Pipettierfehler zu minimieren wurden jeweils 25 µl im Duplikat verwendet.

### 4.2.3 *Sodium dodecyl sulphate*-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Für die Analyse von Proteinen wird eine Trennung nach ihrem Molekulargewicht durch eine *sodium dodecyl sulphate (SDS)*-PAGE durchgeführt. In die Geltaschen wurden jeweils 20 µl mit 50 µg Gesamtprotein (für Zelllysate) oder mit 20 µl Zellüberstand geladen. Die Denaturierung und Reduktion der Disulfidbrücken erfolgte durch das im Lämmli-puffer enthaltene  $\beta$ -Mercaptoethanol bei 95°C für 10 min. Die Proteine bewegen sich im polymerisierte Polyacrylamidgel in Richtung der Anode. Dabei bewegen sich kleinere Proteine im Molekularsieb schneller voran als die größeren. Für die Elektrophorese wurde eine konstante Spannung von 80 Volt angelegt. Diese Spannung wurde solange gehalten, bis die Proteine aus dem Sammelgel das Trenngel erreichen. Ab dann wurde die Spannung auf 130 Volt erhöht.

Hierbei wurden je nach Molekulargewicht des zu analysierenden Proteins 10- oder 15%ige SDS-Polyacrylamidgelle in einer Dicke von 1,5 mm verwendet.

#### 4.2.4 Western Blot

Die fluoreszenzbasierte Methode:

Für eine Detektion spezifischer Proteine wurden die zuvor in der SDS-PAGE voneinander getrennten Proteine, auf eine Nitrocellulose (NC)-Membran transferiert. Für diesen Transfer wurde das Trans-Blot-*semi-dry* Transfer-System von BioRad (München, Deutschland) verwendet. Die NC-Membran wurde zusammen mit Whatman-Papier für 1 min im Transferpuffer äquilibriert. Im Anschluss wurden zuerst drei feuchte Whatman-Papiere in die Transferbox gelegt, dann die NC-Membran und im Anschluss das SDS-Polyacrylamidgel mit den Proteinen. Auf das Gel werden zuletzt nochmals drei feuchte Whatman-Papiere gelegt. Im Anschluss erfolgte der Proteintransfer vom Gel auf die NC-Membran für 30 min unter einer konstanten Spannung von 25 V und einer konstanten Stromstärke von 1 A. Die Membran wurde mindestens 1 h in einer mit TBS (1:3) verdünnten Intercept Blockierlösung (*LI-COR Biosciences GmbH*) bei RT inkubiert. Die NC-Membran wurde nach dem Blocken mit dem primären Antikörper über Nacht bei 4°C inkubiert. Am folgenden Tag wurde die Membran dreimal für 5 min mit TBS-T gewaschen bevor der sekundäre Antikörper hinzugegeben wurde. Sowohl der primäre als auch der sekundäre Antikörper wurden in der 1:3 verdünnten Blockierlösung angesetzt und zusätzlich Tween 20 (0,1%, (v/v)) hinzugegeben. Zum Schluss wurde der sekundäre Antikörper für 1 h zusammen mit der Membran in TBS-T inkubiert. Anschließend wurde für 5 min mit TBS-T und 1x 5 min mit TBS gewaschen, bevor die Zielproteine detektiert wurden. Die Detektion erfolgte am Geldokumentationssystem Odyssey XF Imager (*LI-Cor Biosciences GmbH, USA*).

Die auf Chemilumineszenz basierte Methode:

Für eine spezifische Detektion der Proteine, wurden die zuvor in der SDS-PAGE voneinander getrennten Proteine auf einer Roti® PVDF-Membran, Porengröße 0,45 µm transferiert. Für diesen Transfer wurde das Trans-Blot-*semi-dry* Transfer-System von BioRad (München, Deutschland) verwendet. Die PVDF-Membran wurde initial für 2 min in Methanol ≥99,9% (v/v) äquilibriert. Das Whatman- Papier wurde ebenfalls für 1 min in Transferpuffer äquilibriert. Im Anschluss wurden drei feuchte Whatman-Papiere in die Transferbox gelegt, dann die PVDF-

Membran und im Anschluss das SDS-Polyacrylamidgel mit den Proteinen. Auf das Gel wurden zuletzt nochmals drei feuchte Whatman-Papiere gelegt. Im Anschluss erfolgte der Proteintransfer vom Gel auf die PVDF-Membran für 60 min unter einer konstanten Spannung von 20 V und einer konstanten Stromstärke von 1,5 A. Im Anschluss wurde die Membran mindestens für 1 h in einer 5 %igem (w/v) Milchlösung bei RT inkubiert. Die PVDF-Membran wurde nach dem Blocken mit dem primären Antikörper in einer 5%igem (w/v) BSA-Lösung über Nacht bei 4°C inkubiert. Am folgenden Tag wurde die Membran dreimal für 5 min mit TBS-T gewaschen bevor der sekundäre Antikörper in einer 5%igem (w/v) Milchlösung hinzugegeben wurde. Dieser wurde für 1 h bei RT inkubiert. Anschließend wurde für 5 min mit TBS-T und 1x 5 min mit TBS gewaschen bevor die Proteine detektiert wurden. Die Detektion erfolgte am Geldokumentationssystem Intas ChemoStar PC ECL & Fluorescence Imager (Intas Science Imaging).

#### 4.2.5 Coomassie Färbung von SDS-Polyacrylamidgelen

Zur generellen Sichtbarmachung von Proteinen in einem SDS-Polyacrylamidgel wurden diese mit Coomassie gefärbt. Das hierbei verwendete Coomassie bindet an die basischen Aminosäuren innerhalb der Proteine und macht diese somit sichtbar. Für diesen Vorgang wurde das Polyacrylamidgel in die Coomassie-Färbelösung gelegt, 30 sec. in der Mikrowelle bei 600 W erwärmt und für 15 min bei RT schüttelnd inkubiert. Um das nicht gebundene Coomassie wieder zu entfernen, wurde zuerst die Färbelösung entfernt und anschließend die Coomassie-Entfärbelösung zugegeben. Die Entfärbelösung wurde alle paar Stunden ausgewechselt und neue hinzugegeben, bis der gewünschte Kontrast erkenntlich war.

#### 4.2.6 Protein A-Affinitätschromatografie

Um Fc-getaggte, rekombinante Proteine aus den Expi293 Zellkulturüberständen zu reinigen, wurde die Protein A-Affinitätschromatografie verwendet. Protein-A stammt aus der Zellwand des *Staphylococcus aureus* und bindet spezifisch und pH-responsiv an IgG-Fc. Hierfür wurde die HiTrap MabSelect Prisma (Cytiva, USA) verwendet. Nach Äquilibrierung der Säule und des Systems (Äkta Start, GE Healthcare, Chicago, USA) mit PBS wurden 30-150 ml Zellkulturüberstand mit einer Flussrate von 1 ml/min geladen. Im Anschluss wurde die Säule mit 20 Säulenvolumen PBS gewaschen, um ungebundene Proteine zu entfernen. Die zweistufige Elution erfolgte durch die Senkung des pH-Wertes. Zuerst auf pH 5,5 und dann auf pH 3,2 durch die entsprechenden Citratpuffer. Dadurch dissoziierte die Fc:Protein-A-

Interaktion, sodass Fc-getaggte Proteine als Eluat im Fraktionssammler gesammelt werden konnten. Die Proteinkonzentration der Elutionsfraktionen wurde mittels NanoDrop bestimmt. Im Anschluss fand eine Konzentration des Proteingehalts mittels einer Amicon Ultra Membran (Merk, Darmstadt, Deutschland) auf ein Volumen von ca. 2 ml statt. Die darauffolgende Umpufferung wurde mittels einer NAP-25 Säule (GE Healthcare, Chicago, USA) durchgeführt. Hierfür wurde die NAP-Säule mit insgesamt 30 ml PBS gespült. Anschließend wurde das konzentrierte Protein auf die Säule geladen. Zum Schluss wurde nochmals die Proteinkonzentration bestimmt und weitere Analysen (SDS-PAGE, Coomassie-Färbung, Western Blot) durchgeführt. Die verwendete Säule wurde mit 30 Säulenvolumen 0,5 M NaOH regeneriert und die gereinigten Proteine wurden aliquotiert und bei -80°C gelagert.

#### 4.2.7 StrepTactinXT Affinitätschromatografie

Diese Form der Affinitätschromatografie hat ihren Ursprung in der Interaktion zwischen Streptavidin und Biotin. Aus dieser Interaktion entwickelte sich die StrepTactin Affinitätschromatografie. Hierbei wurde das Biotin durch eine Peptidsequenz von acht Aminosäuren (WSHPQFEK, Strep-tag) und das Streptavidin durch eine Strep-Tactin Säulenmatrix ersetzt. Um eine höhere Effizienz zu erzielen, wurde die Affinität des Tags durch die in Serie geschaltete Peptidsequenz SA-WSHPQFEK-(GGGS)<sub>2</sub>-GGSA-WSHPQFEK gesteigert.

Die TwinStrep getaggte Proteine, welche sich im Expi293 Kulturmedium befanden, wurden daher über die StrepTactinXT Affinitätschromatografie gereinigt. Nach Äquilibrierung der Säule und des Systems (Äkta Start, GE Healthcare, Chicago, USA) mit Puffer W wurden 30-150 ml Zellkulturüberstand mit einer Flussrate von 1 ml/min geladen um die gewünschten Proteine mit einem TwinStrep-tag an der Säulenmatrix zu binden. Anschließend wurde die Säule mit 30 Säulenvolumen Puffer W gewaschen, um die ungebundenen Proteine zu entfernen. Die Elution fand mit dem 50 mM Biotin-haltigem Puffer BXT statt. Infolgedessen, dissoziierte die TwinStrep:StrepTactinXT-Interaktion und wurde als Eluat im Fraktionssammler gesammelt. Die Proteinkonzentration wurde mittels NanoDrop ermittelt. Im Anschluss fand eine Konzentrierung des Proteingehaltes mittels der Amicon Ultra Membran (Merk, Darmstadt, Deutschland) auf ein Volumen von ca. 2 ml statt. Umgepuffert wurde das Protein danach über eine NAP-25 Säule (GE Healthcare, Chicago, USA). Zum Schluss wurde die Endkonzentration bestimmt und weitere Analysen zur Reinheit des Proteins durchgeführt

(SDS-PAGE, Coomassie-Färbung, Western Blot). Die nicht mehr benötigte Säule wurde mit 30 Säulenvolumen 0,5 M NaOH regeneriert. Die gereinigten Proteine wurde aliquotiert und bei -80°C gelagert.

#### 4.2.8 Co-Immunopräzipitation

Um zu überprüfen, ob zwei Proteine miteinander interagieren, wurde eine Co-Immunopräzipitation (Co-IP) durchgeführt. Hierzu wurde ein 1,5 ml Reaktionsgefäß mit den gewünschten Proteinen befüllt und 470 µl TBS-T (0,1% Tween 20) hinzugegeben. Die *Gel-Affinity Beads* wurden 3x mit TBS gewaschen (2.700 g, 2 min, 4°C). Anschließend wurden je 30 µl der *Beads* pro Kondition hinzugegeben. Das Reaktionsgefäß wurde dann mindestens 1 h oder über Nacht bei 4°C unter Rotation inkubiert. Anschließend wurde das Reaktionsgefäß zentrifugiert (2.700 g, 2 min, 4°C) und der Überstand verworfen. Die *Beads*, welche nun das gewünschte Protein gebunden haben, wurden noch 2x mit TBS-T gewaschen. Anschließend wurde 50 µl Lämmli-puffer hinzugegeben und die Lösung bei 95°C für 10 min gekocht. Sollte der Analyt an den *Beads* gebunden haben, konnte dies anschließend im Western Blot nachgewiesen werden.

### 4.3 Zellbiologische Methoden

#### 4.3.1 Kultivierung von eukaryotischen Zellen

Suspensionszellen mit den entsprechenden Rezeptoren wurden in einer 10 cm Zellkulturschale in 10 ml DMEM<sup>+/+</sup> mit 20 µl HIL-6 Überstand oder mit 20 µl IL-3 Überstand kultiviert. Alle sieben Tage wurden die Zellen in einem Verhältnis von 1:10.000 passagiert. Adhärenente HEK293 oder Phönix-Eco Zellen wurden alle 3-4 Tage in 10 cm Zellkulturschalen in 10 ml DMEM<sup>+/+</sup> passagiert. Hierfür wurde das Zellkulturmedium der adhärenenten Zellen abgenommen und diese mit 10 ml PBS abgespült und zentrifugiert (450 g, 5 min, RT). Danach wurde das Zellpellet in 1 ml PBS resuspendiert und 50 µl der Zellsuspension auf eine neue Zellkulturschale überführt und 10 ml DMEM<sup>+/+</sup> hinzugegeben. Kultiviert wurden alle Zellen bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> in einer gesättigten Wasserdampf-atmosphäre.

#### 4.3.2 Transiente Transfektion von HEK293T Zellen

Bei einer transienten Transfektion wurden HEK293T Zellen mit einer Konzentration von  $2 \times 10^6$  Zellen pro 10 cm Zellkulturschale in 10 ml DMEM<sup>+/+</sup> ausgesät. Am nächsten Tag wurde 5 µg pDNA mit 10 µl Turbofect (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) in 1 ml DMEM<sup>-/-</sup> gemischt und 15 min bei RT inkubiert. Hierbei bildete sich ein Komplex aus der pDNA und dem

Transfektionsreagenz, welcher in der Lage ist, die Zellmembran zu passieren. Dieses Gemisch wurde dann auf die HEK293T Zellen getropft. Diese wurden im Anschluss für 48 h bei 37°C inkubiert. Für die Kontrolle der Transfektion wurde eine Zellkulturschale mit der pDNA des peGFP transfiziert. Dieses Plasmid codiert *enhanced GFP* welches in HEK293T Zellen nach 48 h unter einem Fluoreszenzmikroskop bei einer Anregung von  $\lambda_{480\text{nm}}$  nachgewiesen werden kann.

#### 4.3.3 Retrovirale Transduktion

Um Zellen zu generieren, welche bestimmte Proteine stabil auf ihrer Oberfläche exprimieren, wurde eine retrovirale Transduktion durchgeführt. Hierbei wurde die cDNA der Proteine stabil in das Genom der jeweiligen Zielzellen eingebracht. Dafür wurden  $5 \times 10^5$  Ba/F3 Zellen in 2 ml DMEM<sup>+/+</sup> pro 6-Well Zellkulturschale ausgesät. Am nächsten Tag wurde zuerst 2 µg pDNA mit 4 µl Turbofect und 200 µl DMEM<sup>-/-</sup> in ein Reaktionsgefäß gegeben, gemischt und 15 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die zuvor ausgesäten Phönixzellen mit der pDNA-Lösung beträufelt. Nach 6 h wurde das Medium durch DMEM<sup>+/+</sup> 30% FCS ersetzt und die Zellen über Nacht im Inkubator kultiviert. Am folgenden Tag wurde 1 ml des Zellkulturüberstandes der transfizierten Phönixzellen abgenommen und zentrifugiert (450 g, 5 min, RT). Die zu transduzierenden Zellen wurden zuerst mit PBS gewaschen und anschließend auf eine Zellzahl von  $2 \times 10^6$  Zellen eingestellt. In einem neuen 1,5 ml Reaktionsgefäß wurden dann 50 µl der eingestellten Zellsuspension, 250 µl Phönix Überstand, sowie 30 µg Polybren (Sigma-Aldrich, Sternheim, Deutschland) gemischt und 2,5 h bei 300 g, RT herunter zentrifugiert. Das Zellpellet wurde im Anschluss mit 5 ml DMEM<sup>+/+</sup> resuspendiert und das entsprechende Zytokin (HIL-6 oder IL-3 10 ng/ml) hinzugegeben. Je nachdem, welche Resistenz das eingefügte Plasmid hatte, wurde entweder an Tag 1 100 µl Hygromycin B (1mg/ml) oder an Tag 2 Puromycin 7,5 µl (1,5 µg/ml) zur Selektion hinzugegeben. Nach erfolgreicher Selektion wurde die Expression der Rezeptoren mittels Durchflusszytometrie und Western Blot überprüft.

#### 4.3.4 Durchflusszytometrie

Zur Kontrolle, ob die Proteine auf der Zelloberfläche exprimiert werden, wurde eine Durchflusszytometrie durchgeführt. Dieses Verfahren beruht auf einer Antigen-Antikörper-Interaktion, welche mit fluoreszenzmarkierten Farbstoffen durchgeführt wird. Hierbei bindet der primäre Antikörper an das nachzuweisende Oberflächenprotein. Der sekundäre Antikörper, welcher mit einem Fluoreszenzfarbstoff markiert ist, bindet dann an

den primären Antikörper. Die Bindung der Antikörper und die daraus resultierende Fluoreszenz ist hierbei proportional zur Oberflächenexpression des entsprechenden Proteins.

Für die Durchführung wurden  $5 \times 10^5$  Zellen zentrifugiert (450 g 5 min RT). Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet wurde in 1 ml FACS-Puffer gewaschen und wie zuvor zentrifugiert. Danach wurden 50  $\mu$ l FACS-Puffer mit dem entsprechenden Primärantikörper (1:50 oder 1:100) hinzugegeben. Die Zellen wurden 1 h bei RT inkubiert und anschließend wieder mit 1 ml FACS-Puffer gewaschen. Anschließend wurde das Zellpellet wieder mit 50  $\mu$ l FACS-Puffer und dem entsprechendem fluoreszierenden Sekundärantikörper resuspendiert und für 1 h im Dunkeln bei RT inkubiert. Anschließend folgte ein letzter Waschschrift, um den überschüssigen, nicht gebundenen Sekundärantikörper zu entfernen. Danach wurden die Zellen mit 500  $\mu$ l FACS-Puffer resuspendiert und am FACS Canto II analysiert. Die Auswertung fand mit Hilfe der Software FlowJo\_V10 statt.

#### 4.3.5 Proliferationsexperiment

Hierbei handelt es sich um die Methode der irreversiblen Umsetzung des im CellTiter-Blue enthaltenden Resazurins zum fluoreszierenden Resorufin. Die Umsetzung kann nur durch Dehydrogenaseenzyme in metabolisch aktiven Zellen stattfinden. Während dieser Umsetzung nimmt die Fluoreszenzintensität proportional zur Zellproliferation zu, welcher bei einer Wellenlänge von 560 nm gemessen werden kann.

Für diesen Assay wurden die zu analysierenden Zellen zuerst 3x 5 min bei Raumtemperatur mit PBS gewaschen und anschließend auf eine Zelldichte von  $5 \times 10^4$  Zellen/ml DMEM<sup>+/+</sup> verdünnt. Anschließend wurden diese mit dem entsprechenden Zytokin in der gewünschten Konzentration versetzt und als Triplikate mit einem jeweiligen Volumen von 100  $\mu$ l pro Kavität einer 96-Well Zellkulturplatte pipettiert und für 72 h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach dieser Inkubationszeit wurde in jede Kavität 20  $\mu$ l CellTiter-Blue Lösung pipettiert und direkt danach die erste Messung durchgeführt (Zeitpunkt 0). Die Umsetzung des Resorufin wurde bei einer Wellenlänge von 560 nm am Fluorometer Infinite M200 Pro (Tecan, Männedorf) gemessen. Es wurde alle 20 min für maximal 120 min gemessen und anschließend der Zeitpunkt 0 von der letzten Messung subtrahiert.

#### 4.3.6 Stimulationsexperiment

Die Signaltransduktion der zu analysierenden Zellen und die damit verbundene Phosphorylierung von z.B. STAT3 und ERK1/2 wurde mittels des Stimulationsassays ermittelt.

Hierzu wurde pro Kondition jeweils eine 10 cm Zellkulturschale mit jeweils 10 ml DMEM<sup>+/+</sup> mit ungefähr  $2 \times 10^6$  Zellen/ml verwendet. Die Zelle mit dem zu untersuchenden Oberflächenprotein wurden 3x mit PBS gewaschen und in DMEM<sup>-/-</sup> resuspendiert. In diesem serumfreien Medium wurden die Zellen 3-4 h inkubiert, um die Signaltransduktion, die durch das FBS hervorgerufen werden könnte, zu minimieren. Im Anschluss wurden die zu untersuchenden Zellen pro Kondition in jeweils ein 1,5 ml Reaktionsgefäß verteilt, zentrifugiert (450 g, 5 min, RT) und das Zellpellet in 1 ml DMEM<sup>-/-</sup> mit den entsprechenden Zytokinen resuspendiert. Die Stimulation wurde 18 min bei RT durchgeführt. Danach wurden die Zellen zentrifugiert (450 g, 5 min, RT), der Überstand verworfen und das Zellpellet in flüssigen Stickstoff geworfen, um den Signaltransduktionsvorgang abubrechen und zu konservieren. Anschließend erfolgte die Zellyse.

#### 4.3.7 Expression rekombinanter Proteine in Expi293 Zellen

Die Proteinexpression der Expi293 Zellen erfolgte nach dem Protokoll von Gibco Expi293 Expression System (Katalognummer: A29133). Zwei Tage vor der Transfektion wurden die Zellen auf eine Zelldichte von  $1,5 \times 10^6$  Zellen/ml Expi293 Medium verdünnt. Die Zellen wurden gemäß den Herstellerangaben transfiziert und für 5 Tage bei 37°C, 120 rpm, 8% CO<sub>2</sub> inkubiert. Für die Ernte wurden die Zellen bei 450 g, 5 min 4°C zentrifugiert, der Überstand in ein neues 50 ml Reaktionsgefäß überführt und nochmals bei 3220 g, 20 min bei 4°C zentrifugiert. Danach wurde der Zellkulturüberstand durch einen Spritzenfilter mit einer Porengröße von 450 nm filtriert und bis zur Affinitätschromatografie bei -80°C gelagert.

#### 4.3.8 Co-Immunopräzipitation mit Zellen

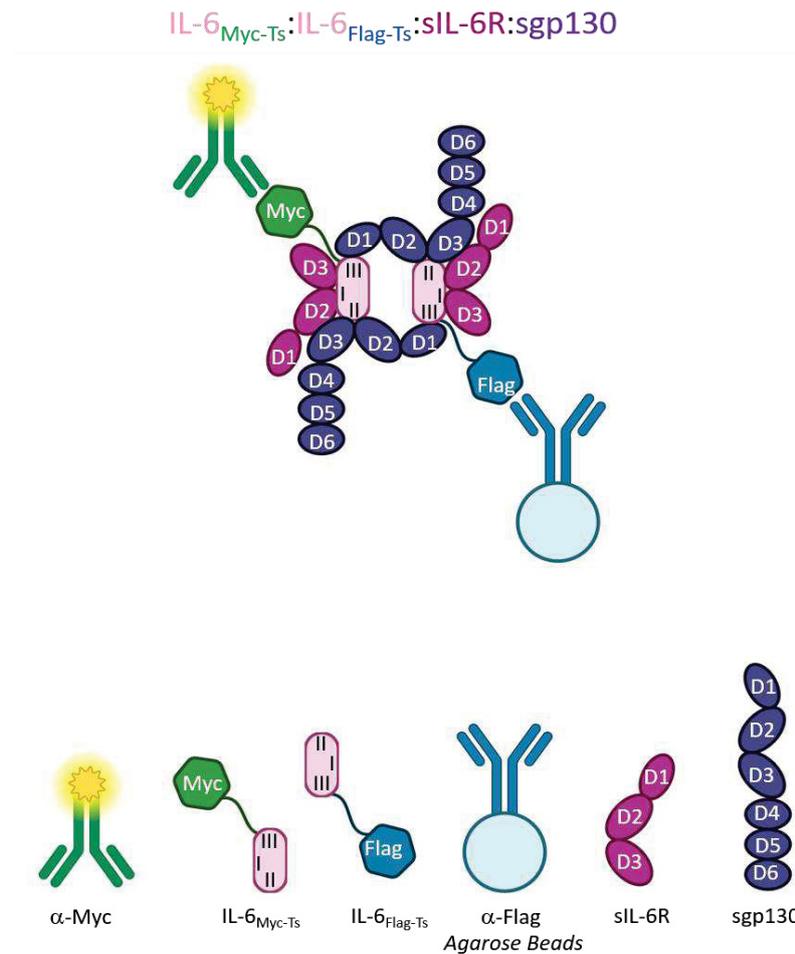
Co-transfizierte HEK293T Zellen wurden 48 h nach der Transfektion mit IP-Lysepuffer I für 1 h auf Eis lysiert. Anschließend wurden die Lysate 20 min bei 13.000 rpm zentrifugiert und der Überstand in ein neues Reaktionsgefäß überführt. In die Zelllysate wurden pro Kondition 30 µl  $\alpha$ -Flag *agarose beads* hinzugegeben und über nacht bei 4°C unter Rotation inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Proben 3x mit dem IP-Lysepuffer II gewaschen. Beim dritten Waschschrift wurde mittels Hamilton Pipette der gesamte Überstand verworfen, sodass nur noch die  $\alpha$ -Flag *agarose beads* übrig blieben. Im Anschluss wurden 50 µl 2,5x Lämmli Puffer hinzugegeben und bei 95°C für 10 min inkubiert. Die Analyse der Interaktion zwischen den unterschiedlichen Rezeptoren erfolgte mittels Western Blot.

## 5. Ergebnisse

### 5.1 Nachweis des hexameren Komplexes aus IL-6, IL-6R und gp130

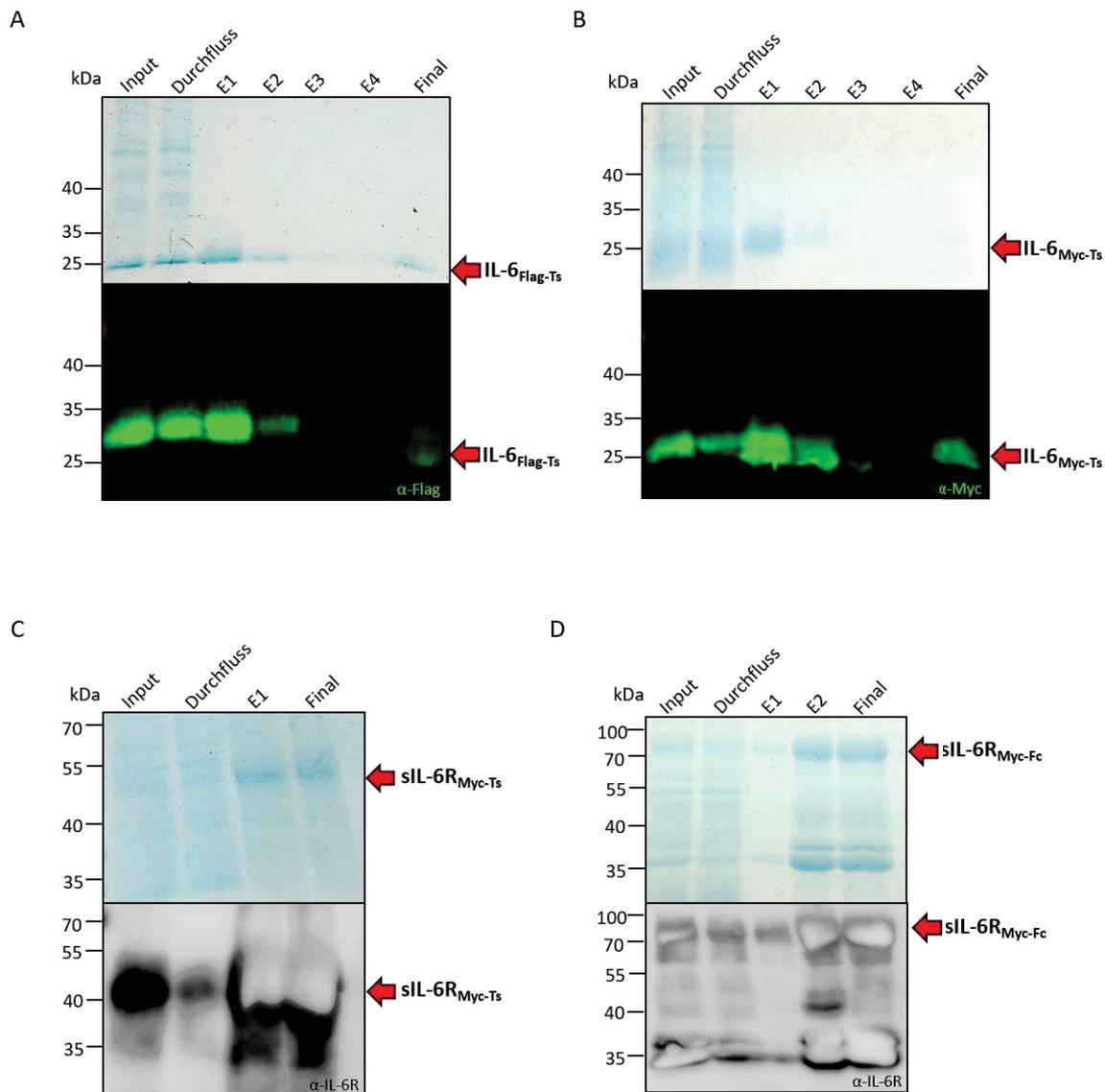
Im ersten Abschnitt dieser Arbeit sollte mittels gereinigter, rekombinanter und löslicher Proteine die Bildung eines hexameren Komplexes aus 2xIL-6:2xIL-6R:2xgp130 mittels Co-IP nachgewiesen werden (siehe 4.2.8). Hierfür wurden die Proteine IL-6<sub>Flag-Ts</sub>, IL-6<sub>Myc-Ts</sub> und sIL-6R<sub>Myc-Ts</sub> exprimiert und auf ihre biologische Aktivität getestet. Als Kontrolle, dass sowohl IL-6<sub>Flag-Ts</sub> als auch IL-6<sub>Myc-Ts</sub> an den IL-6R binden können, wurde das Protein sIL-6R<sub>Myc-Fc</sub> exprimiert, welches zwei Bindestellen für IL-6 aufweist.

Im Gegensatz zu einem tetrameren Komplex, der aus 1xIL-6:1xIL-6R:2xgp130 besteht, befinden sich in einem hexameren Komplex 2xIL-6:2xIL-6R:2xgp130. Mit Hilfe der beiden unterschiedlich markierten IL-6 (Flag und Myc) soll die Assemblierung eines Hexamers überprüft werden. Die Idee dahinter ist, dass  $\alpha$ -Flag *agarose beads* an den Flag-Tag des IL-6<sub>Flag-Ts</sub> binden, welches sich in einem Komplex aus 2xIL-6R:2xgp130 sowie einem IL-6<sub>Myc-Ts</sub> befindet. Die Proteine in diesem Komplex können durch die Co-IP mittels Western Blot nachgewiesen werden (Abbildung 6).



**Abbildung 6: Schematische Darstellung des hexameren Komplex mit den Proteinen 2xIL-6<sub>Flag/Myc-Ts</sub>:2xIL-6R<sub>Myc-Ts</sub>:2xsgp130.** Schematische Darstellung des hexameren Komplexes, bestehend aus 2xIL-6<sub>Flag/Myc-Ts</sub>:2xIL-6R<sub>Myc-Ts</sub>:2xsgp130, welcher durch  $\alpha$ -Flag agarose beads an den Flag-Tag des IL-6 präzipitiert und mittels Chemilumineszenz im Western Blot nachgewiesen werden soll. Durch einen spezifischen  $\alpha$ -Myc Antikörper soll das zweite IL-6<sub>Myc-Ts</sub> nachgewiesen werden. Erstellt mit BioRender.com.

Aufgrund des Ts-Tags wurden die Proteine IL-6<sub>Flag-Ts</sub> (Abbildung 7 A), IL-6<sub>Myc-Ts</sub> (Abbildung 7 B) und sIL-6R<sub>Myc-Ts</sub> (Abbildung 7 C) mittels Strep TactinXT Affinitätschromatographie aus einem Expi293 Zellkulturüberstand von 50 ml gereinigt. IL-6R<sub>Myc-Fc</sub> wurde mittels Protein-A Affinitätschromatographie gereinigt. Die Gesamtproteinmenge betrug bei IL-6<sub>Flag-Ts</sub> 0,6 mg. Die Gesamtproteinmenge von IL-6<sub>Myc-Ts</sub> belief sich auf 0,7 mg. Bei sIL-6R<sub>Myc-Ts</sub> betrug die Gesamtproteinmenge 1,8 mg. Bei dem Protein sIL-6R<sub>Myc-Fc</sub> betrug die Gesamtproteinmenge 2,1 mg. Im Western Blot zeigten sich beim sIL-6R<sub>Myc-Fc</sub> Nebenprodukte auf einer Höhe von 35 kDa. Hierbei handelt es sich vermutlich um ein am C-Terminus abgespaltenes Fc-Fragment ohne das sIL-6R<sub>Myc</sub> Fragment (Abbildung 7 D). Die gereinigten und in PBS umgepufferten Proteine wurden im Anschluss durch flüssigen Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.

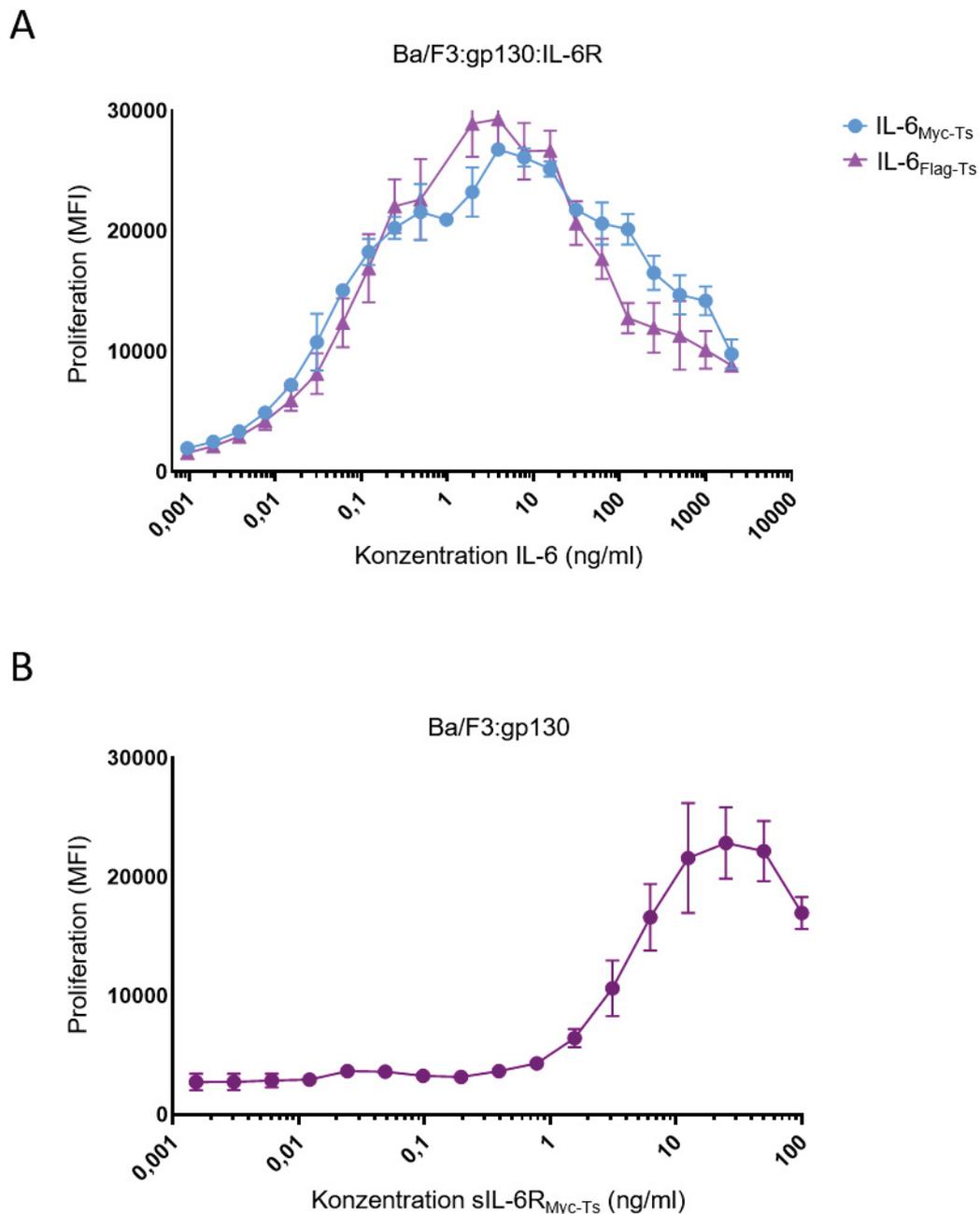


**Abbildung 7: Proteinreinigung von IL-6<sub>Flag-Ts</sub>, IL-6<sub>Myc-Ts</sub>, sIL-6<sub>Myc-Ts</sub> und sIL-6<sub>Myc-Fc</sub>.**

**A** Proteinreinigung des IL-6<sub>Flag-Ts</sub>. **B** Proteinreinigung des IL-6<sub>Myc-Ts</sub>. **C** Proteinreinigung des sIL-6<sub>Myc-Ts</sub>. **D** Proteinreinigung des sIL-6<sub>Myc-Fc</sub>. Jeweils oben: Coomassie Gel. Unten: Western Blot mit spezifischen Antikörpern (α-Myc, α-Flag, α-IL-6R), in **A** und **B** Dokumentation mittels Fluoreszenz, in **C** und **D** mittels Chemilumineszenz aufgenommen. Proteinreinigung mittels Affinitätschromatografie. Input = gefilterter Überstand vor der Reinigung, E = Elutionsfraktion, Final = Finale Probe. Es wurden jeweils 20 µl in jede Spur aufgetragen. Die Pfeile markieren die entsprechenden Proteine.

Zur Untersuchung der Aktivität der gereinigten Proteine IL-6<sub>Flag-Ts</sub>, IL-6<sub>Myc-Ts</sub> und sIL-6<sub>Myc-Ts</sub>, wurden konzentrationsabhängige Proliferationsexperimente durchgeführt. Dadurch wurde die halbmaximale effektorische Konzentration (EC<sub>50</sub>) ermittelt. Für die Proteine IL-6<sub>Flag-Ts</sub> und IL-6<sub>Myc-Ts</sub> wurde die Zelllinie Ba/F3:gp130:IL-6R verwendet. Zur Überprüfung der biologischen Aktivität des sIL-6<sub>Myc-Ts</sub>, wurden Ba/F3:gp130 Zellen mit 100 ng/ml IL-6 verwendet. Die Ergebnisse dieser Experimente zeigten für IL-6<sub>Flag-Ts</sub> eine EC<sub>50</sub> von 0,1 ng/ml und bei IL-6<sub>Myc-Ts</sub> eine EC<sub>50</sub> von 0,4 ng/ml (Abbildung 8 A). Der EC<sub>50</sub> Wert des sIL-6<sub>Myc-Ts</sub> belief sich auf 2,6 ng/ml (Abbildung 8 B). Der Proliferationsverlauf in Abbildung 8 A zeigt eine Glockenform, was darauf

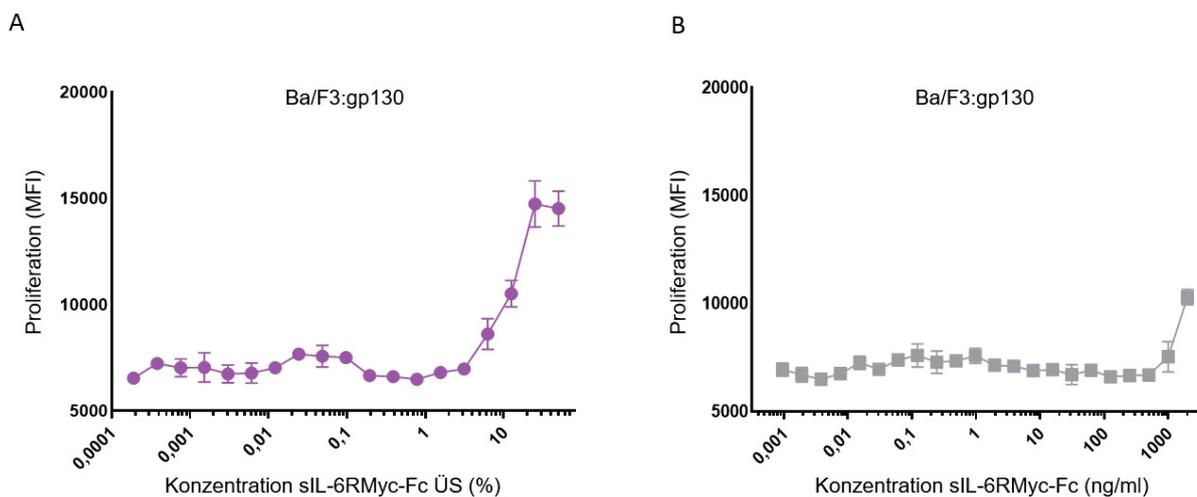
hindeutet, dass die Proliferation der Zellen bei sehr hohen Konzentrationen an IL-6 abnimmt. Dies wurde in der AG Scheller bereits öfter beobachtet, wobei der genaue Grund für dieses Zellverhalten bislang unbekannt ist. Die Ergebnisse bestätigten die biologische Aktivität der gereinigten Proteine.



**Abbildung 8: Die gereinigten Proteine IL-6 Flag Ts, IL-6 Myc Ts und sIL-6R Myc Ts sind aktiv.**

Proliferation von Ba/F3 Zellen mit den gereinigten Proteinen IL-6<sub>Flag-Ts</sub>, IL-6<sub>Myc-Ts</sub> und sIL-6R<sub>Myc-Ts</sub>. **A** Proliferation von Ba/F3:gp130:IL-6R mit dem gereinigten Protein IL-6<sub>Flag-Ts</sub> und IL-6<sub>Myc-Ts</sub> (0,00005-100 ng/ml). **B** Proliferation von Ba/F3:gp130 Zellen mit dem gereinigten Protein sIL-6R<sub>Myc-Ts</sub> (0,00005-100 ng/ml), die IL-6 Konzentration betrug dabei konstant 100 ng/ml. MFI: mittlere Fluoreszenzintensität. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler an. Die Kurven wurden mittels nichtlinearer Regression durch das Programm GraphPad Prism 8 erstellt. Diese Experimente stellen jeweils ein repräsentatives Experiment von insgesamt drei (n=3) unabhängigen Experimenten dar.

Um die biologische Aktivität des gereinigten sIL-6R<sub>Myc-Fc</sub> Proteins nachzuweisen, wurden Ba/F3:gp130 Zellen verwendet. Jedoch zeigten die Proliferationsexperimente, dass das gereinigte sIL-6R<sub>Myc-Fc</sub> zusammen mit IL-6 kaum aktiv war (Abbildung 9 B). Dies kann entweder an den Nebenprodukten liegen, oder ist auf einen Funktionsverlust während der Proteinreinigung zurückzuführen. Als Kontrolle wurde daher der, sich im Zellkulturüberstand (Üs) enthaltene, sIL-6R<sub>Myc-Fc</sub> auf seine Funktion hin untersucht. Dazu wurden Ba/F3:gp130 Zellen mit 100 ng/ml IL-6 verwendet. (Abbildung 9 A). Der resultierende EC<sub>50</sub> Wert des Zellkulturüberstands betrug 12,1% (v/v). Dies weist zwar auf eine eingeschränkte Aktivität hin, jedoch wurde der Überstand des sIL-6R<sub>Myc-Fc</sub> als Positivkontrolle für die folgenden Experimente verwendet.



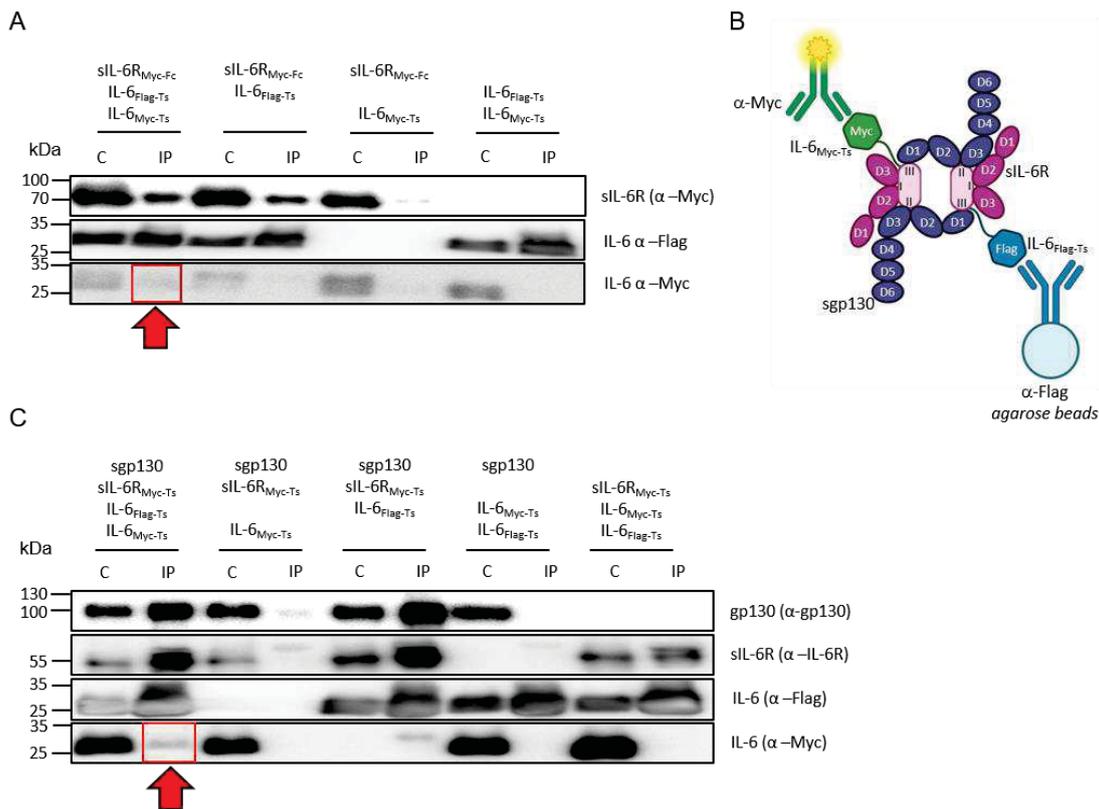
**Abbildung 9: Der sIL-6R<sub>Myc-Fc</sub> zeigt eine geringe Aktivität.**

**A:** Proliferation der Ba/F3:gp130 Zellen mit dem Zellkulturüberstand (Üs) sIL-6R<sub>Myc-Fc</sub> (0,00025-50% (v/v)). Die IL-6 Konzentration betrug konstant 100 ng/ml. **B:** Proliferation der Ba/F3:gp130 Zellen mit dem gereinigten Protein sIL-6R<sub>Myc-Fc</sub> (0,005-15.000 ng/ml). MFI: mittlere Fluoreszenzintensität. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler an. Die Kurven wurden mittels nichtlinearer Regression erstellt in GraphPad Prism 8 erstellt. Diese Experimente stellen jeweils ein repräsentatives, unabhängiges Experiment von insgesamt drei (n=3) Experimenten dar.

Nachdem die biologische Aktivität des sIL-6R<sub>Myc-Fc</sub> im Überstand nachgewiesen wurde, wurden Co-IP Experimente zum Nachweis der Bildung eines hexameren Komplexes mittels  $\alpha$ -Flag *agarose beads* durchgeführt (Abbildung 10 B). Zur Überprüfung, dass beide IL-6 an den IL-6R binden können, wurde das Kontrollexperiment mit IL-6<sub>Flag-Ts</sub> (1  $\mu$ g), IL-6<sub>Myc-Ts</sub> (1,5  $\mu$ g) und sIL-6R<sub>Myc-Fc</sub> Üs durchgeführt. In der IP-Fraktion konnte neben IL-6<sub>Flag-Ts</sub> an dem die *beads* gebunden haben und dem sIL-6R<sub>Myc-Fc</sub> eine schwache Bande des IL-6<sub>Myc-Ts</sub>, rot umrandet, nachgewiesen werden (Abbildung 10 A, Spalte zwei). Um auszuschließen, dass diese Detektion durch unspezifische Bindungen der  $\alpha$ -Flag *agarose beads* zustande kam, wurden IP

Experimente zusätzlich in Abwesenheit einzelner Komponenten durchgeführt (Abbildung 10 A). Hierbei konnte keine Interaktion nachgewiesen werden.

In Abbildung 10 C, Spalte eins und zwei, wurden die Proteine IL-6<sub>Flag-Ts</sub> (1 µg), IL-6<sub>Myc-Ts</sub> (1,5 µg), monomeres sgp130 (1 µg), sowie sIL-6R<sub>Myc-Ts</sub> (1 µg) verwendet. Hierbei wurde ein hexamerer Komplex aus 2xIL-6:2xIL-6R:2xgp130 nachgewiesen. In der IP-Fraktion konnte neben dem sgp130, dem sIL-6R<sub>Myc-Ts</sub> und IL-6<sub>Flag-Ts</sub> ebenfalls IL-6<sub>Myc-Ts</sub> (rotes Kästchen) schwach nachgewiesen werden. Durch diese Ergebnisse wurde nachgewiesen, dass sich zwei IL-6 in einem Komplex befinden, welches wiederum ein Indiz für einen hexameren Komplex ist. Um auszuschließen, dass diese Detektion nicht durch unspezifische Bindungen der  $\alpha$ -Flag *agarose beads* zustande kam, wurden Co-IP Experimente zusätzlich in Abwesenheit einzelner Komponenten durchgeführt. Bei keiner Kontrollkondition konnte das IL-6<sub>Myc-Ts</sub> präzipitiert werden (Abbildung 10 C).



**Abbildung 10: Nachweis des hexameren Komplex mit den Proteinen 2xIL-6<sub>Flag/Myc-Ts</sub>:2xIL-6R<sub>Myc-Ts</sub>:2xsgp130**

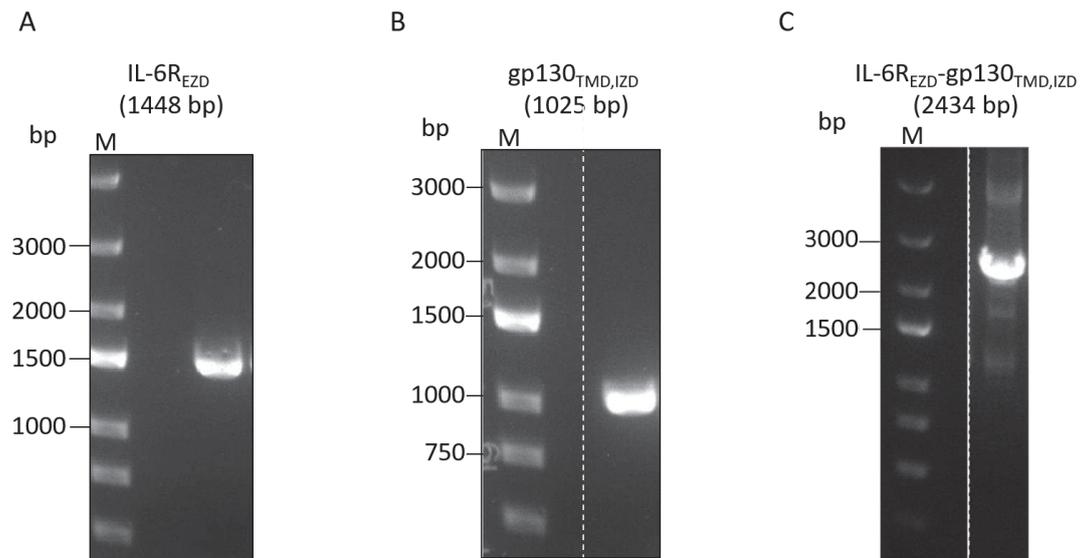
**A:** Mittels Immunopräzipitation (Co-IP) und Western Blot wurde nachgewiesen, dass beide IL-6<sub>Flag/Myc-Ts</sub> Varianten gleichzeitig an ein sIL-6R<sub>Myc-Fc</sub> binden können (rotes Kästchen, Pfeil). **B:** Schematische Abbildung eines Hexamers aus 2:IL-6<sub>Flag/Myc</sub>:2xIL-6R:2xsgp130. Die α-Flag agarose beads binden an den Flag-Tag des IL-6<sub>Flag-Ts</sub>. IL-6<sub>Myc-Ts</sub> wird im Western Blot durch einen α-Myc Antikörper detektiert. **C:** Mittels Co-Immunopräzipitation (Co-IP) und Western Blot wurde der hexamere Komplex, bestehend aus 2xIL-6<sub>Flag/Myc-Ts</sub>:2xIL-6R<sub>Myc-Ts</sub>:2xsgp130, nachgewiesen (rotes Kästchen, Pfeil). Durch weitere Proteinkombinationen, bei dem jeweils ein Protein (IL-6<sub>Flag/Myc-Ts</sub>, IL-6R<sub>Myc-Ts</sub> oder sgp130) fehlt, konnte nachgewiesen werden, dass es sich um spezifische Bindungen handelt. In jeder Spur wurden 20 µl der Fraktionen aufgetragen. Für die IP wurden jeweils für die entsprechenden Fraktionen von sgp130, sIL-6R<sub>Myc-Ts</sub> und IL-6<sub>Flag-Ts</sub> 1 µg Protein verwendet. Von IL-6<sub>Myc-Ts</sub> wurden 1,5 µg Protein für die entsprechenden Konditionen verwendet. Für die Fraktionen der Positivkontrollen in A wurden jeweils 470 µl sIL-6R<sub>Myc-Fc</sub> Zellkulturüberstand (Üs) verwendet, in welchen die Proteine hinzugegeben wurden. Chemilumineszenz-basierter Western Blot. Für die Detektion der Proteine wurden spezifische Antikörper gegen sgp130, Flag, Myc und IL-6R verwendet. Die Western Blots stellen jeweils ein unabhängiges, repräsentatives Experiment (n=3) von insgesamt dreien dar.

Die Ergebnisse der Co-IP weisen auf die Bildung eines hexameren Komplex aus 2xIL-6:2xIL-6R:2xsgp130 hin.

Nachdem der hexamere Komplex (2xIL-6:2xsIL-6R:2xsgp130) mittels Protein Co-IP nachgewiesen wurde, sollte dieser Komplex auf der Zelloberfläche mit membranständigen Rezeptoren nachgestellt werden. Da dieser aus zwei IL-6R besteht und die intrazelluläre Domäne keine signaltransduzierende Funktion besitzt, wurde die TMD und die IZD des IL-6R mit denen des signaltransduzierenden gp130 ausgetauscht. Die so entstandene Rezeptorchimäre IL-6R<sub>EZD</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub> sollte zuerst auf ihre Expressionsfähigkeit auf der Zelloberfläche von Ba/F3 Zellen mittels Durchflusszytometrie und ihre biologische Aktivität durch Stimulationsexperimente überprüft werden.

## 5.2 Design der Rezeptorchimäre IL-6<sub>REZD</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub>

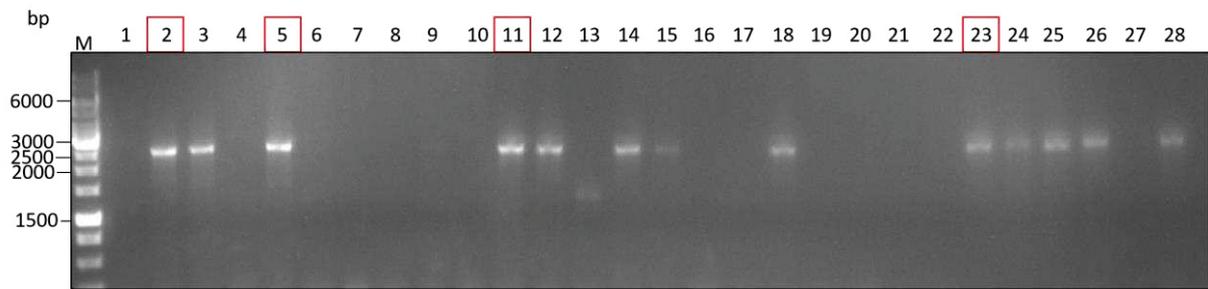
Als Vorlage für den IL-6 Rezeptorabschnitt des IL-6<sub>REZD</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub> diente die Aminosäuresequenz von UniProt (P08887, IL-6RA\_HUMAN). Die pDNA des IL-6R befand sich im pcDNA3.1(+) Vektor. Da es sich bei dieser Klonierungsmethode um eine *overlap extension polymerase chain reaction* (SOE-PCR) handelt, wurden spezifische Oligonukleotide verwendet, um das erste Fragment, welches die extrazellulären Domänen (Signalpeptid D1-D3 und die Stalk-Region, M1-V369) des IL-6R amplifiziert. Zusätzlich wurden die Restriktionsstellen, NheI und PmeI und eine Überlappungssequenz der letzten vier Aminosäuren der TMD des gp130 inseriert. Um zu verifizieren, dass dieses Fragment mit 1448 bp amplifiziert wurde, wurde das PCR-Produkt im Anschluss auf ein Agarosegel aufgetragen (Abbildung 11 A). Als Vorlage für den gp130 Rezeptorabschnitt des IL-6<sub>REZD</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub> diente die Codon-optimierte Aminosäuresequenz von UniProt (P40189, IL-6RB\_HUMAN). Die Sequenz des gp130 befand sich im pcDNA3.1(+) Vektor und lag in der AG Scheller vor. Für die Amplifikation des zweiten Fragmentes, welches die TMD und IZD des gp130 einschließt (A620-Q918), wurden Oligonukleotide designt, welche, zur Überlappung die letzten vier Aminosäuren (VPLP) der extrazellulären Region des IL-6R, sowie die Restriktionsschnittstellen XbaI und PmeI inserieren. Um zu verifizieren, dass dieses Fragment mit 1025 bp amplifiziert wurde, wurde das PCR-Produkt im Anschluss auf ein Agarosegel aufgetragen (Abbildung 11 B). Nach Amplifikation beider einzelner PCR Fragmente, wurden diese in einer dritten PCR zu einem Fragment fusioniert (siehe Klonierungsübersicht und AS-Sequenz 11.1.1). Um zu verifizieren, dass dieses Fragment mit 2434 bp amplifiziert wurde, wurde das PCR-Produkt im Anschluss auf ein Agarosegel aufgetragen (Abbildung 11 C).



**Abbildung 11: Übersicht über die Klonierungsfragmente, welche zum IL-6R<sub>EZD</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub> Fragment mittels PCR fusioniert wurde.**

**A:** Nachweis des amplifizierten IL-6R<sub>EZD</sub> Fragments (1448 bp). **B:** Nachweis des amplifizierten gp130<sub>TMD,IZD</sub> Fragments (1025 bp). **C:** Nachweis des fusionierten und amplifizierten IL-6R<sub>EZD</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub> Fragments (2434 bp). M = Marker. Aufgetragen wurden jeweils 5 µl PCR Produkt mit 1 µl 6xTriTrack DNA-Ladefarbstoff im Agarosegel.

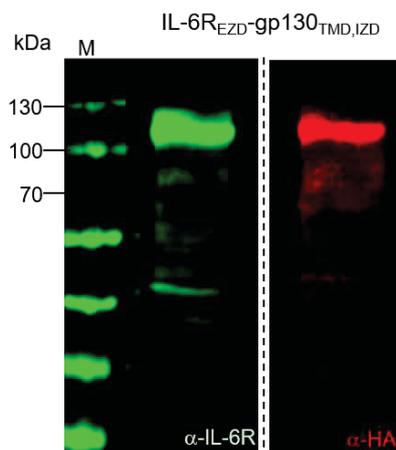
Das PCR-Produkt wurde mittels *NucleoSpin Gel und PCR Clean-up* Kit gereinigt und mit den Restriktionsenzymen XbaI und NheI gespalten (siehe 4.1.4). Nach der Restriktion wurde das IL-6R<sub>EZD</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub> Fragment über Nacht in einen offenen und dephosphorylierten pcDNA3.1(+)-3xHA Vektor ligiert (siehe 4.1.7) und am nächsten Tag in *E.coli XL1-blue* Zellen transformiert (siehe 4.1.8). Um die Transformation des generierten IL-6R<sub>EZD</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub> pcDNA3.1(+) Plasmids in *E.coli XL1-blue* Zellen zu überprüfen, wurde eine *colony-PCR* durchgeführt (siehe 4.1.13.1, Abbildung 12). Anschließend wurde die pDNA ausgewählter Bakterienkolonien mittels Mini-Präparation (siehe 4.1.9) isoliert und zur Sequenzierung eingeschickt.



**Abbildung 12: Die Ligation des IL-6R<sub>EZD</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub> in einen pcDNA3.1(+)<sub>3xHA</sub> Vektor war erfolgreich.**

Colony-PCR zur Überprüfung der Ligation und Transformation des Plasmids IL-6R<sub>EZD</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub> in *E.coli XL1-blue* Zellen. Um zu überprüfen ob das Insert (IL-6R<sub>EZD</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub>) korrekt in den pcDNA3.1(+)<sub>3xHA</sub> Vektor ligiert wurde, wurden spezifische Oligonukleotide (DF16 und DF17) verwendet. Einer *annealt* während der PCR an eine Sequenz im Vektor, während der andere an eine Sequenz im Insert *annealt*. Die Fragmentlänge beträgt 2437 bp. In jede Tasche des Agarosegels wurden 20 µl PCR-Amplifikat in einer Verdünnung von 6:1 mit 6x TriTrack DNA-Ladefarbstoff aufgetragen. Die rot umrandeten Zahlen markieren die Bakterienkolonien mit welchen eine Mini-Präparation durchgeführt wurde. M = Marker. Im Anschluss wurde die pDNA zur Sequenzierung eingeschickt.

Die Sequenz des IL-6R<sub>EZD</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub> in pcDNA3.1(+)<sub>3xHA</sub> wurde durch eine Sequenzierung bestätigt. Anschließend wurde zur Vermehrung der pDNA eine Retransformation mit anschließender Midi-Präparation durchgeführt (siehe 4.1.8 und 4.1.10). Zur Überprüfung der Expression der Rezeptorchimäre IL-6R<sub>EZD</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub>, wurden HEK293T Zellen mit der pDNA des IL-6R<sub>EZD</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub> transfiziert (siehe 4.3.2). Unter Verwendung von spezifischen Antikörpern (α-IL-6R und α-HA) wurde der IL-6R<sub>EZD</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub> nachgewiesen (Abbildung 13).

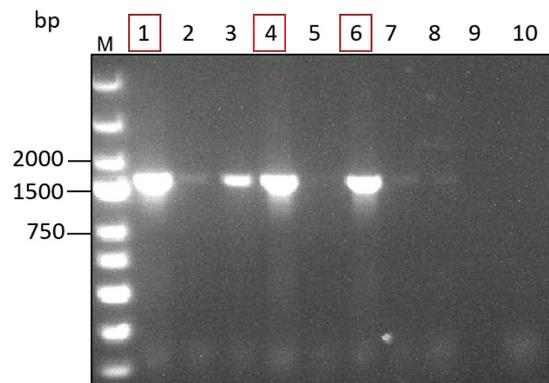


**Abbildung 13: Der IL-6R<sub>EZD</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub> kann in HEK293T exprimiert werden.**

Fluoreszenzbasierter Western Blot. Das theoretische Molekulargewicht des IL-6R<sub>EZD</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub> beträgt 77,5 kDa. Durch die Glykosylierung beträgt sein observiertes Molekulargewicht im Western Blot ca. 120 kDa. In jeder Spur wurden 50 µg Gesamtprotein aufgetragen. Es wurden spezifisch gegen den IL-6R und HA-Tag gehende Antikörper verwendet. M = Marker. Dieser Western Blot wurde für die Überprüfung der Expression einmal (n=1) durchgeführt.

Nachdem die Expressionsfähigkeit des IL-6R<sub>EZD</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub> überprüft wurde, wurde die pDNA mit dem Restriktionsenzym PmeI gespalten und in den, für die retrovirale Transduktion benötigten, bereits offenen und dephosphorylierten pMOWS Vektor mit Puromycinresistenz (pMOWS-(puro)) über Nacht ligiert (siehe 4.1.7). Anschließend wurde der Ligationsansatz in

chemisch kompetente *E.coli XL1-blue* Zellen transformiert. Als Insertionskontrolle wurde am nächsten Tag eine *colony-PCR* durchgeführt (Abbildung 14). Anschließend wurde die pDNA der putativen Bakterienkolonien mittels Mini-Präparation (siehe 4.1.9) isoliert und zur Sequenzierung eingeschickt und bestätigt.

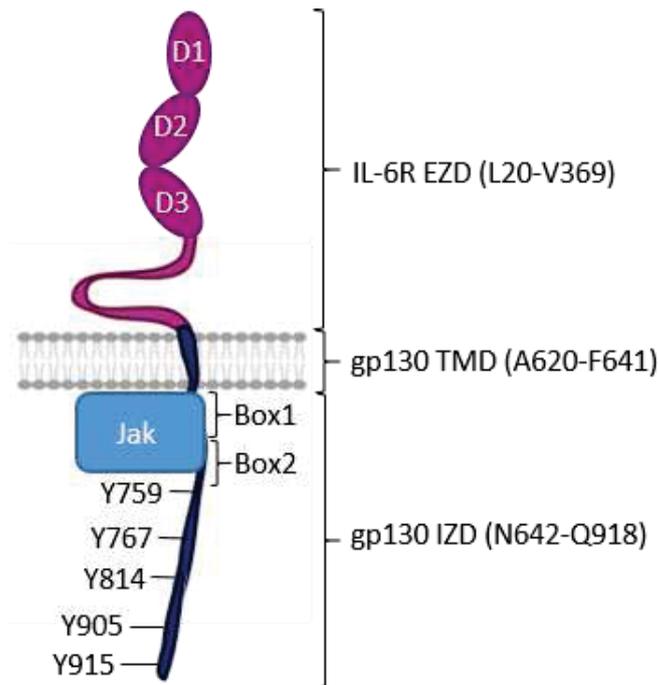


**Abbildung 14:** Die Insertion des IL-6R<sub>EZD</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub> in den pMOWS-(puro) Vektor war erfolgreich.

*Colony-PCR* zur Überprüfung der Ligation und Transformation des Plasmids IL-6R<sub>EZD</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub> in *E.coli XL1-blue* Zellen. Um zu überprüfen, ob das Insert (IL-6R<sub>EZD</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub>) korrekt in den pMOWS-puro Vektor ligiert wurde, wurden spezifische Oligonukleotide (DF45 und DF55) verwendet. Einer *annealt* während der PCR an eine Sequenz im Vektor, während der andere an eine Sequenz im Insert *annealt*. Die Fragmentlänge beträgt 1778 bp. In jede Tasche des Agarosegels wurden 20 µl PCR-Amplifikat in einer Verdünnung von 6:1 mit 6x TriTrack DNA-Ladefarbstoff aufgetragen. Die rot umrandeten Zahlen markieren die Bakterienkolonien, welche für die Sequenzierung eingeschickt wurden. M = Marker.

## 5.2 Expression und Oberflächenpräsentation der Rezeptoren IL-6R<sub>EZD</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub> und gp130\_10AS

Nachdem die Sequenz des klonierten IL-6R<sub>EZD</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub> pMOWS-puro Plasmids überprüft wurde, wurden drei unterschiedliche Ba/F3 Zelllinien mit diesem Plasmid transduziert, um den IL-6R<sub>EZD</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub> stabil auf der Zelloberfläche zu exprimieren und auf seine biologische Aktivität zu untersuchen (Abbildung 15).

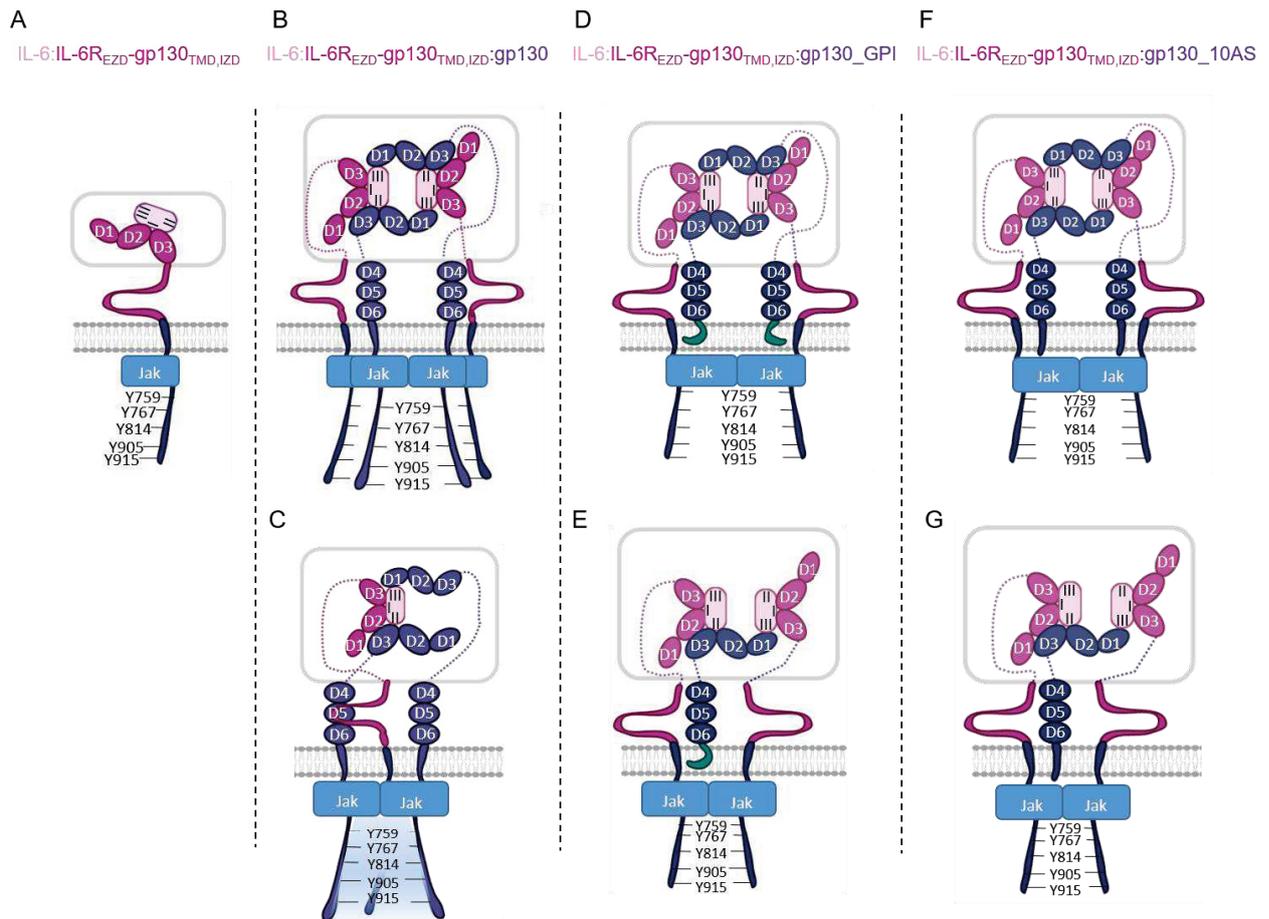


**Abbildung 15: Schematische Darstellung des IL-6<sup>EZD</sup>-gp130<sup>TMD,IZD</sup>.**

Der IL-6<sup>EZD</sup>-gp130<sup>TMD,IZD</sup> besitzt die extrazelluläre Domäne (EZD) des IL-6R (L20-V369), sowie die Transmembrandomäne (TMD, A620-F641) und die intrazelluläre Domäne (IZD, N642-Q918) des gp130 Rezeptors. Intrazellulär befindet sich jeweils eine der assoziierten Januskinasen, wobei Jak1 dominant ist (Jak1, Jak2 und Tyk2). C-terminal befinden sich die für die Signaltransduktion wichtigen Tyrosine Y759, Y767, Y814, Y905 und Y915. Erstellt mit BioRender.com

Die Zelllinie Ba/F3 ist eine nicht adhärenente, aus Prä-B-Zellen bestehende Mauszelllinie (Prä-B-Zellen sind Vorläuferzellen von B-Lymphozyten). Ba/F3-Zellen exprimieren weder den IL-6R noch den gp130 Rezeptor. Die daraus stammende Zelllinie Ba/F3:IL-6<sup>EZD</sup>-gp130<sup>TMD,IZD</sup> kann aufgrund ihrer einzigen Bindestelle zu IL-6 während einer Stimulation nur ein Heterodimer aus IL-6:IL-6<sup>EZD</sup>-gp130<sup>TMD,IZD</sup> bilden und dient zur Kontrolle einer möglichen Kreuzaktivität des IL-6<sup>EZD</sup>-gp130<sup>TMD,IZD</sup> während der Stimulation (Abbildung 16 A). Die zweite Zelllinie, Ba/F3:gp130 exprimierte bereits den WT gp130. Die daraus resultierende Zelllinie Ba/F3:gp130-IL-6<sup>EZD</sup>-gp130<sup>TMD,IZD</sup> diene als Kontrolle, um zu zeigen, dass die EZD des IL-6<sup>EZD</sup>-gp130<sup>TMD,IZD</sup> weiterhin in der Lage ist, einen signaltransduzierenden Komplex mit dem WT gp130 Rezeptor einzugehen. Bei dieser Rezeptorkombination können theoretisch zwei signaltransduzierende Komplexe gebildet werden. Zum einen ein Hexamer aus 2xIL-6:2xIL-6<sup>EZD</sup>-gp130<sup>TMD,IZD</sup>:2xgp130 (Abbildung 16 B) und zum anderen ein Tetramer aus 1xIL-6:1xIL-6<sup>EZD</sup>-gp130<sup>TMD,IZD</sup>:2xgp130 (Abbildung 16 C). In welcher Konstellation dieser Komplex vorliegt, kann jedoch nicht überprüft werden. Bei der dritten Zelllinie handelt es sich um Ba/F3:gp130<sub>GPI</sub> Zellen. Beim gp130<sub>GPI</sub> Rezeptor wurde die IZD deletiert und die TMD durch den Glycosylphosphatidylinositol (GPI)-Anker des *ciliary neurotrophic factor receptor* (CNTFR) substituiert. Die Zelllinie Ba/F3:gp130<sub>GPI</sub> lag in der AG Scheller bereits vor. Dieser

mutierte Rezeptor ist Unfähig zur Signaltransduktion, kann aber durch seine EZD einen Komplex mit dem IL-6:IL-6R Heterodimer eingehen. Die Ba/F3:gp130\_GPI Zelllinie wurde im Vorfeld in der AG Scheller generiert. Nach Transduktion dieser Zelllinie mit dem IL-6<sub>EZD</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub> entstand daraus die Zelllinie Ba/F3:gp130\_GPI:IL-6<sub>EZD</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub>. Die Untersuchung dieser Zelllinie steht in diesem Experiment im Mittelpunkt. Theoretisch sollte während einer Stimulation IL-6 an die Rezeptorchimäre IL-6<sub>EZD</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub> binden. Anschließend sollten sich zwei Heterodimere zu einem Hexamer aus 2xIL-6:2xIL-6<sub>EZD</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub>:2xgp130\_GPI formieren (Abbildung 16D). Jedoch kann sich auch hier ein signaltransduzierendes Tetramer aus 2xIL-6:2xIL-6<sub>EZD</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub>:1xgp130\_GPI bilden (Abbildung 16 E). Um eine Kontrolle für die Zelllinie Ba/F3:gp130\_GPI:IL-6<sub>EZD</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub> zu erhalten, wurde eine gp130 Variante designt, welche N-terminal die letzten 10 Aminosäuren besitzt. Dies bedeutet, dass diese Variante, ebenso wie die gp130\_GPI Rezeptorchimäre weder intrazellulär gelegene Tyrosine, noch die Box-Motive besitzt und somit transduktionsunfähig ist. Anstatt jedoch den GPI-Anker eines fremden Rezeptors besitzt der gp130\_10AS seine eigene TMD (siehe Klonierungsübersicht und AS-Sequenz 11.1.2). Während einer Stimulation mit IL-6 sollten sich auf der Zelloberfläche der Zelllinie Ba/F3:gp130\_10AS:IL-6<sub>EZD</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub> Heterodimere aus IL-6:IL-6<sub>EZD</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub> bilden. Anschließend sollten diese Heterodimere sich zu einem Hexamer aus 2xIL-6:2xIL-6<sub>EZD</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub>:2xgp130\_10AS (Abbildung 16 F) oder zu einem Tetramer aus 2xIL-6:2xIL-6<sub>EZD</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub>:1xgp130\_10AS formieren (Abbildung 16 G).

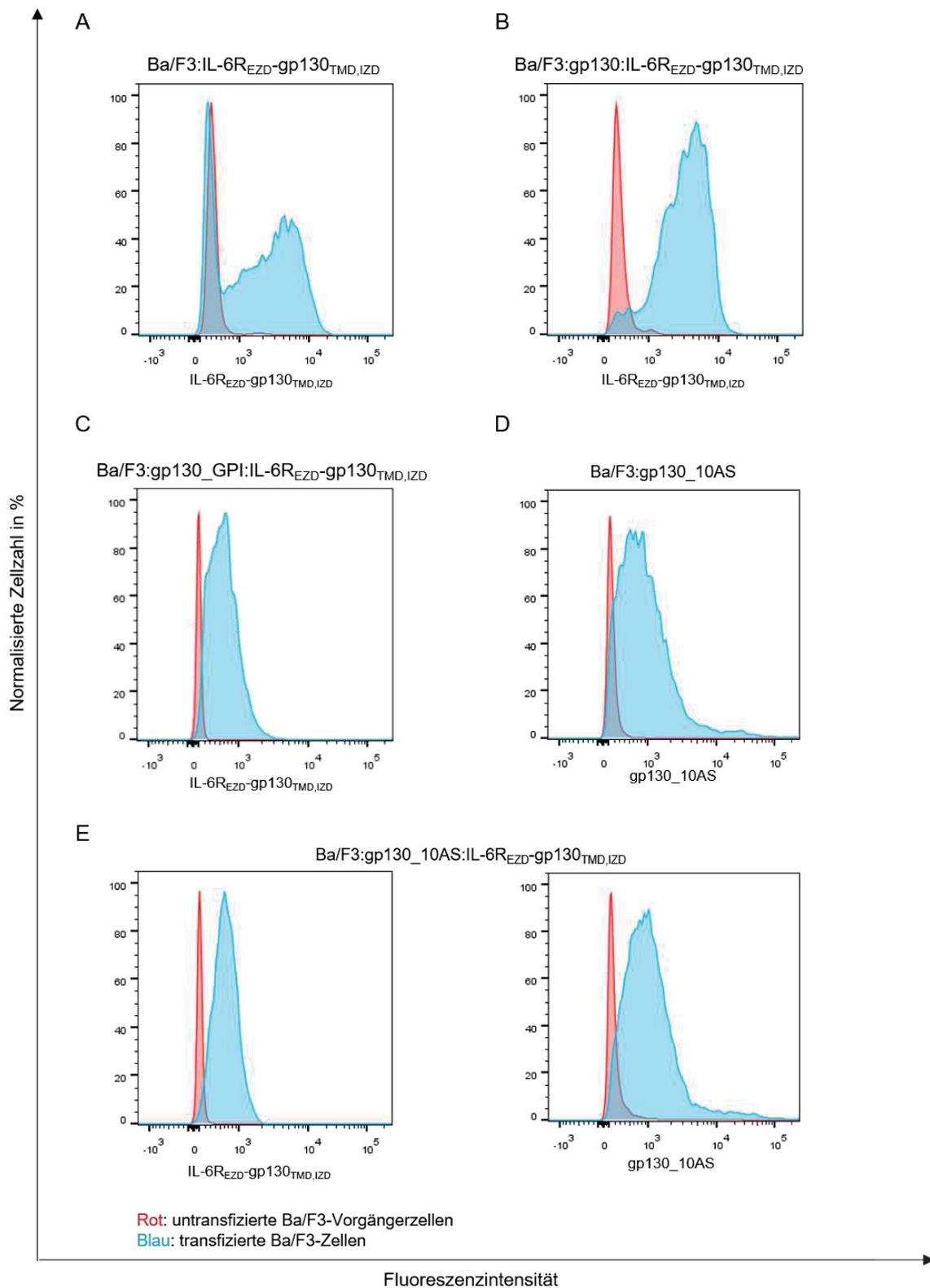


**Abbildung 16: Schematische Darstellung der tetrameren und hexameren Komplexformation zwischen IL-6<sub>EZO</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub> und den gp130 Mutanten gp130 WT, gp130<sub>GPI</sub> und gp130<sub>10AS</sub>.**

**A:** Heterodimer aus 1xIL-6:1xIL-6<sub>EZO</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub>. **B:** Hexamer aus 2xIL-6:2xIL-6<sub>EZO</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub>:2xgp130. **C:** Tetramer aus 1xIL-6:1xIL-6<sub>EZO</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub>:2xgp130. **D:** Hexamer aus 2xIL-6:2xIL-6<sub>EZO</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub>:2xgp130<sub>GPI</sub>. **E:** Tetramer aus 1xIL-6:1xIL-6<sub>EZO</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub>:2xgp130<sub>GPI</sub>. **F:** Hexamer aus 2xIL-6:2xIL-6<sub>EZO</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub>:2xgp130<sub>10AS</sub>. **G:** Tetramer aus 1xIL-6:1xIL-6<sub>EZO</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub>:2xgp130<sub>GPI</sub>. Durch die Bindestelle I bindet IL-6 zuerst an die D2/D3 des IL-6R. Das Heterodimer bindet im Anschluss durch die Bindestelle II des IL-6 an die D2/D3 des gp130. Für die Assemblierung eines signaltransduzierenden Komplex bindet IL-6 durch die Bindestelle III an die D1 des gp130. Erstellt mit BioRender.com.

Für die Durchflusszytometrie (siehe 4.3.4) wurde ein gegen den IL-6R gerichteter Antikörper verwendet. Dadurch konnte die Oberflächenexpression des IL-6<sub>EZO</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub> auf der Zelllinie Ba/F3:IL-6<sub>EZO</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub> bestätigt werden. Die rote Kurve des Histogramms repräsentiert dabei die ursprüngliche Zelllinie Ba/F3, welche den IL-6<sub>EZO</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub> nicht exprimiert und dient als Kontrolle. Durch die Rechtsverschiebung der blauen Kurve im Histogramm auf der Abszisse, welche die Fluoreszenzintensität beschreibt und diese proportional zu Expression des Proteins an dass der fluoreszierende Antikörper gebunden hat zunimmt, wird die Expression des IL-6<sub>EZO</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub> nachgewiesen (Abbildung 17 A). Durch die Rechtsverschiebung der blauen Kurve im Histogramm, konnte die Expression des IL-6<sub>EZO</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub> von der Zelllinie Ba/F3:gp130:IL-6<sub>EZO</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub> bestätigt werden. Die rote Kurve des Histogramms repräsentiert die Kontrollzelllinie Ba/F3:gp130 (Abbildung 17 B).

Bei der Zelllinie Ba/F3:gp130<sub>GPI</sub>:IL-6R<sub>EZD</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub> konnte durch die Rechtsverschiebung der blauen Kurve des Histogramms eine Expression des IL-6R<sub>EZD</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub> nachgewiesen werden. Als Kontrolle, welche durch die rote Kurve im Histogramm dargestellt ist, wurde die ursprüngliche Zelllinie Ba/F3:gp130<sub>GPI</sub> verwendet (Abbildung 17 C). Des Weiteren konnte durch die Durchflusszytometrie die Expression der Rezeptormutante gp130<sub>10AS</sub> auf der Zelloberfläche der Zelllinie Ba/F3:gp130<sub>10AS</sub> durch einen  $\alpha$ -gp130 Antikörper nachgewiesen werden. Die rote Kurve im Histogramm repräsentiert die Kontrollzelllinie. Hierfür wurden Ba/F3 Zellen verwendet (Abbildung 17 D). Für den Nachweis der Oberflächenexpression der Rezeptoren gp130<sub>10AS</sub> und IL-6R<sub>EZD</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub> bei der Zelllinie Ba/F3:gp130<sub>10AS</sub>-IL-6R<sub>EZD</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub> wurden Antikörper gegen den IL-6R und gegen gp130 verwendet. Die Rechtsverschiebung der blauen Kurve bei der Zelllinie bestätigt die Expression beider Rezeptoren auf der Zelloberfläche. Als Kontrollzellen (rote Kurve im Histogramm) wurden Ba/F3 Zellen verwendet (Abbildung 17 D).



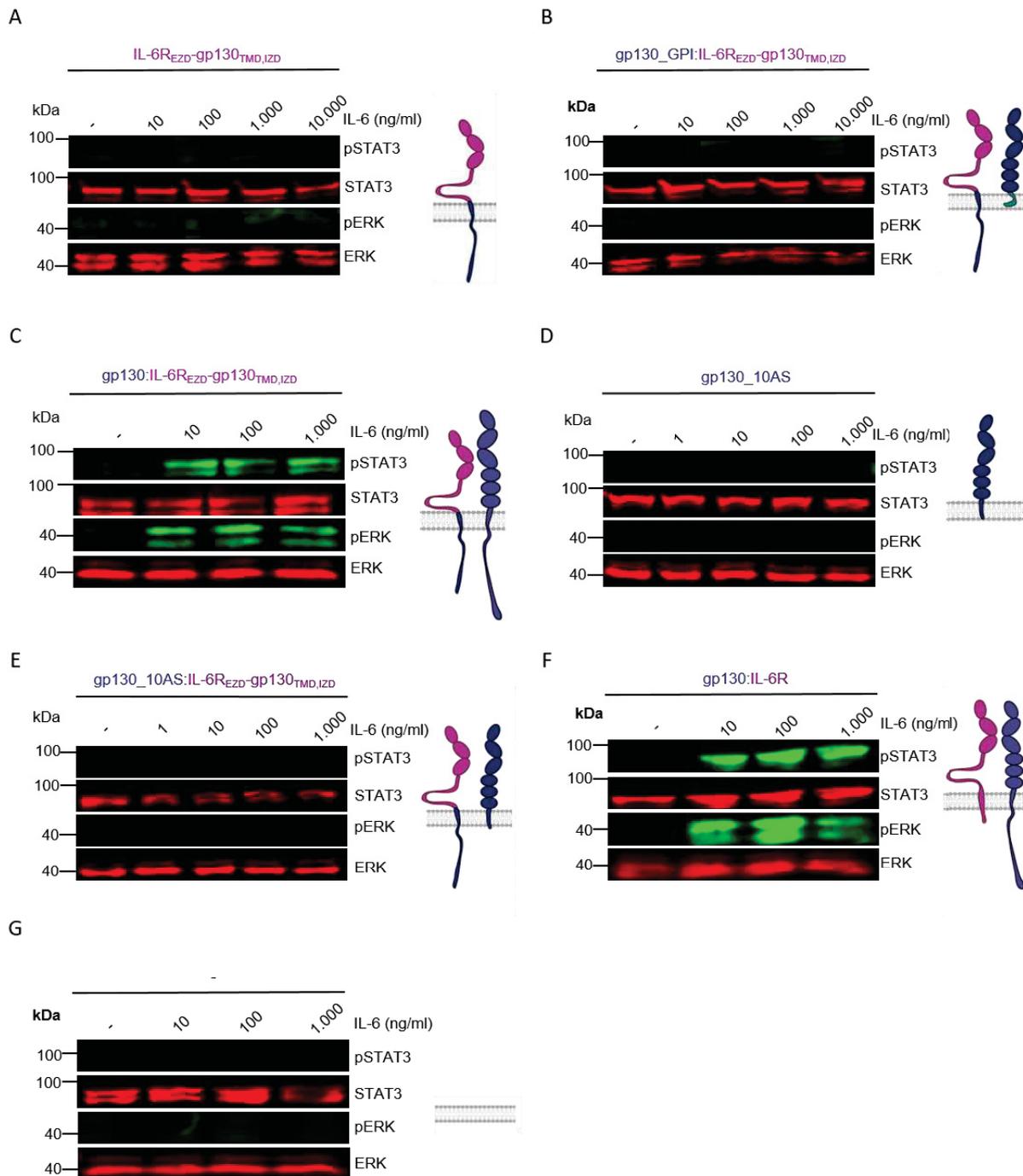
**Abbildung 17: Ba/F3 Zellen exprimieren sowohl den IL-6R<sub>EZD</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub> als auch den gp130\_10AS Rezeptor auf der Zelloberfläche.**

Nachweis der Oberflächenexpression des IL-6R<sub>EZD</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub> und des gp130\_10AS mittels Durchflusszytometrie. **A:** Nachweis des IL-6R<sub>EZD</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub>. **B:** Nachweis des IL-6R<sub>EZD</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub>. **C:** Nachweis des IL-6R<sub>EZD</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub>. **D:** Nachweis des gp130\_10AS. **E:** Nachweis der Rezeptoren IL-6R<sub>EZD</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub> und gp130\_10AS. Die Detektion erfolgte mit spezifischen Antikörpern gegen IL-6R (4-11) und gp130 (B-R3). Die Ordinate gibt die normalisierte Zellzahl in % an. Auf der Abszisse ist die Fluoreszenzintensität angegeben. Die Auswertung erfolgte durch das Programm FlowJo. Das Experiment wurde einmal (n=1) durchgeführt.

### 5.3 Charakterisierung der IL-6<sub>EZD</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub>

#### 5.3.1 IL-6<sub>EZD</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub> Rezeptorchimäre zeigt nur in Kombination mit dem WT gp130 eine biologische Aktivität

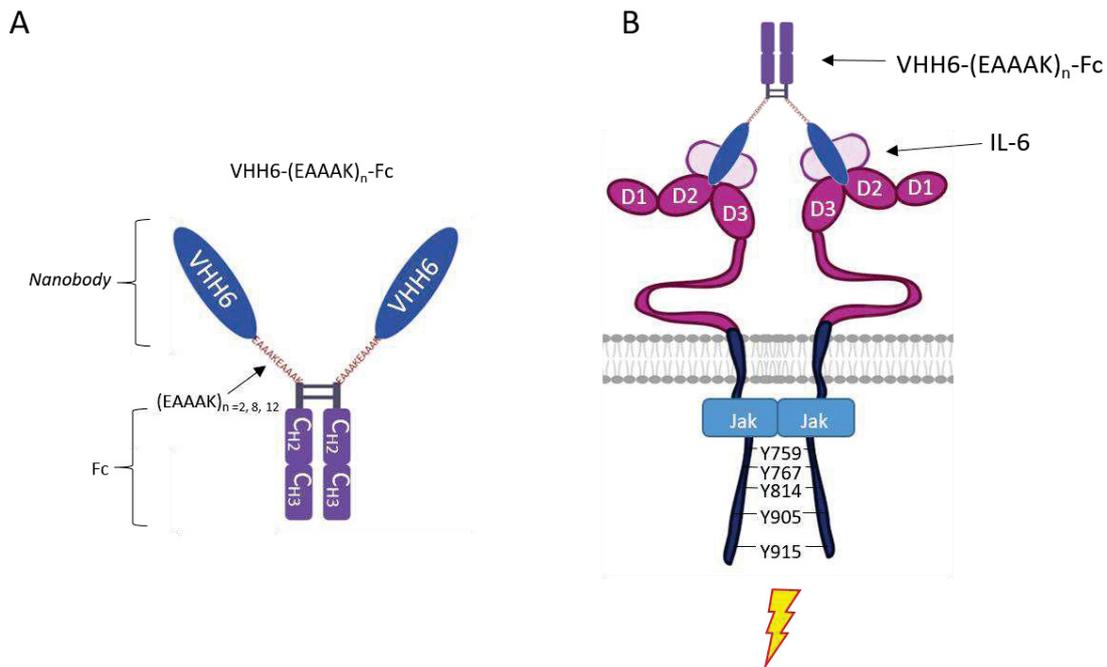
Um die biologische Aktivität des IL-6<sub>EZD</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub> zu untersuchen, welcher mit den Rezeptoren gp130, gp130\_GPI und gp130\_10AS exprimiert wurde, wurden Stimulationsexperimente durchgeführt. Um ein möglichst breites Spektrum an IL-6-Konzentrationen abzudecken, wurden Konzentrationen zwischen 10 ng/ml und 10.000 ng/ml IL-6 verwendet. Da IL-6 vor allem den Jak/STAT, sowie den MEK/ERK Signalweg aktiviert, wurde die Phosphorylierung der Proteine STAT3 und ERK mittels Western Blot untersucht. Bei der Zelllinie Ba/F3:IL-6<sub>EZD</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub> konnte bei keiner der verwendeten IL-6 Konzentration (10 ng/ml, 100 ng/ml, 1.000 ng/ml, 10.000 ng/ml) eine Phosphorylierung von STAT3 oder ERK detektiert werden (Abbildung 18 A). Durch die Stimulation der Zelllinie Ba/F3:gp130\_GPI:IL-6<sub>EZD</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub> konnte ebenfalls bei Konzentrationen von 10 ng/ml, 100 ng/ml, 1.000 ng/ml bis 10.000 ng/ml IL-6 keine Phosphorylierung von STAT3 und ERK detektiert werden (Abbildung 18 B). Durch die IL-6 Stimulation der Zelllinie Ba/F3:gp130:IL-6<sub>EZD</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub>, welche sowohl den WT gp130 Rezeptor als auch die Rezeptorchimäre IL-6<sub>EZD</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub> exprimiert, konnte eine Phosphorylierung sowohl bei STAT3 als auch bei ERK in den IL-6 Konzentrationen 10 ng/ml, 100 ng/ml und 1.000 ng/ml detektiert werden (Abbildung 18 C). Bei der Zelllinie Ba/F3:gp130\_10AS konnte nach Stimulation mit IL-6 in den Konzentrationen 1 ng/ml, 10 ng/ml, 100 ng/ml, 1.000 ng/ml keine Phosphorylierung der Proteine STAT3 oder ERK festgestellt werden (Abbildung 18 D). Ebenso konnte durch die Zelllinie Ba/F3:gp130\_10AS:IL-6<sub>EZD</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub>, welche mit IL-6 Konzentrationen von 1 ng/ml, 10 ng/ml, 100 ng/ml, 1.000 ng/ml stimuliert wurde, keine Phosphorylierung von STAT3 und ERK nachgewiesen werden (Abbildung 18 E). Bei der als Positivkontrolle verwendete Zelllinie Ba/F3:gp130:IL-6R konnte eine deutliche Phosphorylierung der zu analysierenden Proteine STAT3 und ERK bereits ab 10 ng/ml IL-6 im Western Blot detektiert werden (Abbildung 18 F). Die als Negativkontrolle verwendete Zelllinie Ba/F3 wurde mit IL-6 Konzentrationen von 10 ng/ml, 100 ng/ml, 1.000 ng/ml stimuliert. Hierbei konnte jedoch keine Phosphorylierung von STAT3 oder ERK festgestellt werden (Abbildung 18 G).



**Abbildung 18: Der IL-6<sub>EzD</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub> Rezeptor kann ohne WT gp130 kein Signal transduzieren.**

Fluoreszenzbasierter Western Blot. Stimulation der Zelllinie **A:** Ba/F3:IL-6<sub>EzD</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub>. **B:** Ba/F3:gp130<sub>GPI</sub>:IL-6<sub>EzD</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub>. **C:** Ba/F3:gp130:IL-6<sub>EzD</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub>. **D:** Ba/F3:gp130<sub>10AS</sub>. **E:** Ba/F3:gp130<sub>10AS</sub>:IL-6<sub>EzD</sub>-gp130<sub>TMD</sub>. **F:** Ba/F3:gp130:IL-6R (Positivkontrolle) **G:** Ba/F3 (Negativkontrolle). Neben den Western Blots jeder Zelllinie sind schematisch die dazugehörigen Rezeptoren abgebildet. Es wurden spezifisch gegen die Proteine STAT3, phospho-STAT3, ERK und phospho-ERK gehende Antikörper verwendet. Die Konditionen wurden mit den IL-6 Konzentrationen (10 ng/ml, 100 ng/ml, 1.000 ng/ml, bei A und B mit 10.000 ng/ml) für 20 min stimuliert. Die Kontrollen wurden ohne Zytokin (-) behandelt. Über den Western Blots sind die jeweilige Rezeptoren der Zelllinien angegeben. In jeder Spur wurden 50 µg Gesamtprotein aufgetragen. Die Western Blots stellen jeweils ein repräsentatives, unabhängiges Experiment von insgesamt dreien dar (n=3).

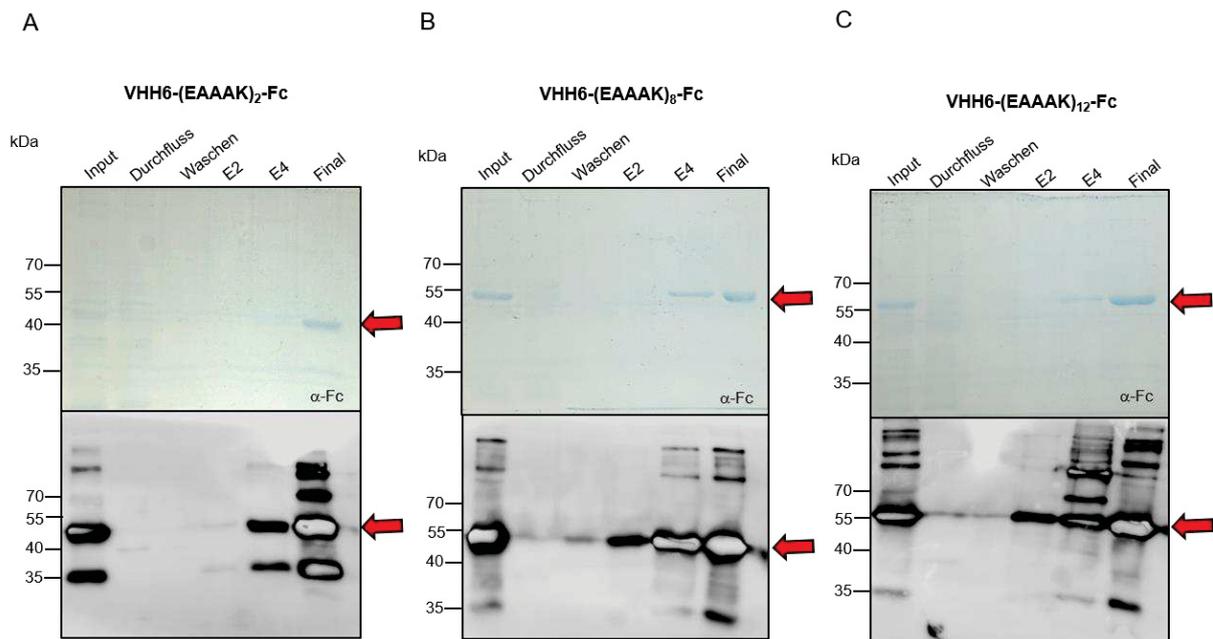
Der Fokus dieser Versuchsreihe ruhte auf der Induktion einer Phosphorylierung der Proteine STAT3 und ERK in den Zelllinien Ba/F3:gp130<sub>GPI</sub>:IL-6<sub>REZD</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub> und Ba/F3:gp130<sub>10AS</sub>:IL-6<sub>REZD</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub>, um einen hexameren Komplex auf der Zelloberfläche nachzuweisen. Eine Phosphorylierung dieser Proteine konnte im Western Blot bei den genannten Zelllinien nicht nachgewiesen werden. Da eine, durch die IL-6 Stimulation induzierte, Phosphorylierung der STAT3 und ERK Proteine bei der Zelllinie Ba/F3:gp130:IL-6<sub>REZD</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub> nachgewiesen wurde, ist davon auszugehen dass die EZD des IL-6<sub>REZD</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub> einen signaltransduzierenden Komplex mit IL-6 und gp130 eingehen konnte. Unklar ist jedoch ob das Signal von den intrazellulären Domänen des WT gp130, oder denen der IL-6<sub>REZD</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub> induziert und weiter geleitet wurde. Um daher die Aktivität der IZD des IL-6<sub>REZD</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub> zu überprüfen, wurden dimere VHH6-Fc Fusionsproteine generiert. Der als VHH6 bekannte *Nanobody* bindet spezifisch an das Epitop, welches die Verbindung zwischen IL-6 und IL-6R bildet, jedoch nicht mit IL-6 oder IL-6R alleine interagiert. Darüber hinaus zeigten weitere Analysen, dass VHH6 den IL-6:IL-6R Komplex stabilisiert ohne die Interaktion mit gp130 zu beeinträchtigen. Weitere Analysen demonstrierten, dass VHH6 in der Lage ist, die *Trans*-Signaltransduktion zu verstärken (Adams *et al.* 2017). *Nanobodies* sind Einzeldomänenantikörper, welche keine leichten Ketten besitzen. Innerhalb der schweren Kette fehlt die CH1 Domäne. Die antigen-bindende Domäne wird durch eine Polypeptidkette (12-17 kDa) gebildet, welche als VHH Domäne bezeichnet wird (Muyldermans 2021). Mit Hilfe des Fc-Fragments konnten dimere VHH6-Fc Varianten generiert werden, welche nicht nur an ein IL-6:IL-6R Heterodimer, sondern an zwei Heterodimere binden können. Weiterhin wurden verschieden lange, rigide Linker (EAAAK)<sub>n</sub> in die VHH6-Fc-Fusionsproteine zwischen dem Fc-Teil und den VHH6 *Nanobodies* inseriert, da unklar war, welche Abstände die IZDs der IL-6<sub>REZD</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub> Rezeptoren zur Auslösung eines Signals benötigen (Abbildung 19 A). Rigide Linker sind in der Lage, eine helikale Struktur zu formen, welche die Orientierung des VHH6 beeinflusst (Li *et al.* 2016). Aufgrund dessen wurden drei VHH6-(EAAAK)<sub>n</sub>-Fc Varianten generiert, welche repetitive Linkersequenzen von 2x, 8x und 12x (EAAAK) besitzen. In Kombination mit diesen VHH6-(EAAAK)<sub>n</sub>-Fc Fusionsproteinen und IL-6 sollten die IL-6<sub>REZD</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub> der Zelllinie Ba/F3:IL-6<sub>REZD</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub> in einen tetrameren Komplex aus 2xIL-6:2xIL-6<sub>REZD</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub> forciert werden, um eine Signaltransduktion auszulösen (Abbildung 19 B).



**Abbildung 19: Schematische Abbildung der VHH6-(EAAAK)<sub>n</sub>-Fc Fusionsproteine und des forcierten Tetramers aus 2xIL-6:2:IL-6REZD-gp130<sub>TMD,IZD</sub>.**

**A:** Abgebildet ist das Fusionsprotein VHH6-(EAAAK)<sub>n</sub>-Fc, bestehend aus dem VHH6-Nanobody, verbunden über ein Linkerpeptid mit dem Fc-Teil. Das Linkerpeptid besteht aus den repetitiven Sequenzen (EAAAK)<sub>2</sub>, (EAAAK)<sub>8</sub>, (EAAAK)<sub>12</sub>. **B:** Dargestellt ist der Komplex aus IL-6:IL-6REZD-gp130<sub>TMD,IZD</sub> stabilisiert und forciert durch die VHH6-(EAAAK)<sub>n</sub>-Fc Variante. Erstellt mit BioRender.com.

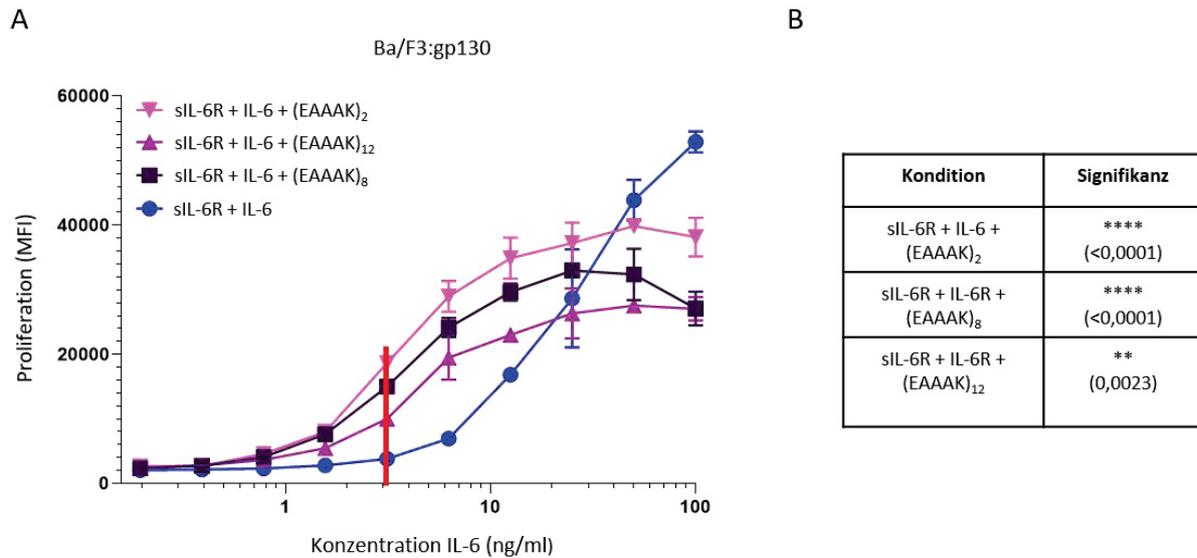
Durch den Fc-Teil, wurden alle VHH6-Fusionsproteine durch eine Protein-A Chromatographie gereinigt. Die VHH6-Fusionsvarianten wurden aus jeweils 50 ml Zellkulturüberstand gereinigt. Die Gesamtproteinmenge betrug bei VHH6-(EAAAK)<sub>12</sub>-Fc 2,2 mg, bei VHH6-(EAAAK)<sub>8</sub>-Fc 1,4 mg und bei VHH6-(EAAAK)<sub>2</sub>-Fc 1,0 mg. Bei allen drei Varianten konnten im Western Blot Nebenprodukte auf einer Höhe von ungefähr 35 kDa detektiert werden. Bei diesem Protein handelte es sich vermutlich um ein am C-Terminus abgespaltenes Fc-Fragment ohne das VHH6 Fragment, was wiederum auf eine Instabilität und Degradation der Proteine hindeutet (Abbildung 20 A, B, C). Die gereinigten und in PBS umgepufferten Proteine wurden im Anschluss in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C gelagert.



**Abbildung 20: Proteinreinigung der VHH6-(EAAAK)*n*-Fc Varianten**

Proteinreinigung mittels Affinitätschromatografie. **A:** Proteinreinigung des VHH6-(EAAAK)<sub>12</sub>-Fc **B:** Proteinreinigung des VHH6-(EAAAK)<sub>8</sub>-Fc **C:** Proteinreinigung des VHH6-(EAAAK)<sub>2</sub>-Fc. Es wurden jeweils 20 µl in jede Spur aufgetragen. Input = gefilterter Überstand vor der Reinigung, E = Elutionsfraktion, Final = Finale Probe. Die Pfeile markieren die Höhe auf der sich die entsprechenden Proteine befinden. Jeweils oben: Coomassiegelelektrophoreogramm. Unten: Western Blot mit Antikörpern gegen den Fc-Teil, aufgenommen durch Chemilumineszenz.

Um die biologische Aktivität der exprimierten und gereinigten VHH6-Fusionsproteine quantifizieren zu können, wurde die Proliferation von Ba/F3:gp130 Zellen in definierten Konzentrationsreihen anhand der EC<sub>50</sub> Werte des dazu titrierten IL-6 mittels einer nichtlinearen Regression bestimmt. In der Annahme, dass die Fusionsproteine den Komplex aus IL-6:sIL-6R:gp130 stabilisieren und somit den Trans-Signalweg fördern, wurde das Zellenmedium mit 100 ng/ml sIL-6R und 10 µg/ml pro VHH6-(EAAAK)<sub>*n*</sub>-Fc Fusionsprotein versetzt. Anschließend wurden aufsteigende Konzentrationen von IL-6 (bis zu 100 ng/ml) hinein titriert und drei Tage lang inkubiert (Abbildung 21 A). Als Kontrolle wurden Zellen nur mit sIL-6R und IL-6 behandelt. Als Vorlage für diesen Versuchsaufbau diente die Publikation von P. Baran aus der AG Scheller (Baran *et al.* 2018).



**Abbildung 21: Die gereinigten VHH6-(EAAAK)<sub>n</sub>-Fc Fusionsproteine sind biologisch aktiv.**

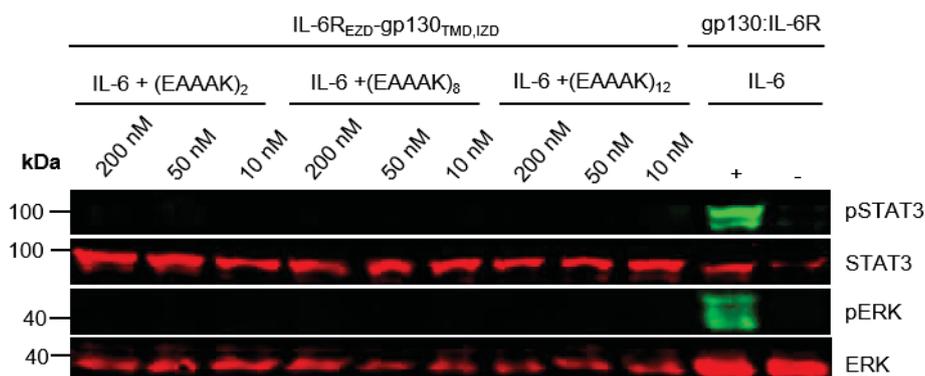
**A:** Proliferation der Ba/F3:gp130 Zellen mit den drei VHH6-(EAAAK)<sub>n</sub>-Fc Varianten. MFI: mittlere Fluoreszenzintensität. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler an. Die Kurven wurden mittels nichtlinearer Regression in GraphPad Prism 8 erstellt. Es befinden sich konstant 100 ng/ml sIL-6R und 10 µg/ml der VHH6-(EAAAK)<sub>n</sub>-Fc Varianten (EAAAK)<sub>2</sub> (rosa), (EAAAK)<sub>12</sub> (violett) und (EAAAK)<sub>8</sub> (lila) im Medium. IL-6 wurde mit einer aufsteigenden Konzentration (0,195-100 ng/ml) im Medium hinzugegeben. **B:** Statistische Auswertung durch *two-way Anova* und des multiple comparisons test. Die Sterne (\*) Stellen die jeweilige Signifikanz zwischen den Konditionen mit VHH6-(EAAAK)<sub>n</sub>-Fc Fusionsprotein und ohne, bei einer IL-6 Konzentration von 3,125 ng/ml (roter Balken) dar. Dieses Experiment stellt ein repräsentatives, unabhängiges von insgesamt dreien dar (n=3).

IL-6 zeigte in Kombination mit dem Fusionsprotein VHH6-(EAAAK)<sub>8</sub>-Fc eine EC<sub>50</sub> von 3,47 ng/ml (Tabelle 18). In Kombination mit dem VHH6-(EAAAK)<sub>2</sub>-Fc wurde betrug die EC<sub>50</sub> des IL-6 3,61 ng/ml (Tabelle 18). In der Kondition von IL-6, sIL-6R und dem Fusionsprotein VHH6-(EAAAK)<sub>12</sub>-Fc wurde eine EC<sub>50</sub> des IL-6 von 4,56 ng/ml nachgewiesen (Tabelle 18). In der Kontrolle, bei der nur der sIL-6R und IL-6 hinzugegeben wurden, betrug die EC<sub>50</sub> des IL-6 26,95 ng/ml (Tabelle 18). Zudem zeigten die jeweiligen Konditionen mit VHH6-(EAAAK)<sub>2</sub>-Fc Fusionsprotein im Vergleich ohne die Fusionsproteine signifikante Unterschiede bei einer IL-6 Konzentration von 3,123 ng/ml (Abbildung 21 B). Durch die Auswertung des Proliferationsexperiments wurde nachgewiesen, dass die VHH6 Varianten biologisch aktiv sind (Abbildung 21).

**Tabelle 18: Übersicht über die EC<sub>50</sub>-Werte des IL-6 ohne und in Kombination mit den VHH6-(EAAAK)<sub>n</sub>-Fc Fusionsproteinen**

Konditionen	EC <sub>50</sub> von IL-6 (ng/ml)
sIL-6R + VHH6-(EAAAK) <sub>2</sub> -Fc + IL-6	3,61
sIL-6R + VHH6-(EAAAK) <sub>8</sub> -Fc + IL-6	3,47
sIL-6R + VHH6-(EAAAK) <sub>12</sub> -Fc + IL-6	4,56
sIL-6R + IL-6	26,95

Um eine Aussage über eine mögliche Aktivierung der IZD der IL-6R<sub>EZD</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub> Rezeptorchimären treffen zu können und unter der Annahme, dass eine Forcierung des 2xIL-6:2xIL-6R<sub>EZD</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub> Tetramers unter Verwendung der VHH6-Fc-Fusionsproteine möglich ist, wurden Ba/F3:IL-6R<sub>EZD</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub> Zellen stimuliert. Hierbei wurden konstante Konzentrationen von 4 nM (100 ng/ml) IL-6 und definierte Konzentrationen von 10 nM, 50 nM und 200 nM der VHH6-(EAAAK)<sub>n</sub>-Fc Fusionsproteine verwendet. Die daraus entstandenen Proben wurden im Western Blot auf eine Phosphorylierung der Proteine STAT3 und ERK untersucht. Allerdings konnte auch unter Verwendung der unterschiedlichen VHH6 Fusionsproteine, welche den Komplex IL-6:IL6R<sub>EZD</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub> stabilisieren sollten, weder eine STAT3 noch eine ERK Aktivierung nachgewiesen werden. Lediglich die Kontrolle (Ba/F3:gp130) zeigte durch die IL-6 Stimulation eine STAT3 und ERK Aktivierung. (Abbildung 22).



**Abbildung 22: Mit Hilfe der VHH6-(EAAAK)<sub>n</sub>-Fc Fusionsproteine konnte keine Signaltransduktion durch den IL-6R<sub>EZD</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub> Rezeptor induziert werden.**

Fluoreszenzbasierter Western Blot. Es wurden spezifisch gegen STAT3, phospho (p)STAT3, ERK und phospho (p)ERK gehende Antikörper verwendet. Die VHH6-(EAAAK)<sub>n</sub>-Fc-Fusionsproteine wurden mit ihrer repetitiven Linkerlänge bezeichnet ((EAAAK)<sub>2</sub>, (EAAAK)<sub>8</sub>, (EAAAK)<sub>12</sub>). Die einzelnen Konditionen wurden mit 4 nM IL-6 und unterschiedlichen Molaritäten von 200 nM, 50 nM und 10 nM VHH6-(EAAAK)<sub>n</sub>-Fc-Fusionsproteinen für 20 min stimuliert. Als Positivkontrolle wurde die Zelllinie Ba/F3:gp130:IL-6R verwendet, welche mit 4 nM IL-6 stimuliert (+) wurde. Das (-) stellt eine unstimulierte Kondition dar. In jeder Spur wurden 50 µg Gesamtprotein aufgetragen. Die Western Blots stellen jeweils ein repräsentatives, unabhängiges Experiment von insgesamt dreien dar (n=3).

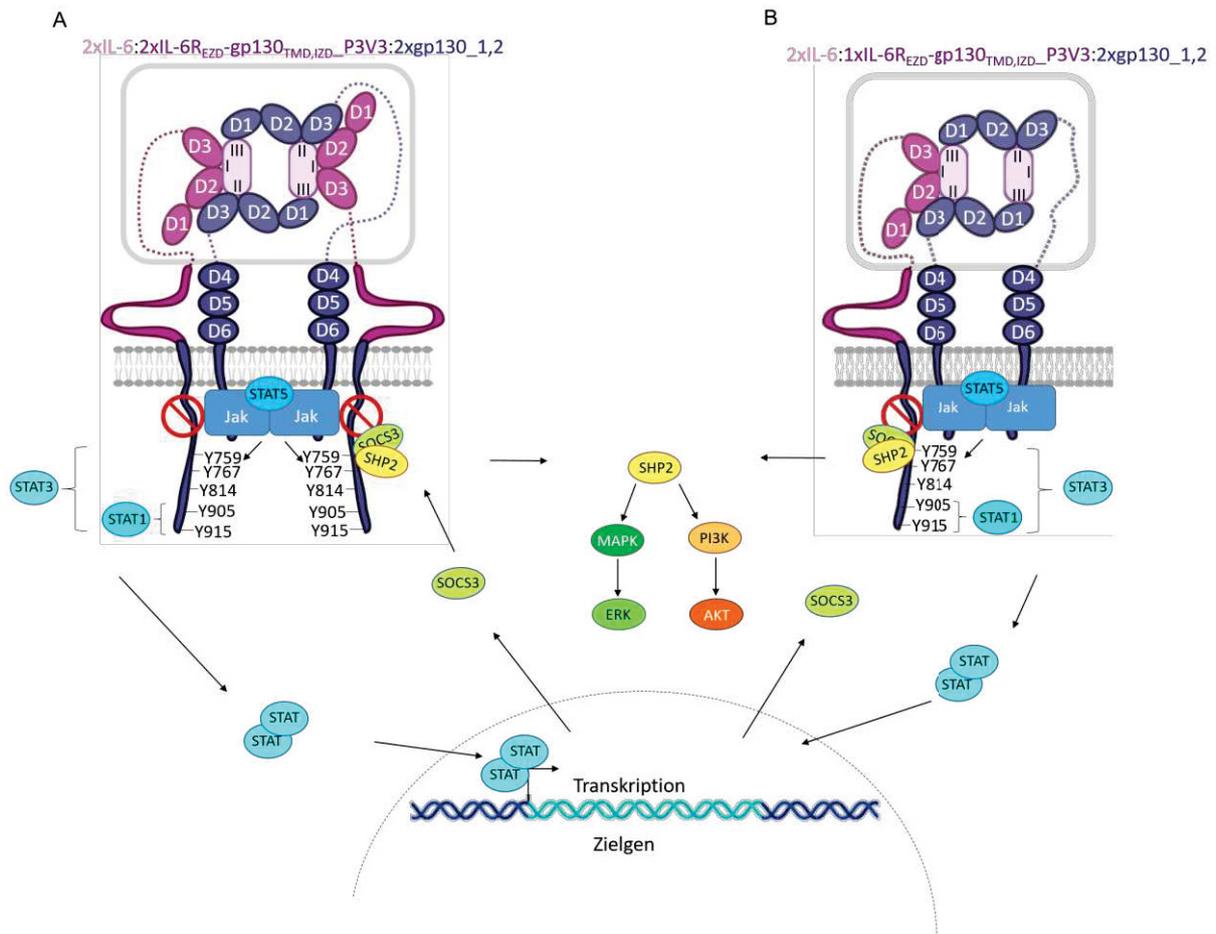
Aufgrund der fehlenden Phosphorylierung der Proteine STAT3 und ERK, ist nicht ersichtlich, ob die Forcierung und die damit einhergehende Dimerisierung der IL-6:IL-6R<sub>EZD</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub> Heterodimere nicht funktioniert hat, oder ob die IZD des IL-6R<sub>EZD</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub> Rezeptors ist so nicht aktivierbar.

5.3.2 Die IZD des IL-6<sub>EZD</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub> ist aktiv, das Transkriptionsmuster unterscheidet sich jedoch deutlich von der Zelllinie Ba/F3:gp130:IL-6R

Im weiteren Verlauf wurde sich weiter auf die IZD des IL-6<sub>EZD</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub> fokussiert. Unter anderem wurde angenommen, dass die IZD des IL-6<sub>EZD</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub> innerhalb des tetrameren Komplex aus 2xIL-6:2xIL-6<sub>EZD</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub> möglicherweise durch die *Stalk*-Region des IL-6R zu weit auseinander, in einer falschen Orientierung vorliegen oder das eine Signaltransduktion von der EZD des IL-6R über die *Stalk*-Region bis hin zur IZD des gp130 nicht möglich war. Um dies zu überprüfen, wurde die Jak/STAT-Aktivierung voneinander getrennt.

Unter natürlichen Bedingungen phosphorylieren sich die Januskinasen (Jak1, Jak2 und Tyk2) bei Kontakt gegenseitig. Daraufhin aktivieren diese die C-terminal gelegenen Tyrosine des gp130, welche in Folge dessen als Bindestellen für die Gruppe der STAT Proteine fungieren (Stahl *et al.* 1995, Gerhartz *et al.* 1996, Lim and Cao 2006). STAT1 bindet an die Tyrosine Y905 und Y915 (Gerhartz *et al.* 1996). STAT3 bindet an die Tyrosine Y767, Y814, Y905 und Y915 (Lokau *et al.* 2019). STAT5 bindet direkt an die Januskinase 2 (Jak2) und wird dort phosphoryliert (Heinrich *et al.* 2003). Die phosphorylierten STATs dissoziieren vom aktivierten gp130 Rezeptor, dimerisieren zu Homo-und/oder Heterodimeren, welche durch die Kernmembran zum Nukleus translozieren, um dort an spezifischen Bindestellen an die Promotoren der Zielgene zu binden und somit als Transkriptionsfaktoren die Transkription von Zielgenen einzuleiten (Delgoffe and Vignali 2013). Als Folge dieser Transkription werden auch Proteine der Familie *supressors of cytokine signaling* (SOCS) exprimiert. Die negativen Rückkopplungsproteine SOCS stellen die Hauptinhibitoren der IL-6 Signaltransduktion dar (Williams *et al.* 2014). Neben den STAT-Proteinen wird ein weiteres Protein rekrutiert sobald der Rezeptor aktiviert wird, *src-homology 2-containing phosphotyrosine phosphatase* (SHP2). SHP2 wird konstitutiv und ubiquitinär exprimiert und bindet ebenfalls an das phosphorylierte Y759 (Lehmann *et al.* 2003). Als Protein-Tyrosin-Phosphatase dephosphoryliert es p759 und trägt somit zur Inhibierung des Signalweges bei (Qu 2000, Dittrich *et al.* 2012). Während der Jak/STAT Signalweg von SHP2 inhibiert wird, werden gleichzeitig die Signalwege PI3K sowie der MAPK Signalweg aktiviert. Durch die Aktivierung des PI3K Signalweges wird AKT phosphoryliert (Abeyrathna and Su 2015). Als Folge der MAPK Aktivierung wird das Protein *extracellular signalregulated kinase* (ERK) phosphoryliert (Shi *et al.* 2000).

Für dieses Experiment wurden die Proline innerhalb der Box1 (IWPNVDPDS) des IL-6<sub>REZD</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub> zu Valinen mutiert (siehe Klonierungsübersicht und AS-Sequenz 11.1.3). Aufgrund dieser Mutation können die Januskinasen nicht mehr an die Sequenz der Box1 binden. In Folge dessen können diese sich nicht gegenseitig phosphorylieren. Dies führt dazu, dass die C-terminal gelegenen Tyrosine nicht ebenfalls nicht mehr phosphoryliert werden können. (Murakami *et al.* 1991). Aufgrund dieser Mutationen kann gewährleistet werden, dass der Rezeptor IL-6<sub>REZD</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub>\_P3V3 unfähig zur Transduktion ist. Gleichzeitig wurde eine gp130 Mutante generiert, welche die intakten Bindestellen der Januskinasen, jedoch keine Tyrosine, welche phosphoryliert werden könnten, besitzt (gp130\_Box1,2 (siehe Klonierungsschema und AS-Sequenz 11.1.4)). Die Idee dahinter war, dass sich bei einer Stimulation mit IL-6 ein Komplex aus 2xIL-6:2xgp130\_Box1,2:2x IL-6<sub>REZD</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub>\_P3V3 (Abbildung 23 A) oder 2xIL-6:2xgp130\_Box1,2:1xIL-6<sub>REZD</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub>\_P3V3 bildet (Abbildung 23 B). Die Januskinasen der beiden gp130\_Box1,2 Rezeptoren könnten sich gegenseitig aktivieren und die C-terminal gelegenen Tyrosine Y759, Y767, Y814, Y905 und Y915 des IL-6<sub>REZD</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub>\_P3V3 phosphorylieren (Abbildung 23).



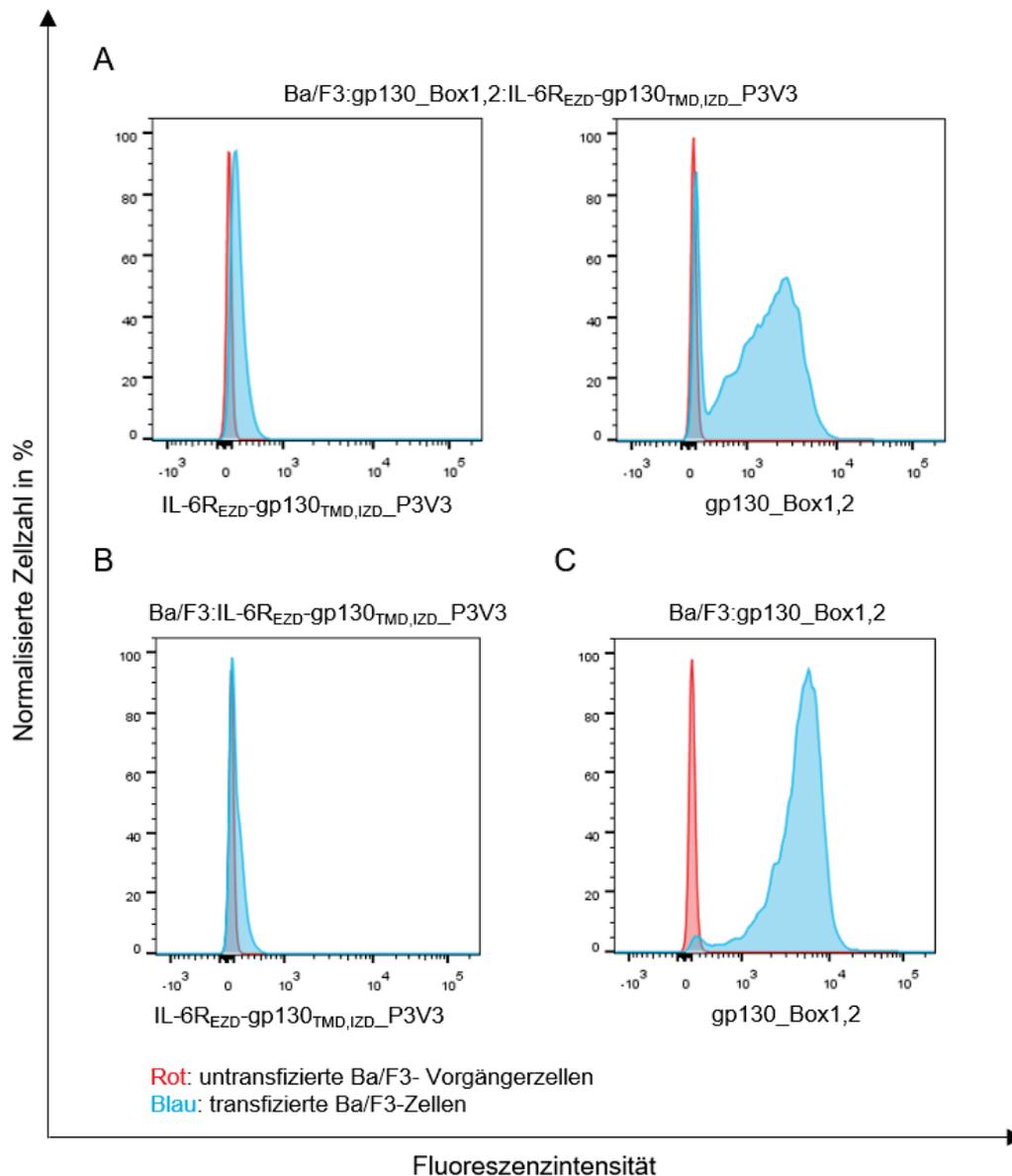
**Abbildung 23: Schematische Abbildung der möglichen Rezeptorkonstellation aus IL-6R<sub>EZD</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub>\_P3V3 und gp130<sub>Box1,2</sub> und einer möglichen Signaltransduktion.**

**A:** Hexamer aus 2xIL-6R:2x IL-6R<sub>EZD</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub>\_P3V3:2xgp130<sub>Box1,2</sub> mit schematisch dargestellter Signaltransduktion. Die Januskinasen des gp130<sub>Box1,2</sub> phosphorylieren sich gegenseitig und sind in der Lage, die C-terminal gelegenen Tyrosine des IL-6R<sub>EZD</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub>\_P3V3 zu aktivieren. Dies ermöglicht es den STAT Proteinen 1 und 3 an die phosphorylierten Tyrosine zu binden während STAT5 an die Januskinasen bindet. STAT Homo-/ Heterodimere translozieren in den Zellkern und agieren dort als Transkriptionsfaktoren woraufhin z.B. SOCS3 exprimiert wird. SHP2 bindet an das phosphorylierte Y759 und Aktiviert die Signalwege MAPK und PI3K. In Folge dessen wird ERK und AKT phosphoryliert. **B:** Rezeptorkomplex aus 2xIL-6:1xIL-6R<sub>EZD</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub>\_P3V3:2xgp130<sub>Box1,2</sub>, welche zur Signaltransduktion fähig sind. Erstellt mit BioRender.com.

Nachdem die Sequenz der klonierten Rezeptoren IL-6R<sub>EZD</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub>\_P3V3 pMOWS-(puro) und gp130<sub>Box1,2</sub> pMOWS-(hygro) mittels Sequenzierung verifiziert wurde, wurden Ba/F3 Zellen mit jeweils einem Plasmid (Ba/F3:gp130<sub>Box1,2</sub> oder Ba/F3-IL-6R<sub>EZD</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub>\_P3V3), sowie mit beiden Plasmiden zusammen (Ba/F3:gp130<sub>Box1,2</sub>:IL-6R<sub>EZD</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub>\_P3V3) transduziert. Die Expression der Rezeptoren gp130<sub>Box1,2</sub> und/ oder IL-6R<sub>EZD</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub>\_P3V3 wurde mittels Durchflusszytometrie nachgewiesen.

Für die Zelllinie Ba/F3:gp130<sub>Box1,2</sub>:IL-6R<sub>EZD</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub>\_P3V3 wurde ein gegen den IL-6R, sowie gegen gp130 gerichteter Antikörper verwendet. Durch die Rechtsverschiebung der blauen Kurven im Histogramm, wurde eine Expression des IL-6R<sub>EZD</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub>\_P3V3 und des

gp130\_Box1,2 auf der Oberfläche dieser Zelllinie nachgewiesen. Die rote Kurve des Histogramms repräsentiert dabei die ursprüngliche Zelllinie Ba/F3, welche keinen der beiden Rezeptoren exprimiert (Abbildung 24 A). Bei der Zelllinie Ba/F3:IL-6R<sub>EZD</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub>\_P3V3 konnte durch die Rechtsverschiebung der blauen Kurve des Histogramms eine Expression des IL-6R<sub>EZD</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub> bestätigt werden. Die rote Kurve des Histogramms repräsentiert die Kontrollzelllinie Ba/F3 (Abbildung 24 B). Der gp130\_Box1,2 Rezeptor wurde mittels eines gegen den gp130 Rezeptor gerichteten Antikörpers auf der Oberfläche der Zelllinie Ba/F3:gp130\_Box1,2 nachgewiesen. Als Kontrolle, welche durch die rote Kurve im Histogramm dargestellt ist, wurde die ursprüngliche Zelllinie Ba/F3 verwendet (Abbildung 24 C).



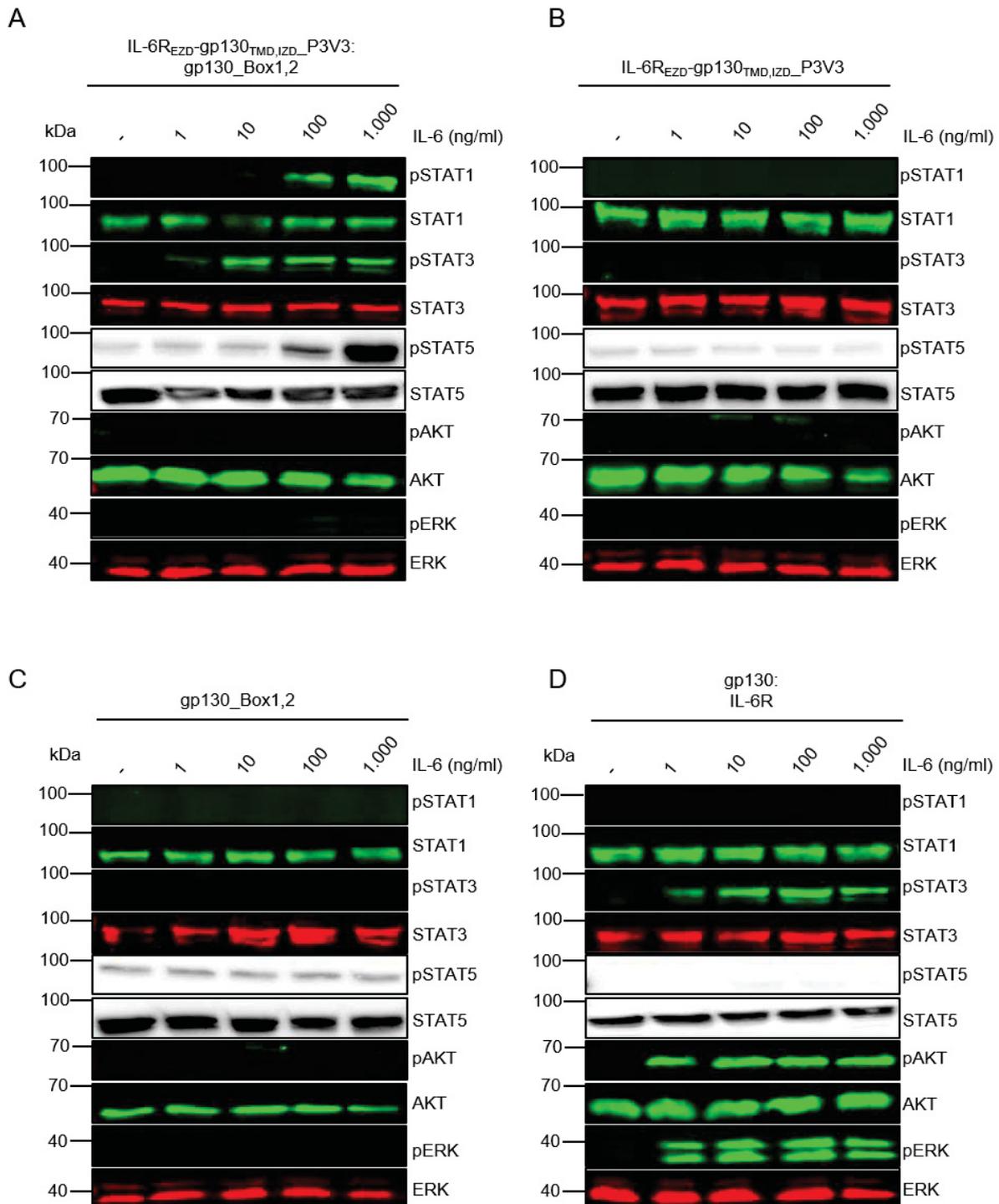
**Abbildung 24: Ba/F3 Zellen exprimieren IL-6R<sub>EZD</sub>-gp130<sub>TMD,IZD\_P3V3</sub> und gp130\_Box1,2 auf der Oberfläche.**

Überprüfung der Oberflächenexpression der Rezeptoren IL-6R<sub>EZD</sub>-gp130<sub>TMD,IZD\_P3V3</sub> und gp130\_Box1,2 mittels Durchflusszytometrie. **A:** Nachweis der Oberflächenexpression des IL-6R<sub>EZD</sub>-gp130<sub>TMD\_P3V3</sub> ( $\alpha$ -IL-6R) und des gp130\_Box1,2 ( $\alpha$ -gp130) Rezeptors auf der Zelloberfläche der Ba/F3:gp130\_Box1,2:IL-6R<sub>EZD</sub>-gp130<sub>TMD,IZD\_P3V3</sub> Zelllinie (blaue Kurve). Als Kontrolle dienten Ba/F3 Zellen (rote Kurve). **B:** Nachweis der Oberflächenexpression des IL-6R<sub>EZD</sub>-gp130<sub>TMD\_P3V3</sub> mit einem gegen den IL-6R gerichteten Antikörper auf der Ba/F3:IL-6R<sub>EZD</sub>-gp130<sub>TMD,IZD\_P3V3</sub> Zelllinie (blaue Kurve). Als Kontrolle dienten Ba/F3 Zellen (rote Kurve). **C:** Nachweis der Oberflächenexpression des gp130\_Box1,2 Rezeptors mittels, gegen gp130 gerichteten Antikörper auf der Ba/F3:gp130\_Box1,2 Zelllinie (blaue Kurve). Als Kontrolle dienten Ba/F3 Zellen (rote Kurve). Die Ordinate gibt die normalisierte Anzahl der Ereignisse in % an. Die Abszisse ist die Fluoreszenzintensität angegeben. Die Auswertung erfolgte durch das Programm FlowJo. Das Experiment wurde einmal (n=1) durchgeführt.

Durch Stimulationsexperimente wurden die Zelllinien Ba/F3:gp130\_Box1,2:IL-6R<sub>EZD</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub>\_P3V3, Ba/F3:gp130\_Box1,2 und Ba/F3:IL-6R<sub>EZD</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub>\_P3V3 auf ihre biologische Aktivität untersucht. Als Vergleichszelllinie wurden Ba/F3:gp130:IL-6R Zellen verwendet. Bei der Zelllinie Ba/F3:gp130\_Box1,2:IL-6R<sub>EZD</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub>\_P3V3 wurde eine Phosphorylierung von STAT1 bei 100 ng/ml und 1.000 ng/ml IL-6 nachgewiesen, während bei der Vergleichszelllinie Ba/F3:gp130:IL-6R STAT1 nicht phosphoryliert wurde (Abbildung 25 A, D). Bei den Zelllinien Ba/F3:IL6R<sub>EZD</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub>\_P3V3 und Ba/F3:gp130\_Box1,2, welche jeweils nur einen der beiden Rezeptor exprimieren, konnte ebenfalls keine Phosphorylierung von STAT1 nachgewiesen werden (Abbildung 25 B, C). Eine STAT3 Phosphorylierung der Zelllinie Ba/F3:gp130\_Box1,2:IL6R<sub>EZD</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub>\_P3V3 war bereits durch eine IL-6 Konzentration von 10 ng/ml nachweisbar, während bei der Zelllinie Ba/F3:gp130:IL-6R eine Phosphorylierung von STAT3 ab einer Konzentration von 1 ng/ml IL-6 nachgewiesen wurde (Abbildung 25 A, D). Bei den beiden Zelllinien, welche jeweils nur einen der beiden Rezeptoren auf der Oberfläche exprimieren, wurde kein phosphoryliertes STAT3 Signal nachgewiesen (Abbildung 25 B, C). Eine Phosphorylierung von STAT5 wurde bei der Zelllinie Ba/F3:gp130\_Box1,2:IL6R<sub>EZD</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub>\_P3V3, nicht aber bei Ba/F3:gp130:IL-6R Zellen detektiert (Abbildung 25 A, D). Auch bei den Zelllinien Ba/F3:gp130\_Box1,2 oder Ba/F3:IL6R<sub>EZD</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub>\_P3V3, wurde eine Phosphorylierung von STAT5 nicht nachgewiesen (Abbildung 25 B, C). Dagegen wurde bei der Ba/F3:gp130\_Box1,2:IL6R<sub>EZD</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub>\_P3V3 Zelllinie, welche beide Rezeptoren auf ihrer Zelloberfläche exprimiert weder eine Phosphorylierung von AKT, noch von ERK nachgewiesen. Im Gegensatz dazu, war eine Aktivierung von AKT und ERK in der Ba/F3:gp130:IL-6R Zelllinie bereits ab 1 ng/ml IL-6 nachweisbar (Abbildung 25 A, D). Bei den Kontrollzelllinien Ba/F3:IL6R<sub>EZD</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub>\_P3V3 und Ba/F3:gp130\_Box1,2 wurde ebenfalls keine Aktivierung von AKT und ERK nachgewiesen (Abbildung 25 B, C).

Zusammengefasst kann gesagt werden, dass die Zelllinien Ba/F3:IL-6R<sub>EZD</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub>\_P3V3 und Ba/F3:gp130\_Box1,2, welche jeweils nur einen Rezeptor auf der Zelloberfläche exprimieren, keine Aktivierung von STAT1, STAT3, STAT5, AKT und ERK zeigten. Bei der Zelllinie Ba/F3:gp130\_Box1,2:IL6R<sub>EZD</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub>\_P3V3 wurde ein abweichendes Aktivierungsmuster gegenüber der Kontrollzelllinie Ba/F3:gp130:IL-6R nachgewiesen. So wurde eine Phosphorylierung von STAT1, STAT3 und STAT5, jedoch nicht von ERK oder AKT nachgewiesen.

Bei der Zelllinie Ba/F3:gp130:IL-6R wurde dagegen eine Aktivierung von STAT3, AKT und ERK nachgewiesen (Abbildung 25). Durch dieses Experiment wurde die biologische Aktivität der IZD der IL6R<sub>EZD</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub>\_P3V3 Rezeptorchimäre nachgewiesen.

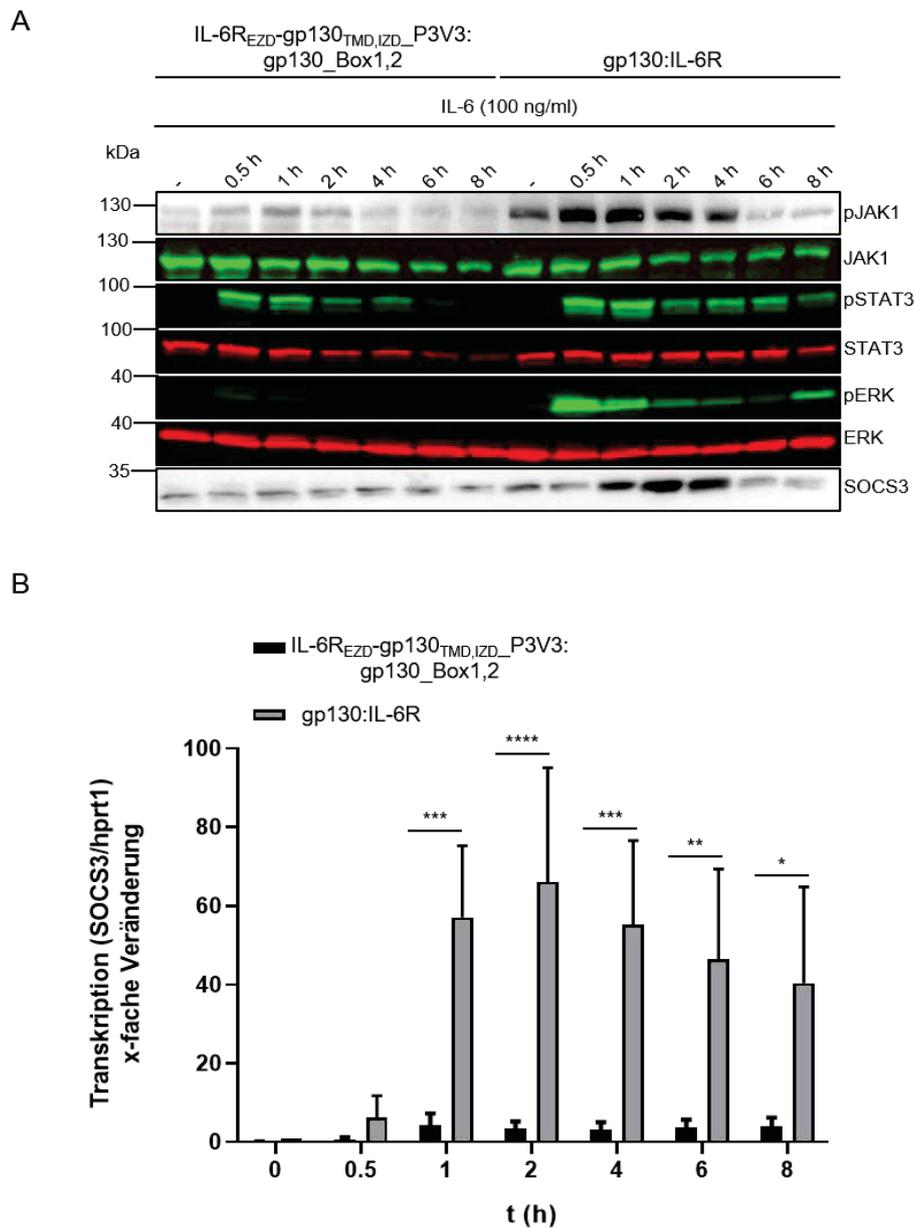


**Abbildung 25: Die IZD der Rezeptorchimäre IL-6<sub>EzD</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub>-P3V3 ist in Kombination mit gp130<sub>Box1,2</sub> durch IL-6 aktiv.**

**A:** Stimulation der Zelllinie Ba/F3:gp130<sub>Box1,2</sub>:IL-6<sub>EzD</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub>-P3V3. **B:** Stimulation der Zelllinie Ba/F3:IL-6<sub>EzD</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub>-P3V3. **C:** Stimulation der Zelllinie Ba/F3:gp130<sub>Box1,2</sub>. **D:** Stimulation der Zelllinie Ba/F3:gp130:IL-6R. Stimuliert wurde mit IL-6 in den Konzentrationen 1 ng/ml, 10 ng/ml, 100 ng/ml und 1.000 ng/ml. Eine unstimulierte Kondition ist mit (-) gekennzeichnet. Die Stimulation aller Zelllinien erfolgte durch IL-6 für 20 min. Fluoreszenzbasierter Western Blot gegen STAT1, phospho-STAT1, STAT3, phospho-STAT3, STAT5, phospho-STAT5, AKT, phospho-AKT, ERK und phospho-ERK. In jeder Spur wurden 50 µg Gesamtprotein aufgetragen. Die Western Blots stellen jeweils ein repräsentatives, unabhängiges Experiment von insgesamt dreien dar (n=3).

Um die Signaltransduktion der Ba/F3:gp130\_Box1,2:IL-6<sub>REZD</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub>\_P3V3 Zelllinie genauer zu charakterisieren, wurde ein Zeitverlauf der Signaltransduktion unter dauerhafter Zytokingabe, im weiteren Verlauf als „Kinetik“ beschrieben, durchgeführt. Als Vergleichszelllinie wurden Ba/F3:gp130:IL-6R Zellen verwendet. Hierbei wurden die beiden Zelllinien Ba/F3:gp130\_Box1,2:IL-6<sub>REZD</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub>\_P3V3 und Ba/F3:gp130:IL-6R mit 100 ng/ml IL-6 stimuliert und zu den Zeitpunkten 0 h, 0,5 h, 1 h, 2 h, 4 h, 6 h und 8 h geerntet. Im Fokus standen die phosphorylierten Proteine STAT3, ERK, JAK1 und der negative Rückkopplungsinhibitor SOCS3, welche im Western Bot untersucht wurden. Die Vervielfältigung der SOCS3 mRNA wurde zusätzlich durch eine Real-Time- (RT) PCR (siehe 4.1.13) analysiert (Abbildung 26). Durch die Proteinanalyse mittels Western Blot konnte eine schwache Phosphorylierung von JAK1 zwischen den Zeitpunkten 0,5 h und 2 h in der Ba/F3:gp130\_Box1,2:IL-6<sub>REZD</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub>\_P3V3 Zelllinie nachgewiesen werden (Abbildung 26 A). Die Kontrollzelllinie Ba/F3:gp130:IL-6R zeigt dagegen zwischen den Zeitpunkten 0,5 h und 4 h eine Phosphorylierung von Jak1. Auch bei der unstimulierten Kontrolle der Vergleichszelllinie ist eine Jak1 Phosphorylierung nachzuweisen. Dies könnte auf die Unterschiede zwischen den Zelllinien zurückzuführen sein. Eine STAT3 Aktivierung wurde bei der Zelllinie Ba/F3:gp130\_Box1,2:IL-6<sub>REZD</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub>\_P3V3 zwischen 0,5 h und 4 h nachgewiesen, wobei die Phosphorylierung an Intensität abnimmt und ab 6 h kaum noch nachzuweisen ist. Die Kontrollzelllinie Ba/F3:gp130:IL-6R zeigt dagegen auch nach 8 h eine, wenn auch abnehmende STAT3 Phosphorylierung. Bei der Zelllinie Ba/F3:gp130\_Box1,2:IL-6<sub>REZD</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub>\_P3V3 wurde eine sehr schwache Phosphorylierung von ERK zwischen den Zeitpunkten 0,5 h und 1 h nachgewiesen, während bei den Ba/F3:gp130:IL-6R Kontrollzellen im Western Blot zwischen 0,5 h und 8 h eine starke Phosphorylierung nachweisbar war. Während das Protein SOCS3 im Western Blot bei der Zelllinie Ba/F3:gp130\_Box1,2:IL-6<sub>REZD</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub>\_P3V3 zu keinem Zeitpunkt nachgewiesen wurde, so wurde durch die RT-PCR eine signifikant geringe Vervielfältigung der SOCS3 mRNA zwischen 1 h und 8 h, im Vergleich zur Vergleichszelllinie Ba/F3:gp130:IL-6R nachgewiesen (Abbildung 26 B).

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass die IL-6 Stimulation in der Zelllinie Ba/F3:gp130\_Box1,2:IL-6<sub>REZD</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub>\_P3V3 im Vergleich zur Zelllinie Ba/F3:gp130:IL-6R allgemein zu einer abgeschwächten Phosphorylierung von Jak1, STAT3, ERK und zu einer verminderten Transkription der SOCS3 mRNA führt.



**Abbildung 26: Ba/F3:gp130\_Box1,2:IL-6R<sub>EZD</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub>\_P3V3 zeigt im zeitlichen Verlauf einer IL-6 induzierten Stimulation ein abgeschwächtes Expressions- und Transkriptionsmuster im Vergleich zur Ba/F3:gp130:IL-6R Zelllinie.**

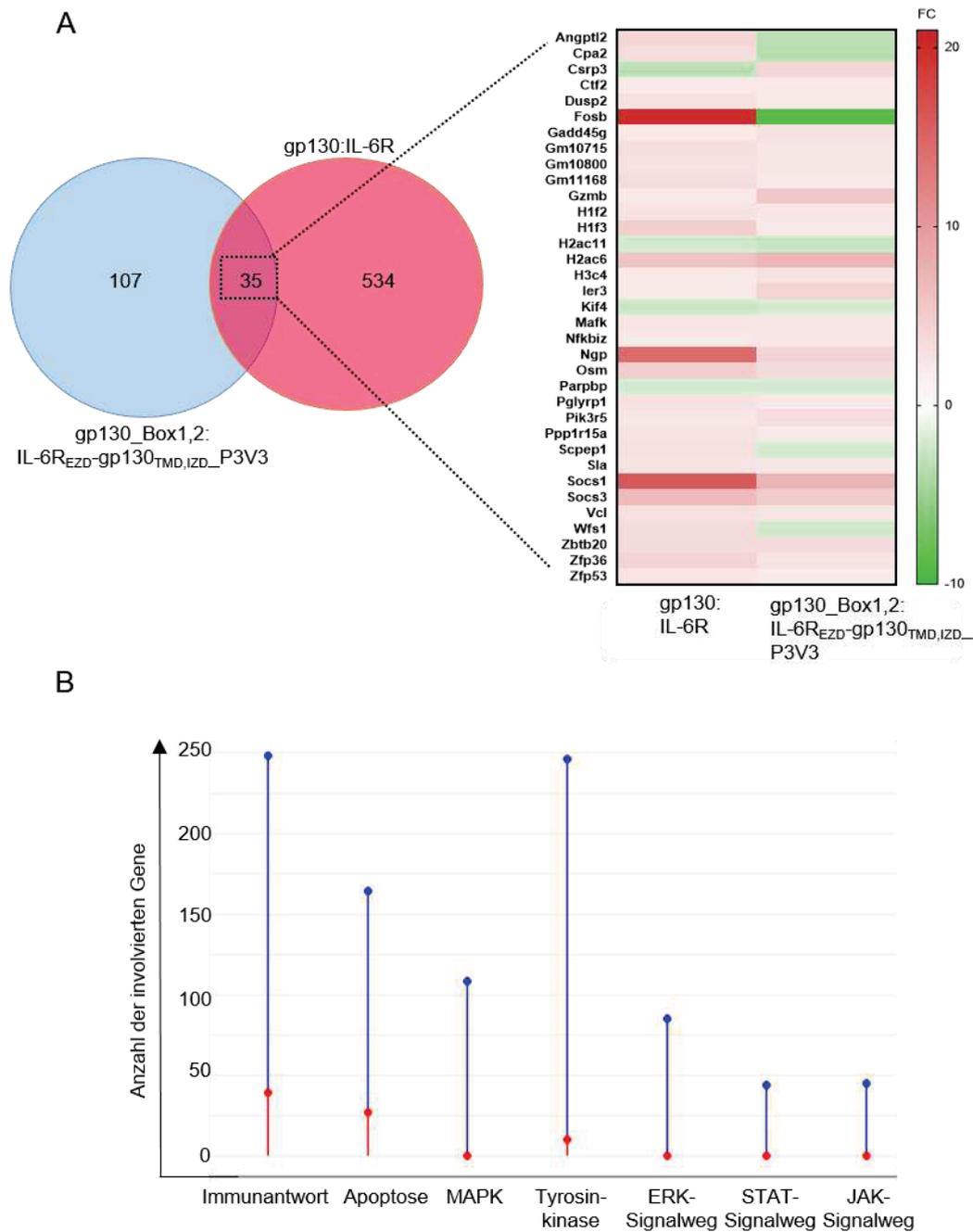
**A:** Nach der Stimulation der Zelllinien Ba/F3:gp130\_Box1,2:IL-6R<sub>EZD</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub>\_P3V3 und Ba/F3:gp130:IL-6R wurde ein Western Blot gegen Jak1, phospho (p)-Jak1, STAT3, phospho (p)-STAT3, ERK, phospho (p)-ERK und SOCS3 durchgeführt. In jeder Spur wurden 50 µg Gesamtprotein aufgetragen. **B:** Spezifische Oligonukleotide wurden gegen die SOCS3 mRNA, sowie gegen die hprt1 mRNA, welche als Kontrolle diente, in einer *Real Time*-(RT) PCR verwendet. Für die Quantifizierung der relativen x-fachen Transkription von SOCS3 der Zelllinie Ba/F3:gp130\_Box1,2:IL-6R<sub>EZD</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub>\_P3V3, wurde der Zeitpunkt 0 h der Kontrolle Ba/F3:gp130:IL-6R auf 1-fach gesetzt. Stimulation der Zelllinie Ba/F3:gp130\_Box1,2:IL-6R<sub>EZD</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub>\_P3V3, sowie der Kontrolle Ba/F3:gp130:IL-6R mit 100 ng/ml IL-6 zu den Zeitpunkten 0 h, 0, 5 h, 1 h, 2 h, 4 h, 6 h und 8 h. Die Fehlerbalken spiegeln den Standardfehler wieder. Statistische Auswertung durch *two-way ANOVA* und des *Sidak's multiple comparison test*. Die oben aufgeführten Ergebnisse stellen ein repräsentatives, unabhängiges durchgeführtes Experiment von insgesamt drei dar (n=3).

Aufgrund der unterschiedlichen Expressionsmuster sowie der abgeschwächten Transkription von SOCS3, wurde eine Transkriptomanalyse durchgeführt. Hierfür wurde die Zelllinie Ba/F3:gp130\_Box1,2:IL-6R<sub>EZD</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub>\_P3V3 sowie die Kontrollzelllinie Ba/F3:gp130:IL-6R für 40 min mit 100 ng/ml IL-6 stimuliert. Anschließend wurde deren mRNA isoliert und durch das Biologisch-Medizinisches Forschungszentrum (BMFZ) analysiert.

Das Venn-Diagramm zeigt 107 Gene ( $p < 0,05$  einschließlich einer *False Discovery Rate* (FDR) Korrektur), welche von der Zelllinie Ba/F3:gp130\_Box1,2:IL-6R<sub>EZD</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub>\_P3V3 im Vergleich zur Ba/F3:gp130:IL-6R Zelllinie mindestens 2-fach hoch – oder herunterreguliert wurden. Im Gegensatz dazu wurden bei der Kontrollzelllinie Ba/F3:gp130:IL-6R 534 Gene durch die Stimulation mit IL-6 hoch- oder herunterreguliert, welche die Zelllinie Ba/F3:gp130\_Box1,2:IL-6R<sub>EZD</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub>\_P3V3 nicht transkribiert oder sich unterhalb des gesetzten Schwellenwertes (*Fold Change*, FC) und dem von Betrag  $|2|$  befinden. Durch das Venn-Diagramm wurden 35 Gene ermittelt, welche von beiden Zelllinien um mindestens das doppelte hoch- oder herunterreguliert sind (Abbildung 27 A). Es wird deutlich, dass die Genexpression mancher Gene teilweise in gegensätzliche Richtungen verlaufen. Zu diesen Genen gehört beispielsweise *FosB proto-oncogenic* (*Fosb*). *Fosb* ist bei der Kontrollzelllinie Ba/F3:gp130:IL-6R durch die Stimulation von IL-6 um das 20-fache hoch-, und bei der Zelllinie Ba/F3:gp130\_Box1,2:IL-6R<sub>EZD</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub>\_P3V3 um das 8-fache herunterreguliert. Umgekehrt wurde die Transkription einiger mRNA wie *Cysteine and glycine-rich protein 3* (*Csrp3*) von der Kontrollzelllinie Ba/F3:gp130:IL-6R um das 3,5-herunter- und bei der charakterisierenden Zelllinie Ba/F3:gp130\_Box1,2:IL-6R<sub>EZD</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub>\_P3V3 um mehr als das 4-fache hochreguliert. SOCS1 wird durch die Stimulation der Zelllinie Ba/F3:gp130:IL-6R um das 16-fache hochreguliert, während die Transkription der Zelllinie Ba/F3:gp130\_Box1,2:IL-6R<sub>EZD</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub>\_P3V3 nur um das 7-fache erhöht ist (Abbildung 26 A).

Unter Verwendung einer Genontologie (GO) Analyse wurde sich gezielt auf Gene fokussiert, welche in den Signalwegen oder im Zusammenhang mit spezifischen Schlagworten wie „Immunabwehr“, „Apoptose“, „MAPK“, „Tyrosinkinase“, „ERK-Signalweg“, „STAT-Signalweg“ und „JAK-Signalweg“ involviert und, im Vergleich zur Kontrollzelllinie Ba/F3:gp130:IL-6R, um mindestens das 1,5-fache erhöht- oder erniedrigt sind. Hierbei konnte nachgewiesen werden, dass die Zelllinie Ba/F3:gp130\_Box1,2:IL-6R<sub>EZD</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub>\_P3V3 ein Defizit in der

Transkription von Genen, im Zusammenhang mit diesen Schlagworten aufweist, welches im Lolli-Diagramm dargestellt ist (Abbildung 27 B). In blau ist jeweils die Anzahl der Gene markiert, welche im Vergleich zur Kontrollzelllinie Ba/F3:gp130 herunterreguliert sind. Rot zeigt die Anzahl der Gene, welche bei der Zelllinie Ba/F3:gp130\_Box1,2:IL-6R<sub>EZD</sub>-gp130<sub>TMD,IZD\_P3V3</sub> im Vergleich zur Kontrolle stärker transkribiert werden. Dem Diagramm kann entnommen werden, dass die Transkription von mehr als 25 Genen die mindestens um das 1,5-fache höher reguliert sind im Vergleich zur Kontrolle im Zusammenhang mit den Schlagworten „Immunantwort und Apoptose“ stehen. Die mRNA von fast 250 Genen, welche im Zusammenhang mit den untersuchten Signalwegen ERK, STAT, JAK, MAPK oder den Tyrosinkinasen stehen und durch die IL-6 Stimulation heraufreguliert sein müssten, sind fast vollständig um mindestens das 1,5-fache herunterreguliert (Abbildung 27 B).



**Abbildung 27:** Ba/F3:gp130\_Box1,2:IL-6R<sub>EZD</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub>\_P3V3 Zellen zeigen während der Stimulation mit IL-6 ein eingeschränktes Transkriptionsmuster im Vergleich zur Kontrollzelllinie Ba/F3:gp130:IL-6R.

**A:** Venn-Diagramm zeigt die mRNA der Gene, welche nur von der Zelllinie Ba/F3:gp130\_Box1,2:IL-6R<sub>EZD</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub>\_P3V3, nur von der Zelllinie Ba/F3:gp130:IL-6R und von beiden während der Stimulation um mindestens das doppelte hoch- oder herunterreguliert wird. Filter:  $p < 0,05$  inklusive der *False Discovery Rate* (FDR). Der *Fold Change* wurde mit 2 definiert ( $|FC| \geq 2$ ) **B:** Das Lolli-Diagramm stellt die Anzahl der mRNA von Genen da, welche bei der Zelllinie Ba/F3:gp130\_Box1,2:IL-6R<sub>EZD</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub>\_P3V3 im Vergleich zur Kontrolle Ba/F3:gp130:IL-6R, um mindestens das 1,5-fache herauf oder herunterreguliert wurden. Filter:  $p < 0,05$  inklusive der *False Discovery Rate* (FDR). Der *Fold Change* wurde mit 1,5 definiert ( $|FC| \geq 1,5$ ). Rot stellt die Anzahl an transkribierter mRNA da, welche um mindestens das 1,5-fache erhöht wurden. Blau stellt die Anzahl an transkribierter mRNA da, welche um mindestens das 1,5-fache reduziert wurde. Stimuliert wurden die Zelllinien Ba/F3:gp130\_Box1,2:IL-6R<sub>EZD</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub>\_P3V3 sowie die Kontrollzelllinie Ba/F3:gp130:IL-6R mit 100 ng/ml IL-6 für 40 min. Zur Auswertung dieses Experiments wurden jeweils vier Stimulationen durchgeführt (n=4).

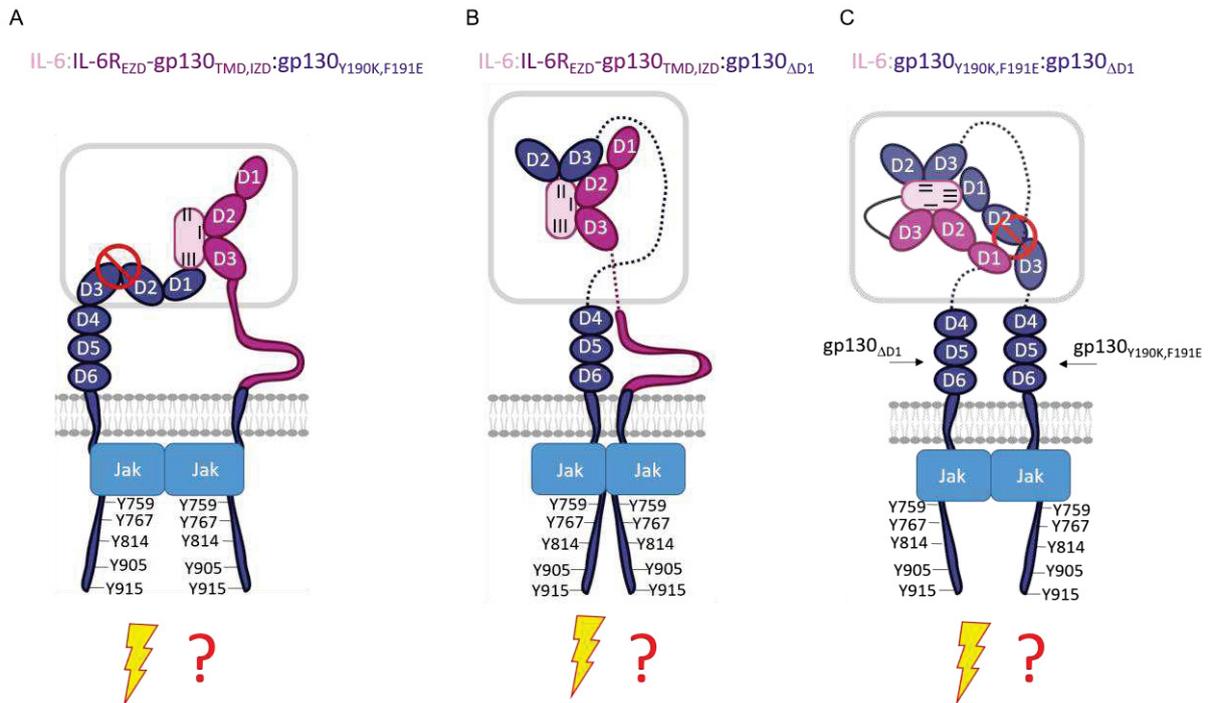
Durch das Experiment der Transphosphorylierung (in diesem Fall die Phosphorylierung der C-terminal gelegenen Tyrosine des IL-6<sub>EZD</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub> durch die Januskinasen des gp130\_Box1,2) mittels der Ba/F3:IL-6<sub>EZD</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub>\_P3V3:gp130\_Box1,2 Zelllinie wurde nachgewiesen, dass die IZD der Rezeptorchimäre IL-6<sub>EZD</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub> aktiv und zur Signaltransduktion mit einem gp130 Rezeptor fähig ist. Durch die Transkriptomanalysen wurde nachgewiesen, dass die mit IL-6 stimulierten Zelllinien Ba/F3:gp130\_Box1,2:IL-6<sub>EZD</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub>\_P3V3 sowie die Kontrollzelllinie Ba/F3:gp130:IL-6R unterschiedliche Transkriptionsmuster aufweisen. Es wurde nachgewiesen, dass einige Gene in der zu untersuchenden Zelllinie um mindestens das doppelte herunter reguliert sind, während die selben Gene in der Kontrolle Ba/F3:gp130:IL-6R während einer Stimulation mit IL-6 um mehr als das zehnfache heraufreguliert sind. Zudem ist der Großteil an transkribierter mRNA vieler Gene, welche im Zusammenhang mit den untersuchten Schlagworten, vor allem bei „ERK-, STAT-, JAK-Signalweg“, steht, bei der zu analysierenden Zelllinie Ba/F3:gp130\_Box1,2:IL-6<sub>EZD</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub>\_P3V3 um mindestens das 1,5-fache herunterreguliert.

5.4 Die Signaltransduktion eines synthetischen, trimeren IL-6-Rezeptorkomplexes deutet auf einen hexameren Rezeptoraufbau hin.

Aufgrund des Aktivitätsnachweises der IZD des IL-6<sub>EZD</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub> sollte dieser in einer neuen Rezeptorkombination einen synthetischen, trimeren Rezeptorkomplex auf der Zelloberfläche erzeugen. In der Annahme, dass sich Unterschiede zwischen den verschiedenen Bindungsmodi der Rezeptoren in der Signaltransduktion nachweisen lassen, wurden zwei unterschiedliche gp130 Mutanten designt, welche jeweils nur eine der beiden Bindestellen für IL-6 besitzen. Für die erste gp130 Mutante wurden die Aminosäuren Y190 zu K und F191 zu E mutiert (siehe Klonierungsübersucht und AS-Sequenz 11.1.5). Diese Aminosäuren befinden sich in der CBD der D2 des gp130 und sind für die Liganden-Rezeptorinteraktion von immenser Bedeutung. Analysen zeigten, dass im Falle einer Mutation von Y190 und F191, die Interaktion zwischen dem gp130<sub>Y190K,F191E</sub> und der Bindestelle II des IL-6 kaum mehr stattfinden kann und somit nur noch die D1 des gp130 für die Bindestelle III des IL-6 zur Verfügung steht (Kurth *et al.* 1999). Diese Bindestelle III des IL-6 ist bei der zweiten Rezeptormutante gp130<sub>ΔD1</sub> nicht mehr in der Lage, an die D1 des gp130 zu binden, da die D1 des gp130 vollständig deletiert

wurde, sodass IL-6 nur noch mit der Bindestelle II an die D2 des gp130 binden kann (siehe Klonierungsübersicht 11.1.6).

Ba/F3 und Ba/F3:IL-6<sub>EZD</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub> Zellen wurden mit der pDNA des gp130<sub>Y190K,F191E</sub> oder mit der des gp130<sub>ΔD1</sub> transduziert. Die Idee dahinter war, dass im Falle der Zelllinie Ba/F3:IL-6<sub>EZD</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub>:gp130<sub>Y190K,F191E</sub> IL-6 mit seiner Bindestelle III an die D1 des gp130<sub>Y190K,F191E</sub> bindet, sodass ein signaltransduzierender tetramerer Komplex aus 1xIL-6:1xIL-6<sub>EZD</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub>:1xgp130<sub>Y190K,F191E</sub> entsteht (Abbildung 28 A). Im Falle der Zelllinie Ba/F3:IL-6<sub>EZD</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub>:gp130<sub>ΔD1</sub> würde das Heterodimer aus IL-6:IL-6<sub>EZD</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub> während der Stimulation mit der Bindestelle II des IL-6 an die D2/D3 des gp130<sub>ΔD1</sub> binden (Abbildung 28 B). Die transduzierten Ba/F3 Zellen, welche nur den gp130<sub>Y190K,F191E</sub> oder nur den gp130<sub>ΔD1</sub> Rezeptor auf der Zelloberfläche exprimierten dienten als Kontrolle, sodass nachgewiesen werden konnte, dass die Rezeptoren alleine funktionsunfähig waren. Des Weiteren wurden Ba/F3 Zellen mit der pDNA des gp130<sub>Y190K,F191E</sub> und des gp130<sub>ΔD1</sub> zusammen transduziert. Mit dieser Zelllinie (Ba/F3:gp130<sub>Y190K,F191E</sub>:gp130<sub>ΔD1</sub>) sollte überprüft werden, ob die beiden Rezeptoren, während einer Stimulation mit HIL-6, ihre jeweilige Defizite ausgleichen können und einen signaltransduzierenden Rezeptorkomplex bilden können. Dieses Experiment wurde bereits durchgeführt. Die damals publizierten Daten bestätigten eine signaltransduzierende Komplexbildung der beiden mutierten gp130 Rezeptoren (Pflanz *et al.* 2000). Des Weiteren könnte mit dieser Rezeptorkombination überprüft werden, ob ein tetramerer Rezeptorkomplex aus 1xHIL-6:2xgp130<sub>Y190K,F191E/ΔD1</sub> entsteht, und welche Signalwege aktiviert werden. Der mögliche Bindungsmodi könnte daher wie folgt verlaufen: Das IL-6 des HIL-6 bindet zuerst mit seiner Bindestelle II an die D2 des gp130<sub>ΔD1</sub> und anschließend mit seiner Bindestelle III an die D1 des gp130<sub>Y190K,F191E</sub> (Abbildung 28 C).

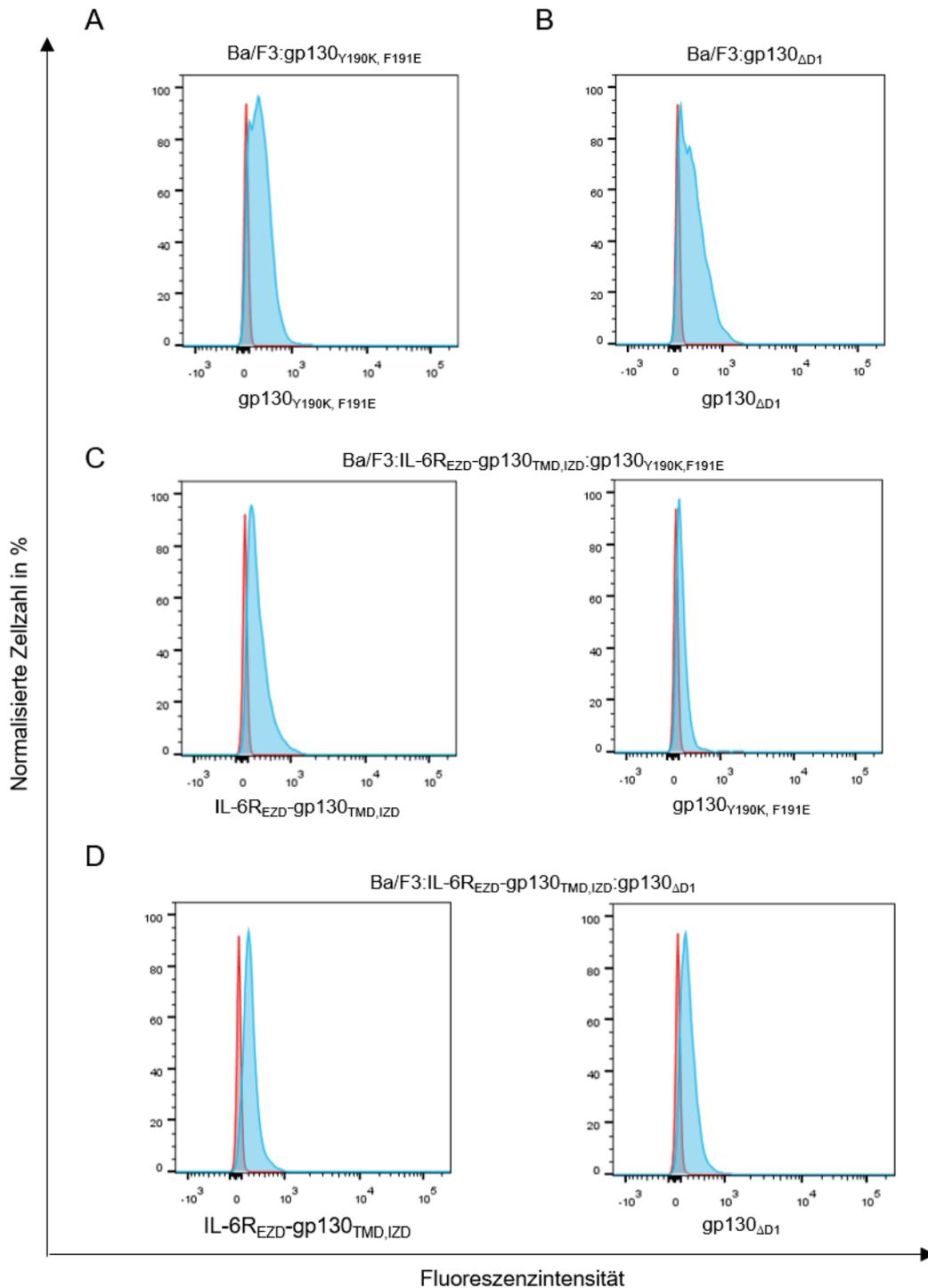


**Abbildung 28: Schematische Darstellung der Rezeptorkomplexe IL-6:IL-6R<sub>EZD</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub>:gp130<sub>Y190K,F191E</sub>, IL-6:IL-6R<sub>EZD</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub>:gp130<sub>ΔD1</sub> und HIL-6: gp130<sub>Y190K,F191E</sub>: gp130<sub>ΔD1</sub>.**

**A:** Schematische Darstellung des IL-6:IL-6R<sub>EZD</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub>:gp130<sub>Y190K,F191E</sub> Rezeptorkomplexes. Der rote, durchgestrichene Kreis markiert die mutierte Bindestelle Y190K,F191E innerhalb der D2 des gp130. In Folge dessen kann IL-6 mit seiner Bindestelle III nur an die D1 des gp130 binden. **B:** Schematische Darstellung des IL-6:IL-6R<sub>EZD</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub>:gp130<sub>ΔD1</sub> Rezeptorkomplexes. Die D1 des gp130 wurde deletiert, sodass IL-6 mit der Bindestelle II nur an die D2/D3 des gp130 binden kann. **C:** Schematische Darstellung des HIL-6: gp130<sub>Y190K,F191E</sub>:gp130<sub>ΔD1</sub> Rezeptorkomplex. Das IL-6 des HIL-6 bindet mit der Bindestelle II an die D2 des gp130<sub>ΔD1</sub> und anschließend mit der Bindestelle III an die D1 des gp130<sub>Y190K,F191E</sub>. Abbildung erstellt in BioRender.com.

Für die Durchflusszytometrie wurde ein gegen den gp130 gerichteter Antikörper verwendet. Dadurch konnte eine Oberflächenexpression der gp130<sub>Y190K,F191E</sub> Mutante auf der Zelllinie Ba/F3:gp130<sub>Y190K,F191E</sub> bestätigt werden. Die rote Kurve des Histogramms repräsentiert dabei die ursprüngliche Zelllinie Ba/F3, welche den Rezeptor gp130<sub>Y190K,F191E</sub> nicht exprimiert. Die Rechtsverschiebung der blauen Kurve im Histogramm auf der Abszisse bestätigt die Expression des gp130<sub>Y190K,F191E</sub> (Abbildung 29 A). Durch die Rechtsverschiebung der blauen Kurve im Histogramm, konnte die Expression des gp130<sub>ΔD1</sub> der Zelllinie Ba/F3:gp130<sub>ΔD1</sub> bestätigt werden. Die rote Kurve des Histogramms repräsentiert die Kontrollzelllinie Ba/F3 (Abbildung 29 B). Für die Zelllinie Ba/F3:IL-6R<sub>EZD</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub>:gp130<sub>Y190K,F191E</sub> wurde zusätzlich ein α-IL-6R Antikörper verwendet. Dadurch konnte durch die Rechtsverschiebung der blauen Kurven der Histogramme eine Expression des IL-6R<sub>EZD</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub> sowie des gp130<sub>Y190K,F191E</sub> bestätigt werden. Als Kontrolle, welche durch die rote Kurve in den Histogrammen dargestellt ist, wurde die ursprüngliche Zelllinie Ba/F3 verwendet (Abbildung 29 C). Des Weiteren konnte

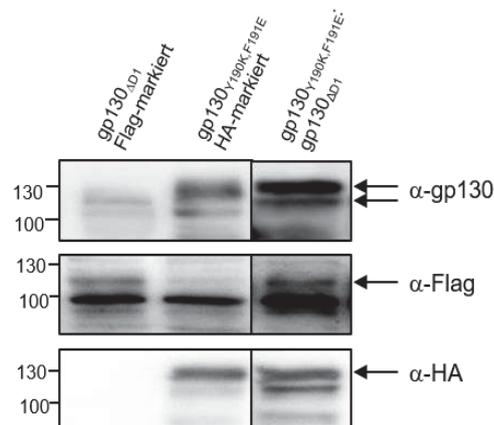
durch die Durchflusszytometrie die Oberflächenexpression der Rezeptormutanten IL-6<sup>REZD</sup>-gp130<sup>TMD,IZD</sup> und gp130<sup>ΔD1</sup> auf der Zelloberfläche der Zelllinie Ba/F3:IL-6<sup>REZD</sup>:gp130<sup>TMD,IZD</sup>-gp130<sup>ΔD1</sup> nachgewiesen werden. Hierbei wurden Antikörper gegen IL-6R und gp130 verwendet. Als Kontrolle, welche durch die rote Kurve in den Histogrammen dargestellt ist, wurde die ursprüngliche Zelllinie Ba/F3 verwendet (Abbildung 29 D).



**Abbildung 29: Ba/F3 und Ba/F3:IL-6R<sub>EZD</sub>-gp130<sub>TMD, IZD</sub> Zellen exprimieren sowohl den gp130<sub>Y190K, F191E</sub> als auch den gp130<sub>ΔD1</sub> Rezeptor auf der Zelloberfläche.**

**A:** Überprüfung der Oberflächenexpression des gp130<sub>Y190K, F191E</sub> auf der Zelllinie Ba/F3:gp130<sub>Y190K, F191E</sub>. **B:** Überprüfung der Oberflächenexpression des gp130<sub>ΔD1</sub> auf der Zelllinie Ba/F3:gp130<sub>ΔD1</sub>. In beiden Fällen wurde ein gegen den gp130 gerichteter Antikörper verwendet. **C:** Überprüfung der Oberflächenexpression des IL-6R<sub>EZD</sub>-gp130<sub>TMD, IZD</sub> und des gp130<sub>Y190K, F191E</sub> auf der Zelloberfläche der Zelllinie Ba/F3:IL-6R<sub>EZD</sub>-gp130<sub>TMD, IZD</sub>:gp130<sub>Y190K, F191E</sub>. **D:** Überprüfung der Oberflächenexpression des IL-6R<sub>EZD</sub>-gp130<sub>TMD, IZD</sub> und des gp130<sub>ΔD1</sub> auf der Zelloberfläche der Zelllinie Ba/F3:IL-6R<sub>EZD</sub>-gp130<sub>TMD, IZD</sub>:gp130<sub>ΔD1</sub>. In beiden Fällen wurden gegen IL-6R und gp130 gerichtete Antikörper verwendet. Als Kontrolle wurden Ba/F3 Zellen verwendet, welche keine der zu überprüfenden Rezeptoren exprimierten. Die x-Achse repräsentiert die Intensität des Fluoreszenzsignals während die y-Achse die normalisierte Zellzahl (%) wiedergibt. Die Auswertung erfolgte durch das Programm FlowJo. Das Experiment wurde einmal (n=1) durchgeführt.

Da durch die Durchflusszytometrie bereits die Oberflächenexpression der Rezeptoren gp130<sub>Y190K,F191E</sub> und gp130<sub>ΔD1</sub> bestätigt wurde und es keine Möglichkeit gab, diese beiden Rezeptoren in der Durchflusszytometrie voneinander zu unterscheiden, wurde ein Western Blot durchgeführt (Abbildung 30). Hierbei wurden mittels Antikörper, welche gegen gp130, Flag und Ha gerichtet sind, sowohl die gp130 Rezeptoren, als auch ihre jeweiligen C-terminalen *Tags* (Flag und HA) nachgewiesen.

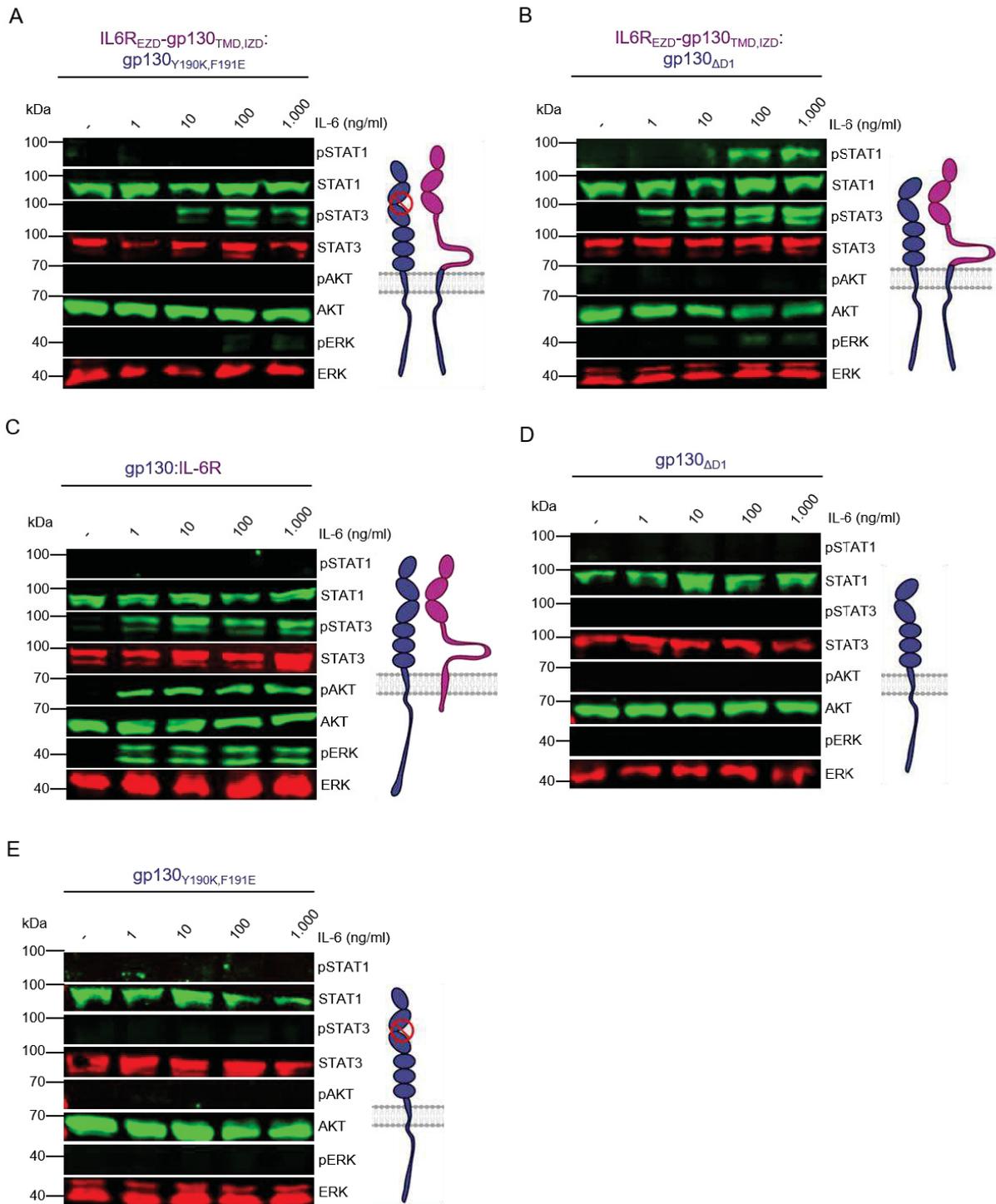


**Abbildung 30: Nachweis der Rezeptoren gp130<sub>Y190K,F191E</sub> HA und gp130<sub>ΔD1</sub> Flag, welche von der Zelllinie Ba/F3:gp130<sub>Y190K,F191E</sub>:gp130<sub>ΔD1</sub> exprimiert werden.**

Überprüfung der Expression der Rezeptoren mittels Chemilumineszenz Western Blot. Gp130<sub>ΔD1</sub> (unglykosyliert: 95,77 kDa) wurde auf einer Höhe von 120 kDa nachgewiesen. Der dazugehörige Flag-*Tag* wurde ebenfalls auf einer Höhe von ungefähr 120 kDa nachgewiesen. Gp130<sub>Y190K,F191E</sub> (unglykosyliert 107,21 kDa) wurde bei ungefähr 130 kDa nachgewiesen. Der dazugehörige HA-*Tag* wurde ebenfalls auf einer Höhe von ca. 130 kDa nachgewiesen. In jede Tasche wurden 20  $\mu$ l Gesamtprotein aufgetragen. Dieser Versuch wurde einmal durchgeführt (n=1).

Um zu untersuchen, ob die gp130 Mutanten gp130<sub>Y190K,F191E</sub> und gp130<sub>ΔD1</sub> im Komplex mit IL-6 und IL-6R<sub>EZD</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub> biologisch aktiv sind und ob sich die Signaltransduktion der Zelllinien voneinander unterscheiden, wurden Stimulationsexperimente durchgeführt. Hierbei wurden die Zelllinien Ba/F3:IL-6R<sub>EZD</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub>:gp130<sub>Y190K,F191E</sub>, Ba/F3:IL-6R<sub>EZD</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub>:gp130<sub>ΔD1</sub> sowie die Kontrollzelllinien Ba/F3:gp130<sub>Y190K,F191E</sub> und Ba/F3:gp130<sub>ΔD1</sub> mit den definierten IL-6 Konzentrationen von 1 ng/ml, 10 ng/ml, 100 ng/ml und 1000 ng/ml stimuliert. Als Positivkontrolle wurde die Zelllinie Ba/F3:gp130:IL-6R verwendet und gleichsam behandelt. Im Anschluss wurde mittels Western Blot die Signaltransduktion mit Fokus auf die Proteine STAT1, phospho-STAT1, STAT3, phospho-STAT3, AKT, phospho-AKT, ERK und phospho-ERK analysiert (Abbildung 31). Die Zelllinie mit der Rezeptorkombination IL-6R<sub>EZD</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub>-gp130<sub>ΔD1</sub> zeigte eine Phosphorylierung von STAT1 ab einer Konzentration von 100 ng/ml während bei der Zelllinie Ba/F3:IL-6R<sub>EZD</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub>:gp130<sub>Y190K,F191E</sub> keine Phosphorylierung von STAT1 nachgewiesen wurde. Des Weiteren konnte eine Phosphorylierung von STAT3 ab

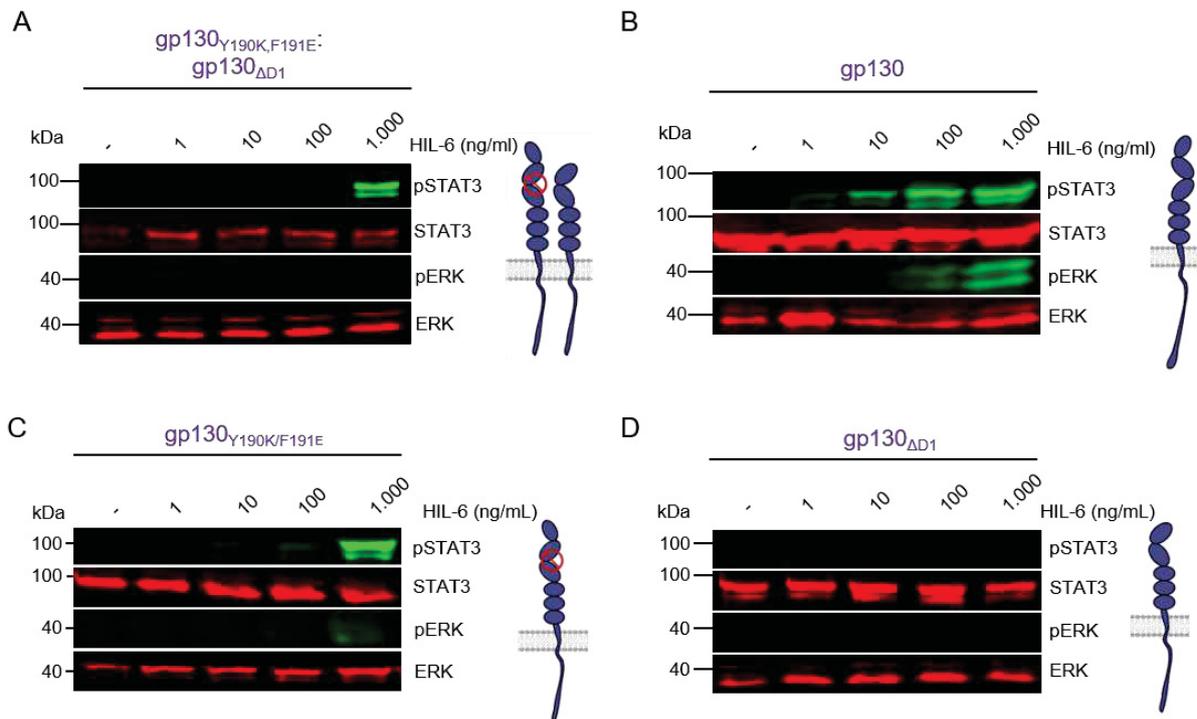
einer Konzentration von 1 ng/ml IL-6 bei der Zelllinie Ba/F3:IL-6R<sup>EZD</sup>-gp130<sup>TMD,IZD</sup>:gp130<sup>ΔD1</sup> nachgewiesen werden, während bei der Zelllinie Ba/F3:IL-6R<sup>EZD</sup>-gp130<sup>TMD,IZD</sup>:gp130<sup>Y190K,F191E</sup> eine STAT3 Phosphorylierung ab einer Konzentration von 10 ng/ml nachzuweisen war (Abbildung 31 A). Eine Signalaktivierung von ERK oder AKT konnte jedoch bei beiden Zelllinien nicht nachgewiesen werden. Bei den Kontrollzelllinien Ba/F3:gp130<sup>Y190K,F191E</sup> und Ba/F3:gp130<sup>ΔD1</sup> konnte keine Phosphorylierung der im Fokus stehenden Proteine nachgewiesen werden (Abbildung 31 D, E). Bei der als Positivkontrolle verwendete Zelllinie Ba/F3:gp130:IL-6R wurde eine Phosphorylierung ab 1 ng/ml IL-6 bei den Proteinen STAT3, AKT und ERK nachgewiesen (Abbildung 31 C).



**Abbildung 31: Die Zelllinie Ba/F3:IL-6R<sup>EzD</sup>-gp130<sup>TMD,IZD</sup>:gp130<sup>ΔD1</sup> zeigt eine stärkere Phosphorylierung der Signalproteine durch IL-6 als Ba/F3:IL-6R<sup>EzD</sup>-gp130<sup>TMD,IZD</sup>:gp130<sup>Y190K,F191E</sup>.**

**A:** Stimulation der Zelllinie Ba/F3:IL-6R<sup>EzD</sup>-gp130<sup>TMD,IZD</sup>:gp130<sup>Y190K,F191E</sup>. **B:** Stimulation der Zelllinie Ba/F3:IL-6R<sup>EzD</sup>-gp130<sup>TMD,IZD</sup>:gp130<sup>ΔD1</sup>. **C:** Stimulation der Kontrollzelllinie Ba/F3:gp130:IL-6R. **D:** Stimulation der Zelllinie Ba/F3:gp130<sup>ΔD1</sup>. **E:** Stimulation der Zelllinie Ba/F3:gp130<sup>Y190K,F191E</sup>. Fluoreszenzbasierter Western Blot mit spezifischen Antikörpern gegen die Proteine STAT1, phospho (p)-STAT1, STAT3, phospho (p)-STAT3, AKT, phospho (p)-AKT, ERK und phospho (p)-ERK. Stimuliert wurde mit den IL-6 Konzentrationen von 1 ng/ml, 10 ng/ml, 100ng/ml, 1.000 ng/ml oder unstimuliert (-) für 20 min. In jeder Spur wurden 50 µg Gesamtprotein aufgetragen. Die Western Blots stellen jeweils ein unabhängiges, repräsentatives Experiment von drei dar (n=3).

Um eine mögliche Signaltransduktion der Zelllinie Ba/F3:gp130<sub>Y190K,F191E</sub>:gp130<sub>ΔD1</sub> zu untersuchen, wurde diese mit definierten Konzentrationen von HIL-6 (1 ng/ml, 10 ng/ml, 100 ng/ml und 1.000 ng/ml) stimuliert. Als Positivkontrolle wurde die Zelllinie Ba/F3:gp130 verwendet und als Negativkontrolle dienten die Zelllinien Ba/F3:gp130<sub>Y190K,F191E</sub> und gp130<sub>ΔD1</sub>. Diese Zelllinien wurden ebenfalls mit definierten Konzentrationen HIL-6 stimuliert. Im anschließendem Western Blot wurde nach den Proteinen STAT3, phosphorylierten STAT3, ERK und phosphorylierten ERK detektiert. Bei der Zelllinie Ba/F3:gp130<sub>Y190K,F191E</sub>:gp130<sub>ΔD1</sub> konnte erst ab einer Konzentration von 1.000 ng/ml HIL-6 eine Phosphorylierung von STAT3 nachgewiesen werden (Abbildung 32 A). Im Vergleich dazu wurde bei der Zelllinie Ba/F3:gp130 bereits ab 10 ng/ml HIL-6 eine Phosphorylierung von STAT3 und ab 100 ng/ml HIL-6 eine Phosphorylierung von ERK nachgewiesen (Abbildung 32 B). Bei der Zelllinie Ba/F3:gp130<sub>Y190K,F191E</sub> wurde eine Phosphorylierung von STAT3 und eine sehr schwache Phosphorylierung von ERK ab einer Konzentration von 1000 ng/ml HIL-6 nachgewiesen (Abbildung 32 C). Bei der Zelllinie Ba/F3:gp130<sub>ΔD1</sub> konnte bei keiner der mit HIL-6 stimulierten Konditionen eine Phosphorylierung von STAT3 oder ERK nachgewiesen werden (Abbildung 32 D).



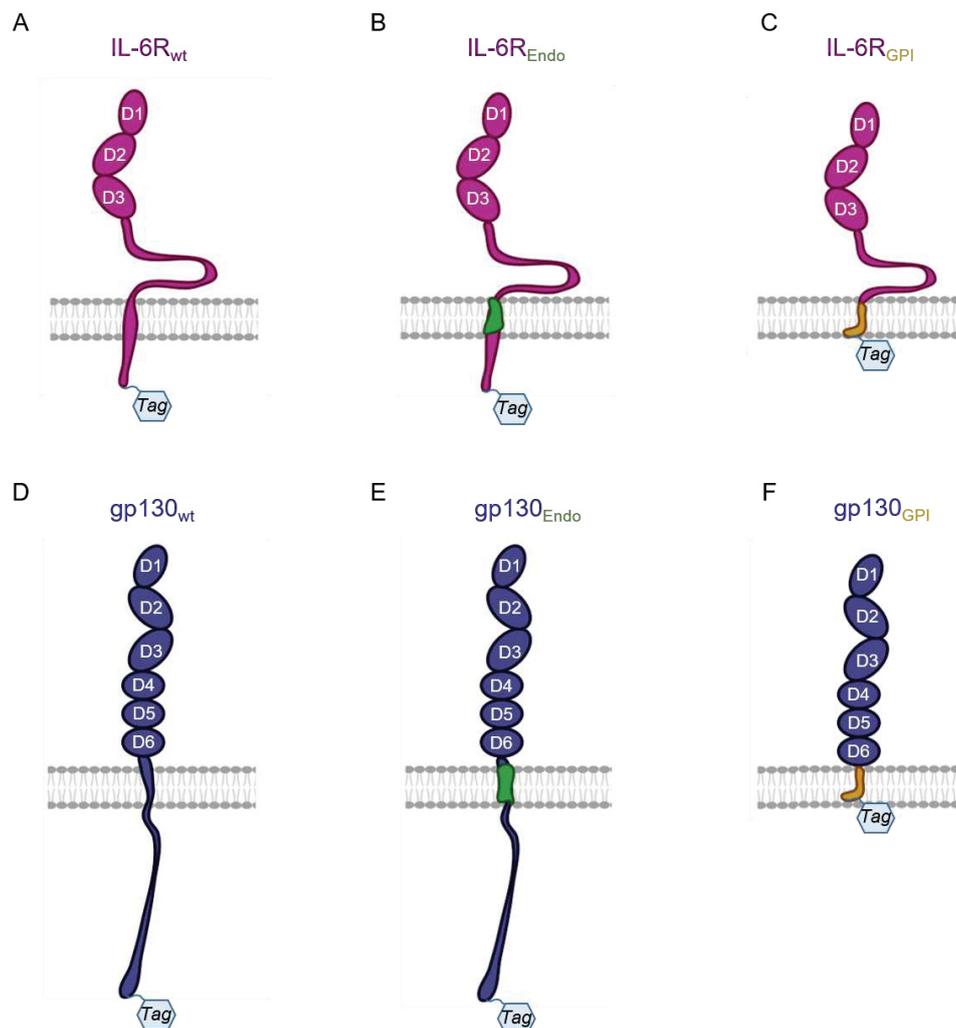
**Abbildung 32: Die Rezeptoren gp130<sub>Y190K,F191E</sub> und gp130<sub>ΔD1</sub> können ihr jeweiliges Defizit durch den anderen Rezeptor nicht ausgleichen.**

**A:** Stimulation der Zelllinie Ba/F3:gp130<sub>Y190K,F191E</sub>:gp130<sub>ΔD1</sub>. **B:** Stimulation der Zelllinie Ba/F3:gp130. **C:** Stimulation der Zelllinie Ba/F3:gp130<sub>Y190K,F191E</sub>. **D:** Stimulation der Zelllinie Ba/F3:gp130<sub>ΔD1</sub>. Fluoreszenzbasierter Western Blot mit spezifischen Antikörper gegen die Proteine STAT3, phospho (p)-STAT3, ERK und phospho (p)-ERK. Stimuliert wurde mit den HIL-6 Konzentrationen 1 ng/ml, 10 ng/ml, 100 ng/ml, 1.000 ng/ml oder unstimuliert (-) für 20 min. In jeder Spur wurden 50 µg Gesamtprotein aufgetragen. Die Western Blots der Zelllinien Ba/F3:gp130<sub>Y190K,F191E</sub>:gp130<sub>ΔD1</sub> und Ba/F3:gp130 stellen jeweils ein unabhängiges, repräsentatives Experiment von drei dar (n=3). Die Western Blots der Zelllinien Ba/F3:gp130<sub>Y190K,F191E</sub> und Ba/F3:gp130<sub>ΔD1</sub> stellen jeweils ein unabhängiges, repräsentatives Experiment von zwei dar (n=2).

Durch die Stimulationsexperimente wurden Unterschiede der verschiedenen Bindungsmodi in der Signaltransduktion nachgewiesen. Die unterschiedlichen Rezeptorkombinationen IL-6R<sub>EZD</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub>:gp130<sub>Y190K,F191E</sub>, IL-6R<sub>EZD</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub>:gp130<sub>ΔD1</sub> und gp130<sub>Y190K,F191E</sub>:gp130<sub>ΔD1</sub> zeigten im Vergleich zu ihren jeweiligen Kontrollzelllinien Ba/F3:gp130:IL-6R oder Ba/F3:gp130 unterschiedliche Signalmuster. Zudem konnte nachgewiesen werden, dass die Bindung der Bindestelle II des IL-6 an die D2/D3 des gp130 eine stärkere Signaltransduktion auslöst, als die Bindung der Bindestelle III an die D1 des gp130. Im Falle der Rezeptorkombination gp130<sub>Y190K,F191E</sub>-gp130<sub>ΔD1</sub>, welche mit HIL-6 stimuliert wurde, konnte keine eindeutige Signaltransduktion nachgewiesen werden, da auch in der Kontrollzelllinie BaF3- gp130<sub>Y190K,F191E</sub> eine Phosphorylierung von STAT3 nachgewiesen wurde.

#### 5.4 Die Transmembrandomäne von gp130 und IL-6R ist nachweislich nicht von Rezeptorhomo-/heterodimeren beteiligt

Durch die vorrausgehenden Experimente wurde nachgewiesen, dass ein trimerer Komplex aus IL-6R<sub>EZD</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub> und einer gp130 Mutante, welche nur eine Bindestelle für IL-6 aufweist, ein Signal weiterleiten kann. Bezugnehmend auf die Hypothese, dass sich das Hexamer (2xIL-6:2xIL-6R:2xgp130) aus zwei präformierten, dimeren Rezeptorkomplexen 1xIL-6R:1xgp130 bildet, wurde die Präformation der Rezeptoren IL-6R und gp130 nachfolgend untersucht. Bekannt ist bereits das gp130 auch ohne Ligand ein nicht signaltransduzierendes Heterodimer mit LIFR (gp130:LIFR) und ein Homodimer mit sich selbst (gp130:gp130) eingehen kann (Tenhumberg *et al.* 2006). Ebenso wurde ein Homodimer aus IL-6R:IL-6R nachgewiesen (Schuster *et al.* 2003). Diese Ergebnisse eröffnen die Fragestellung, ob auch präformierte Komplexe aus IL-6R:gp130 auf der Zelloberfläche vorliegen und inwiefern die TMD der beiden Rezeptoren in diesen Vorgang involviert ist. Um einen tieferen molekularbiologischen Einblick zu erhalten, sollte zusätzlich untersucht werden, welche Domäne (EZD, TMD, IZD) ausschlaggebend für die Präformierung eines Rezeptordimers ist. Erste Studien weisen darauf hin, dass die TMD verschiedener Rezeptoren maßgeblich an der Initiierung der präformierten Homo-/Heterodimere beteiligt ist (Maruyama 2015). Daher wurde sich im weiteren Verlauf vor allem auf die TMD der Rezeptoren fokussiert. Hierfür wurden, neben den natürlich vorkommenden Rezeptorvarianten (IL-6R<sub>wt</sub> (Abbildung 33 A) und gp130<sub>wt</sub> (Abbildung 33 D)) der Rezeptor IL-6R<sub>Endo</sub> und IL-6R<sub>GPI</sub> kloniert. Der IL-6R<sub>Endo</sub> besteht extrazellulär und intrazellulär aus dem IL-6R. Seine TMD wurde jedoch durch die TMD des Kollagenrezeptors Endo180, auch bekannt als uPARAP, substituiert (Abbildung 33 B, siehe Klonierungsübersicht und AS-Sequenz 11.1.7). Dieser Kollagenrezeptor ist nachweislich nicht in den Signalweg von IL-6 involviert und sollte daher nicht mit IL-6R oder gp130 interagieren (Engelholm *et al.* 2009). Der IL-6R<sub>GPI</sub> besteht extrazellulär aus dem IL-6R. Die TMD wurde durch den Glycosylphosphatidylinositol-(GPI) Anker des CNTFR substituiert (Abbildung 33 C). Die IZD wurde trunziert (siehe Klonierungsübersicht 11.1.8). An jede klonierte Rezeptorvariante wurde eine C-terminal gelegene Markierung in Form eines Flag-, HA- oder Myc- Tags inseriert. Die gp130 Mutanten (gp130<sub>Endo</sub> und gp130<sub>GPI</sub>) wurden, gleichsam den IL-6R Mutanten kloniert und befanden sich bereits in der AG Scheller (Abbildung 33 D, E).

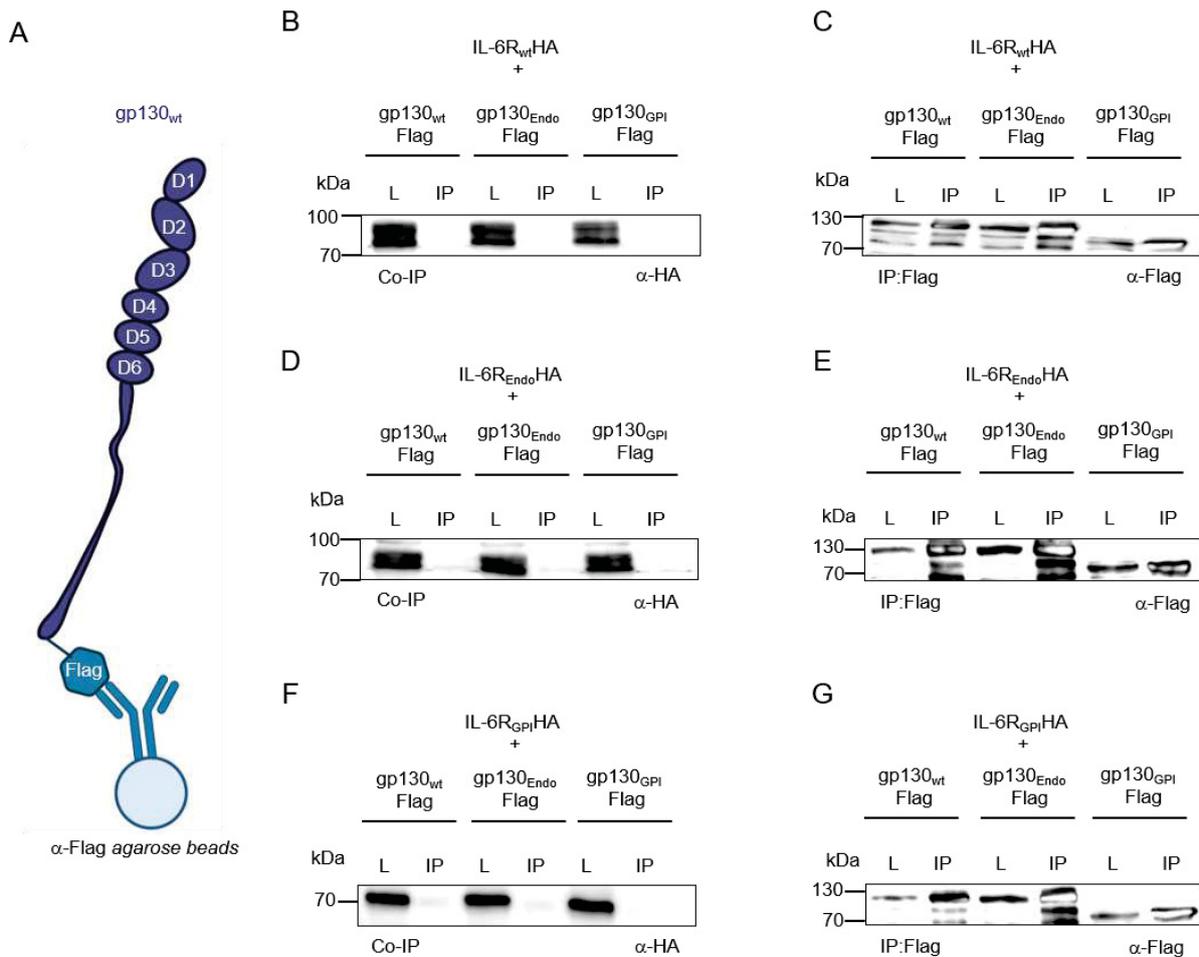


**Abbildung 33: Schematische Übersicht der Rezeptoren IL-6R<sub>wt</sub>, IL-6R<sub>Endo</sub> und IL-6R<sub>GPI</sub>, sowie gp130<sub>wt</sub>, gp130<sub>Endo</sub> und gp130<sub>GPI</sub>.** Schematische Übersicht des A: IL-6R<sub>wt</sub>. B: IL-6R<sub>Endo</sub>. C: IL-6R<sub>GPI</sub>. D: gp130<sub>wt</sub>. E: gp130<sub>Endo</sub>. F: gp130<sub>GPI</sub>. Im Falle der Endo-Mutation wurde die Transmembrandomäne (TMD) des IL-6R mit der des Endo180 Rezeptors substituiert. Bei den GPI-Mutanten wurde die gesamte TMD, sowie die intrazelluläre Domäne (IZD) durch den Glycosylphosphatidylinositol-(GPI) Anker des CNTFR substituiert. Alle Rezeptoren besitzen C-terminal einen Myc, Flag oder HA-Tag. Erstellt mit BioRender.com.

5.4.1 Die präformierten Rezeptorkomplexe aus IL-6R- und gp130-Rezeptormutanten können sich nur auf der Zelloberfläche, jedoch nicht im Zelllysat bilden.

Um nachzuweisen, dass die Rezeptoren nach der Zellernte, im Zelllysat keine Komplexe formieren können, wurden als vorausgehendes Experiment HEK293T-Zellen mit der pDNA von je einer Rezeptormutante einzeln transfiziert (siehe 4.3.2). Die Zelllysate wurden im Anschluss in verschiedenen Konstellationen miteinander vermischt. Anschließend wurden mit den vermischten Zelllysaten Co-Immunopräzipitationen (Co-IPs) mittels  $\alpha$ -Flag-agarose beads durchgeführt und die Proben durch einen Western Blot analysiert (Abbildung 34, siehe 4.3.8).

und 4.2.4). Hierbei binden die  $\alpha$ -Flag *agarose beads* an den Flag-Tag des gp130. Im Western Blot wurden die IL-6R sowie die gp130 Mutanten mittels spezifischer Antikörper gegen HA und Flag nachgewiesen (Abbildung 34 A). Es wurde nachgewiesen, dass aus den Kombination aus den Rezeptoren IL-6R<sub>wt</sub>HA mit gp130<sub>wt</sub>Flag, gp130<sub>Endo</sub>Flag oder gp130<sub>GPI</sub>Flag keine nachträglichen Heterodimere entstehen können. Einzig im Lysat wurde der HA-tag des IL-6R<sub>wt</sub> auf einer Höhe von 70 kDa nachgewiesen (Abbildung 34 A). Als Kontrolle, dass sich beide Rezeptoren im Lysat befanden, und dass die  $\alpha$ -Flag *agarose beads* an den Flag-Tag der gp130 Mutanten binden, wurde ein Western Blot mit einem  $\alpha$ -Flag Antikörper durchgeführt. Gp130<sub>wt</sub> ist bei einer Höhe von 130 kDa nachweisbar. Der trunkierte gp130<sub>GPI</sub> Rezeptor wurde bei ungefähr 80 kDa nachgewiesen. Somit konnte jede gp130 Variante sowohl im Lysat, als auch in der IP Fraktion nachgewiesen werden (Abbildung 34 B). Bei einer Kombination aus IL-6R<sub>Endo</sub>HA mit gp130<sub>wt</sub>Flag, gp130<sub>Endo</sub>Flag oder gp130<sub>GPI</sub>Flag konnte der IL-6R im Western Blot, durch einen  $\alpha$ -HA Antikörper, einzig im Lysat, nicht aber in der IP nachgewiesen werden (Abbildung 34 D). Im Western Blot wurden alle gp130 Mutanten mit einer stärkeren Akkumulation in der IP Fraktion durch einen  $\alpha$ -Flag Antikörper nachgewiesen (Abbildung 34 E). Bei einer Kombination aus IL-6R<sub>GPI</sub>HA mit gp130<sub>wt</sub>Flag, gp130<sub>Endo</sub>Flag oder gp130<sub>GPI</sub>Flag, wurde der IL-6R durch seine HA Markierung nur im Lysat nachgewiesen. Im dazugehörigen Western Blot konnten die gp130 Varianten gp130<sub>wt</sub>Flag, gp130<sub>Endo</sub>Flag und gp130<sub>GPI</sub>Flag im Lysat und in der IP nachgewiesen werden (Abbildung 34 G).



**Abbildung 34: Die Rezeptoren können nur auf der Zelloberfläche, nicht aber im Lysat dimerisieren.**

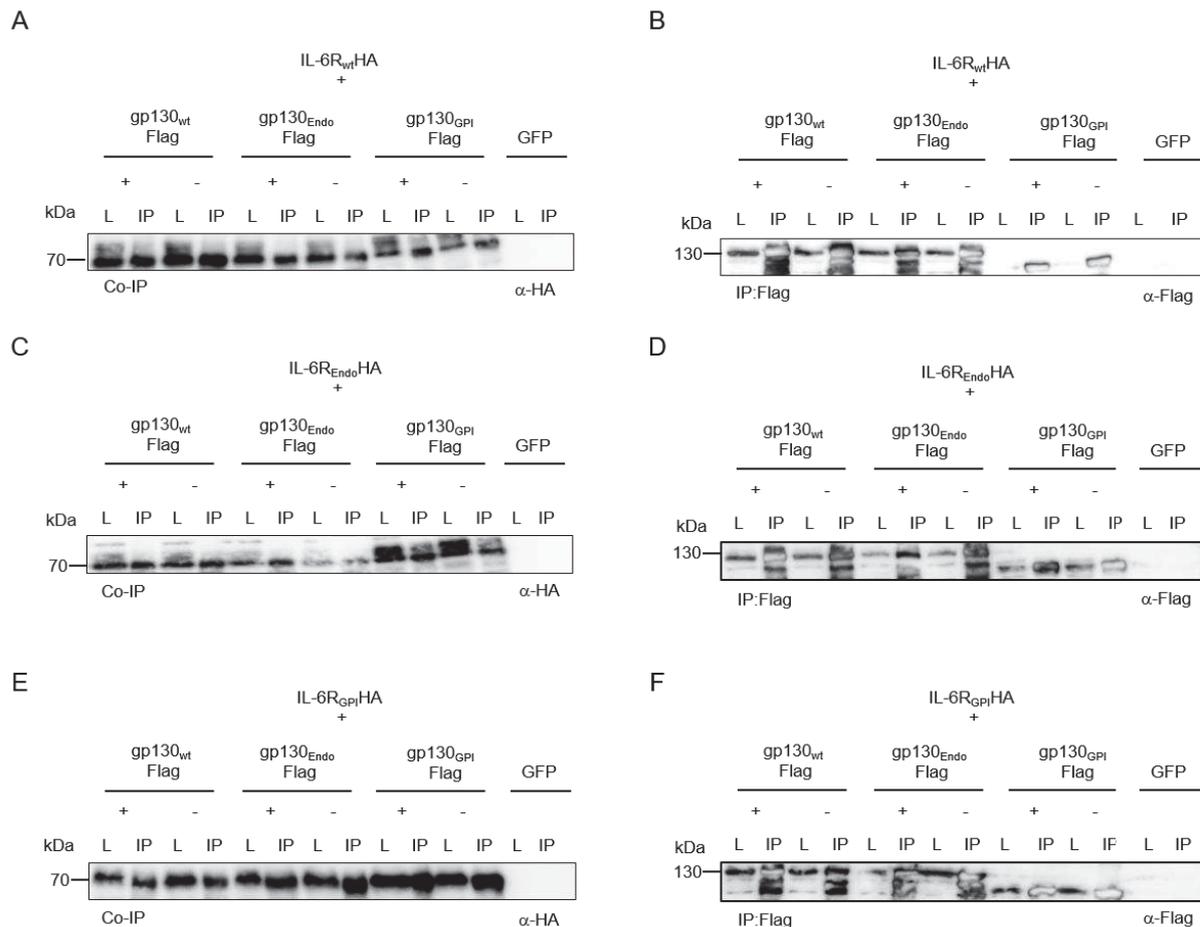
Western Blots basierend auf Chemilumineszenz. HEK293T Zellen wurden mit jeweils einer Rezeptormutante IL-6R oder gp130 transfiziert und anschließend lysiert. Die Lysate wurden gemischt und Co-Immunopräzipitationen (Co-IPs) durchgeführt. **A:** Schematische Abbildung der Bindung von α-Flag agarose beads an einen Flag-markierten gp130<sub>wt</sub> Rezeptor. Untersuchung der IL-6 Rezeptormutanten in den Kombinationen gp130<sub>wt</sub>, gp130<sub>Endo</sub> und gp130<sub>GPI</sub>. Für die IL-6R Rezeptormutanten wurde ein α-HA Antikörper verwendet. **B:** Nachweis des IL-6R<sub>wt</sub>. **D:** Nachweis des IL-6R<sub>Endo</sub>. **F:** Nachweis des IL-6R<sub>GPI</sub>. In den Western Blots **C, E, G** wurde mittels Flag gerichteten Antikörper die Expression der gp130 Varianten gp130<sub>wt</sub>, gp130<sub>Endo</sub> und gp130<sub>GPI</sub> nachgewiesen. In jeder Spur wurden 20 µl aufgetragen. Die Western Blots stellen jeweils ein repräsentatives, unabhängiges Experiment von insgesamt dreien dar (n=3).

Zusammengefasst kann durch dieses Experiment bestätigt werden, dass sich Hetero-/Homodimere nur auf der Zellmembran, nicht aber nach dem Mischen des Zelllysates bilden können. Zudem können unspezifische Bindungen zwischen den α-Flag agarose beads und den HA-markierten IL-6R Mutanten ausgeschlossen werden.

#### 5.4.2 Die präformierten Komplexe aus IL-6R- und gp130 Varianten bilden sich stimulationsunabhängig auf der Membran.

Nachdem nachgewiesen wurde, dass sich die präformierten Heterodimere nur auf der Zellmembran, nicht aber nach der Ernte im Zelllysat bilden, wurden HEK293T Zellen ko-transfiziert. Hierbei wurden die Zellen mit der gleichen Menge an pDNA von jeweils zwei verschiedenen IL-6R- und gp130 Rezeptorvarianten, in unterschiedlichen Kombinationen, transfiziert. Da sich die präformierten Heterodimere ohne Zugabe von Zytokin assemblieren sollen (Tenhumberg *et al.* 2006), wurde dies ebenfalls überprüft. Von jeder Rezeptorkombination wurden zwei 10 cm Zellkulturschalen HEK293T Zellen mit 10 ml DEMEM<sup>+/+</sup> transfiziert. Kurz vor der Ernte, wurde eine Zellkulturschale je Rezeptorkombination mit 10 ng/ml IL-6 für 20 min stimuliert. Anschließend wurden sowohl die stimulierten, als auch die unstimulierten Zellen geerntet um Co-IPs mit  $\alpha$ -Flag *agarose beads* durchgeführt. Nach dem Waschen bleiben nur die *Beads* mit den gebundenen Rezeptoren übrig. Hat sich auf der Zelloberfläche ein präformiertes Heterodimer aus IL-6R:gp130 gebildet, so wird der an gp130 gebundenen IL-6R ebenfalls präzipitiert und kann im Western Blot nachgewiesen werden. Als Transfektionskontrolle und um zu überprüfen, dass keiner der Antikörper unspezifisch bindet, wurden HEK293T mit der pDNA des peGFP transfiziert (siehe 4.3.2). Mit den daraus stammenden Lysaten wurden Co-IPs mit  $\alpha$ -Flag *agarose beads* durchgeführt. Die daraus resultierenden Proben wurden im Anschluss im Western Blot aufgetragen. Im Western Blot wurden sowohl die IL-6R Mutanten mittels HA-gerichteten Antikörpern als auch die gp130 Rezeptormutanten mittels eines gegen Flag-gerichteten Antikörper nachgewiesen. Bei den Rezeptorkombinationen aus IL-6R<sub>wt</sub>HA mit gp130<sub>wt</sub>Flag, gp130<sub>Endo</sub>Flag oder gp130<sub>GPI</sub>Flag konnte der IL-6R immer, im Lysat und der IP Fraktion, stimulationsunabhängig und unabhängig von der TMD des IL-6R, der TMD des Endo180 oder des GPI-Ankers des CNTFR, nachgewiesen werden (Abbildung 35 A). Im Western Blot wurden alle gp130 Rezeptormutanten durch einen  $\alpha$ -Flag Antikörper mit einer stärkeren Akkumulation in der IP Fraktion nachgewiesen (Abbildung 35 B). In den Western Blots der Rezeptorkombinationen aus IL-6R<sub>Endo</sub>HA mit gp130<sub>wt</sub>Flag, gp130<sub>Endo</sub>Flag oder gp130<sub>GPI</sub>Flag konnte der IL-6R im Lysat und in der IP Fraktion in allen Kombinationen stimulationsunabhängig und unabhängig von der TMD nachgewiesen werden (Abbildung 35 C). Im dazugehörigen Western Blot wurden die gp130 Rezeptormutanten in allen Fraktionen nachgewiesen (Abbildung 35 D). Durch den Western Blot wurde nachgewiesen, dass der IL-6R

stimulations- und TMD-unabhängig in den IP Fraktionen bei den Rezeptorkombinationen IL-6R<sub>GPI</sub>HA mit gp130<sub>wt</sub>Flag, gp130<sub>Endo</sub>Flag oder gp130<sub>GPI</sub>Flag akkumuliert (Abbildung 35 E). Im gegen Flag gerichteten Western Blot konnten alle gp130 Varianten mit einer stärkeren Akkumulation in der IP Fraktion nachgewiesen werden (Abbildung 35 F). In keiner der peGFP Fraktionen konnten unspezifische Bindungen seitens der Antikörper nachgewiesen werden, sodass keine Bande in den peGFP Fraktionen nachzuweisen waren.



**Abbildung 35: Die Heterodimere aus IL-6R und gp130 Rezeptormutanten bilden sich ohne IL-6 Stimulation auf der Zelloberfläche.**

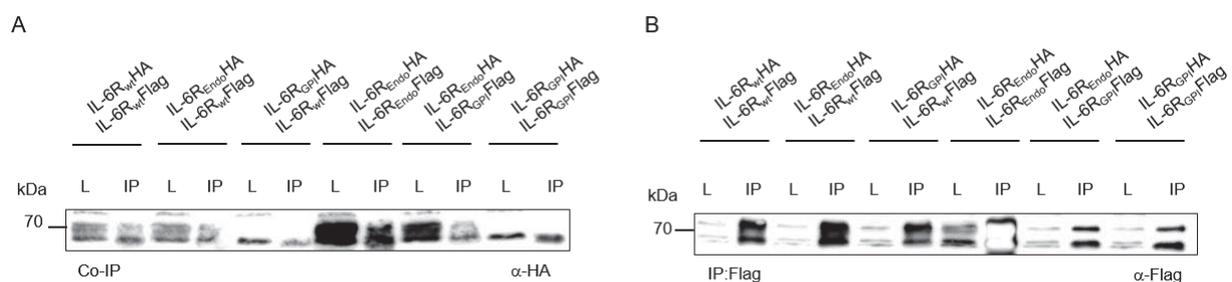
Western Blot basierend auf Chemilumineszenz. Die ko-transfizierten HEK293T Zellen wurden stimuliert (10 ng/ml IL-6 für 20 min) und unstimuliert geerntet. Im Anschluss wurden Co-Immunopräzipitationen (anti-Flag Co-IPs) durchgeführt und mittels Western Blot ausgewertet. Nachweis der IL-6R Mutanten **A**: IL-6R<sub>wt</sub>, **C**: IL-6R<sub>Endo</sub>, **E**: IL-6R<sub>GPI</sub>. durch einen α-HA Antikörper. Nachweis der gp130 Rezeptormutanten **B**: gp130<sub>wt</sub>, **D**: gp130<sub>Endo</sub>, **E**: gp130<sub>GPI</sub> durch einen α-Flag Antikörper. Aufgetragen wurden die Proben der Co-IP stimuliert (+) und unstimuliert (-). In jeder Spur wurden 20 µl aufgetragen. Die Western Blots stellen jeweils ein repräsentatives, unabhängiges Experiment von insgesamt dreien dar (n=3).

Es konnte nachgewiesen werden, dass sich Heterodimere aus IL-6R- und den gp130 Varianten wt, Endo und GPI, unabhängig von einer Stimulation durch IL-6 formieren. Des Weiteren wurde nachgewiesen, dass die TMD der beiden Rezeptoren IL-6R und gp130 keinen nachweisbaren Einfluss auf die Bildung der präformierten Heterodimere hat. Dies zeigt sich in

der IP Fraktion IL-6R<sub>GPI</sub>HA+gp130<sub>GPI</sub>Flag. Beide Rezeptormutanten besitzen keine TMD, jedoch wurde der IL-6R<sub>GPI</sub>HA dennoch in der IP-Fraktion nachgewiesen.

### 5.4.3 Unabhängig von der TMD kann der IL-6R präformierte Homodimere auf der Zellmembran bilden.

In den vorherigen Experimenten stand vor allem die Rolle der TMD in Bezug auf die Bildung der präformierten Dimere zwischen IL-6R und gp130 im Fokus. Da diese keinen nachweisbaren Einfluss auf die Komplexbildung zu haben schien, jedoch Homodimere zwischen gp130:gp130 nachgewiesen wurden, könnte die EZD der gp130 Rezeptormutanten maßgeblich beteiligt sein (Tenhumberg *et al.* 2006). Im weiteren Verlauf soll untersucht werden, ob die TMD der IL-6R Mutanten einen Einfluss auf die Bildung der präformierten Homodimere hat. Zu diesem Zweck wurden HEK293T Zellen in unterschiedlichen Konstellationen mit den IL-6R Varianten ko-transfiziert. Hierbei wurde für jede IL-6R Variante die gleiche Konzentration an pDNA verwendet. Mit den daraus stammenden Lysaten wurden Co-IPs mit  $\alpha$ -Flag *agarose beads* durchgeführt. Die daraus resultierenden Proben wurden im Anschluss im Western Blot aufgetragen (Abbildung 36). Um beide IL-6R Varianten im Western Blot nachzuweisen, wurde sowohl ein  $\alpha$ -HA als auch ein  $\alpha$ -Flag Antikörper verwendet. Der HA markierte IL-6R konnte in den Kombination aus IL-6R<sub>wt</sub>HA:IL-6R<sub>wt</sub>Flag, IL-6R<sub>Endo</sub>HA:IL-6R<sub>wt</sub>Flag, IL-6R<sub>GPI</sub>HA:IL-6R<sub>wt</sub>Flag, IL-6R<sub>Endo</sub>HA:IL-6R<sub>Endo</sub>Flag, IL-6R<sub>Endo</sub>HA:IL-6R<sub>GPI</sub>Flag und IL-6R<sub>GPI</sub>HA:IL-6R<sub>GPI</sub>Flag in den jeweiligen IP Fraktion nachgewiesen werden (Abbildung 36 A). Im Kontrollgel wurden die IL-6RFlag Varianten akkumuliert in der IP Fraktion nachgewiesen (Abbildung 36 B).



**Abbildung 36: Die Transmembrandomäne ist nachweislich nicht in die Präformation der IL-6R:IL-6R Homodimere involviert.**

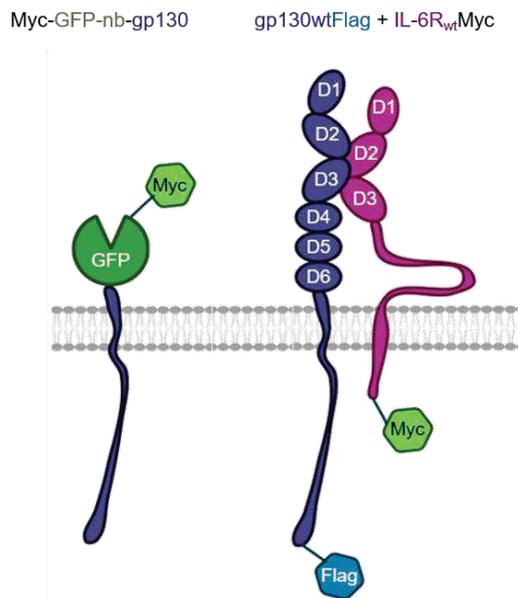
Western Blot basierend auf Chemilumineszenz. **A:** Nachweis der IL-6R Varianten IL-6R<sub>wt</sub>, IL-6R<sub>Endo</sub> und IL-6R<sub>GPI</sub>HA durch einen  $\alpha$ -HA Antikörper **B:** Nachweis der IL-6R Varianten IL-6R<sub>wt</sub>, IL-6R<sub>Endo</sub> und IL-6R<sub>GPI</sub>Flag durch einen  $\alpha$ -Flag Antikörper. In jeder Spur wurden 20  $\mu$ l aufgetragen. Die Western Blots stellen jeweils ein repräsentatives, unabhängiges Experiment von insgesamt dreien dar (n=3).

Aufgrund dieses Experiments, konnte eine nachweisbare Beteiligung der TMD des IL-6R bei der Präformierung von IL-6R:IL-6R Homodimeren nicht bestätigt werden. In der IP Fraktion der IL-6R<sub>GPI</sub>HA:IL-6R<sub>GPI</sub>Flag Kombination, in welcher weder die IZD, noch die TMD beider IL-6R vorhanden waren, wurde der IL-6R<sub>GPI</sub>HA mit dem IL-6R<sub>GPI</sub>Flag präzipitiert und im Western Blot nachgewiesen. Dies lässt auf eine Beteiligung der EZD bei der IL-6R:IL-6R Präformierung schließen.

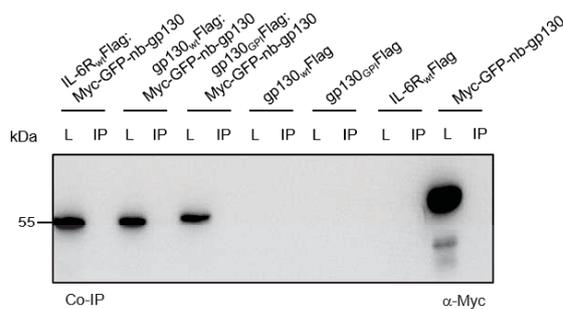
#### 5.4.4 Die EZD der Rezeptoren IL-6R und gp130 bindet nicht unspezifisch

Um auszuschließen, dass die EZD vom IL-6R und gp130 durch die Überexpression der Rezeptoren auf der Zelloberfläche zu dicht beieinander exprimiert wurden und dies der Grund für die Präzipitation beider Rezeptoren ist, wurde der synthetische Rezeptor Myc-GFP-nb-gp130 als Kontrolle verwendet. Myc-GFP-nb-gp130 besteht extrazellulär aus einem Myc markierten GFP *Nanobody*, während die TMD und IZD des synthetischen Rezeptors vom gp130 stammt. Keiner der Rezeptorvarianten vom IL-6R oder gp130 sollte durch seine jeweilige EZD an den Myc-GFP-nb-gp130 binden (Abbildung 37 A). Um dies zu überprüfen, wurden HEK293T Zellen mit den Rezeptorkombinationen IL-6R<sub>wt</sub>Flag:Myc-GFP-nb-gp130, gp130<sub>wt</sub>Flag:Myc-GFP-nb-gp130 und gp130<sub>GPI</sub>Flag:Myc-GFP-nb-gp130 transfiziert. Zusätzlich wurden HEK293T Zellen mit der pDNA von jeweils nur einem Rezeptor als Kontrolle transfiziert. Somit sollte nachgewiesen werden, dass alle Rezeptoren exprimiert und der synthetische Rezeptor Myc-GFP-nb-gp130 nicht unspezifisch an die  $\alpha$ -Flag *agarose beads* bindet. Nachfolgend wurden Co-IPs durchgeführt, welche mittels Western Blot ausgewertet wurden. Für den Nachweis des Myc-GFP-nb-gp130, welcher auf einer Höhe von 55 kDa läuft, wurde ein gegen Myc gerichteter Antikörper verwendet. Myc-GFP-nb-gp130 wurde in Kombination mit IL-6R<sub>wt</sub>Flag, gp130<sub>wt</sub>Flag und gp130<sub>GPI</sub>Flag jeweils im Lysat, nicht aber in der IP Fraktion nachgewiesen (Abbildung 37 B). In der IP Fraktion des Myc-GFP-nb-gp130 wurde keine Bande nachgewiesen. Die IL-6R- und gp130 Varianten wurden durch ihren Flag-Tag im Western Blot nachgewiesen. Der IL-6R<sub>wt</sub> befindet sich bei etwa 70 kDa während der gp130<sub>wt</sub> sich bei 130 kDa befindet. Der trunkierte gp130<sub>GPI</sub> Rezeptor wurde bei 80 kDa nachgewiesen. In allen IP Fraktionen wurde eine Akkumulation der Rezeptoren nachgewiesen (Abbildung 37 C).

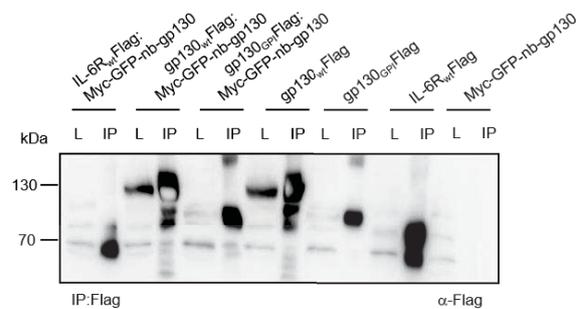
A



B



C



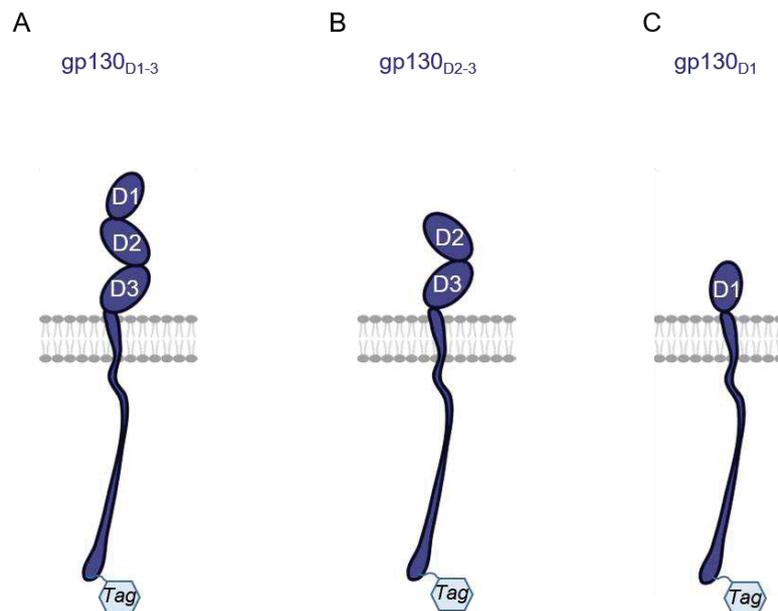
**Abbildung 37: Die extrazelluläre Domäne der Rezeptoren IL-6R und gp130 bindet nicht unspezifisch an Myc-GFP-nb-gp130.**  
**A:** Schematische Abbildung eines Myc-GFP-nb-gp130 Rezeptors, sowie ein Heterodimer aus IL-6R<sub>wt</sub>Myc:gp130<sub>wt</sub>Flag auf der Zelloberfläche. Erstellt mit BioRender.com. Western Blot basierend auf Chemilumineszenz. **B:** Nachweis des Myc-GFP-nb-gp130 durch einen  $\alpha$ -Myc Antikörper. **C:** Nachweis des IL-6R<sub>wt</sub>Flag, gp130<sub>wt</sub>Flag, gp130<sub>GPI</sub>Flag durch einen  $\alpha$ -Flag Antikörper. In jeder Spur wurden 20  $\mu$ l aufgetragen. Die Western Blots stellen jeweils ein repräsentatives, unabhängiges Experiment von insgesamt dreien dar (n=3).

Die durchgeführten Experimente zeigen eher, dass die EZD der Rezeptoren IL-6R und gp130 spezifisch für die Formation eines Homodimers bindet.

#### 5.4.5 Die Domänen D1-D3 des gp130 sind für die Formierung der Dimere relevant.

Im Folgenden soll die für die Komplexbildung verantwortliche Domäne identifiziert werden. Dabei ist keinesfalls ausgeschlossen, dass mehrere Domänen der EZD an der Komplexbildung beteiligt sind. Aufgrund dessen wurden drei gp130 Mutanten kloniert. Für gp130<sub>D1-3</sub> wurden die Domänen D4-6 deletiert (Abbildung 38 A, siehe Klonierungsübersicht und AS-Sequenz 11.1.9) Im Falle des gp130<sub>D2-3</sub> wurde die D1 sowie die D4-6 des gp130 Rezeptors deletiert (Abbildung 38 B, siehe Klonierungsübersicht und AS-Sequenz 11.1.10). Bei

der gp130<sub>D1</sub> Mutante wurden sowohl die D2-3, als auch die D4-6 der gp130 Domänen deletiert (Abbildung 38 C, siehe Klonierungsübersicht und AS-Sequenz 11.1.11).

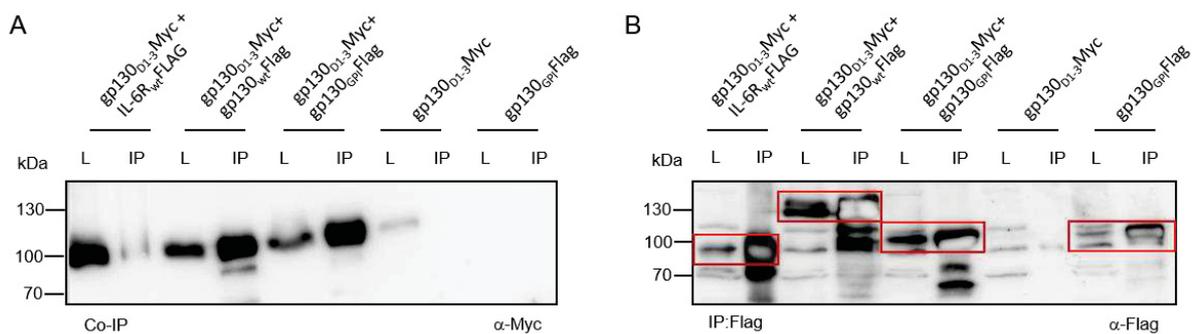


**Abbildung 38: Schematische Übersicht der gp130 Deletionsmutanten gp130<sub>D1-3</sub>, gp130<sub>D2-3</sub> und gp130<sub>D1</sub>.**

Schematische Darstellung der generierten gp130 Rezeptormutanten. **A:** gp130<sub>D1-3</sub>. **B:** gp130<sub>D2-3</sub> **C:** gp130<sub>D1</sub>. Grafik erstellt in BioRender.com.

Nach erfolgreicher Synthese der Plasmide gp130<sub>D2-3</sub>, gp130<sub>D1</sub> und gp130<sub>D1-3</sub>, sollte in einem ersten Testexperiment analysiert werden, welchen Einfluss die Deletionen der D4-D6 des gp130 auf die präformierte Komplexbildung mit den Rezeptoren gp130<sub>wt</sub>, gp130<sub>GPI</sub> und IL-6R<sub>wt</sub> hat. Dafür wurden HEK293T Zellen in den Kombinationen gp130<sub>D1-3</sub>Myc:IL-6R<sub>wt</sub>Flag, gp130<sub>D1-3</sub>Myc:gp130<sub>wt</sub>Flag und gp130<sub>D1-3</sub>Myc:gp130<sub>GPI</sub>Flag mit der jeweils gleichen Konzentration an pDNA transfiziert. Zusätzlich wurde eine 10 cm Zellkulturschale HEK293T mit 10 ml DEMEM<sup>+/+</sup> nur mit der pDNA des gp130<sub>D1-3</sub>Myc und eine andere nur mit der pDNA des gp130<sub>GPI</sub>Flag transfiziert. Dadurch sollte überprüft werden, dass sich keine unspezifischen Bindungen zwischen den α-Flag *agrose beads* und der gp130<sub>D1-3</sub> Mutante entstehen. Im Anschluss wurden mit α-Flag *agrose beads* Co-IPs durchgeführt und mittels Western Blot analysiert. Für den Nachweis des gp130<sub>D1-3</sub>Myc wurde im Western Blot ein α-Myc Antikörper verwendet. Der gp130<sub>D1-3</sub>Myc konnte in allen Lysaten nachgewiesen werden, welches auf eine gute Expression hindeutet. In der IP Fraktion von gp130<sub>D1-3</sub>Myc:IL-6R<sub>wt</sub>Flag wurde eine schwache Bande detektiert. In den IP Fraktionen des gp130<sub>D1-3</sub>Myc in Kombination mit gp130<sub>wt</sub>Flag oder gp130<sub>GPI</sub>Flag wurde eine Akkumulation des gp130<sub>D1-3</sub>Myc nachgewiesen. In der Kontrolle, in welcher die HEK293T nur mit der pDNA der gp130<sub>D1-3</sub>Myc Mutante

transfiziert wurden, wurde erwartungsgemäß nur im Lysat, nicht aber in der IP Fraktion der Rezeptor nachgewiesen. Der Rezeptor gp130<sub>GPI</sub>Flag, welcher als zweite Kontrolle alleine transfiziert wurde, wurde im Myc-gerichteten Western Blot nicht nachgewiesen (Abbildung 39 A). Zum Nachweis, dass die Rezeptoren gp130<sub>wt</sub>Flag, gp130<sub>GPI</sub>Flag und IL-6R<sub>wt</sub>Flag exprimiert wurden und sich in den Fraktionen Lysat und IP befinden, wurde ein Western Blot mit einem  $\alpha$ -Flag Antikörper durchgeführt. Aufgrund des Hintergrunds und der unspezifischen Bindungen wurden die nachzuweisenden Rezeptoren rot umrandet (Abbildung 39 B).



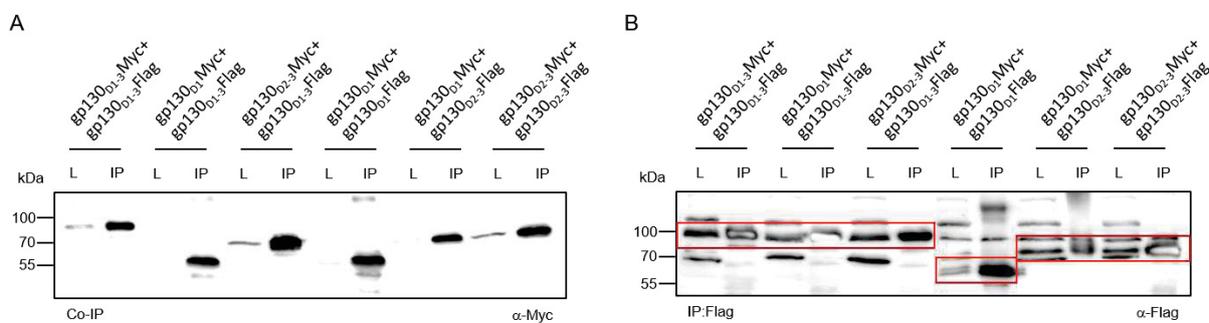
**Abbildung 39: Die Domänen D4-6 des gp130 haben keinen nachweisbaren Einfluss auf die Homodimerisierung zwischen gp130:gp130, wohl aber auf die Heterodimerisierung von IL-6R und gp130**

Western Blot basierend auf Chemilumineszenz. **A:** Nachweis des gp130<sub>D1-3</sub>Myc mittels  $\alpha$ -Myc Antikörper. **B:** Nachweis der Rezeptoren IL-6R<sub>wt</sub>Flag, gp130<sub>wt</sub>Flag und gp130<sub>GPI</sub>Flag mittels  $\alpha$ -Flag Antikörper. In jeder Spur wurden 20  $\mu$ l der Co-Immunopräzipitation aufgetragen. Die Western Blots stellen jeweils ein repräsentatives, unabhängiges Experiment von insgesamt dreien dar (n=3).

Durch dieses Experiment konnte nachgewiesen werden, dass die D4-6 bei den Rezeptorkonstellationen aus den gp130:gp130 Mutanten keinen nachweisbaren Einfluss auf die Homodimerisierung hat. Sie scheinen jedoch einen Einfluss auf die Heterodimerisierung im Zusammenhang mit dem IL-6R zu haben.

In der Annahme, dass bei einer Kombination zweier gp130 Mutanten eine von beiden im Western Blot nicht nachgewiesen kann und somit die relevante Domäne identifiziert wird, wurden HEK293T Zellen mit der pDNA unterschiedlicher Kombinationen der gp130 Mutanten gp130<sub>D1-3</sub>, gp130<sub>D2-3</sub> und gp130<sub>D1</sub> transfiziert. Im Anschluss wurden mit  $\alpha$ -Flag agarose beads Co-IPs durchgeführt und mittels Western Blot analysiert. Die Myc-markierten gp130 Mutanten wurden durch einen Western Blot mit einem  $\alpha$ -Myc Antikörper nachgewiesen. Für die Flag-markierten gp130 Mutanten wurde im Western Blot ein  $\alpha$ -Flag Antikörper verwendet. Aufgrund der unspezifischen Bindungen wurden die jeweiligen Rezeptoren im Western Blot rot umrandet. In der Kombination aus gp130<sub>D1-3</sub>Myc:gp130<sub>D1-3</sub>Flag konnte in beiden Western Blots in der IP Fraktion sowohl gp130<sub>D1-3</sub>Myc, als auch gp130<sub>D1-3</sub>Flag nachgewiesen werden

(Abbildung 40 A, B). Bei der Kombination aus gp130<sub>D1</sub>Myc:gp130<sub>D1-3</sub>Flag wurde gp130<sub>D1</sub>Myc nicht im Lysat, jedoch akkumuliert in der IP Fraktion nachgewiesen (Abbildung 40 A). Die gp130<sub>D1-3</sub>Flag Mutante wurde in beiden Fraktionen (Lysat und IP) nachgewiesen (Abbildung 40 B). In der Kombination aus gp130<sub>D2-3</sub>Myc:gp130<sub>D1-3</sub>Flag wurde gp130<sub>D2-3</sub>Myc und gp130<sub>D1-3</sub>Flag akkumuliert in der IP Fraktion nachgewiesen (Abbildung 40 A, B). In den IP Fraktionen aus den Kombinationen gp130<sub>D1</sub>Myc:gp130<sub>D1</sub>Flag, welche jeweils nur die D1 besitzen, wurde jeweils eine Akkumulation im Western Blot nachgewiesen (Abbildung 40 A, B). In den beiden letzten Kombinationen aus gp130<sub>D1</sub>Myc:gp130<sub>D2-3</sub>Flag und gp130<sub>D2-3</sub>Myc:gp130<sub>D2-3</sub>Flag wurden jeweils beide Rezeptoren in den IP Fraktionen akkumuliert nachgewiesen (Abbildung 40 A, B).



**Abbildung 40:** Die gp130 Domänen D1-3 können jeweils für sich mit den Domänen D1-3 des anderen gp130 interagieren. Chemilumineszenzbasierter Western Blot. **A:** Nachweis der Myc markierten gp130 Mutanten mittels  $\alpha$ -Myc Antikörper. **B:** Nachweis der Flag markierten gp130 Mutanten mittels  $\alpha$ -Flag Antikörper. In jeder Spur wurden 20  $\mu$ l aufgetragen. Die Western Blots stellen jeweils ein repräsentatives, unabhängiges Experiment von insgesamt dreien dar (n=3).

Zusammengefasst kann gesagt werden, dass eine einzelne Domäne der EZD des gp130, welche für einen präformierten Komplex auf der Oberfläche essentiell ist, nicht identifiziert werden konnte. Die Daten weisen darauf hin, dass jede der Domänen D1-D3 eines gp130 Rezeptors wichtig ist für die Interaktion mit den Domänen D1-D3 eines anderen gp130 Rezeptors, einen präformiertes Homodimer auf der Zelloberfläche zu bilden. In Bezug auf die Kombination aus gp130<sub>D1-3</sub> und IL-6R wurde eine verminderte Bindung im Rahmen dieser Überexpressionsexperimente nachgewiesen.

## Diskussion

Im Rahmen dieser Dissertation wurden neuartige chimäre IL-6 Rezeptoren, unterschiedliche Mutanten des gp130 Rezeptors sowie rekombinante Proteine der IL-6 Familie generiert und exprimiert, wodurch vier maßgebliche Resultate erzielt wurden.

### 6.1 Nachweis des hexameren Komplex (IL-6:IL-6R:gp130) durch lösliche Proteine

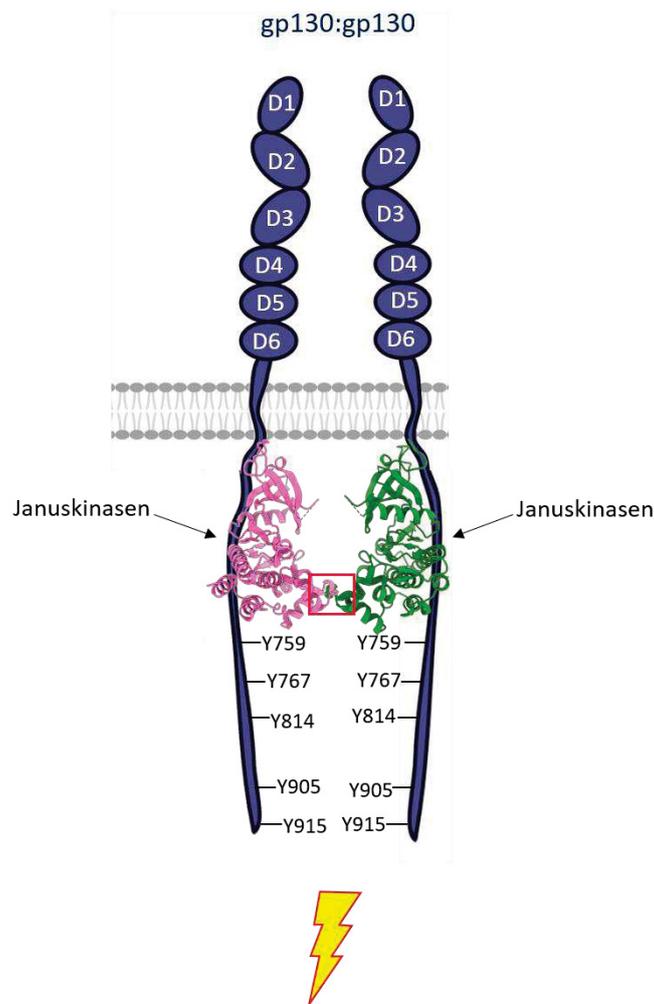
Durch den Einsatz von rekombinanten, löslichen Proteinen konnte unabhängig verifiziert werden, dass es unter den IL-6:IL-6R:gp130 Komplexen auch solche gibt, die hexamerer Natur (2xIL-6:2xIL-6R:2xgp130) sind. Die Experimente mittels Co-IP ließen jedoch keine Aussage darüber zu, in welchem Ausmaß dieser hexamere Komplex im Verhältnis zur Menge der möglicherweise gebildeten tetrameren Komplexe aus 1xIL-6:1xIL-6R:2xgp130 steht. Der hexamere Komplex wäre nativen im Western Blot bei ungefähr 470 kDa (2xgp130 (2x130 kDa = 260 kDa):2xIL-6R (2x80 kDa = 160 kDa):2xIL-6(2x25 kDa = 50 kDa) nachzuweisen sein, der tetramere Komplex (1xIL-6:1xIL-6R:2xgp130) auf einer Höhe von ungefähr 365 kDa und trimere Komplexe (IL-6:IL-6R:gp130) auf einer Höhe von 235 kDa. Um eine erste Einschätzung des Verhältnisses ermitteln zu können, könnten die, durch die Co-IP gewonnenen Proben in nicht-denaturierendem Probenpuffer aufbereitet und unter Verwendung eines vorgefertigten Western Blot Gels für große Proteine untersucht werden (Fang *et al.* 2010). Hypothetisch gesehen können auf der Zellmembran beide Komplexformen (Tetramer und Hexamer) aus IL-6:IL-6R und gp130 vorkommen, welche sich nicht gegenseitig ausschließen müssen (Grötzinger *et al.* 1999). Der Antikörper 25F10 ist gegen den murinen löslichen und membrangebundenen IL-6R gerichtet und bindet an die Bindestelle IIb des IL-6R und an E261 der D3 des gp130. Trotz der Bindung des Antikörpers an den IL-6R kann ein trimere Komplex aus IL-6:IL-6R:gp130 gebildet werden (Lacroix *et al.* 2015). Mittels Mutagenese- und Bindungsstudien wurde nachgewiesen, dass der Antikörper 25F10 die Bildung eines hexameren IL-6:IL-6R:gp130 Komplex verhindert, nicht aber die Rekrutierung eines zweiten gp130 Rezeptors um einen signaltransduzierenden Rezeptorkomplex zu initiieren. Ferner wurde nachgewiesen, dass der Trans-Signalweg, nicht aber der klassische Signalweg inhibiert wurden. Dies lässt darauf schließen, dass die Art der Signalweiterleitung einen Einfluss auf die Assemblierung des IL-6:IL-6R:gp130 Komplex hat (Lacroix *et al.* 2015). Im Zuge dessen könnte mit den unterschiedlichen Rezeptorkonstellationen die Signaltransduktion beeinflusst und somit pro-inflammatorische oder anti-inflammatorische Signalwege aktiviert werden. Der

Versuch dieses Phänomen auf den humanen IL-6 *Trans*-Signalweg zu übertragen und zu charakterisieren gelang jedoch nicht, welches auf die Unterschiede zwischen dem humanen und murinem IL-6-Rezeptorsystem zurückzuführen ist (Lacroix *et al.* 2015). Der hexamere IL-6:IL-6R:gp130 Signalkomplex konnte bis heute nicht auf der Zellmembran mit membranständigen Proteinen nachgewiesen werden, jedoch zeigen verschiedene Experimente (Gelfiltration, Ultrazentrifugation und Co-IPs), bei denen mikromolare Konzentrationen von IL-6 und lösliche IL-6R und gp130 Varianten verwendet wurden, die Existenz eines hexameren Komplexes (Ward *et al.* 1994, Paonessa *et al.* 1995). In diesem Zusammenhang muss die Hypothese der konzentrationsabhängigen Komplexbildung hervorgehoben werden. Hierbei wird der „selbst-inhibierende Effekt“ von IL-6 beschrieben. Dabei führen geringe Konzentrationen von IL-6 zu einer Formierung eines aktiven Tetramer (1xIL-6:1xIL-6R:2xgp130), welcher sich bei höheren Konzentrationen in einen inaktiven hexameren Komplex umformt (Grötzinger *et al.* 1999). Diese Hypothese könnte eine mögliche Erklärung für die Beobachtung der Glockenkurven in den Proliferationsexperimenten zur Überprüfung der biologischen Aktivität des gereinigten IL-6<sub>Flag/Myc-Ts</sub> in Abschnitt 5.1 sein. Eine weitere Erklärung für die Abnahme der Proliferation bei zunehmender IL-6 Konzentration könnte jedoch auch die andauernde Signaltransduktion sein. Erst kürzlich wurden Studien zu signalinduzierenden Antikörpern veröffentlicht (Yu *et al.* 2023). Dabei zeigte sich, dass Antikörper mit geringerer Rezeptoraffinität eine stärkere Signaltransduktion induzierten als Antikörper mit einer stärkeren Rezeptoraffinität. Dies bedeutet, dass die Antikörper mit stärkeren Rezeptoraffinitäten am Rezeptor gebunden bleiben, welches wiederum zu einer andauernden Signaltransduktion führt. Im Verlauf der Proliferationsexperimente konnte eben diese Glockenform beobachtet werden. Für diese Experimente wurden jedoch andere Zelllinien verwendet, sowie Rezeptoren analysiert, welche nicht zur IL-6R Familie gehören. Als mögliche Erklärung für dieses Phänomen mutmaßte der Autor über eine mögliche Internalisierung der Rezeptoren, welche im Zusammenhang mit IL-6R und gp130 nicht in Frage kommt, da beide konstitutiv und IL-6 unabhängig internalisiert werden (Zohlnhöfer *et al.* 1992, Gerhartz *et al.* 1994). Jedoch ist der Ansatzpunkt davon auszugehen, dass die Signaltransduktion und in gewissem Maße auch die damit einhergehende Proliferation bei andauernder Initiierung durch einen Überschuss an IL-6 auf anderem Weg inhibiert wird, wahrscheinlich. So inhibieren nicht nur die SOCS Proteine die Januskinasen (Cooney 2002, Liau *et al.* 2018), sondern auch die Familie der PIAS Proteine, welche die phosphorylierten STAT

Proteine inhibiert, sodass diese nicht in den Zellkern translozieren können (Niu *et al.* 2018). Es ist davon auszugehen, dass für das Überleben der Zelle weitere Sicherheitsmechanismen existieren, welche bis heute im Detail noch nicht bekannt sind.

## 6.2 Nachweis neuartiger Phosphorylierungsmöglichkeiten der Januskinasen, sowie eine veränderte Signaltransduktion durch synthetische Rezeptoren.

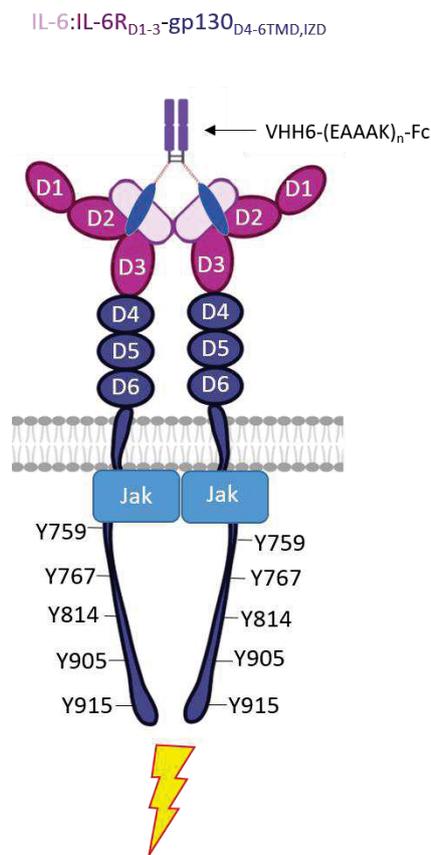
Durch den Einsatz von synthetischer Biologie wurden IL-6<sub>REZD</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub> Rezeptorchimären generiert, die theoretisch dazu in der Lage sein sollten, die Assemblierung eines hexameren Rezeptorkomplexes auf der Zelloberfläche nachzuweisen. Die hierfür generierte Rezeptorchimäre IL-6<sub>REZD</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub> war jedoch in dem dafür gedachten Kontext, im Zusammenspiel mit dem Rezeptor gp130<sub>GPI</sub> oder gp130<sub>10AS</sub>, biologisch nicht aktiv, so dass dieses Ziel nicht erreicht werden konnte. Durch die Stimulation der Ba/F3:gp130:IL-6<sub>REZD</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub> Zelllinie in Abschnitt 5.3.1 wurde jedoch nachgewiesen, dass die EZD des IL-6<sub>REZD</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub> bei Stimulation mit IL-6 einen signaltransduzierenden Komplex eingehen kann. Der Versuch die IL-6<sub>REZD</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub> Rezeptoren der Zelllinie Ba/F3:IL-6<sub>REZD</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub> durch VHH6-Fc Fusionsproteine, welche unterschiedliche Linkerlängen besaßen, in einen signaltransduzierenden Komplex zu forcieren, war nicht erfolgreich. Ein möglicher Grund könnte die Stalk-Region des IL-6<sub>REZD</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub> sein, wodurch trotz Forcierung der EZD die IZDs der Rezeptorchimären IL-6<sub>REZD</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub> und somit die Januskinasen zu weit voneinander entfernt waren, als dass diese sich gegenseitig Phosphorylieren könnten. Um eine Transphosphorylierung der Januskinasen zu erreichen, müssen diese nicht nur in räumliche Nähe zueinander, sondern in direkten Kontakt zueinander stehen (Glassman *et al.* 2022, Caveney *et al.* 2023) (Abbildung 41).



**Abbildung 41: Schematische Darstellung eines gp130:gp130 Komplexes mit der Proteinstruktur der aktivierten Januskinasen.** Abgebildet sind nur die aktiven gp130 Rezeptoren, welche sich während der Signaltransduktion in einem Komplex mit IL-6:IL-6R befinden. Ihre Januskinasen, welche sich mit ihren Tyrosinkinase-Domänen (TK) berühren (rot umrahmt: TK-TK Interaktion) berühren phosphorylieren sich auf diese Weise. In Folge dessen werden die C-terminal gelegenen Tyrosine phosphoryliert und ein Signal weitergeleitet. In dieser Abbildung wurde auf die Markierung „p“ für phosphoryliert, verzichtet. Die Darstellung der Januskinasen wurde nach Vorlage der PDB: 3EYG (nur eine Jak1), mit ChimeraX gemodelt und als Homodimer dargestellt. Diese Abbildung orientiert sich an der Veröffentlichung (Glassman *et al.* 2022). Grafik erstellt mit BioRender.com.

Des Weiteren ist ungewiss, ob die Stalk-Region ein Signal weiterleiten kann, oder ob für die Signaltransduktion ein  $\beta$ -Rezeptor benötigt wird. Untersuchungen zeigten, dass bei einem Austausch der Stalk-Region des IL-23R durch die des IL-6R, der IL-23R aktiv war (Hummel *et al.* 2017). Jedoch bindet der IL-23R zur Signaltransduktion an den IL-12R $\beta$ 1, welcher ebenfalls FNIII Domänen nahe der Membran besitzt. Auch der IL-6R benötigt unter natürlichen Bedingungen die signaltransduzierenden gp130 Rezeptoren. Studien zeigten, dass die FNIII Domänen nicht in die Zytokinbindung involviert, jedoch unabdingbar für die Signalweiterleitung sind, da sie unter anderem bei der Konformationsänderung während der Komplexbildung eine Rolle spielen (Timmermann *et al.* 2002). Daher wäre ein weiterer Ansatz

die Stalk-Region durch die FNIII Domänen (D4-D6) des gp130 Rezeptors zu substituieren und das Stimulationsexperiment mit den VHH6-Fusionsproteinen zu wiederholen (Abbildung 42).



**Abbildung 42: Schematische Abbildung des signaltransduzierenden Komplex aus IL-6:IL-6R<sub>D1-3</sub>-gp130<sub>D4-6TMD,IZD</sub>, forciert über ein VHH6-Fusionsprotein.**

Die beiden IL-6:IL-6R<sub>D1-3</sub>-gp130<sub>D4-6TMD,IZD</sub> Heterodimere werden über das VHH6-(EAAAK)<sub>n</sub>-Fc Fusionsprotein forciert. Durch die Fibronectin III Domänen könnte eine Signaltransduktion und Konformationsänderung möglich sein, sodass die Januskinasen sich gegenseitig und in Zuge dessen die Tyrosin-Motive phosphorylieren können. Erstellt mit BioRender.com.

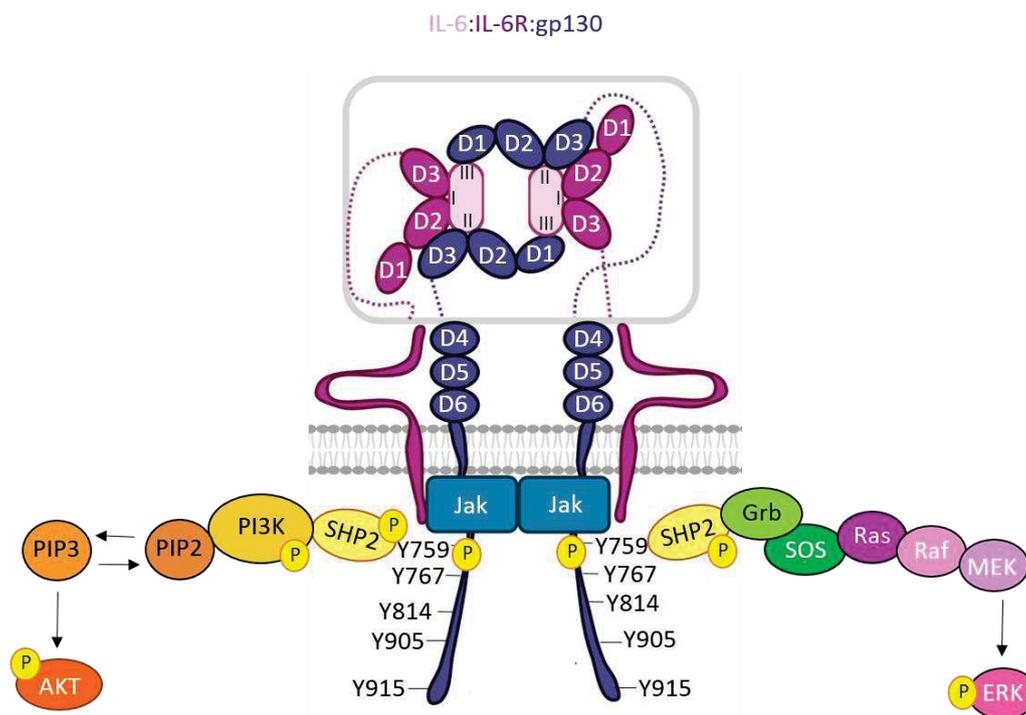
Eine zusätzliche Möglichkeit zur Steigerung der Rezeptoraktivität wäre es die Box-Motive durch Insertion von Alaninen zum C-Terminus hin zu verlagern. Durch Insertionsexperimente von ein bis vier Alaninen innerhalb der IZD des gp130 wurden die Box-Motive nach C-terminal verschoben. Dadurch wurde nachgewiesen, dass sich die  $\alpha$ -helikale Orientierung der Januskinasen veränderte und im Zuge dessen auch die Aktivität der Januskinasen sowie das Phosphorylierungsmuster der STAT Proteine. Es wurde nachgewiesen, dass wenn nur ein Alanin inseriert wird, die Aktivierung von STAT1 und STAT3 stark reduziert sind. Interessanterweise wurde bei einer Insertion von drei Alaninen eine stärkere STAT Aktivierung nachgewiesen (Greiser *et al.* 2002).

Beruhend auf dem Experiment die Januskinasen und Tyrosin-Motive auf zwei Rezeptorketten zu verteilen, wurde der Nachweis erbracht, dass die IZD der Rezeptorchimäre IL-6<sub>REZD</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub> biologisch aktiv ist. Aus diesem Experiment ging die Zelllinie Ba/F3:IL-6<sub>REZD</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub>\_P3V3:gp130\_Box1,2 hervor. Diese lieferte in Stimulationsexperimenten wichtige Erkenntnisse. So konnte mit Hilfe der mutierten IL-6<sub>REZD</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub>\_P3V3 Rezeptorchimäre gezeigt werden, dass die gp130 assoziierte Januskinasen im Zuge der Signaltransduktion nach Ligandenbindung durch *Trans*-Phosphorylierung die Tyrosin-Motive, welche sich auf einer anderen Rezeptorkette befanden, phosphorylieren können. Des Weiteren wurde gezeigt, dass sich die *Trans*-Signaltransduktion über die IL-6<sub>REZD</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub>\_P3V3 Rezeptorchimäre sowohl in Intensität als auch Qualität deutlich von der Signaltransduktion unterscheidet, die von dem natürlichen IL-6 Rezeptorkomplex ausgeht. Die synthetische nicht-kanonische IL-6 Signaltransduktion könnte zur Generierung von maßgeschneiderten Signalkaskaden genutzt werden.

Interessant ist zudem, dass bei der Zelllinie, Ba/F3:IL-6<sub>REZD</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub>\_P3V3:gp130\_Box1,2, im Vergleich zu der Kontrolllinie Ba/F3:gp130:IL-6R weder ein AKT oder ein ERK Signal nachgewiesen wurde. Dies sind die Proteine, welche durch den MAP Kinase und den PI3K Signalweg aktiviert werden. Der MAPK Signalweg wird durch die Aktivierung der Januskinasen induziert. Durch die Phosphorylierung des Tyrosin Y759 entsteht eine Bindestelle für *Src homology region 2 domain-containing Phosphatase 2* (SHP2) (Dillon *et al.* 2021). SHP2 selbst, wird konstitutiv exprimiert und besitzt zwei N-terminal gelegene SH2 Domänen, gefolgt von einer Protein-Tyrosin-Phosphatase (PTP) Domäne. C-terminal befinden sich zwei regulatorische Tyrosine (Eck *et al.* 1996). Im aktiven Zustand interagiert SHP2 mit der SH2 Domäne des phosphorylierten Tyrosins 759 (pY759) und dephosphoryliert dieses durch seine PTP Domäne (Stahl *et al.* 1995). So wird SHP2 relativ schnell nach der IL-6 induzierten Aktivierung der Januskinasen und die darauf folgenden Phosphorylierungen an gp130 rekrutiert und wirkt dort als frühe negative Rückkopplung der Signaltransduktion (Schaper *et al.* 1998). Des weiteren unterdrückt SHP2 die basale Zytokin-unabhängige Phosphorylierung von STAT3 (Lehmann *et al.* 2003, Dittrich *et al.* 2012). SHP2 fungiert jedoch nicht nur als Negativregulator für den Jak/STAT Signalweg, sondern nimmt eine wichtige Stellung für die IL-6 induzierte Aktivierung des MAPK Signalweges ein (Schiemann *et al.* 1997). Durch die Bindung an pY759 wird SHP2 selbst durch die Januskinasen phosphoryliert. Dies wiederum führt zu einer Rekrutierung des *Growth Factor-Receptor-Bound Protein / Son of Sevenless*

(Grb/SOS) Komplex (Takahashi-Tezuka *et al.* 1998, Bongartz *et al.* 2019). Dieser Komplex aktiviert das Protein Ras, welches mit Raf dimerisiert (Blaževič *et al.* 2016). Das aktivierte Raf rekrutiert anschließend MEK welches in Folge dessen ERK phosphoryliert (Roberts and Der 2007, Lavoie and Therrien 2015).

PI3K gehört zu den Membran-assoziierten Lipidkinasen welche aus zwei Untereinheiten bestehen. Zum einen aus der katalytischen Untereinheit P110, zum anderen aus der adaptiven/regulativen Untereinheit P85 (Donahue *et al.* 2012). In Folge der Phosphorylierung der Tyrosine innerhalb der IZD des gp130, wird auch PI3K phosphoryliert (Osaki *et al.* 2004). Dies geschieht durch die Aktivierung der intrazellulären Region des gp130, da SHP2 dort phosphoryliert wird. Aufgrund dieser Phosphorylierung, ist es der regulatorischen Untereinheit P85 möglich an SHP2 zu binden (Hennessy *et al.* 2005). Diese Bindung aktiviert die katalytische Untereinheit P110 welche den *second messenger* *PtdIns(4,5) P2* (PIP2) zu *PtdIns(3,4,5) P3* (PIP3) konvertiert. In Folge dessen wird die Serin/Threonin Kinase AKT phosphoryliert und aktiviert wird (Rascio *et al.* 2021).



**Abbildung 43: Schematische Darstellung der AKT und ERK Aktivierung.**

Durch die IL-6 induzierte Rezeptorkomplexbildung werden die Tyrosine der IZD der gp130 Rezeptoren phosphoryliert. Der Übersicht halber wurde auf das Symbol „p gelb“ für phosphoryliert bei allen Tyrosinen bis auf Y759 verzichtet. Durch die Phosphorylierung des p759 kann SHP2 daran binden und wird von den Januskinasen phosphoryliert. **Links:** SHP2 phosphoryliert die PI3K. Diese aktiviert PIP2 welcher zu PIP3 konvertiert. Als Folge dessen wird AKT phosphoryliert. **Rechts:** SHP2 rekrutiert den Grb/SOS Komplex, welcher Ras aktiviert und einen dimeren Komplex mit Raf eingetht. Dieser Komplex aktiviert wiederum Mek. Als Folge dessen wird ERK1/2 phosphoryliert. Erstellt mit BioRender.com.

Die beiden kurz skizzierten Signalwege durch die ERK und AKT phosphoryliert werden, zeigen den gemeinsamen Ausgangspunkt SHP2 auf, welches von beiden zur Induktion des Signalweges benötigt wird. SHP2 selbst bindet an p759. Die Daten weisen darauf hin, dass SHP2 entweder nicht an p759 binden, oder an dem entsprechenden Tyrosin nicht bzw. in sehr geringen Mengen phosphoryliert werden kann. Eine weitere Möglichkeit könnte die Existenz von einem pY759 sein, etwa, wenn der Komplex als Tetramer vorliegen würde. In der Literatur wurde bis jetzt noch nicht beschrieben, ob für die Phosphorylierung von AKT und ERK zwei pY759 Bindestellen benötigt werden.

Ebenso konnte abschließend nicht geklärt werden, weshalb die Transkription der mRNA von SOCS3 in der Zelllinie Ba/F3:gp130\_Box1,2:IL-6R<sub>EZD</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub>\_P3V3 im Vergleich zur Kontrolle Ba/F3:gp130:IL-6R so schwach ausfällt. Dies ist verwunderlich, da eine Phosphorylierung der STAT Proteine, welche eine Transkription der mRNA von SOCS3 induzieren, nachgewiesen wurde. Ebenso wie die Transkription der mRNA von SOCS3, konnte die sehr geringe Phosphorylierung von Jak1 bei der zu untersuchenden Zelllinie im Vergleich zum Wildtyp im Western Blot nur sehr schwach nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis, in Bezug auf die starke STAT3 Phosphorylierung, ist ebenfalls verwunderlich. Es ist jedoch nicht von der Hand zu weisen, dass die Januskinasen des gp130\_Box1,2 phosphoryliert sein müssen, da sonst keine Aktivierung der STAT Proteine erfolgen kann.

### 6.3 Der Bindungsmodus des IL-6:IL-6R:gp130 Komplex unterliegt einer definierten Reihenfolge

Anhand der IL-6R<sub>EZD</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub> Rezeptorchimäre in Kombination mit den Mutanten gp130<sub>ΔD1</sub> oder gp130<sub>Y190K,F191E</sub>, welche jeweils nur eine Bindestelle für IL-6 aufweisen, konnte erstmals auf der Zellmembran gezeigt werden, dass die Assemblierung des Liganden-Rezeptorkomplex einer genau definierten Abfolge unterliegt. So wurde gezeigt, dass sich der hexamere IL-6 Rezeptorkomplex unter normalen Bedingungen in folgender Reihenfolge bildet: Das initial gebildete IL-6:IL-6R Heterodimer bindet über die Bindestelle II von IL-6 an die Domäne 2/3 des ersten gp130 Rezeptors. Dies führt zu der Bildung eines trimeren IL-6:IL-6R:gp130 Komplex. In einem zweiten Schritt werden dann zwei Trimere zu einem hexameren Komplex zusammengesetzt. Dieses erfolgt über die Interaktion zwischen der Bindestelle III des IL-6 des ersten Timers und der Domäne D1 des gp130 im zweiten Trimer. Die hier präsentierten Zellkulturexperimente zeigen, dass auch auf der Zellmembran die

Bildung des Kontakts zwischen der Bindestelle II des IL-6:IL-6R Heterodimers und der D2/D3 des gp130 Rezeptors, der Bildung des Kontakts zwischen der Bindestelle III von IL-6 und der D1 des zweiten gp130 deutlich überlegen ist. Die hier präsentierten und bereits publizierten Experimente unterstützen die Hypothese, dass sich initial zwei Trimere IL-6:IL-6R:gp130 Komplexe bilden, die sich im zweiten Schritt zu einem hexameren, signaltransduzierenden Komplex assemblieren.

Die Trimer-/Hexamer Assemblierungshypothese könnte in einem weiteren Experiment detaillierter untersucht werden. Hierfür müssten die Rezeptoren IL-6R, gp130<sub>ΔD1</sub> und gp130<sub>Y190K,F191E</sub> zusammen auf der Zelloberfläche einer neuen Zelllinie exprimiert und mit IL-6 Stimuliert werden. Des Weiteren konnte anhand der beiden Rezeptorkombinationen IL-6R<sub>EZD</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub>:gp130<sub>ΔD1</sub> und IL-6R<sub>EZD</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub>:gp130<sub>Y190K,F191E</sub> unabhängig nachgewiesen werden, welchen Einfluss eine Mutation innerhalb der EZD des gp130 auf die Signaltransduktion hat. So wurde bestätigt, dass die Mutation des Y191 eine massive Reduktion des STAT1 Signal zur Folge hat. Diese Ergebnisse sind konsistent zu bereits publizierten Ergebnissen (Kurth *et al.* 1999).

#### 6.4 EZD der IL-6R und gp130 Rezeptoren ist essentiell für die Bildung präformierter Komplexe auf der Zelloberfläche

Obwohl viele Daten darauf hinwiesen, dass die TMD an der Komplexbildung präformierter Dimere in vielen Rezeptorsystemen beteiligt ist (Matthews *et al.* 2011, Sarabipour and Hristova 2013, Maruyama 2015), konnte dies anhand der gewonnenen Daten in Bezug auf gp130 und IL-6R nicht bestätigt werden. Durch die Verwendung eines synthetischen Rezeptors als Kontrolle, welcher die IZD des gp130 besaß, konnte zudem eine Beteiligung der IZD an der präformierten Dimerisierung ausgeschlossen werden. Vielmehr wurde nachgewiesen, dass die Domänen der EZD einen erheblichen Einfluss auf die Dimerisierung haben. So konnte anhand von Co-IPs und gp130 Deletionsvarianten (gp130<sub>D1-3</sub>, gp130<sub>D2-3</sub> und gp130<sub>D1</sub>) gezeigt werden, dass jede Domäne für sich in der Lage ist, ein präformiertes Dimer einzugehen. Des Weiteren konnte unabhängig bestätigt werden, dass die Rezeptoren IL-6R und gp130 in der Lage sind, sich einen zytokinunabhängigen dimeren homodimeren Komplex einzugehen (Schuster *et al.* 2003, Tenhumberg *et al.* 2006). Durch die Co-IPs wurde zudem die Existenz eines präformierten Heterodimers aus IL-6R:gp130 nachgewiesen, welches ein weiteres Indiz für die Bildung eines hexameren Komplexes aus zwei trimeren IL-6:IL-6R:gp130 ist. Interessant

wäre es, dieses Co-IP Experiment mit einer gp130<sub>D4-D6</sub> Rezeptormutante durchzuführen. Diese Rezeptormutante würde nur noch die Domänen D4-D6 besitzen. Somit könnte untersucht werden, ob diese Domänen ebenfalls für die Präformierung der Dimere eine Rolle spielen.

## 7. Ausblick

Im Zuge dieser Doktorarbeit wurde ein hexamerer IL-6 Rezeptorkomplex durch rekombinante, lösliche Proteine nachgewiesen. Um diesen auf der Zelloberfläche nachzuweisen, wurden Rezeptorchimären generiert, welche sich jedoch in der dafür vorgesehenen Rezeptorkonstellation nicht aktivieren ließen. Auf Grund dessen sollte nun eine Rezeptorchimäre IL-6<sup>REZD</sup>-gp130<sup>TMD,IZD</sup> weiterentwickelt werden bei der die extrazellulär gelegene Stalk-Region des IL-6R durch die Domänen D4-D6 des gp130 Rezeptors substituiert wird (IL-6R<sup>D1-3</sup>-gp130<sup>D4-6TMD</sup>). Anschließend sollte diese Chimäre stabil von Ba/F3 Zellen auf der Zelloberfläche exprimiert und auf ihre biologische Aktivität überprüft werden. Dies würde bei der Zelllinie Ba/F3:IL-6R<sup>D1-3</sup>-gp130<sup>D4-6TMD</sup> unter Verwendung der VHH6-(EAAAK)<sub>n</sub>-Fc Fusionsproteine erfolgen. Bei den Zelllinien Ba/F3:gp130<sub>GPI</sub>:IL-6R<sup>D1-3</sup>-gp130<sup>D4-6TMD</sup> oder Ba/F3:gp130<sub>10AS</sub>:IL-6R<sup>D1-3</sup>-gp130<sup>D4-6TMD</sup> sollte eine Stimulation mit IL-6 in den Konzentrationen 10 ng/ml und 100 ng/ml erfolgen. Sollte durch die Ergebnisse ein aktiver, signaltransduzierender Komplex nachgewiesen werden, ist dies gleichzeitig der Nachweis eines hexameren Komplex auf der Zellmembran mit membranständigen Proteinen. Daraufhin sollten die IL-6 induzierten Signalwege Jak/STAT, MAPK und PI3K detailliert untersucht und mit der Kontrollzelllinie Ba/F3:gp130:IL-6R verglichen werden.

Um die ausbleibende Phosphorylierung von ERK und AKT der Zelllinie Ba/F3:gp130<sub>Box1,2</sub>:IL-6<sup>REZD</sup>-gp130<sup>TMD,IZD</sup><sub>P3V3</sub> detaillierter zu charakterisieren, müsste die Phosphorylierung von SHP2 mittels Western Blot untersucht werden. Des Weiteren wäre es interessant, in wie fern sich die Signalwege vor allem der PI3K und MAPK-Signalweg von der jetzigen Signaltransduktion unterscheiden, wenn statt einer möglichen SHP2 Bindestelle, drei existieren würden. Dafür müsste ein gp130<sub>wt</sub> Rezeptor bis zum Tyrosin 767 trunkiert werden, sodass die entscheidende Bindestelle (Y759) phosphoryliert werden kann.

Des Weiteren könnte eine neue Zelllinie mit den Rezeptoren IL-6R, gp130<sup>Y190K, F191E</sup> und gp130<sup>ΔD1</sup> generiert und stimuliert werden um mittels Co-IP und Western Blot zu überprüfen, ob sich ein Hexamer oder ein Tetramer während der Stimulation auf der Zelloberfläche gebildet hat.

Um der Frage nachzugehen, inwiefern die Domänen D4-D6 des gp130 in die Assemblierung präformierter Dimere involviert sind, müsste die Deletionsvariante gp130<sub>D4-D6</sub> kloniert, in HEK293T Zellen exprimiert und Co-IP Experimente durchgeführt werden.

## 8. Zusammenfassung

Die IL-6 induzierten Signalwege sind sowohl in physiologische als auch in pathophysiologische Prozesse involviert. Daher können in Folge eines Ungleichgewichts Autoimmunerkrankungen entstehen. Die Bedeutung der Entschlüsselung der schrittweisen Assemblierung des hexameren/tetrameren IL-6-Signalkomplexes, sowie deren Einfluss auf die Signaltransduktion ist nicht vollständig geklärt, jedoch könnten initiale Unterschiede eine „enorme“ Tragweite mit sich bringen.

Im Zuge dieser Arbeit wurde ein hexamerer Komplex aus 2xIL-6:2xIL-6R:2xgp130 mit rekombinanten, löslichen Proteinen mittels einer Co-Immunpräzipitation (Co-IP) nachgewiesen. Um einen hexameren Komplex (2xIL-6:2xIL-6R:2xgp130) auf der Zelloberfläche mit membranständigen Proteinen nachzuweisen, wurden neuartige Rezeptorchimären, bestehend aus der extrazellulären Domäne (EZD) des IL-6R, sowie der Transmembrandomäne (TMD) und intrazellulären Domäne (IZD) des gp130 (IL-6R<sub>EZD</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub>) generiert und in Ba/F3 Zellen stabil integriert. Jedoch konnte durch die generierte Rezeptorchimäre IL-6R<sub>EZD</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub> der Nachweis eines membrangebundenen Hexamers auf der Zellmembran nicht erbracht werden. Durch die Weiterentwicklung dieser Rezeptorchimäre wurden die Januskinasen und Tyrosin-Motive voneinander getrennt und auf zwei Rezeptorketten aufgeteilt. Durch zellbasierte Experimente wurde gezeigt, dass die assoziierten Januskinasen durch eine *Trans*-Phosphorylierung die Tyrosin-Motive, welche auf einer anderen Rezeptorkette liegen, phosphorylieren können. Die Signalaktivierung des synthetischen IL-6 Rezeptorkomplex unterscheidet sich sowohl in Intensität als auch Qualität deutlich von der Signaltransduktion des wildtyp IL-6 Rezeptorkomplex. Daher bilden die hier entwickelten synthetischen Rezeptoren der IL-6 Rezeptorfamilie die Grundlage einer maßgeschneiderten Signalkaskade.

Des Weiteren konnte mittels des IL-6R<sub>EZD</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub> und der Kombination aus den gp130 Mutanten, welche jeweils nur eine Bindestelle für IL-6 aufweisen, erstmals gezeigt werden, dass die Assemblierung des Liganden-Rezeptorkomplex auf der Zelloberfläche einer genau definierten Abfolge unterliegt. Des Weiteren wurde durch die Überexpression von membrangebundenen Deletionsvarianten und durch Co-IP Experimente der Nachweis erbracht, dass nicht die TMD, sondern die EZD an der Präformierung Hetero-/Homodimerer IL-6R und gp130 Komplexe beteiligt ist.

## 9. Summary

The IL-6 induced signaling pathways are involved in both physiological and pathophysiological processes. As a result, imbalance may give birth to autoimmune disorders. It is unknown how important it is to understand the stepwise assembly of the hexameric/tetrameric signaling complex and how it affects signal transduction, however, initial disparities could have a “tremendous” effect.

In the course of this study, a hexameric complex consisting of 2xIL-6:2xIL-6R:2xgp130 was detected using recombinant soluble proteins via co-immunoprecipitation (Co-IP). To detect a hexameric complex (2xIL-6:2xIL-6R:2xgp130) on the cell surface with membrane-bound proteins, novel receptor chimeras were generated, comprising the extracellular domain (EZD) of IL<sub>6</sub>R, as well as the transmembrane domain (TMD) and intracellular domain (IZD) of gp130 (IL-6R<sub>EZD</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub>), and stably integrated into Ba/F3 cells via retroviral transduction. However, the IL-6R<sub>EZD</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub> receptor chimera failed to demonstrate the presence of a membrane-bound hexamer on the cell membrane. Through further development of this receptor chimera, the Janus kinases and tyrosine motifs were separated and divided between two receptor chains. Cell-based experiments showed that the associated janus kinases could phosphorylate the tyrosine motifs located on a different receptor chain through trans-phosphorylation. This signal activation differed significantly in both intensity and quality from the signal transduction of the wild-type cell line. This experiment could serve as a basis for generating tailored signaling cascades.

Furthermore, using the IL-6R<sub>EZD</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub> receptor and a combination of gp130 mutants, each possessing only one binding site for IL-6, it was demonstrated for the first time that the assembly of the ligand-receptor complex on the cell surface follows a precisely defined sequence. Additionally, through the overexpressing of membrane-bound deletion variants and co-immunoprecipitation experiments, it was shown that it is not the TMD but rather the EZD that is involved in the preformation of hetero-/homodimers of IL-6R and gp130 complexes on the cell surface.

## 10. Literaturverzeichnis

- Abeyrathna, P. & Su, Y. (2015) The critical role of Akt in cardiovascular function. *Vascular pharmacology* 74, 38-48.
- Adams, R., Burnley, R. J., Valenzano, C. R., Qureshi, O., Doyle, C., Lumb, S., del Carmen Lopez, M., Griffin, R., McMillan, D. & Taylor, R. D. (2017) Discovery of a junctional epitope antibody that stabilizes IL-6 and gp80 protein: protein interaction and modulates its downstream signaling. *Scientific reports* 7, 37716.
- Akira, S., Taniuchi, T. & Kishimoto, T. (1993) Interleukin-6 in biology and medicine. *Advances in immunology* 54, 1-78.
- Arend, W. P. (2001) Physiology of cytokine pathways in rheumatoid arthritis. *Arthritis care & research: Official journal of the american college of rheumatology* 45, 101-106.
- Ataie-Kachoie, P., Pourgholami, M. H. & Morris, D. L. (2013) Inhibition of the IL-6 signaling pathway: a strategy to combat chronic inflammatory diseases and cancer. *Cytokine & growth factor reviews* 24, 163-173.
- Ataie-Kachoie, P., Pourgholami, M. H., Richardson, D. R. & Morris, D. L. (2014) Gene of the month: Interleukin 6 (IL-6). *Journal of clinical pathology* 67, 932-937.
- Audet, J., Miller, C. L., Rose-John, S., Piret, J. M. & Eaves, C. J. (2001) Distinct role of gp130 activation in promoting self-renewal divisions by mitogenically stimulated murine hematopoietic stem cells. *Proceedings of the national academy of sciences* 98, 1757-1762.
- Baran, P., Hansen, S., Waetzig, G. H., Akbarzadeh, M., Lamertz, L., Huber, H. J., Ahmadian, M. R., Moll, J. M. & Scheller, J. (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. *Journal of biological chemistry* 293, 6762-6775.
- Baran, P., Nitz, R., Grötzinger, J., Scheller, J. & Garbers, C. (2013) Minimal interleukin 6 (IL-6) receptor stalk composition for IL-6 receptor shedding and IL-6 classic signaling. *Journal of biological chemistry* 288, 14756-14768.
- Barton, V. A., Hall, M. A., Hudson, K. R. & Heath, J. K. (2000) Interleukin-11 signals through the formation of a hexameric receptor complex. *Journal of biological chemistry* 275, 36197-36203.
- Benner, S. A. & Sismour, A. M. (2005) Synthetic biology. *Nature reviews genetics* 6, 533-543.
- Blaževič, O., Mideksa, Y. G., Šolman, M., Ligabue, A., Ariotti, N., Nakhaeizadeh, H., Fansa, E. K., Papageorgiou, A. C., Wittinghofer, A. & Ahmadian, M. R. (2016) Galectin-1 dimers can scaffold Raf-effectors to increase H-ras nanoclustering. *Scientific reports* 6, 24165.
- Bongartz, H., Gille, K., Hessenkemper, W., Mandel, K., Lewitzky, M., Feller, S. M. & Schaper, F. (2019) The multi-site docking protein Grb2-associated binder 1 (Gab1) enhances interleukin-6-induced MAPK-pathway activation in an SHP2-, Grb2-, and time-dependent manner. *Cell communication and signaling* 17, 1-23.
- Böttcher, J. P., Schanz, O., Garbers, C., Zaremba, A., Hegenbarth, S., Kurts, C., Beyer, M., Schultze, J. L., Kastenmüller, W. & Rose-John, S. (2014) IL-6 trans-signaling-dependent rapid development of cytotoxic CD8+ T cell function. *Cell reports* 8, 1318-1327.
- Boulanger, M. J., Chow, D.-c., Brevnova, E. E. & Garcia, K. C. (2003) Hexameric structure and assembly of the interleukin-6/IL-6  $\alpha$ -receptor/gp130 complex. *Science* 300, 2101-2104.
- Cameron, D. E., Bashor, C. J. & Collins, J. J. (2014) A brief history of synthetic biology. *Nature reviews microbiology* 12, 381-390.
- Campbell, I. L., Erta, M., Lim, S. L., Frausto, R., May, U., Rose-John, S., Scheller, J. & Hidalgo, J. (2014) Trans-signaling is a dominant mechanism for the pathogenic actions of interleukin-6 in the brain. *Journal of neuroscience* 34, 2503-2513.
- Caveney, N. A., Saxton, R. A., Waghray, D., Glassman, C. R., Tsutsumi, N., Hubbard, S. R. & Garcia, K. C. (2023) Structural basis of Janus kinase trans-activation. *Cell reports* 42.

- Choy, E. H., De Benedetti, F., Takeuchi, T., Hashizume, M., John, M. R. & Kishimoto, T. (2020) Translating IL-6 biology into effective treatments. *Nature reviews rheumatology* 16, 335-345.
- Clayton, A. H., Walker, F., Orchard, S. G., Henderson, C., Fuchs, D., Rothacker, J., Nice, E. C. & Burgess, A. W. (2005) Ligand-induced dimer-tetramer transition during the activation of the cell surface epidermal growth factor receptor-a multidimensional microscopy analysis. *Journal of biological chemistry* 280, 30392-30399.
- Cooney, R. N. (2002) Suppressors of cytokine signaling (SOCS): inhibitors of the JAK/STAT pathway. *Shock* 17, 83-90.
- Delgoffe, G. M. & Vignali, D. A. (2013) STAT heterodimers in immunity: A mixed message or a unique signal? *Jak-stat* 2, e23060.
- Dillon, M., Lopez, A., Lin, E., Sales, D., Perets, R. & Jain, P. (2021) Progress on Ras/MAPK signaling research and targeting in blood and solid cancers. *Cancers* 13, 5059.
- Dittrich, A., Quaiser, T., Khouri, C., Görtz, D., Mönnigmann, M. & Schaper, F. (2012) Model-driven experimental analysis of the function of SHP-2 in IL-6-induced Jak/STAT signaling. *Molecular biosystems* 8, 2119-2134.
- Donahue, T. R., Tran, L. M., Hill, R., Li, Y., Kovochich, A., Calvopina, J. H., Patel, S. G., Wu, N., Hindoyan, A. & Farrell, J. J. (2012) Integrative survival-based molecular profiling of human pancreatic cancer. *Clinical cancer research* 18, 1352-1363.
- Eck, M. J., Pluskey, S., Trüb, T., Harrison, S. C. & Shoelson, S. E. (1996) Spatial constraints on the recognition of phosphoproteins by the tandem SH2 domains of the phosphatase SH-PTP2. *Nature* 379, 277-280.
- Engelholm, L. H., Ingvarsen, S., Jurgensen, H. J., Hillig, T., Madsen, D. H., Nielsen, B. S. & Behrendt, N. (2009) The collagen receptor uPARAP/Endo180. *Front Biosci* 14, 2103-2114.
- Fang, X., Lu, Q., Emoto, K. & Adler, P. N. (2010) The *Drosophila* fry protein interacts with Trc and is highly mobile in vivo. *BMC developmental biology* 10, 1-15.
- Fazel Modares, N., Polz, R., Haghghi, F., Lamertz, L., Behnke, K., Zhuang, Y., Kordes, C., Häussinger, D., Sorg, U. R. & Pfeffer, K. (2019) IL-6 trans-signaling controls liver regeneration after partial hepatectomy. *Hepatology* 70, 2075-2091.
- Fischer, M., Goldschmitt, J., Peschel, C., Brakenhoff, J. P., Kallen, K.-J., Wollmer, A., Grötzinger, J. & Rose-John, S. (1997) A bioactive designer cytokine for human hematopoietic progenitor cell expansion. *Nature biotechnology* 15, 142-145.
- Franco, D. M., Arevalo-Rodriguez, I., i Figuls, M. R., Oleas, N. G. M., Nuvials, X. & Zamora, J. (2019) Plasma interleukin-6 concentration for the diagnosis of sepsis in critically ill adults. *Cochrane database of systematic reviews*.
- Gadd, S. L. & Clevenger, C. V. (2006) Ligand-independent dimerization of the human prolactin receptor isoforms: functional implications. *Molecular endocrinology* 20, 2734-2746.
- Gearing, D., Gough, N., King, J., Hilton, D., Nicola, N., Simpson, R., Nice, E., Kelso, A. & Metcalf, D. (1987) Molecular cloning and expression of cDNA encoding a murine myeloid leukaemia inhibitory factor (LIF). *The EMBO journal* 6, 3995-4002.
- George, M. J., Jasmin, N. H., Cummings, V. T., Richard-Loendt, A., Launchbury, F., Woollard, K., Turner-Stokes, T., Garcia Diaz, A. I., Lythgoe, M. & Stuckey, D. J. (2021) Selective interleukin-6 trans-signaling blockade is more effective than panantagonism in reperfused myocardial infarction. *Basic to translational science* 6, 431-443.
- Gerhartz, C., Dittrich, E., Stoyan, T., Rose-John, S., Yasukawa, K., Heinrich, P. C. & Graeve, L. (1994) Biosynthesis and half-life of the interleukin-6 receptor and its signal transducer gp130. *European journal of biochemistry* 223, 265-274.
- Gerhartz, C., Heesel, B., Sasse, J., Hemmann, U., Landgraf, C., Schneider-Mergener, J., Horn, F., Heinrich, P. C. & Graeve, L. (1996) Differential activation of acute phase response factor/STAT3 and STAT1 via the cytoplasmic domain of the interleukin 6 signal transducer gp130: I. Definition of a novel phosphotyrosine motif mediating STAT1 activation. *Journal of biological chemistry* 271, 12991-12998.

- Ghoreschi, K., Laurence, A. & O'Shea, J. J. (2009) Janus kinases in immune cell signaling. *Immunological reviews* 228, 273-287.
- Giese, B., Roderburg, C., Sommerauer, M., Wortmann, S. B., Metz, S., Heinrich, P. C. & Müller-Newen, G. (2005) Dimerization of the cytokine receptors gp130 and LIFR analysed in single cells. *Journal of cell science* 118, 5129-5140.
- Glassman, C. R., Tsutsumi, N., Saxton, R. A., Lupardus, P. J., Jude, K. M. & Garcia, K. C. (2022) Structure of a Janus kinase cytokine receptor complex reveals the basis for dimeric activation. *Science* 376, 163-169.
- Gordon, S., Fraser, I., Nath, D., Hughes, D. & Clarke, S. (1992) Macrophages in tissues and in vitro. *Current opinion in immunology* 4, 25-32.
- Greiser, J. S., Stross, C., Heinrich, P. C., Behrmann, I. & Hermanns, H. M. (2002) Orientational constraints of the gp130 intracellular juxtamembrane domain for signaling. *Journal of biological chemistry* 277, 26959-26965.
- Grötzinger, J., Kernebeck, T., Kallen, K.-J. & Rose-John, S. (1999) IL-6 type cytokine receptor complexes: hexamer, tetramer or both?
- Haan, C., Kreis, S., Margue, C. & Behrmann, I. (2006) Jaks and cytokine receptors—an intimate relationship. *Biochemical pharmacology* 72, 1538-1546.
- Hashizume, M., Higuchi, Y., Uchiyama, Y. & Mihara, M. (2011) IL-6 plays an essential role in neutrophilia under inflammation. *Cytokine* 54, 92-99.
- Hassan, H. & Drexler, H. (1995) Interleukins and colony stimulating factors in human myeloid leukemia cell lines. *Leukemia & lymphoma* 20, 1-15.
- Heink, S., Yogev, N., Garbers, C., Herwerth, M., Aly, L., Gasperi, C., Husterer, V., Croxford, A. L., Möller-Hackbarth, K. & Bartsch, H. S. (2017) Trans-presentation of IL-6 by dendritic cells is required for the priming of pathogenic TH17 cells. *Nature immunology* 18, 74-85.
- Heinrich, P. C., Behrmann, I., Haan, S., Hermanns, H. M., Müller-Newen, G. & Schaper, F. (2003) Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochemical journal* 374, 1-20.
- Hemann, U., Gerhartz, C., Heesel, B., Sasse, J., Kurapkat, G., Grötzinger, J., Wollmer, A., Zhong, Z., Darnell, J. E. & Graeve, L. (1996) Differential activation of acute phase response factor/Stat3 and Stat1 via the cytoplasmic domain of the interleukin 6 signal transducer gp130: II. Src homology SH2 domains define the specificity of stat factor activation. *Journal of biological chemistry* 271, 12999-13007.
- Hennessy, B. T., Smith, D. L., Ram, P. T., Lu, Y. & Mills, G. B. (2005) Exploiting the PI3K/AKT pathway for cancer drug discovery. *Nature reviews drug discovery* 4, 988-1004.
- Hobom-Schnegg, B., Robinson, H. L. & Robinson, W. (1970) Replication of rous sarcoma virus in synchronized cells. *Journal of general virology* 7, 85-93.
- Holub, M. C., Szalai, C., Polgár, A., Tóth, S. & Falus, A. (1999) Generation of 'truncated' interleukin-6 receptor (IL-6R) mRNA by alternative splicing; a possible source of soluble IL-6R. *Immunology letters* 68, 121-124.
- Horiuchi, S., Koyanagi, Y., Zhou, Y., Miyamoto, H., Tanaka, Y., Waki, M., Matsumoto, A., Yamamoto, M. & Yamamoto, N. (1994) Soluble interleukin-6 receptors released from T cell or granulocyte/macrophage cell lines and human peripheral blood mononuclear cells are generated through an alternative splicing mechanism. *European journal of immunology* 24, 1945-1948.
- Horsten, U., Müller-Newen, G., Gerhartz, C., Wollmer, A., Wijdenes, J., Heinrich, P. C. & Grötzinger, J. (1997) Molecular modeling-guided mutagenesis of the extracellular part of gp130 leads to the identification of contact sites in the interleukin-6 (IL-6)·IL-6 receptor·gp130 complex. *Journal of biological chemistry* 272, 23748-23757.
- Howlett, M., Menheniott, T., Judd, L. & Giraud, A. (2009) Cytokine signalling via gp130 in gastric cancer. *Biochimica et biophysica acta (BBA)-molecular cell research* 1793, 1623-1633.
- Hummel, T. M., Ackfeld, T., Schönberg, M., Ciupka, G., Schulz, F., Oberdoerster, A., Grötzinger, J., Scheller, J. & Floss, D. M. (2017) Synthetic deletion of the interleukin 23 receptor (IL-23R)

- stalk region led to autonomous IL-23R homodimerization and activation. *Molecular and cellular biology* 37, e00014-00017.
- Isshiki, H., Akira, S., Tanabe, O., Nakajima, T., Shimamoto, T., Hirano, T. & Kishimoto, T. (1990) Constitutive and interleukin-1 (IL-1)-inducible factors interact with the IL-1-responsive element in the IL-6 gene. *Molecular and cellular biology*.
- Jain, N. K., Barkowski-Clark, S., Altman, R., Johnson, K., Sun, F., Zmuda, J., Liu, C. Y., Kita, A., Schulz, R. & Neill, A. (2017) A high density CHO-S transient transfection system: Comparison of ExpiCHO and Expi293. *Protein expression and purification* 134, 38-46.
- Kallen, K.-J., Grötzinger, J., Lelièvre, E., Vollmer, P., Aasland, D., Renné, C., Müllberg, J. r., zum Büschenfelde, K.-H. M., Gascan, H. & Rose-John, S. (1999) Receptor recognition sites of cytokines are organized as exchangeable modules: transfer of the leukemia inhibitory factor receptor-binding site from ciliary neurotrophic factor to interleukin-6. *Journal of biological chemistry* 274, 11859-11867.
- Kishimoto, T. & Kang, S. (2022) IL-6 revisited: from rheumatoid arthritis to CAR T cell therapy and COVID-19. *Annual review of immunology* 40, 323-348.
- Klouche, M., Bhakdi, S., Hemmes, M. & Rose-John, S. (1999) Novel path to activation of vascular smooth muscle cells: up-regulation of gp130 creates an autocrine activation loop by IL-6 and its soluble receptor. *The journal of immunology* 163, 4583-4589.
- Kurth, I., Horsten, U., Pflanz, S., Dahmen, H., Küster, A., Grötzinger, J., Heinrich, P. C. & Müller-Newen, G. (1999) Activation of the signal transducer glycoprotein 130 by both IL-6 and IL-11 requires two distinct binding epitopes. *The journal of immunology* 162, 1480-1487.
- Lacroix, M., Rousseau, F., Guilhot, F., Malinge, P., Magistrelli, G., Herren, S., Jones, S. A., Jones, G. W., Scheller, J. & Lissilaa, R. (2015) Novel insights into interleukin 6 (IL-6) cis-and trans-signaling pathways by differentially manipulating the assembly of the IL-6 signaling complex. *Journal of biological chemistry* 290, 26943-26953.
- Lamertz, L., Rummel, F., Polz, R., Baran, P., Hansen, S., Waetzig, G. H., Moll, J. M., Floss, D. M. & Scheller, J. (2018) Soluble gp130 prevents interleukin-6 and interleukin-11 cluster signaling but not intracellular autocrine responses. *Science signaling* 11, eaar7388.
- Lavoie, H. & Therrien, M. (2015) Regulation of RAF protein kinases in ERK signalling. *Nature reviews molecular cell biology* 16, 281-298.
- Lehmann, U., Schmitz, J., Weissenbach, M., Sobota, R. M., Hortner, M., Friederichs, K., Behrmann, I., Tsiaris, W., Sasaki, A. & Schneider-Mergener, J. (2003) SHP2 and SOCS3 contribute to Tyr-759-dependent attenuation of interleukin-6 signaling through gp130. *Journal of biological chemistry* 278, 661-671.
- Li, G., Huang, Z., Zhang, C., Dong, B.-J., Guo, R.-H., Yue, H.-W., Yan, L.-T. & Xing, X.-H. (2016) Construction of a linker library with widely controllable flexibility for fusion protein design. *Applied microbiology and biotechnology* 100, 215-225.
- Liau, N. P., Laktyushin, A., Lucet, I. S., Murphy, J. M., Yao, S., Whitlock, E., Callaghan, K., Nicola, N. A., Kershaw, N. J. & Babon, J. J. (2018) The molecular basis of JAK/STAT inhibition by SOCS1. *Nature communications* 9, 1558.
- Lim, C. P. & Cao, X. (2006) Structure, function, and regulation of STAT proteins. *Molecular biosystems* 2, 536-550.
- Lin, L.-F. H., Mismar, D., Lile, J. D., Armes, L. G., Butler III, E. T., Vannice, J. L. & Collins, F. (1989) Purification, cloning, and expression of ciliary neurotrophic factor (CNTF). *Science* 246, 1023-1025.
- Lokau, J. & Garbers, C. (2021) Interleukin-6–interleukin-11 receptor chimeras reveal ionomycin-induced proteolysis beyond ADAM10. *FEBS letters* 595, 3072-3082.
- Lokau, J., Schoeder, V., Haybaeck, J. & Garbers, C. (2019) Jak-stat signaling induced by interleukin-6 family cytokines in hepatocellular carcinoma. *Cancers* 11, 1704.
- Lorenzen, I., Shang, W., Perbandt, M., Petoukhov, M. V., Svergun, D. I., Waetzig, G. H., Rose-John, S., Hilgenfeld, R. & Grötzinger, J. (2011) The structure of the unliganded extracellular domain of

- the interleukin-6 signal transducer gp130 in solution. *European journal of cell biology* 90, 515-520.
- Malik, N., Kallestad, J. C., Gunderson, N. L., Austin, S. D., Neubauer, M. G., Ochs, V., Marquardt, H., Zarling, J. M., Shoyab, M. & Wei, C.-M. (1989) Molecular cloning, sequence analysis, and functional expression of a novel growth regulator, oncostatin M. *Molecular and cellular biology* 9, 2847-2853.
- Margulies, L. & Sehgal, P. (1993) Modulation of the human interleukin-6 promoter (IL-6) and transcription factor C/EBP beta (NF-IL6) activity by p53 species. *Journal of biological chemistry* 268, 15096-15100.
- Martinez-Fabregas, J., Wilmes, S., Wang, L., Hafer, M., Pohler, E., Lokau, J., Garbers, C., Cozzani, A., Fyfe, P. K. & Piehler, J. (2019) Kinetics of cytokine receptor trafficking determine signaling and functional selectivity. *Elife* 8, e49314.
- Maruyama, I. N. (2015) Activation of transmembrane cell-surface receptors via a common mechanism? The "rotation model". *Bioessays* 37, 959-967.
- Matthews, E. E., Thévenin, D., Rogers, J. M., Gotow, L., Lira, P. D., Reiter, L. A., Brissette, W. H. & Engelman, D. M. (2011) Thrombopoietin receptor activation: transmembrane helix dimerization, rotation, and allosteric modulation. *The FASEB journal* 25, 2234.
- Mitsuyama, K., Toyonaga, A., Sasaki, E., Ishida, O., Ikeda, H., Tsuruta, O., Harada, K., Tateishi, H., Nishiyama, T. & Tanikawa, K. (1995) Soluble interleukin-6 receptors in inflammatory bowel disease: relation to circulating interleukin-6. *Gut* 36, 45-49.
- Montero-Julian, F. (2001) The soluble IL-6 receptors: serum levels and biological function. *Cellular and molecular biology (noisy-le-grand, france)* 47, 583-597.
- Morieri, M. L., Passaro, A. & Zuliani, G. (2017) Interleukin-6 "trans-signaling" and ischemic vascular disease: the important role of soluble gp130. *Mediators of inflammation* 2017.
- Moriki, T., Maruyama, H. & Maruyama, I. N. (2001) Activation of preformed EGF receptor dimers by ligand-induced rotation of the transmembrane domain. *Journal of molecular biology* 311, 1011-1026.
- Müllberg, J., Oberthür, W., Lottspeich, F., Mehl, E., Dittrich, E., Graeve, L., Heinrich, P. C. & Rose-John, S. (1994) The soluble human IL-6 receptor. Mutational characterization of the proteolytic cleavage site. *Journal of immunology (Baltimore, MD.: 1950)* 152, 4958-4968.
- Muller-Newen, G. (2003) The cytokine receptor gp130: faithfully promiscuous. *Science's STKE* 2003, pe40-pe40.
- Muraguchi, A., Hirano, T., Tang, B., Matsuda, T., Horii, Y., Nakajima, K. & Kishimoto, T. (1988) The essential role of B cell stimulatory factor 2 (BSF-2/IL-6) for the terminal differentiation of B cells. *The journal of experimental medicine* 167, 332-344.
- Murakami, M., Narazaki, M., Hibi, M., Yawata, H., Yasukawa, K., Hamaguchi, M., Taga, T. & Kishimoto, T. (1991) Critical cytoplasmic region of the interleukin 6 signal transducer gp130 is conserved in the cytokine receptor family. *Proceedings of the national academy of sciences* 88, 11349-11353.
- Muyldermans, S. (2021) Applications of nanobodies. *Annual review of animal biosciences* 9, 401-421.
- Naka, T., Nishimoto, N. & Kishimoto, T. (2002) The paradigm of IL-6: from basic science to medicine. *Arthritis research & therapy* 4, 1-10.
- Nakahara, T. & Furue, M. (2018) Nemolizumab and atopic dermatitis: the interaction between interleukin-31 and interleukin-31 receptor as a potential therapeutic target for pruritus in patients with atopic dermatitis. *Current treatment options in allergy* 5, 405-414.
- Niu, G.-J., Xu, J.-D., Yuan, W.-J., Sun, J.-J., Yang, M.-C., He, Z.-H., Zhao, X.-F. & Wang, J.-X. (2018) Protein inhibitor of activated STAT (PIAS) negatively regulates the JAK/STAT pathway by inhibiting STAT phosphorylation and translocation. *Frontiers in immunology* 9, 2392.
- Osaki, M., Oshimura, M. a. & Ito, H. (2004) PI3K-Akt pathway: its functions and alterations in human cancer. *Apoptosis* 9, 667-676.
- Özbek, S., Grötzinger, J., Krebs, B., Fischer, M., Wollmer, A., Jostock, T., Müllberg, J. r. & Rose-John, S. (1998) The membrane proximal cytokine receptor domain of the human interleukin-6

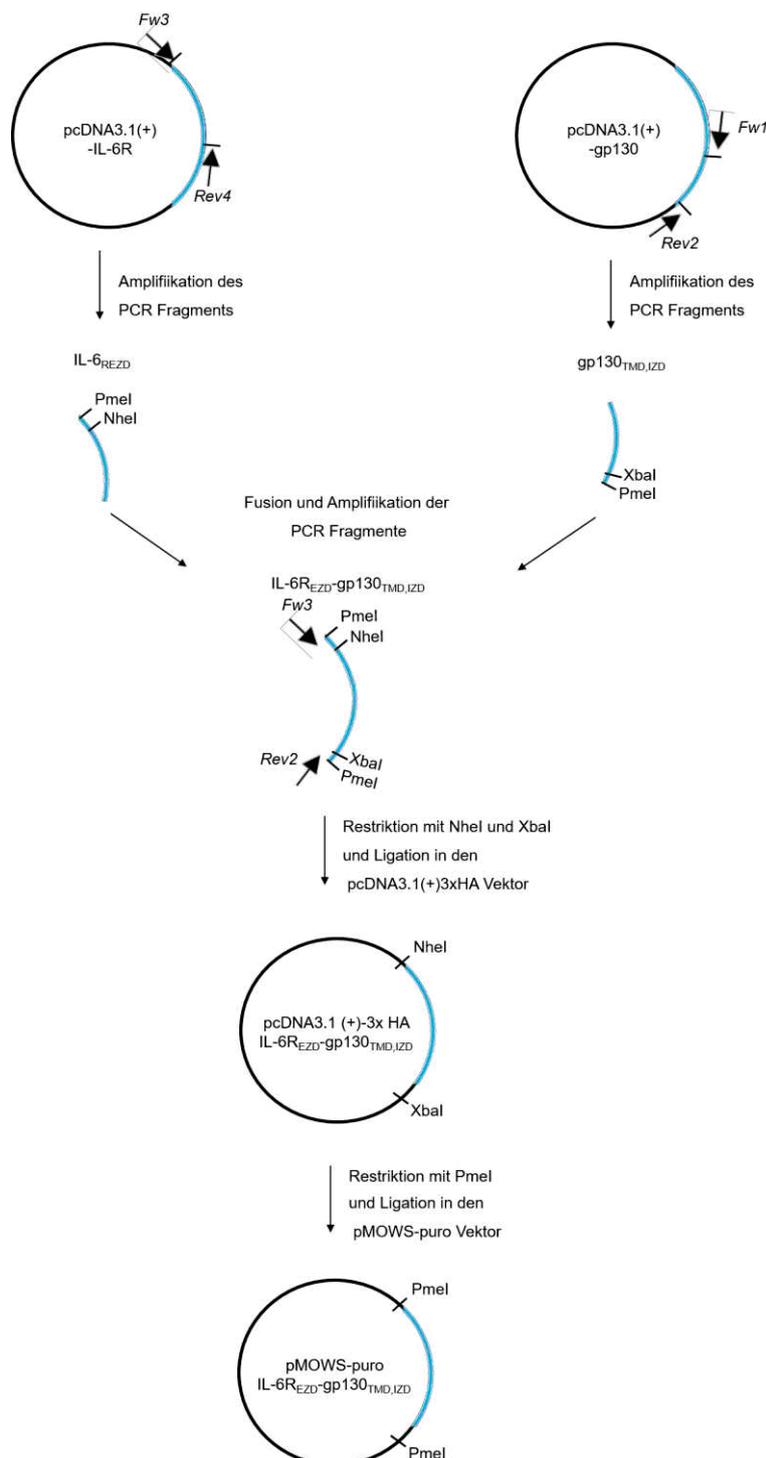
- receptor is sufficient for ligand binding but not for gp130 association. *Journal of biological chemistry* 273, 21374-21379.
- Palacios, R., Henson, G., Steinmetz, M. & McKearn, J. P. (1984) Interleukin-3 supports growth of mouse pre-B-cell clones in vitro. *Nature* 309, 126-131.
- Paonessa, G., Graziani, R., De Serio, A., Savino, R., Ciapponi, L., Lahm, A., Salvati, A. L., Toniatti, C. & Ciliberto, G. (1995) Two distinct and independent sites on IL-6 trigger gp 130 dimer formation and signalling. *The EMBO journal* 14, 1942-1951.
- Park, J., Lee, M., Cho, K., Park, B., Chae, K., Byun, D., Ryu, B., Park, Y. & Chi, S. in *Urologic oncology: Seminars and original investigations*. 83-84.
- Paul, S., Bennett, F., Calvetti, J., Kelleher, K., Wood, C., O'Hara Jr, R., Leary, A., Sibley, B., Clark, S. & Williams, D. (1990) Molecular cloning of a cDNA encoding interleukin 11, a stromal cell-derived lymphopoietic and hematopoietic cytokine. *Proceedings of the national academy of sciences* 87, 7512-7516.
- Pear, W. S., Nolan, G. P., Scott, M. L. & Baltimore, D. (1993) Production of high-titer helper-free retroviruses by transient transfection. *Proceedings of the national academy of sciences* 90, 8392-8396.
- Pennica, D., King, K. L., ShAw, K. J., Luis, E., Rullamas, J., Luoh, S.-M., Darbonne, W. C., Knutzon, D. S., Yen, R. & Chien, K. R. (1995) Expression cloning of cardiotrophin 1, a cytokine that induces cardiac myocyte hypertrophy. *Proceedings of the national academy of Sciences* 92, 1142-1146.
- Pflanz, S., Kurth, I., Grötzinger, J., Heinrich, P. C. & Muller-Newen, G. (2000) Two different epitopes of the signal transducer gp130 sequentially cooperate on IL-6-induced receptor activation. *The journal of immunology* 165, 7042-7049.
- Qu, C. K. (2000) The SHP-2 tyrosine phosphatase: signaling mechanisms and biological functions. *Cell research* 10, 279-288.
- Rascio, F., Spadaccino, F., Rocchetti, M. T., Castellano, G., Stallone, G., Netti, G. S. & Ranieri, E. (2021) The pathogenic role of PI3K/AKT pathway in cancer onset and drug resistance: An updated review. *Cancers* 13, 3949.
- Rebouissou, S., Amessou, M., Couchy, G., Poussin, K., Imbeaud, S., Pilati, C., Izard, T., Balabaud, C., Bioulac-Sage, P. & Zucman-Rossi, J. (2009) Frequent in-frame somatic deletions activate gp130 in inflammatory hepatocellular tumours. *Nature* 457, 200-204.
- Riethmueller, S., Somasundaram, P., Ehlers, J. C., Hung, C.-W., Flynn, C. M., Lokau, J., Agthe, M., Düsterhöft, S., Zhu, Y. & Grötzinger, J. (2017) Proteolytic origin of the soluble human IL-6R in vivo and a decisive role of N-glycosylation. *Plos biology* 15, e2000080.
- Roberts, P. J. & Der, C. J. (2007) Targeting the Raf-MEK-ERK mitogen-activated protein kinase cascade for the treatment of cancer. *Oncogene* 26, 3291-3310.
- Romano, M., Sironi, M., Toniatti, C., Polentarutti, N., Fruscella, P., Ghezzi, P., Faggioni, R., Luini, W., van Hinsbergh, V. & Sozzani, S. (1997) Role of IL-6 and its soluble receptor in induction of chemokines and leukocyte recruitment. *Immunity* 6, 315-325.
- Rose-John, S. (2020) Interleukin-6 signalling in health and disease. *F1000research* 9.
- Rose-John, S., Scheller, J., Elson, G. & Jones, S. A. (2006) Interleukin-6 biology is coordinated by membrane-bound and soluble receptors: role in inflammation and cancer. *Journal of leukocyte biology* 80, 227-236.
- Rose-John, S., Schooltink, H., Schmitz-Van de Leur, H., Müllberg, J., Heinrich, P. C. & Graeve, L. (1993) Intracellular retention of interleukin-6 abrogates signaling. *Journal of biological chemistry* 268, 22084-22091.
- Rose-John, S. (2017) The soluble interleukin 6 receptor: advanced therapeutic options in inflammation. *Clinical pharmacology & therapeutics* 102, 591-598.
- Sarabipour, S. & Hristova, K. (2013) FGFR3 transmembrane domain interactions persist in the presence of its extracellular domain. *Biophysical journal* 105, 165-171.

- Sato, K., Tsuchiya, M., Saldanha, J., Koishihara, Y., Ohsugi, Y., Kishimoto, T. & Bendig, M. M. (1993) Reshaping a human antibody to inhibit the interleukin 6-dependent tumor cell growth. *Cancer research* 53, 851-856.
- Schaper, F., Gendo, C., Eck, M., Schmitz, J., Grimm, C., Anhuf, D., Kerr, I. M. & Heinrich, P. C. (1998) Activation of the protein tyrosine phosphatase SHP2 via the interleukin-6 signal transducing receptor protein gp130 requires tyrosine kinase Jak1 and limits acute-phase protein expression. *Biochemical journal* 335, 557-565.
- Schaper, F. & Rose-John, S. (2015) Interleukin-6: Biology, signaling and strategies of blockade. *Cytokine & growth factor reviews* 26, 475-487.
- Schiemann, W. P., Bartoe, J. L. & Nathanson, N. M. (1997) Box 3-independent signaling mechanisms are involved in leukemia inhibitory factor receptor  $\alpha$ -and gp130-mediated stimulation of mitogen-activated protein kinase: evidence for participation of multiple signaling pathways which converge at Ras. *Journal of biological chemistry* 272, 16631-16636.
- Schmitz, J., Dahmen, H., Grimm, C., Gendo, C., Muller-Newen, G., Heinrich, P. C. & Schaper, F. (2000) The cytoplasmic tyrosine motifs in full-length glycoprotein 130 have different roles in IL-6 signal transduction. *The journal of immunology* 164, 848-854.
- Schroers, A., Hecht, O., Kallen, K. J., Pachta, M., Rose-John, S. & Grötzinger, J. (2005) Dynamics of the gp130 cytokine complex: a model for assembly on the cellular membrane. *Protein science* 14, 783-790.
- Schuster, B., Meinert, W., Rose-John, S. & Kallen, K.-J. (2003) The human interleukin-6 (IL-6) receptor exists as a preformed dimer in the plasma membrane. *FEBS letters* 538, 113-116.
- Shi, Z.-Q., Yu, D.-H., Park, M., Marshall, M. & Feng, G.-S. (2000) Molecular mechanism for the Shp-2 tyrosine phosphatase function in promoting growth factor stimulation of Erk activity. *Molecular and cellular biology* 20, 1526-1536.
- Simpson, R. J., Hammacher, A., Smith, D. K., Matthews, J. M. & Ward, L. D. (1997) Interleukin-6: structure-function relationships. *Protein science* 6, 929-955.
- Skiniotis, G., Boulanger, M. J., Garcia, K. C. & Walz, T. (2005) Signaling conformations of the tall cytokine receptor gp130 when in complex with IL-6 and IL-6 receptor. *Nature structural & molecular biology* 12, 545-551.
- Stahl, N., Boulton, T. G., Farruggella, T., Ip, N. Y., Davis, S., Witthuhn, B. A., Quelle, F. W., Silvennoinen, O., Barbieri, G. & Pellegrini, S. (1994) Association and activation of Jak-Tyk kinases by CNTF-LIF-OSM-IL-6  $\beta$  receptor components. *Science* 263, 92-95.
- Stahl, N., Farruggella, T. J., Boulton, T. G., Zhong, Z., Darnell Jr, J. E. & Yancopoulos, G. D. (1995) Choice of STATs and other substrates specified by modular tyrosine-based motifs in cytokine receptors. *Science* 267, 1349-1353.
- Stuhlmann-Laeisz, C., Lang, S., Chalaris, A., Krzysztow, P., Enge, S., Eichler, J., Klingmüller, U., Samuel, M., Ernst, M. & Rose-John, S. (2006) Forced dimerization of gp130 leads to constitutive STAT3 activation, cytokine-independent growth, and blockade of differentiation of embryonic stem cells. *Molecular biology of the cell* 17, 2986-2995.
- Takahashi-Tezuka, M., Yoshida, Y., Fukada, T., Ohtani, T., Yamanaka, Y., Nishida, K., Nakajima, K., Hibi, M. & Hirano, T. (1998) Gab1 acts as an adapter molecule linking the cytokine receptor gp130 to ERK mitogen-activated protein kinase. *Molecular and cellular biology* 18, 4109-4117.
- Tenhuberg, S., Schuster, B., Zhu, L., Kovaleva, M., Scheller, J., Kallen, K.-J. & Rose-John, S. (2006) gp130 dimerization in the absence of ligand: preformed cytokine receptor complexes. *Biochemical and biophysical research communications* 346, 649-657.
- Timmermann, A., Küster, A., Kurth, I., Heinrich, P. C. & Müller-Newen, G. (2002) A functional role of the membrane-proximal extracellular domains of the signal transducer gp130 in heterodimerization with the leukemia inhibitory factor receptor. *European journal of biochemistry* 269, 2716-2726.
- Usacheva, A., Sandoval, R., Domanski, P., Kotenko, S. V., Nelms, K., Goldsmith, M. A. & Colamonici, O. R. (2002) Contribution of the Box 1 and Box 2 motifs of cytokine receptors to Jak1 association and activation. *Journal of biological chemistry* 277, 48220-48226.

- Varghese, J., Moritz, R., Lou, M.-Z., Van Donkelaar, A., Ji, H., Ivancic, N., Branson, K., Hall, N. & Simpson, R. (2002) Structure of the extracellular domains of the human interleukin-6 receptor  $\alpha$ -chain. *Proceedings of the national academy of sciences* 99, 15959-15964.
- Veverka, V., Baker, T., Redpath, N. T., Carrington, B., Muskett, F. W., Taylor, R. J., Lawson, A. D., Henry, A. J. & Carr, M. D. (2012) Conservation of functional sites on interleukin-6 and implications for evolution of signaling complex assembly and therapeutic intervention. *Journal of biological chemistry* 287, 40043-40050.
- Vilar, M., Charalampopoulos, I., Kenchappa, R. S., Simi, A., Karaca, E., Reversi, A., Choi, S., Bothwell, M., Mingarro, I. & Friedman, W. J. (2009) Activation of the p75 neurotrophin receptor through conformational rearrangement of disulphide-linked receptor dimers. *Neuron* 62, 72-83.
- Viswanathan, S., Benatar, T., Rose-John, S., Lauffenburger, D. A. & Zandstra, P. W. (2002) Ligand/receptor signaling threshold (LIST) model accounts for gp130-mediated embryonic stem cell self-renewal responses to LIF and HIL-6. *Stem cells* 20, 119-138.
- Ward, L. D., Howlett, G. J., Discolo, G., Yasukawa, K., Hammacher, A., Moritz, R. L. & Simpson, R. J. (1994) High affinity interleukin-6 receptor is a hexameric complex consisting of two molecules each of interleukin-6, interleukin-6 receptor, and gp-130. *Journal of biological chemistry* 269, 23286-23289.
- Williams, J. J., Munro, K. M. & Palmer, T. M. (2014) Role of ubiquitylation in controlling suppressor of cytokine signalling 3 (SOCS3) function and expression. *Cells* 3, 546-562.
- Yawata, H., Yasukawa, K., Natsuka, S., Murakami, M., Yamasaki, K., Hibi, M., Taga, T. & Kishimoto, T. (1993) Structure-function analysis of human IL-6 receptor: dissociation of amino acid residues required for IL-6-binding and for IL-6 signal transduction through gp130. *The EMBO journal* 12, 1705-1712.
- Yu, X., Orr, C. M., Chan, H. C., James, S., Penfold, C. A., Kim, J., Inzhelevskaya, T., Mockridge, C. I., Cox, K. L. & Essex, J. W. (2023) Reducing affinity as a strategy to boost immunomodulatory antibody agonism. *Nature* 614, 539-547.
- Zohlnhöfer, D., Graeve, L., Rose-John, S., Schooltink, H., Dittrich, E. & Heinrich, P. C. (1992) The hepatic interleukin-6 receptor down-regulation of the interleukin-6 binding subunit (gp80) by its ligand. *FEBS letters* 306, 219-222.

## 11. Anhang

### 11.1 Klonierungen und Aminosäuresequenzen

11.1.1 IL-6<sub>REZD</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub>Klonierungsübersicht:**Abbildung 44: Klonierungsübersicht der Chimäre IL-6<sub>REZD</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub>.**

Das IL-6<sub>REZD</sub> Fragment wurde mittels spezifischer Oligonukleotide (Fw3 und Rev4) in einer Polymerase-Kettenreaktion (PCR) amplifiziert. Die Restriktionsschnittstellen PmeI und NheI wurden zudem inseriert. Als Vorlage diente die Aminosäuresequenz des IL-6R, welcher sich in einem pcDNA3.1(+) Vektor in der AG Scheller befindet. Für die Amplifikation und Insertion der Restriktionsschnittstellen PmeI und XbaI des gp130<sub>TMD,IZD</sub> Fragments, wurden die Oligonukleotide Fw1 und Rev2 verwendet. Beide Fragmente wurden durch eine PCR mit den Oligonukleotiden Rev2 und Fw3 mittels einer Phusion Polymerase fusioniert. Das IL-6<sub>REZD</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub> Fragment wurde im Anschluss mit den Restriktionsenzymen NheI und XbaI gespalten und in einen pcDNA3.1(+)-3xHA Vektor ligiert. Die pDNA wurde mit den Restriktionsenzym PmeI gespalten und das Insert (IL-6<sub>REZD</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub>) in einen pMOWS Vektor mit Puromycinresistenz (pMOWS-puro) ligiert. Die AS Sequenz des Plasmids wurde durch eine Sequenzierung bestätigt.

Aminosäuresequenz: IL-6R<sub>EZD</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub>

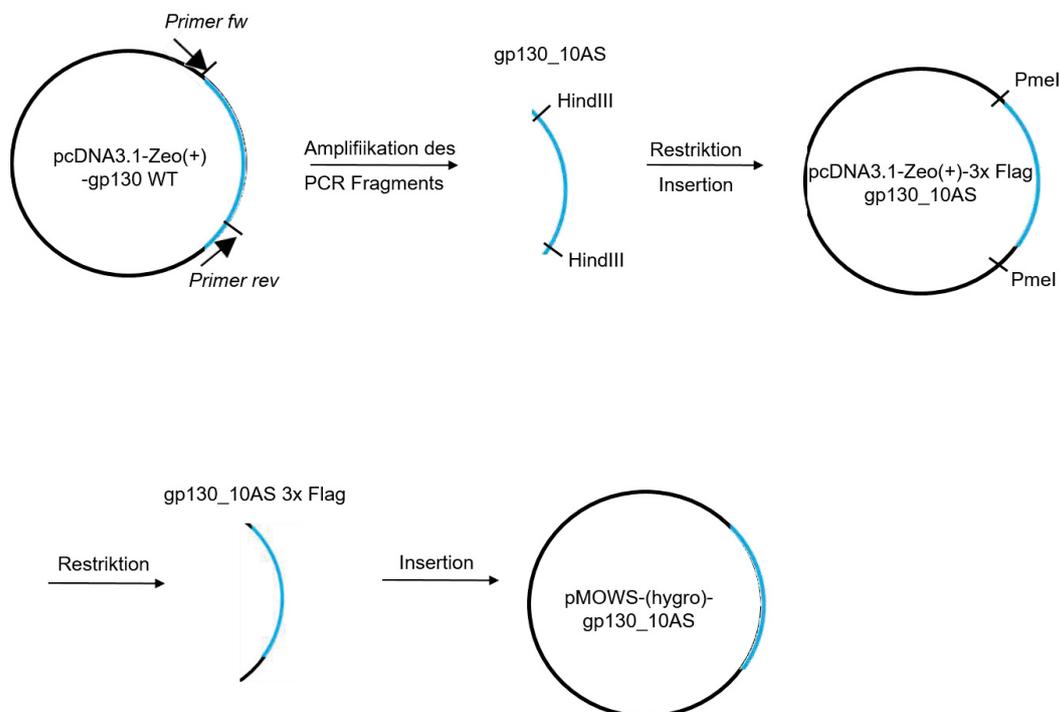
MLAVGCALLAALLAAPGAALAPRRCPAQEVARGVLTSLPGDSVTLTICPGV    Signalpeptid  
 EPEDNATVHVWLRKPAAGSHPSRWAGMGRLLLLRSVQLHDSGNYSYRAG    D1-D3 IL-6R  
 RPAGTVHLLVDVPPPEEPQLSCFRKSPLSNVVCEWGPRSTPSLTTKAVLLV  
 RKFNSPAEDFQEPQCQYSQESQKFSCQLAVPEGDSSFYIVSMCVASSVGS  
 KFSKTQTFQCGILQPDPPANITVTAVARNPRWLSVTWQDPHSWNSSFYR  
 LRFELRYRAERSKTF<sup>T</sup>TWMVKDLQHHCVIHDAWSGLRHVVQLRAQEEFGQ  
 GEWSEWSPEAMGTPWTESRSPPAENEVSTPMQAL<sup>T</sup>TNKDDDNILFRDSAN  
 ATSLPVQDSSSVPLP<sup>AI</sup>IVVPVCLAFL<sup>LL</sup>TLLGLV<sup>LF</sup>CFNKRDLIKKHIWPN    TMD gp130  
 VPDPSKSHIAQWSPHTPPRHNFNSKDQMYSDGNFTDVSVEIEANDKKPF    IZD gp130  
 PEDLKS<sup>LD</sup>LFKKEKINTEGHSSGIGSSCMSSSRPSISSSDENESSQNTS  
 STVQYSTVVHSGYRHQVPSVQVFSRSEATQPLLDSEERPEDLQLVDHVDG  
 GDGILPRQYFKQNC<sup>S</sup>QHESPDISHFERSKQVSSVNEEDFVRLKQQISD  
 HISQSCSGQM<sup>K</sup>MFQEVSAADAFGPGTEGQVERFETVGMEAATDEGMPKS  
 YLPQTVRQGGYMPQAAA<sup>YPYDVPDYAGYPYDVPDYAGSYPYDVPDYA</sup>    3xHA-Tag

## 11.1.2 gp130\_10AS

Klonierungsübersicht:

Als Vorlage für die gp130\_10AS Mutante diente die Codon-optimierte Aminosäuresequenz von UniProt (P40189, IL-6RB\_HUMAN). Die pDNA des gp130 befand sich in dem Expressionsvektor pcDNA3.1-Zeo(+) und lag in der AG Scheller vor. Für die Deletions-PCR wurden spezifische Oligonukleotide auf der Internetseite <https://nebasechanger.neb.com/> designt (*forward*: CGTTTAAACGATATCTTAAGCTTGCCACCATGC, *reverse*: AAGAAAGCTTGATGTGCTTCTTGATCAGGTCCCGC). Die PCR, der anschließende DpnI Verdau sowie die Phosphorylierung des Fragments wurde mit dem Q5® *Site-Directed Mutagenesis Kit* (New England Biolabs®) durchgeführt. Durch das reverse Oligonukleotid, wurde eine HindIII Restriktionsschnittstelle inseriert, welche für die spätere Klonierung wichtig war. Das amplifizierte PCR-Produkt umfasste die Aminosäuren M1-I651 des gp130. Nach Amplifikation wurde das PCR-Produkt mit dem Restriktionsenzym HindIII gespalten (siehe 4.1.4) und in einen pcDNA3.1-Zeo(+)-3x Flag Vektor ligiert (siehe 4.1.7). Am folgenden Tag wurden *E.coli XL-1 blue* Zellen mit dem Ligationsansatz transformiert (siehe 4.1.8). Mit den, auf der Agarplatte gewachsenen Bakterienkolonien wurde zur Überprüfung der inserierten DNA in die Bakterien, eine *colony* PCR durchgeführt (siehe 4.1.13.1). Die Aminosäuresequenz wurde durch eine Sequenzierung bestätigt. Für eine retrovirale Transduktion wurde die sequenzierte pDNA mit dem Enzym PmeI gespalten, um das Insert (gp130\_10AS) in einen pMOWS Vektor mit Hygromycinresistenz (pMOWS-(hygro)) ligiert (Abbildung 45). Am folgenden Tag wurden *E.coli XL-1 blue* Zellen mit dem Ligationsansatz

transformiert. Mit den, auf der Agarplatte gewachsenen Bakterienkolonien wurde zur Überprüfung der inserierten pDNA in die Bakterien, eine *colony* PCR durchgeführt. Die Sequenz der pDNA des gp130\_10AS pMOWS-(hygro) wurde durch eine Sequenzierung bestätigt.



**Abbildung 45: Klonierung des Expressionsvektors gp130\_10AS-pMOWS-(hygro).**

Das gp130\_10AS Fragment wurde durch eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) mit spezifischen Oligonukleotiden amplifiziert. Als Ausgangsplasmid diente dabei der Expressionsvektor pcDNA3.1 Vektor-Zeo(+)-gp130. Das amplifizierte Fragment wurde mit dem Restriktionsenzym HindIII gespalten und in den pcDNA3.1-Zeo(+)-3x Flag Expressionsvektor ligiert. Anschließend wurde das Plasmid pcDNA3.1-Zeo(+)-3x Flag-gp130\_10AS an den Restriktionsschnittstellen mit dem Enzym PmeI gespalten und in den Expressionsvektor pMOWS mit Hygromycinresistenz (pMOWS-(hygro)) ligiert. Die Aminosäuresequenz des daraus resultierende, Plasmid pMOWS-(hygro)-gp130\_10AS wurde durch eine Sequenzierung bestätigt.

### Aminosäuresequenz: gp130\_10AS

MLTLQTWLVQALFIFLTTTESTGELLDPGYSIPESPVVQLHSNFTAVCVL  
 KEKCMDYFHVNANYIVWKTNHFTIPKEQYTIINRTASSVTFTDIASLNIQ  
 LTCNILTFGQLEQNVYGITIIISGLPPEKPKNLSCIVNEGKKMRCEWDRGR  
 ETHLETNFTLKSEWATHKFADCKAKRDTPTSCTVDYSTVYFVNIEVWVEA  
 ENALGKVTSDHINFDPVYKVKPNPPHNLVINSEELSSILKLTWTNPSIK  
 SVIILKYNIQYRTKDASTWSQIPPEDTASTRSSFTVQDLKPFTEYVFRIR  
 CMKEDGKGYWSDWSEEASGITYEDRPSKAPSFWKIDPSHTQGYRTVQLV  
 WKTLPPEFANGKILDYEVTLTRWKSHLQNYTVNATKLTVNLTNDRYVATL  
 TVRNLVGKSDAAVLTIPACDFQATHPVMDLKAFPKDNMLWVEWTTPRESV  
 KKYILEWCVLSDKAPCITDWQQEDGTVHRTYLRGNLAESKCYLITVTPVY  
 ADGPGSPESIKAYLKQAPPSKGPVTRTKKVGKNEAVLEWDQLPVDVQNGF  
 IRNYTIFYRTIIGNETAVNVDSSTHEYTLSSLTSDTLYMVRMAAYTDEGG  
 KDGPEFTFTTPKFAQGEIEAIVVPVALAFLLTLLGLVLFVAFNKRDLIKKH  
 IKLATMAAADYKDHDGDYKDHDIDYKDDDDK

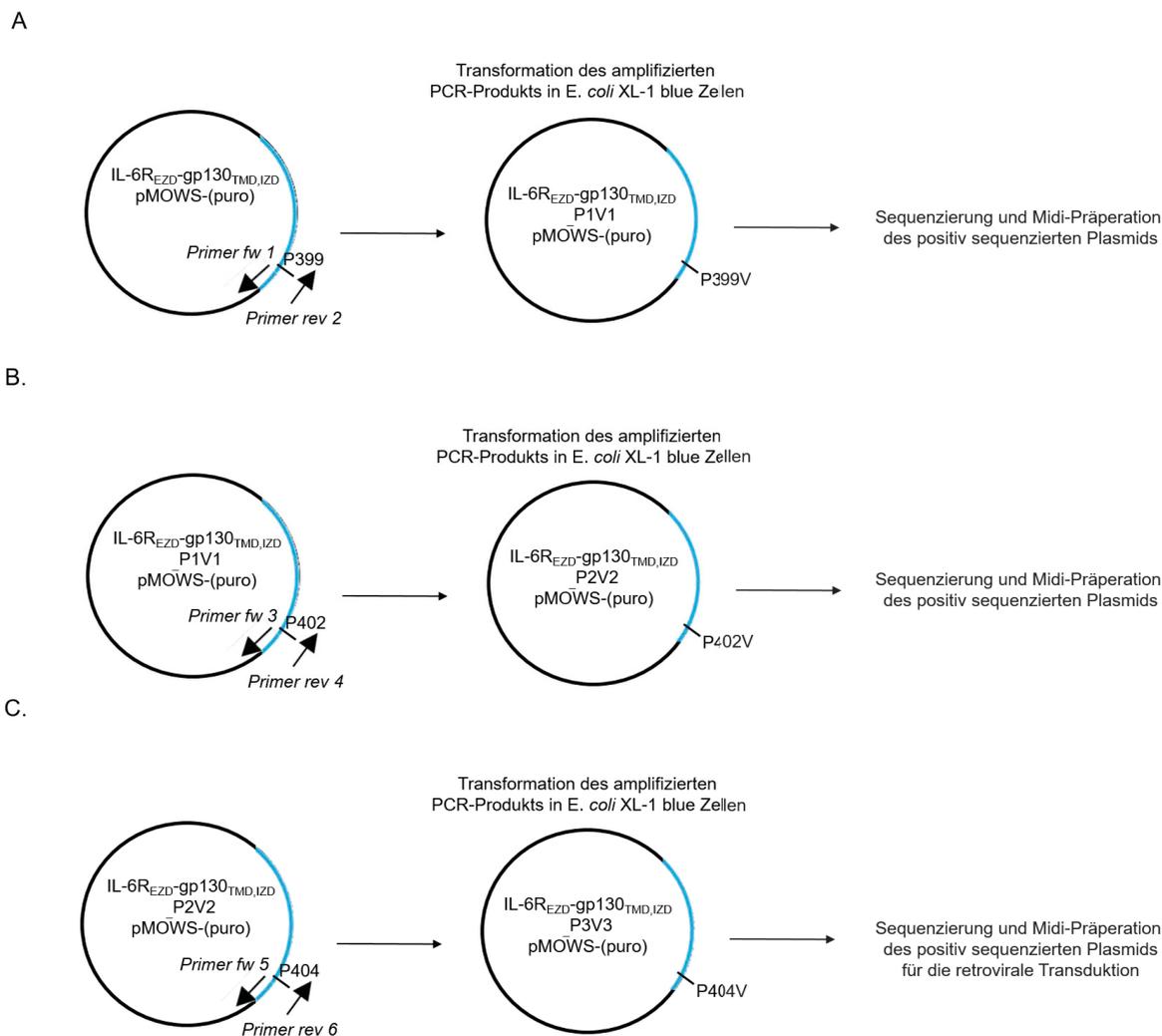
Signalpeptid

3xFlag-Tag

### 11.1.3. IL-6R<sub>EZD</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub>\_P3V3

#### Klonierungsübersicht:

Als Vorlage für den IL-6R<sub>EZD</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub>\_P3V3, diente die Aminosäuresequenz des IL-6R<sub>EZD</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub> im pMOWS-puro Vektor. Die, insgesamt drei Proline innerhalb der Sequenz der Box1 wurden identifiziert (P399, P402 und P404) und mittels spezifischer Oligonukleotide in drei unabhängigen PCR Zyklen unter Verwendung der Phusion Polymerase (Thermo Fisher Scientific), nacheinander zu Valinen mutiert (für P399: CS53: AAGCACATCTGGGTCAACGTGCCCG und CS54: CGGGCACGTTGACCCAGATGTGCTT, P402: CS55: ACATCTGGGTCAACTGGTCGACCCCTCCA und CS64: GGCTCTTGAGGGGTCGACCACGTTGACC, P404: CS86: CGTGGTCGACGTCTCCAAGAGCC und CS87: TTGACCCAGATGTGCTTC). Das amplifizierte PCR-Produkt wurde in *E.coli XL-1 blue* Zellen transformiert (siehe 4.1.8). Da es sich um eine Substitution einer Aminosäure handelt, konnte keine *colony* PCR durchgeführt werden, sodass drei der, auf der Agarplatte gewachsenen Bakterienkolonien, zur Sequenzierung eingeschickt wurden. Mit dem Klon, dessen Aminosäuresequenz durch die Sequenzierung bestätigt wurde, wurde zuerst eine Midi-Präparation (siehe 4.1.10) zur Vervielfältigung der pDNA durchgeführt. Anschließend wurde das nächste Prolin zu einem Valin zu mutiert (Abbildung 46).



**Abbildung 46: Klonierungsstrategie des IL-6R<sub>EZD</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub>\_P3V3.**

Substitution des **A:** Prolin (P) 399 zu Valin (V). **B:** (P) Prolin 402 zu Valin (V). **C:** (P) Prolin 404 zu Valin (V). Durch eine ortsgerichtete Mutagenese und den Oligonukleotiden *fw1* und *rev2*, *fw3* und *rev4* sowie der Primer *fw5* und *rev6* wurden die jeweiligen Proline zu Valinen mutiert. Die Aminosäuresequenz wurde durch eine Sequenzierung bestätigt.

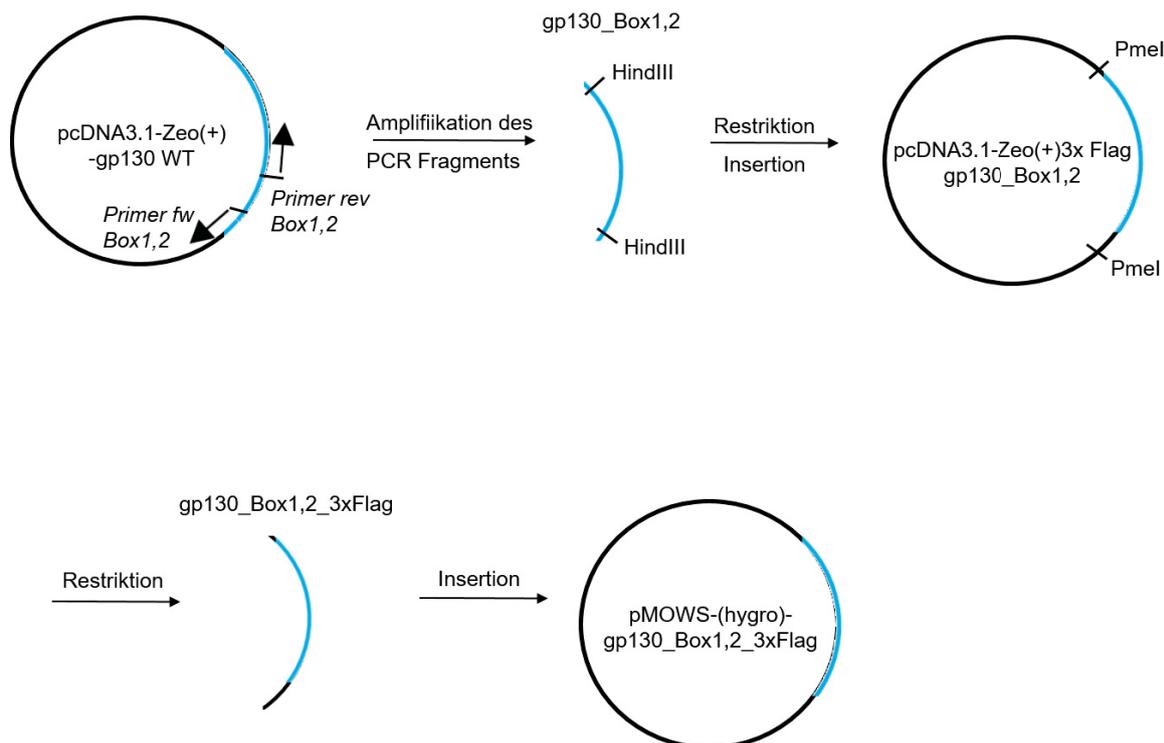
Aminosäuresequenz: IL-6R<sub>EZD</sub>-gp130<sub>TMD,IZD</sub>\_P3V3

MLAVGCALLAALLAAPGAALAPRRCPAQEVARGVLTSLPGDSVTLTCPG	Signalpeptid
VEPEDNATVHWVLRKPAAGSHPSRWAGMGRRLLLRSVQLHDSGNYSYR	D1-D3 IL-6R
AGRPAGTVHLLVDVPEEPQLSCFRKSPLSNVVCEWGPSTPSLTTKAV	
LLVRFKQNSPAEDFQEPQCYSQESQKFSCQLAVPEGDSSFYIVSMCVAS	
SVGSKFSKTQTFQCGILQPDPPANITVTAVARNPRWLSVTWQDPHSWN	
SSFYRLRFELRYAERSKFTTWMVKDLQHHCVIHDAWSGLRHVVQLRA	
QEEFGQGEWSEWSPEAMGTPWTESRSPPAENEVSTPMQALTTNKDDNI	Stalk IL-6R
LFRDSANATSLPVQDSSSVPLPAIVVPVCLAFLLTLLGLVLFVCFNKRD	TMD gp130
IKKHIVNVVDVSKSHIAQWSPHTPPRHNFNSKDQMYSDGNFTDVSVE	Box1, P399V
IEANDKKPFPEDLKSLDLFKKEKINTEGHSSGIGSSCMSRRPSISS	P402V, P404V
DENESSQNTSSTVQYSTVHSGYRHQVPSVQVFSRSEATQPLLDSEERP	
EDLQLVDHVDGGDGLPRQQYFKQNCQHESSPDISHFERSKQVSSVNE	
EDFVRLKQQISDHISQSCSGQMFMQEVSAADAFGPGTEGQVERFETV	
GMEAAATDEGMPKSYLPQTVRQGGYMPQAAAYPYDVPDYAGYPYDVPDYA	3xHA-Tag
GSYPYDVPDYA	

#### 11.1.4 gp130\_Box1,2 Rezeptors

##### Klonierungsübersicht:

Als Vorlage für den gp130 Mutante, gp130\_Box1,2, diente die Codon-optimierte Aminosäuresequenz von UniProt (P40189, IL-6RB\_HUMAN). Die pDNA des gp130 befand sich in einen Zeo(+)-3xFlag Vektor. Mittels PCR und *des Q5® Site-Directed Mutagenesis Kit* (New England Biolabs®) wurde das gp130 Fragment mit seinem Signalpeptid, welches die Aminosäuren M1-N699 umfasst durch spezifischer Oligonukleotide, welche auf der Internetseite <https://nebasechanger.neb.com/> erstellt wurden (fw\_Box1,2: CGTTTAAACGATATCTTAAGCTTGCCACCATGC, rev\_Box1,2: AAGCTTCTGCACGGTGGAGGAGGTGTTC), amplifiziert. Im Anschluss wurde das PCR-Produkt mit dem Restriktionsenzym HindIII gespalten (siehe 4.1.4). Das trunkierte gp130 Fragment wurde in einen bereits offenen pcDNA3.1 Zeo(+)-3xFlag Vektor ligiert (siehe 4.1.7), am nächsten Tag in chemisch kompetente *E.coli XL-1 blue* Zellen transformiert (siehe 4.1.8) und mittels *colony* PCR kontrolliert (siehe 4.1.13). Die pDNA putativer Bakterienkolonien wurde mittels Mini-Präparation (siehe 4.1.9) isoliert. Die Sequenz der pDNA des gp130\_Box1,2 im pcDNA3.1 Zeo(+)-3x Flag Vektor wurde durch eine Sequenzierung bestätigt. Im Anschluss wurde mit der positiv sequenzierten pDNA eine Midi-Präparation (siehe 4.1.10) durchgeführt. Die isolierte pDNA wurde durch das Restriktionsenzym PmeI gespalten und in einen bereits offenen und dephosphorylierten pMOWS-hygro Vektor ligiert (Abbildung 47). Am folgenden Tag wurden *E.coli XL-1 blue* Zellen mit dem Ligationsansatz transformiert. Mit den, auf der Agarplatte gewachsenen Bakterienkolonien wurde zur Überprüfung der inserierten pDNA in die Bakterien, eine *colony* PCR durchgeführt (siehe 4.1.13.1). Die Sequenz der pDNA des gp130\_Box1,2 im pMOWS hygro Vektor wurde durch eine Sequenzierung bestätigt.



**Abbildung 47: Klonierungsschema des gp130\_Box1,2.**

Mittels spezifischer Oligonukleotide (fw\_Box1,2 und rev\_Box1,2) wurde durch eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) das Fragment gp130\_Box1,2 amplifiziert. Dieses Fragment wurde im Anschluss mit den Restriktionsenzym HindIII gespalten und in einen bereits offenen und dephosphorylierten pcDNA3.1-Zeo(+)-3xFlag Vektor ligiert. Die Aminosäuresequenz wurde durch eine Sequenzierung bestätigt. Im Anschluss wurde die Plasmid-DNA durch das Restriktionsenzym PmeI gespalten und das Insert (gp130\_Box1,2\_3xFlag) in einen pMOWS Vektor mit Hygromycinresistenz (pMOWS-(hygro)) ligiert. Die Aminosäuresequenz wurde durch eine Sequenzierung bestätigt.

#### Aminosäuresequenz: gp130\_Box1,2:

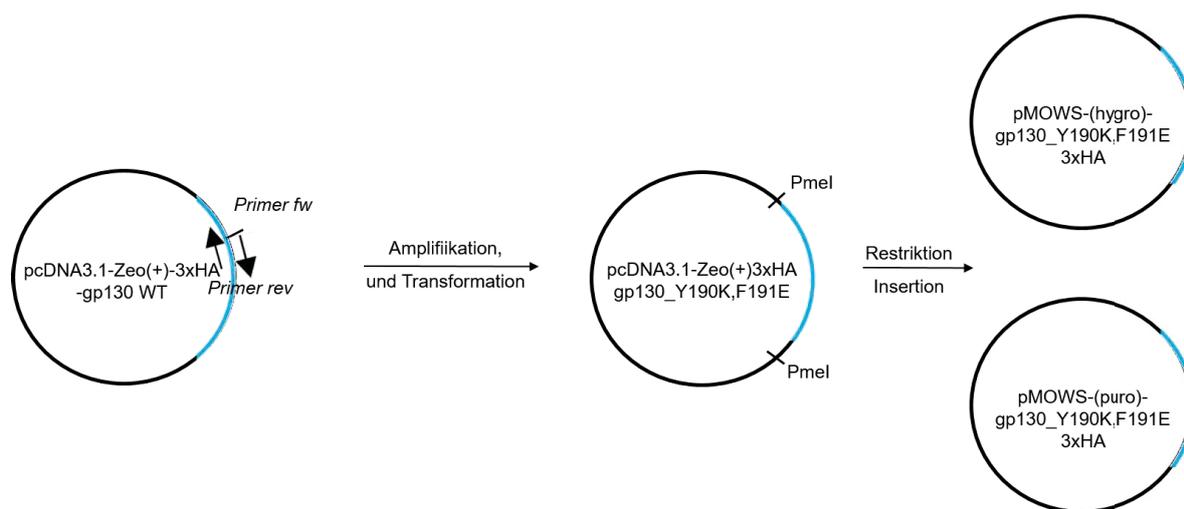
MLTLQTWLVQALFIFLTTSTGELLDP CGYISPESPVVQLHSNFTAVCV  
 LKEKCMDYFHV NANYIVWKT NHFTIPKEQYTI INRTASSVTF TDIASLN  
 IQLTCNILTFGQLEQNVYGITIIISGLPPEKPKNLSCIVNEGKKMRCEWD  
 RGRETHLETNFTL KSEWATHKFADCKAKRDTPTSC TVDYSTVYFVNIEV  
 WVEAENALGKV TSDHINFDPVYKVKPNPPHNL SVINSEELSSILKLTWT  
 NPSIKSVIILKYNIQYRTK DASTWSQIPPEDTASTRSSFTVQDLKPFTE  
 YVFRIRCMKEDG KGYWSDWSEEASGIT YEDRPSKAPSFWYKIDPSHTQG  
 YRTVQLVWKTLP PFEANGKILDYEVTLTRWKS HLQNYTVNATKLTVNLT  
 NDRYVATLTVRNLV GKSDAAVLTIPACDFQATHPVMDLKA FPKDNMLWV  
 EWTTPRESVKKY ILEWCVLSDKAPCITDWQOEDGTVHRTYLRGNLAESK  
 CYLITVTPVYADG PGPSPESIKAYLKQAPPSKGP TVRTKKVKGNEAVLEW  
 DQLPVDVQNGF IRNYTIFYRTIIGNETAVNV DSSHT EYTLSSLTSDTLY  
 MVRMAAYTDEGG KDGPEFTFTTPKF AQGEIEAIVVPVALAFL LTTLLGV  
 LFCFNKRDLIKKH IWPNVDPDSKSHIAQWSPHTPPRHNFNSKDQMYSDG  
 NFTDVSVVEIEAN DKKPFPEDLKSLDLFKKEKINTEGHSSGIGGSSCMS  
 SSRPSISSDENESS QNTSSTVQKLATMAAADYKDHDGDYKDHDIDYKD  
 DDDK

#### Signalpeptid

Box1 gp130  
 Box2 gp130  
 3xFlag-Tag

### 11.1.5 gp130<sub>Y190K,F191E</sub>

Als Vorlage für die Rezeptormutante gp130<sub>Y190K,F191E</sub>, diente die Codon-optimierte Aminosäuresequenz von UniProt (P40189, IL-6RB\_HUMAN). Die pDNA des gp130 befand sich bereits in einen pcDNA3.1-Zeo(+)-3xHA Vektor und lag der AG Scheller vor. Um eine Substitution zweier Aminosäuren in einer PCR durchführen zu können, wurden Oligonukleotide auf der Internetseite <https://nebasechangerv1.neb.com/> erstellt. Mit Hilfe dieser Oligonukleotide (*forward*: CAGCACCGTGAAGGAGGTGAACATCGAAGTGTG, *reverse*: TAGTCCACGGTACAGCTG) und des Q5® *Site-Directed Mutagenesis Kit* (New England Biolabs®), wurde die pDNA nach einer mit der Phusion Polymerase durchgeführten PCR mit DpnI verdaut und in chemisch kompetente *E.coli XL-1 blue* Zellen transformiert (siehe 4.1.8). Mit den, auf den Agarplatten gewachsenen Bakterienkolonien wurde eine Mini-Präparation durchgeführt (siehe 4.1.9). Im Anschluss wurden drei der Plasmide zur Sequenzierung eingeschickt. Nachdem die Aminosäuresequenz des pcDNA3.1-Zeo(+)-3xHA gp130<sub>Y190K,F191E</sub> Plasmids durch eine Sequenzierung bestätigt wurde, wurde eine Midi-Präparation (siehe 4.1.10) zur Vermehrung der pDNA durchgeführt und anschließend mit dem Restriktionsenzym PmlI gespalten und in den bereits offen und dephosphorylierten pMOWS Vektor mit Puromycinresistenz (pMOWS-(puro)) sowie den pMOWS mit Hygromycinresistenz (pMOWS-(hygro)) über Nacht ligiert und anschließend eine Transformation in *E.coli XL-1 blue* Zellen durchgeführt (siehe 4.1.7, Abbildung 48). Am nächsten Tag wurde mit den gewachsenen Bakterienkolonien eine *colony*-PCR zur Überprüfung der Transformation durchgeführt (siehe 4.1.13.1). Die Aminosäuresequenzen der pDNA des gp130<sub>Y190K,F191E</sub> im pMOWS-(puro) und pMOWS-(hygro) Vektor wurden durch eine Sequenzierung bestätigt.



**Abbildung 48: Klonierungsschema des gp130<sub>Y190K,F191E</sub>.**

Das Fragment gp130<sub>Y190K,F191E</sub> wurde mittels spezifischer Oligonukleotide durch eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) amplifiziert und in *E.coli XL-1 blue* Zellen transformiert. Die Aminosäuresequenz der Plasmid-DNA (pDNA) gp130<sub>Y190K,F191E</sub> pcDNA3.1(+)-3xHA wurde durch eine Sequenzierung bestätigt. Anschließend wurde die pDNA mit dem Enzym PmeI gespalten und das Insert gp130<sub>Y190K,F191E</sub>HA in einen pMOWS Vektor mit einer Puromycin (puro) oder Hygromycin (hygro) Resistenz inseriert. Die Aminosäuresequenz wurde durch eine Sequenzierung bestätigt.

Aminosäuresequenz: gp130<sub>Y190K,F191E</sub>

MLTLQTWLVQALFIFLTTTESTGELLDPGYSIPESPVVQLHSNFTAVCV  
 LKEKCMDYFHVNANYI VWKTNHF'TI PKEQYTI INRTASSVT'FTDIASLN  
 IQLTCNILTFGQLEQNVYGITIIISGLPPEKPKNLSCIVNEGKKMRCEWD  
 RGRETHLETNFTLKSEWATHKFADCKAKRDTPTSCTVDYSTVKEVNIIEVY  
 WVEAENALGKVTSDHINFDPVYKVKPNPPHNLSVINSEELSSILKLTWT  
 NPSIKSVIILKYNIQYRTKDASTWSQIPPEDTASTRSSFTVQDLKPFTE  
 YVFRIRCMKEDGKGYWSWSEEASGITIEDRPSKAPSFWYKIDPSHTQG  
 YRTVQLVWKTLPPEANGKILDYEVTLTRWKSHLQNYTVNATKLTVNLT  
 NDRYVATLTVRNLVGKSDDAVALTI PACDFQATHPVMDLKAFPKDNMLWV

Signalpeptid

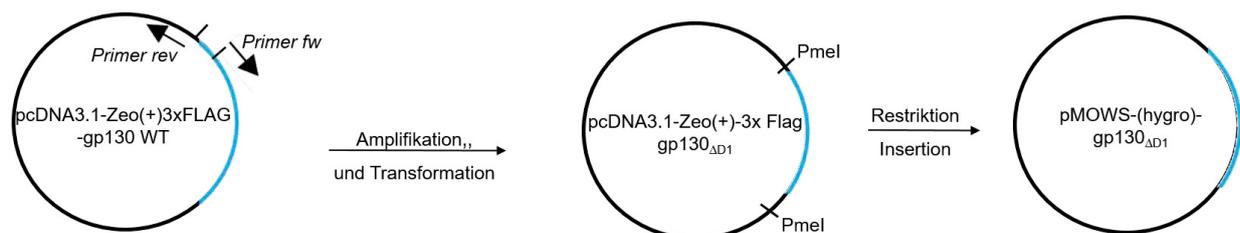
Y190K, F191E

EWTPRESVKKYILEWCVLSDKAPCITDWQQEDGTVHRTYLRGNLAESK  
 CYLITVTPVYADGPGSPESIKAYLKQAPPSKGPVTRTKKVGKNEAVLEW  
 DQLPVDVQNGFIRNYTIFYRTIIGNETAVNVDSSTHEYTLSSLTSDTLY  
 MVRMAAYTDEGGKDGPEFTFTTPKFAQGEIEAIVVPVCLAFLLTLLGV  
 LFCFNKRDLIKKHIWPNVPDPSKSHIAQWSPHTPPRHNFNSKDQMYSDG  
 NFTDVSVEIEANDKKPFPEDLKSLDLFKKEKINTEGHSSGIGGSSCMS  
 SSRPSISSSDENESSQNTSSTVQYSTVVHSGYRHQVPSVQVFSRSEATQ  
 PLLDSEERPEDLQLVDHVDGGDILPRQQYFKQNCSEQHSSPDISHFER  
 SKQVSSVNEEDFVRLKQQISDHISQSCGSGQMFMQEVSAADAFPGTE  
 GQVERFETVGMEEATDEGMPKSYLPQTVRQGGYMPQAAAYPYDVPDYAG  
 YPYDVPDYAGSYPYDVPDYA

3xHA-Tag

11.1.6 gp130<sub>ΔD1</sub>

Als Vorlage für die Rezeptormutante gp130<sub>ΔD1</sub>, diente die Codon-optimierte Aminosäuresequenz von UniProt (P40189, IL-6RB\_HUMAN). Die pcDNA des gp130 befand sich in einen Zeo(+)-3xFlag Vektor und lag in der AG Scheller vor. Um die D1 (D26-I120) des gp130 mittels PCR zu deletieren, wurden Oligonukleotide auf der Internetseite <https://nebasechangerv1.neb.com/> designt. Mit Hilfe dieser Oligonukleotide (*forward*: ATCAGCGGCCTGCCCCCG, *reverse*: CAGCAGCTCGCCGGTGCTC) und des Q5® *Site-Directed Mutagenesis Kit* (New England Biolabs®), wurde das PCR Produkt amplifiziert und anschließend mit dem Restriktionsenzym DpnI verdaut. Die verdaute pDNA wurde in chemisch kompetente *E.coli XL-1 blue* Zellen transformiert (siehe 4.1.8). Mit den, auf den Agarplatten gewachsenen Bakterienkolonien wurde eine *colony*-PCR zur Überprüfung der Transformation, durchgeführt (siehe 4.1.13.1). Die Aminosäuresequenz der pDNA des gp130<sub>ΔD1</sub> im pcDNA3.1 Zeo(+)-3x Flag Vektor wurde durch eine Sequenzierung bestätigt. Nach Bestätigung wurde, zur Vervielfältigung der pDNA, eine Midi-Präparation (siehe 4.1.10) durchgeführt und mit dem Restriktionsenzym PmeI gespalten. Das Insert, gp130<sub>ΔD1</sub>, wurde in den pMOWS Vektor mit Hygromycinresistenz (pMOWS-(hygro)) über Nacht ligiert und am nächsten Tag in chemisch kompetente *E.coli XL-1 blue* Zellen transformiert (Abbildung 49). Als Ligations- und Transformationskontrolle wurde eine *colony*-PCR durchgeführt. Die Sequenz der pDNA des gp130<sub>ΔD1</sub> im pMOWS-(hygro) Vektors wurde durch eine Sequenzierung bestätigt.



**Abbildung 49: Klonierungsschema des gp130<sub>ΔD1</sub>.**

Das Fragment gp130<sub>ΔD1</sub> wurde mittels spezifischer Oligonukleotide durch eine Polymerase-Kettenreaktion (PCR) amplifiziert und in *E.coli XL-1 blue* Zellen transformiert. Die Aminosäuresequenz der Plasmid-DNA (pDNA) gp130<sub>ΔD1</sub> pcDNA3.1(+)-3xFlag wurde durch eine Sequenzierung bestätigt. Anschließend wurde die pDNA mit dem Enzym PmeI gespalten und das Insert, gp130<sub>ΔD1</sub>Flag, in einen pMOWS Vektor mit Hygromycin (pMOWS-(hygro)) ligiert. Die Aminosäuresequenz wurde durch eine Sequenzierung bestätigt.

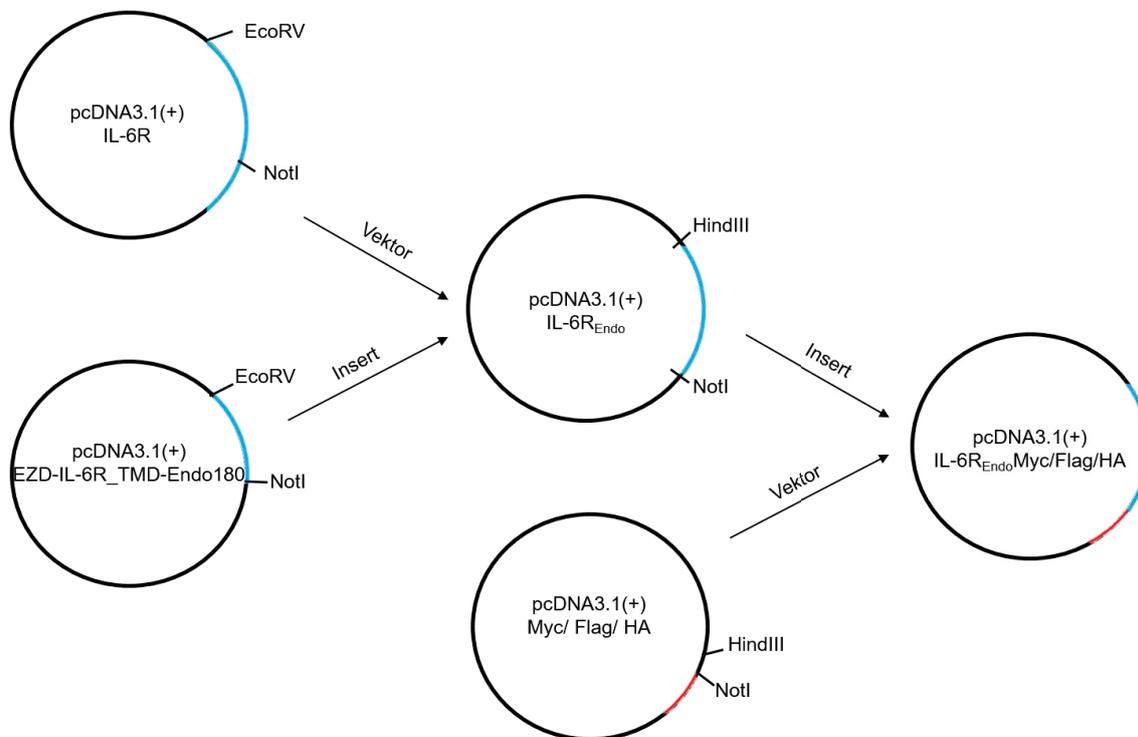
Aminosäuresequenz des gp130<sub>AD1</sub>

MLTLQTWLVQALFIFLTTTESTGELLISGLPPEKPKNLSIVNEGKKMRC Signalpeptid gp130  
 EWDRGRETHLETNFTLKSEWATHKFADCKAKRDTPTSCTVDYSTVYFVN D2 gp130  
 IEVWVEAENALGKVTSDHINFDPVYKVKPNPPHNLSVINSEELSSILKL  
 TWTNPSIKSVIILKYNIQYRTKDASTWSQIPPEDTASTRSSFTVQDLKP  
 FTEYVFRIRCMKEDGKGYWSDWSEEASGITYEDRPSKAPSFYKIDPSH  
 TQGYRTVQLVWKTLPPEFANGKILDYEVTLTRWKSHLQNYTVNATKLTV  
 NLTNDRYVATLTVRNLVGKSDAAVLTIPACDFQATHPVMDLKAFPKDNM  
 LWVEWTPRESVKKYILEWCVLSDKAPCITDWQQEDGTVHRFTYLRGNLA  
 ESKCYLITVTPVYADGPGSPESIKAYLKQAPPSKGPTVRTKKVKGNEAV  
 LEWDQLPVDVQNGFIRNYTIFYRTIIGNETAVNVDSSTHEYTLSSLTSD  
 TLYMVRMAAYTDEGGKDGPEFTFTTPKFAQGEIEAIVVPVCLAFLLTTL  
 LGVLFVCFNKRDLIKKHIWPNVPDPSKSHIAQWSPHTPPRHNFNSKDQMY  
 SDGNFTDVSVEIEANDKKFPPEDLKSLDLFKKEKINTEGHSSGIGGSS  
 CMSSSRPSSISSDENESSQNTSSTVQYSTVVHSGYRHQVPSVQVFSRSE  
 ATQPLLDSEERPEDLQLVDHVDGGDILPRQYFKQNCQHESSPDISH  
 FERSKQVSSVNEEDFVRLKQQISDHISQSCGSGQMKMFQEVSAADAFGP  
 GTEGQVERFETVGMEAATDEGMPKSYLPQTVRQGGYMPQAAA DYKDHDG 3xFlag-Tag  
DYKDHDIDYKDDDDK

11.1.7 IL-6R<sub>Endo</sub>

Für die Rezeptormutante IL-6R<sub>Endo</sub> wurde die Aminosäuresequenz EZD\_IL-6R-TMD\_Endo180 bei BioCat in einem pcDNA3.1(+) Vektor bestellt. Diese wurde in *E.coli XL-1 blue* Zellen transformiert (siehe 4.1.8). Anschließend wurde eine Midi-Präparation (4.1.10) und eine Testrestriktion zur Überprüfung der Retransformation durchgeführt (siehe 4.1.8). Im Anschluss wurde das EZD\_IL-6R\_TMD-Endo180 Plasmid mit den Restriktionsenzymen HindIII und EcoRV gespalten (siehe 4.1.4). Für die IZD des IL-6R wurde der IL-6R pcDNA3.1(+) Vektor, welcher sich in der AG Scheller befand, mit den Enzymen NotI und EcoRI gespalten. Anschließend wurde das EZD\_IL-6R\_TMD-Endo180 Fragment in den IL-6R pcDNA3.1(+) Vektor über Nacht ligiert (siehe 4.1.7). Am nächsten Tag wurden *E.coli XL-1 blue* Zellen mit dem Ligationsprodukt transformiert (siehe 4.1.8). Als Ligations- und Transformationskontrolle wurde eine colony-PCR durchgeführt (siehe 4.1.13.1). Die Sequenz der pDNA des IL-6R<sub>Endo</sub> in pcDNA3.1(+) wurde durch eine Sequenzierung bestätigt, sodass *E.coli XL-1 blue* Zellen mit der sequenzierten pDNA transformiert werden konnten. Anschließend wurde eine Midi-Präparation durchgeführt (siehe 4.1.10). Die Aminosäuresequenz der Tags Myc, HA und Flag wurde in einem pcDNA3.1(+) Vektor bei BioCat bestellt. Diese wurde in *E.coli XL-1 blue* Zellen transformiert. Anschließend wurde eine Midi-Präparation und eine Testrestriktion zur Überprüfung der Retransformation durchgeführt. Die Myc-, HA- und Flag pcDNA3.1(+) Vektoren wurden mit den Restriktionsenzymen HindIII und NotI gespalten und dephosphoryliert (siehe 4.1.4 und 4.1.5). Die IL-6R<sub>Endo</sub> pcDNA3.1(+) wurde ebenfalls mit HindIII

und Not gespalten und in die offenen und dephosphorylierten Myc-, HA- und Flag pcDNA3.1(+) Vektoren ligiert (Abbildung 50). Als Ligations- und Transformationskontrolle wurde eine *colony*-PCR durchgeführt. Die Sequenz der pDNA des IL-6R<sub>Endo</sub> Myc, HA oder Flag in pcDNA3.1(+) wurde durch eine Sequenzierung bestätigt.



**Abbildung 50: Klonierungsschema des IL-6R<sub>Endo</sub>.**

Die Aminosäuresequenz für die extrazelluläre Domäne (EZD) des IL-6R und die Transmembrandomäne (TMD) des Endo180 Rezeptors wurde zusammen in einem pcDNA3.1(+) Vektor von BioCat bestellt und mit den Enzymen EcoRV und NotI gespalten. Für die intrazelluläre Domäne des IL-6 wurde der, in der AG Scheller vorliegende IL-6R pcDNA3.1(+) Vektor mit den Enzymen EcoRV und NotI gespalten. Das Insert EZD-IL-6R\_TMD-Endo180 wurde in den IL-6R pcDNA3.1 Vektor ligiert. Der von BioCat bestellte pcDNA3.1(+) Vektor mit den Tags Myc, Flag oder HA wurde mit den Enzymen HindIII und NotI gespalten und dephosphoryliert. Die Plasmid-DNA (pDNA) des pcDNA3.1(+)-IL-6R<sub>Endo</sub> wurde mit den Restriktionsenzymen HindIII und NotI gespalten und in den Myc-, Flag- und HA pcDNA3.1(+) Vektor ligiert. Die Aminosäuresequenz der klonierten pDNA des IL-6R<sub>Endo</sub>Myc/Flag und HA wurde durch eine Sequenzierung bestätigt.

### Aminosäuresequenz IL-6R<sub>Endo</sub>Myc

MLAVGCALLAALLAAPGAALAPRRCPAQEVARGVLTSLPGDSVTLTCPG  
 VEPEDNATVHWVLRKPAAGSHPSRWAGMGRLLLLRSVQLHDSGNYSYR  
 AGRPAGTVHLLVDVPPEEPQLSCFRKSPVSNVCEWGPSTPSTLTKAV  
 LLVRFQNSPAEDFQEPQCYSQESQKFSCQLAVPEGDSSFYIVSMCVAS  
 SVGSKFSKTQTFQCGILQDPANITVTAVARNPRWLSVTWQDPHSWN  
 SSFYRLRFELRYAERSKFTTWMVKDLQHHCVIHDAWSGLRHVVQLRA  
 QEEFGQGEWSEWSPEAMGTPWTESRSPPAENEVSTPMQALTTNKDDNI  
 LFRDSANATSLPVQDSSSVPLPALVVVLMVLLLLALLTAALIRFKKTW  
 KLRALKEGKTSMHPPYSLGQLVPERPRPTVPLVPLISPPVSPSSLGSDN  
 TSSHNRPDARDPRSPYDISNTDYFFPRAAAEQKLISEEDL

Signalpeptid

TMD Endo180

Myc-Tag

Aminosäuresequenz IL-6R<sub>Endo</sub> Flag

MLAVGCALLAALLAAPGAALAPRRCPAQEVARGVLTSLPGDSVTLTCPG **Signalpeptid**  
 VEPEDNATVHWVLRKPAAGSHPSRWAGMGRRLLLRSVQLHDSGNYSYR  
 AGRPAGTVHLLVDVPPEEPQLSCFRKSPNSNVCEWGPSTPSLTTKAV  
 LLVRKFQNSPAEDFQEPQYSQESQKFSCQLAVPEGDSSFYIVSMCVAS  
 SVGSKFSKTQTFQGCILQPDPPANITVTAVARNPRWLSVTWQDPHSWN  
 SSFYRLRFELRYRAERSKTFTTWMVKDLQHHCVIHDAWGLRHVVQLRA  
 QEEFGQGEWSEWSPEAMGTPWTESRSPPAENEVSTPMQALTTNKDDDNI  
 LFRDSANATSLPVQDSSSVPLPALVVVLMVLLLLLALLTAALIRFKKTW **TMD Endo180**  
 KLRALKEGKTSMHPPYSLGQLVPERPRPTVPLVPLISPPVSPSSLGSDN  
 TSSHNRPDARDPRSPYDISNTDYFFPRAAADYKDHDGDYKDHDIDYKDD  
 DDK **3xFlag-Tag**

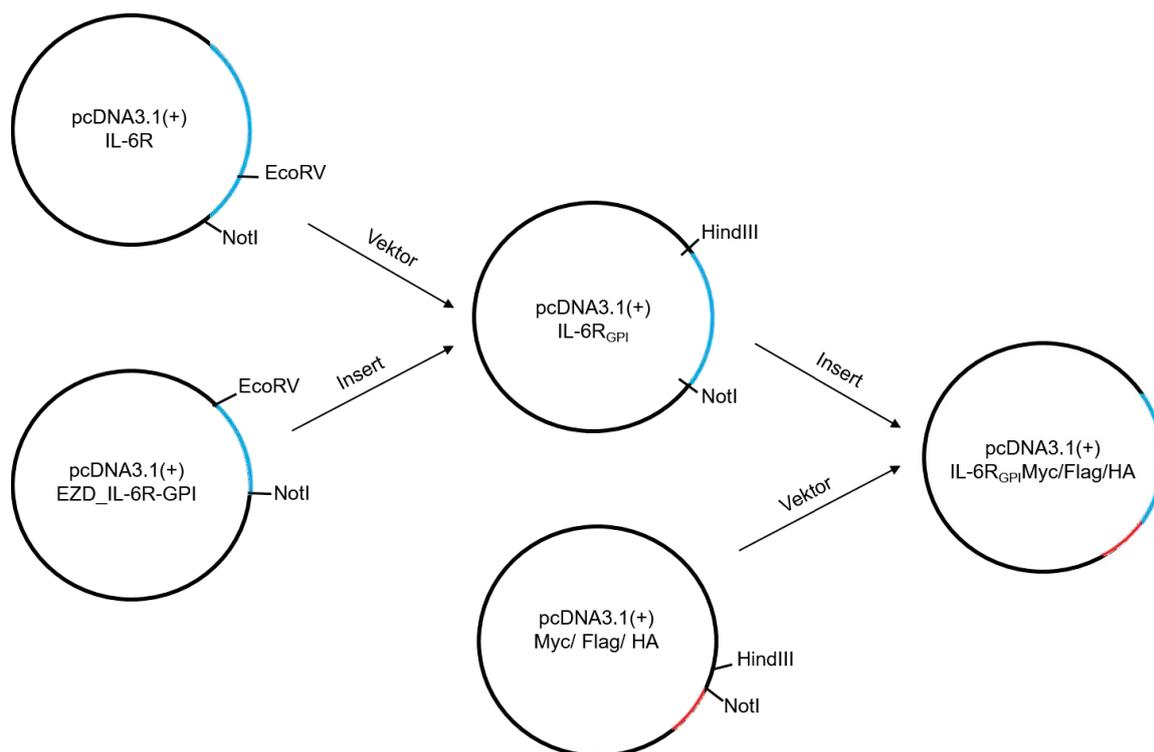
Aminosäuresequenz IL-6R<sub>Endo</sub> HA

MLAVGCALLAALLAAPGAALAPRRCPAQEVARGVLTSLPGDSVTLTCPG **Signalpeptid**  
 VEPEDNATVHWVLRKPAAGSHPSRWAGMGRRLLLRSVQLHDSGNYSYR  
 AGRPAGTVHLLVDVPPEEPQLSCFRKSPNSNVCEWGPSTPSLTTKAV  
 LLVRKFQNSPAEDFQEPQYSQESQKFSCQLAVPEGDSSFYIVSMCVAS  
 SVGSKFSKTQTFQGCILQPDPPANITVTAVARNPRWLSVTWQDPHSWN  
 SSFYRLRFELRYRAERSKTFTTWMVKDLQHHCVIHDAWGLRHVVQLRA  
 QEEFGQGEWSEWSPEAMGTPWTESRSPPAENEVSTPMQALTTNKDDDNI  
 LFRDSANATSLPVQDSSSVPLPALVVVLMVLLLLLALLTAALIRFKKTW **TMD Endo180**  
 KLRALKEGKTSMHPPYSLGQLVPERPRPTVPLVPLISPPVSPSSLGSDN  
 TSSHNRPDARDPRSPYDISNTDYFFPRAAAYPYDVPDYAGYPYDVPDYA  
 GSYPYDVPDY **3xHA-Tag**

11.1.8 IL-6R<sub>GPI</sub>

Als Vorlage für die Rezeptormutante IL-6R<sub>GPI</sub> diene die Aminosäuresequenz von UniProt (P08887, IL-6RA\_HUMAN). Diese befand sich bereits in einen pcDNA3.1(+) Vektor und lag in der AG Scheller vor. Die Sequenzen der EZD des IL-6R und die des GPI-Ankers des CNTFR (EZD-IL-6R\_GPI) wurden bei BioCat in einem Fragment in pcDNA3.1(+) Vektor bestellt. Das Plasmid wurde in *E.coli XL-1 blue* Zellen transformiert (siehe 4.1.8). Anschließend wurde eine Midi-Präparation (siehe 4.1.10) und eine Testrestriktion zur Überprüfung der Retransformation durchgeführt (siehe 4.1.4). Im Anschluss wurde das EZD-IL-6R\_GPI pcDNA3.1(+) Plasmid mit den Restriktionsenzymen EcoRV und NotI gespalten (siehe 4.1.5). Der IL-6R pcDNA3.1(+) Vektor wurde ebenfalls mit den Enzymen EcoRV und NotI gespalten und dephosphoryliert (siehe 4.1.5). Das EZD-IL-6R\_GPI Fragment wurde als Insert in den offenen und dephosphorylierten IL-6R pcDNA3.1(+) Vektor ligiert (siehe 4.1.7). Am nächsten Tag wurden *E.coli XL-1 blue* Zellen mit dem Ligationsprodukt transformiert. Als Ligations- und Transformationskontrolle wurde eine *colony*-PCR durchgeführt (siehe 4.1.13.1). Die

Aminosäuresequenz der pDNA des IL-6R<sub>GPI</sub> in pcDNA3.1(+) wurde durch eine Sequenzierung bestätigt, sodass *E.coli XL-1 blue* Zellen mit der sequenzierten pDNA transformiert werden konnten. Anschließend wurde eine Midi-Präparation durchgeführt (siehe 4.1.10). Die Aminosäuresequenz der *Tags* Myc, HA und Flag wurde in einem pcDNA3.1(+) Vektor von BioCat bestellt und in *E.coli XL-1 blue* Zellen transformiert. Anschließend wurde eine Midi-Präparation und eine Testrestriktion zur Überprüfung der Retransformation durchgeführt. Die Myc-, HA- und Flag pcDNA3.1(+) Vektoren wurden mit den Restriktionsenzymen HindIII und NotI gespalten und dephosphoryliert. Die IL-6R<sub>GPI</sub> pDNA wurde ebenfalls mit HindIII und NotI gespalten und in die offenen und dephosphorylierten Myc, HA und Flag pcDNA3.1(+) Vektoren über Nacht ligiert (Abbildung 51). Als Ligations- und Transformationskontrolle wurde eine *colony-PCR* durchgeführt. Die Aminosäuresequenz der pDNA des IL-6R<sub>GPI</sub> Myc, HA oder Flag in pcDNA3.1(+) wurde durch eine Sequenzierung bestätigt.



**Abbildung 51: Schematische Klonierungsübersicht.**

Die Aminosäuresequenzen für die extrazelluläre Domäne (EZD) des IL-6R und die des GPI-Ankers des CNTFR (GPI) Rezeptors wurden in einem Fragment in pcDNA3.1(+) Vektor von BioCat bestellt und mit den Enzymen EcoRV und NotI gespalten. Für die intrazelluläre Domäne des IL-6R wurde der, in der AG Scheller vorliegende IL-6R pcDNA3.1(+) Vektor mit den Enzymen EcoRV und NotI gespalten. Das Insert EZD-IL-6R\_GPI wurde in den IL-6R pcDNA3.1(+) Vektor ligiert. Der von BioCat bestellte pcDNA3.1(+) Vektor mit den *Tags* Myc-, Flag- und HA wurde mit den Enzymen HindIII und NotI gespalten und dephosphoryliert. Die Plasmid-DNA (pDNA) des pcDNA3.1(+)-IL-6R<sub>GPI</sub> wurde mit den Restriktionsenzymen HindIII und NotI gespalten und in den Myc, Flag und HA pcDNA3.1(+) Vektor ligiert. Die Aminosäuresequenz der klonierten pDNA des IL-6R<sub>GPI</sub>/Myc/Flag oder HA wurde durch eine Sequenzierung bestätigt.

Aminosäuresequenz des IL-6R<sub>GPI</sub>Flag

MLAVGCALLAALLAAPGAALAPRRCPAQEVARGVLTSLPGDSVTLTCPG **Signalpeptid**  
 VEPEDNATVHWVLRKPAAGSHPSRWAGMGRRLLLRSVQLHDSGNYSYR  
 AGRPAGTVHLLVDVPPEEPQLSCFRKSPNSVCEWGPRSTPSLTTKAV  
 LLVRKFQNSPAEDFQEPQYSQESQKFSCQLAVPEGDSSFYIVSMCVAS  
 SVGSKFSKTQTFQCGILQPDPPANITVTAVARNPRWLSVTWQDPHSWN  
 SSFYRLRFELRYRAERSKTFTTWMVKDLQHHCVIHDAWSGLRHVVQLRA  
 QEEFGQGEWSEWSPEAMGTPWTESRSPPAENEVSTPMQALTTNKDDDNI  
 LFRDSANATSLPVQDSSSVPLP**YTACDLAPPAGTTDAAHPGRSVVPALL** **GPI-Sequenz**  
**PLLAGTLLLLLETATAPAAADYKDHDGDYKDHDIDYKDDDDK** **3xFlag-Tag**

Aminosäuresequenz des IL-6R<sub>GPI</sub>Myc

MLAVGCALLAALLAAPGAALAPRRCPAQEVARGVLTSLPGDSVTLTCPG **Signalpeptid**  
 VEPEDNATVHWVLRKPAAGSHPSRWAGMGRRLLLRSVQLHDSGNYSYR  
 AGRPAGTVHLLVDVPPEEPQLSCFRKSPNSVCEWGPRSTPSLTTKAV  
 LLVRKFQNSPAEDFQEPQYSQESQKFSCQLAVPEGDSSFYIVSMCVAS  
 SVGSKFSKTQTFQCGILQPDPPANITVTAVARNPRWLSVTWQDPHSWN  
 SSFYRLRFELRYRAERSKTFTTWMVKDLQHHCVIHDAWSGLRHVVQLRA  
 QEEFGQGEWSEWSPEAMGTPWTESRSPPAENEVSTPMQALTTNKDDDNI  
 LFRDSANATSLPVQDSSSVPLP**YTACDLAPPAGTTDAAHPGRSVVPALL** **GPI-Sequenz**  
**PLLAGTLLLLLETATAPAAAQKLISEEDLNGAVE** **Myc-Tag**

Aminosäuresequenz des IL-6R<sub>GPI</sub>HA

MLAVGCALLAALLAAPGAALAPRRCPAQEVARGVLTSLPGDSVTLTCPG **Signalpeptid**  
 VEPEDNATVHWVLRKPAAGSHPSRWAGMGRRLLLRSVQLHDSGNYSYR  
 AGRPAGTVHLLVDVPPEEPQLSCFRKSPNSVCEWGPRSTPSLTTKAV  
 LLVRKFQNSPAEDFQEPQYSQESQKFSCQLAVPEGDSSFYIVSMCVAS  
 SVGSKFSKTQTFQCGILQPDPPANITVTAVARNPRWLSVTWQDPHSWN  
 SSFYRLRFELRYRAERSKTFTTWMVKDLQHHCVIHDAWSGLRHVVQLRA  
 QEEFGQGEWSEWSPEAMGTPWTESRSPPAENEVSTPMQALTTNKDDDNI  
 LFRDSANATSLPVQDSSSVPLP**YTACDLAPPAGTTDAAHPGRSVVPALL** **GPI-Sequenz**  
**PLLAGTLLLLLETATAPAAAYPYDVPDYAGYPYDVPDYAGSYPYDVPDYA** **3xHA-Tag**

11.1.9 gp130<sub>D1-3</sub>Myc

Als Vorlage für die Rezeptormutante gp130<sub>D1-3</sub> diente die Codon-optimierte Aminosäuresequenz von UniProt (P40189, IL-6RB\_HUMAN). Die pDNA des gp130 befand sich bereits in einen pcDNA3.1(+) Myc-, beziehungsweise Flag Vektor und lag in der AG Scheller vor. Um die Domänen D4-6 (A324-F613) des gp130 mittels PCR zu deletieren, wurden Oligonukleotide auf der Internetseite <https://nebbasechangerv1.neb.com/> designt. Mit Hilfe dieser Oligonukleotide (*forward*: CATCACCTACGAGGACAGACCCCTCTAAG, *reverse*: CGGGTCCCCTCTAGCTC) und des Q5® Site-Directed Mutagenesis Kit (New England Biolabs®), wurden chemisch kompetente *E.coli* XL-1 blue Zellen mit dem DpnI verdauten,

zierkulären PCR-Produkt transformiert (siehe 4.1.8, Abbildung 52). Mit den, auf den Agarplatten gewachsenen Bakterienkolonien wurde eine *colony*-PCR zur Überprüfung der Transformation, durchgeführt (siehe 4.1.8). Die Sequenz der pDNA des gp130<sub>D1-3</sub> in pcDNA3.1-Zeo(+)-Myc und Flag Vektor wurde durch eine Sequenzierung bestätigt.



**Abbildung 52:** Schematische Übersicht über das Klonierungsschema des gp130<sub>D1-3</sub>.

Als Vorlage für die gp130<sub>D1-3</sub> Mutante diente die Aminosäuresequenz des gp130, welche sich in der pcDNA3.1-Zeo(+) mit Myc- oder einem Flag-Tag in der AG Scheller befand. Mittels spezifischer Oligonukleotide und des Q5® *Site-Directed Mutagenesis Kit* (New England Biolabs®) erfolgte die Transformation der *E.coli XL-1 blue* Zellen mit dem amplifizierten, zirkulären und DpnI verdauten PCR-Produkt. Die Aminosäuresequenz der klonierten pDNA wurde durch eine Sequenzierung bestätigt.

### Aminosäuresequenz gp130<sub>D1-3</sub>

MLTLQTWLVQALFIFLTTTESTG	ELLDPCGYISPE	SPVVQLHSNFTAVCV	Signalpeptid
LKEKCMDYFHVNANYIVWKT	NHFTIPKEQYTI	INRTASSVTF	D1 gp130
IQLTCNILTFGQLEQN	VYGITIIISGLPPEKPKNL	SCIVNEGKKMRCEWD	D2 gp130
RGRETHLETNFTL	KSEWATHKFADCKAKRDTPT	SCTVDYSTVYFVNIEV	
WVEAENALGKVTSDH	INFDPVYKVKPNPPHNL	SVINSEELSSILKLTWT	D3 gp130
NPSIKSVIILKYNIQYR	TKDASTWSQIPPEDTASTR	SSFTVQDLKPFTE	
YVFRIRCMKEDGKGY	WSDWSEEASGITAI	VVPVCLAFLLTLLGVLF	TMD gp130
CFNKRDLIKKHIWPNV	PDPSKSHIAQWSPHT	PPRHNFN	SKDQMYSDGNFTD
VSVVEIEANDKKPF	PEDLKS	LDLDFKKEKINTEGH	SSGIGGSSCMSSSRP
SISSDENESSQNTS	SSTVQYSTV	VHSGYRHQVPSVQV	FSRSEATQPLLD
SEERPEDLQLVDH	VDDGGDILPRQQY	FKQNC	QHESPDISHFERSKQV
SSVNEEDFVRLKQ	QISDHISQCGSGQ	KMFQEVSAADAF	GPTEGQVE
RFETVGMEAATDE	GMPKSYLPQTVRQ	GGYMPQAAA	EQKLISEEDLNGAV
E			Myc-Tag

#### 11.1.10 gp130<sub>D2-3</sub>

Als Vorlage für die Rezeptormutante gp130<sub>D2-3</sub> diente die Aminosäuresequenz des gp130<sub>D1-3</sub> Rezeptors im Vektor pcDNA3.1(+)-Flag- /Myc. Um die Domänen D1 (D26-1120) des gp130 mittels PCR zu deletieren, wurden Oligonukleotide auf der Internetseite <https://nebbasechangerv1.neb.com/> designt. Mit Hilfe dieser Oligonukleotide (*forward*: GCCATCGTGGTGCCTGTG, *reverse*: CAGCAGCTCGCCGGTGCTC) und des Q5® *Site-Directed Mutagenesis Kit* (New England Biolabs®), wurden chemisch kompetente *E.coli XL-1 blue* Zellen mit dem DpnI verdauten, zirkulären PCR-Produkt transformiert (siehe 4.1.8). Mit den,

auf den Agarplatten gewachsenen Bakterienkolonien wurde eine *colony*-PCR zur Überprüfung der Transformation, durchgeführt (siehe 4.1.8, Abbildung 53). Die Sequenz der pDNA des gp130<sub>D2-3</sub> in pcDNA3.1-Zeo(+)-Myc und Flag Vektor wurde durch eine Sequenzierung bestätigt.



**Abbildung 53: Schematische Übersicht des Klonierungsschema des gp130<sub>D2-3</sub>.**

Als Vorlage für die gp130<sub>D2-3</sub> Mutante diente die Aminosäuresequenz des gp130<sub>D1-3</sub>, welche sich in der pcDNA3.1-Zeo(+)-Myc/Flag Vektor befand. Mittels spezifischer Oligonukleotide und des Q5® *Site-Directed Mutagenesis Kit* (New England Biolabs®) erfolgte die Transformation der *E. coli XL-1 blue* Zellen mit dem amplifizierten, zirkulären und DpnI verdauten PCR-Produkt. Die Aminosäuresequenz der klonierten pDNA wurde durch eine Sequenzierung bestätigt.

### Aminosäuresequenz gp130<sub>D2-3</sub>

MLTLQTWLVQALFIFLTTTESTGELLISGLPPEKPKNLS CIVNEGKKMRC **Signalpeptid**  
 EWDRGRETHLETNFTLKSEWATHKFADCKAKRDTPTSCTVDYSTVYFVN **D2 gp130**  
 IEVWVEAENALGKVTSDHINFDPVYKVKPNPPHNLSVINSEELSSILKL **D3 gp130**  
 TWTNPSIKSVIILKYNIQYRTKDASTWSQIPPEDTASTRSSFTVQDLKP **TMD gp130**  
 FTEYVFRIRCMKEDGKGYWSDWSEEASGITAIIVVPVCLAFLLTLLGVL  
 FCFNKRDLIKKHIWPNVPDPSKSHIAQWSPHTPPRHNFNSKDQMYSDGN  
 FTDVSVVEIEANDKKPFPELDKSLDLFKKEKINTEGHSSGIGSSCMSS  
 SRPSISSDENESSQNTSSTVQYSTVHSGYRHQVPSVQVFSRSEATQP  
 LLDSEERPEDLQLVDHVDGGDILPRQYFKQNCQHESSPDISHFERS  
 KQVSSVNEEDFVRLKQQISDHISQSCGSGQMFMFQEVSAADAFPGTEG  
 QVERFETVGMEEATDEGMPKSYLPQTVRQGGYMPQAAAEQKLISEEDLN **Myc-Tag**  
 GAVE

#### 11.1.11 gp130<sub>D1</sub>

Als Vorlage für die Rezeptormutante gp130<sub>D1</sub> diente die Aminosäuresequenz des gp130<sub>D1-3</sub>. Die pDNA der gp130 Mutante befand sich in einen pcDNA3.1(+) Myc/ Flag Vektor und lag in der AG Scheller vor. Um die D2 und D3 (P125-D234) mittels PCR zu deletieren, wurden Oligonukleotide auf der Internetseite <https://nebbasechangerv1.neb.com/> designt. Mit Hilfe dieser Oligonukleotide (*forward*: CATCACAATCGAATTCGGCCTGGCCATC, *reverse*: CCGTACACGTTCTGTTCC) und des Q5® *Site-Directed Mutagenesis Kit* (New England Biolabs®), wurden chemisch kompetente *E. coli XL-1 blue* Zellen mit dem DpnI verdauten, zirkulären PCR-Produkt transformiert (siehe 4.1.8). Mit den, auf den Agarplatten gewachsenen Bakterienkolonien wurde eine *colony*-PCR zur Überprüfung der Transformation durchgeführt

(siehe 4.1.8, Abbildung 54). Die Sequenz der pDNA des gp130<sub>D2-3</sub> in pcDNA3.1-Zeo(+)-Myc/ Flag Vektor wurde durch eine Sequenzierung bestätigt.



**Abbildung 54: Schematische Übersicht des Klonierungsschema des gp130<sub>D2-3</sub>.**

Als Vorlage für die gp130<sub>D1</sub> Mutante diente die Aminosäuresequenz des gp130<sub>D1-3</sub>, welche sich in der pcDNA3.1-Zeo(+)-Myc/Flag in der AG Scheller befand. Mittels spezifischer Oligonukleotide und des Q5<sup>®</sup> Site-Directed Mutagenesis Kit (New England Biolabs<sup>®</sup>) erfolgte die Transformation der *E.coli* XL-1 blue Zellen mit dem amplifizierten, zirkulären und DpnI verdauten PCR-Produkt. Die Aminosäuresequenz der klonierten pDNA wurde durch eine Sequenzierung bestätigt.

### Aminosäuresequenz gp130<sub>D1</sub>

MLTLQTWLVQALFIFLTTTESTGELLDPCGYISPESPVVQLHSNFTAVCV      Signalpeptid  
 LKEKCMDYFHVNANYIVWKTNHFTIPKEQYTIINRTASSVTF'TDIASLN      D1 gp130  
 IQLTCNILTFGQLEQNRYGITIISGLAIVVPVCLAFLLTTLGVLFCFN      TMD gp130  
 KRDLIKKHIWPNVPDPSKSHIAQWSPHTPPRHNFNSKDQMYSDGNFTDV  
 SVVEIEANDKKPFPEDLKSLDLFKKEKINTEGHSSGIGGSSCMSSSRPS  
 ISSSDENESSQNTSSSTVQYSTVVHSGYRHQVPSVQVFSRSEATQPLLDS  
 EERPEDLQLVDHVDGGDILPRQQYFKQNCQHESSPDISHFERSKQVS  
 SVNEEDFVRLKQQISDHISQSCGSGQMKMFQEVSAADAFGPGTEGQVER  
 FETVGMEEAATDEGMPKSYLPQTVRQGGYMPQAAA      3xFLAG-Tag  
 YKDDDDK

## 12. Eidesstattliche Versicherung

Hiermit versichere ich an Eides Statt, dass die her vorliegende Dissertation selbstständig und nur mit Hilfe der angegebenen Hilfsmittel und Quellen unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“ verfasst wurde. Alle Zitate sind gemäß §6 Abs. 7 MAPO kenntlich gemacht. Diese Dissertation wurde in der hier vorgelegten oder ähnlichen Form noch bei keiner anderen Institution eingereicht. Bisher wurden von mir keine erfolglosen Promotionsversuche unternommen.

Düsseldorf den 11 April 2024

-----

-----

Christiane Seibel

## 11. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich die Gelegenheit nutzen, um meinen aufrichtigen Dank an Herrn **Prof. Dr. Jürgen Scheller** auszusprechen, welcher mir die Möglichkeit zur Promotion am Institut für Biochemie und Molekularbiologie II gab. Insbesondere gilt mein Dank der exzellenten Betreuung, dem Freiraum auch eigene Ideen einbringen zu können und dem damit einhergehenden Vertrauen.

Bei Herrn **Prof. Dr. rer. nat. Matias Zurbriggen** möchte ich mich herzlich für die Übernahme des Zweitgutachters bedanken.

Ein großes Dankeschön geht an dieser Stelle an **Dr. PD Doreen M. Floss**, welche durch ihre andauernde Unterstützung, ihr Fachwissen und ihr offenes Ohr einen großen Anteil zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat. Vielen Dank für die Ratschläge, die konstruktiven Gespräche und die tolle Zusammenarbeit.

Bei **Petra Oprea-Jeremic** möchte ich mich ebenfalls für alle die nervigen Kleinigkeiten rund um den Laboralltag, welche sie für mich erledigt hat, bedanken. Zudem war sie mir ein großer Halt und durch ihre wundervolle freundliche, flippige Art ein richtiger Sonnenschein im Institut. Vielen Dank Feuerfuchs!

Meinem Verlobten **Puyan Rafii** danke ich von ganzem Herzen für seine Unterstützung durchzuhalten, wenn die Versuche mal wieder nicht so liefen wie erwartet, das Verständnis in stressigen Zeiten und für die Kraft welche du mir in dieser Zeit gegeben hast. Ich bin unglaublich froh dich an meiner Seite zu wissen. Danke!

Bei meinen Freunden **Sabrina Basler, Sean Noran** und **Denise Schäfer** bedanke ich mich für eure Freundschaft und die Unterstützung.

Meiner Familie **Cornelia und Uwe Seibel**, sowie meinem Bruder **Max** und meinem Onkel **Hubert Przyklenk** gilt mein tiefster Dank für ihre bedingungslose Unterstützung, Geduld und Liebe während dieser langen Zeit. Ihr habt mir den Rücken gestärkt und mich immer ermutigt.

In liebevoller Erinnerung an meine **Nana** möchte ich meine Dankbarkeit für ihre lebenslange Unterstützung, sowie ihre humorvolle, offene und direkte Art zum Ausdruck bringen, auch wenn sie physisch nicht mehr bei mir sein kann.