

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

Charakterisierung eines ELISA-Testsystems zur spezifischen
Quantifizierung von Interleukin (IL)-6/löslichen IL-6 Rezeptor
Transsignalingkomplexen

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin der Medizinischen
Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
(2024)

vorgelegt von
Rana Sadiq

2024

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. Med Nikolaj Klöcker

Erstgutachter/in: Prof. Dr. Jürgen Scheller

Zweitgutachter: PD Dr. med Oliver Sander

„Sei mutig und mächtige Kräfte kommen dir zur Hilfe.“

Basil King

**Für meine Eltern Shafiqurrahman und Banat und meine Geschwister
Sisai, Hosai und Wagma.**

Zusammenfassung

Charakterisierung eines ELISA-Testsystems zur spezifischen Quantifizierung von Interleukin (IL)-6/löslichen IL-6 Rezeptor Transsignalingkomplexen von Rana Sadiq

IL-6 ist ein körpereigenes Protein, das im Rahmen des Entzündungsgeschehens hochreguliert wird. Die Signaltransduktion von IL-6 wird über zwei Wege induziert. Während des *classic-signaling* bindet IL-6 an den membrangebundenen IL-6R, der sich auf Hepatozyten und einigen Leukozytenarten befindet. Der Komplex aus IL-6 und dem nicht signaltransduzierendem, membrangebundenen IL-6R, der α -Rezeptor, bildet einen Komplex mit dem signaltransduzierendem β -Rezeptor gp130. Dadurch werden verschiedene Signalwege eingeleitet. Durch das *classic-signaling* werden vor allem anti-inflammatorische Reaktionen hervorgerufen. Im Laufe des Entzündungsgeschehens werden aus dem membrangebundenen IL-6R immer größere Mengen des löslichen IL-6R (sIL-6R) gebildet. Dies geschieht zum größten Teil durch Ektodomänen-Shedding des membrangebundenen IL-6R (90%), ein geringerer Anteil des sIL-6R entsteht durch alternatives Splicing der mRNA des membrangebundenen IL-6R (10%). Der durch den sIL-6R induzierte Signalweg wird *trans-signaling* genannt und ruft zum größten Teil pro-inflammatorische Reaktionen hervor. Der Komplex aus IL-6 und dem sIL-6R kann durch den Inhibitor sgp130Fc gehemmt werden. In dieser Arbeit wurden verschiedene Methodiken verwendet, um den Komplex aus IL-6/sIL-6R zu untersuchen. Im Zuge dieser Untersuchungen wurde ein ELISA genutzt, der den IL-6/sIL-6R Komplex detektieren kann. Im Gegensatz zu diesem ELISA können bisher genutzte ELISA IL-6 und den sIL-6R nur einzeln detektieren, jedoch nicht als Komplex. In verschiedenen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass der IL-6/sIL-6R Komplex ELISA *in vitro* verwendet werden kann. Ausserdem wurde gezeigt, dass der IL-6/sIL-6R Komplex ELISA auch *in vivo* mit Blutseren von verschiedenen Probanden verwendet werden kann. Der IL-6/sIL-6R Komplex ELISA wurde im Kontext dieser Arbeit erstmals *in vivo* getestet. In einem zweiten Projekt wurde untersucht, ob es möglich ist, einen disulfid-gekoppelten Komplex aus IL-6 und dem sIL-6R zu bilden, der biologisch aktiv ist.

Summary

Characterization of an ELISA test system for the specific quantification of interleukin (IL)-6/soluble IL-6 receptor transsignaling complexes by Rana Sadiq

IL-6 is an endogenous protein, that is upregulated as part of the inflammatory process. IL-6 signaling is induced via two pathways. During classic signaling, IL-6 binds to the membrane-bound IL-6R found on hepatocytes and some types of leukocytes.

The complex of IL-6 and the non-signal-transducing, membrane-bound IL-6R, the α -receptor, forms a complex with the signal-transducing β -receptor gp130.

This initiates various signaling pathways. Above all, anti-inflammatory reactions are caused by the classic signaling. In the course of the inflammatory process, increasing amounts of the soluble IL-6R (sIL-6R) are formed from the membrane-bound IL-6R. This occurs mostly through ectodomain shedding of the membrane-bound IL-6R (90%), a smaller proportion of the sIL-6R arises through alternative splicing of the mRNA of the membrane-bound IL-6R (10%).

The signaling pathway induced by the sIL-6R is called trans signaling and elicits mostly pro-inflammatory responses. The complex of IL-6 and the sIL-6R can be inhibited by the inhibitor sgp130Fc. In this work different methodologies were used to study the IL-6/sIL-6R complex. In the course of these investigations, an ELISA was used that can detect the IL-6/sIL-6R complex. In contrast to this ELISA, previously used ELISAs can only detect IL-6 and the sIL-6R individually, but not as a complex. Various studies have shown that the IL-6/sIL-6R complex ELISA can be used *in vitro*. In addition, it was shown that the IL-6/sIL-6R complex ELISA can also be used *in vivo* with blood sera from different subjects. The IL-6/sIL-6R complex ELISA was tested *in vivo* for the first time in the context of this work. A second project investigated whether it is possible to form a disulfide-coupled complex between IL-6 and the sIL-6R that is biologically active.

Inhaltsverzeichnis

	Zusammenfassung (deutsch/englisch)	I
	Abbildungsverzeichnis	V
	Tabellenverzeichnis	VIII
1	Einleitung	1
1.1	Das pleiotrope Zytokin Interleukin 6	1
1.2	Die Signaltransduktion des Interleukin 6	2
1.3	Die Pathologie des Interleukin 6	7
2	Ziel dieser Arbeit	12
3	Material und Methoden	14
3.1	Material	14
3.1.1	Antibiotika	14
3.1.2	Antikörper	14
3.1.3	Chemikalien	15
3.1.4	Enzyme	16
3.1.5	Geräte	17
3.1.6	Größenmarker	18
3.1.7	KITs	18
3.1.8	Kulturmedien	18
3.1.8.1	Kulturmedien: Bakterien	18
3.1.8.2	Kulturmedien: Zellkultur	19
3.1.9	Oligonukleotide	19
3.1.10	Plasmide	20
3.1.11	Pufferzusammensetzung	20
3.1.12	Rekombinante Proteine	22
3.1.13	Verbrauchsmaterial	23
3.1.14	Zelllinien	23
3.2	Methoden	24
3.2.1	Molekularbiologische Methoden	24
3.2.1.1	DNA-Konzentrationsbestimmung	24
3.2.1.2	DNA-Präparation durch Mini-Präparation und Midi-Präparation	24
3.2.1.2.1	Mini-Präparation	24
3.2.1.2.2	Midi-Präparation	25
3.2.1.3	Kultivierung von Bakterien mittels Nährmedium und Agar-Platten	26
3.2.1.4	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	27
3.2.1.4.1	Gradienten-PCR	28
3.2.1.4.2	Zielgerichtete Mutagenese-PCR	29
3.2.1.5	DpnI-Verdau	30
3.2.1.6	Transformation des PCR-Produktes in chemisch kompetente	

Inhaltsverzeichnis

	XL1 blue-E. coli Stämme	30
3.2.1.7	Enzymatische Spaltung durch Restriktionsenzyme	31
3.2.1.7.1	Erstellung des s IL-6R aus mutiertem HIL-6 durch BamH1 Spaltung	31
3.2.1.8	Ligation von DNA-Fragmenten	32
3.2.1.9	DNA-Extraktion mittels Agarosegelelektrophorese	33
3.2.2	Zellkultur	34
3.2.2.1	Zellzahlbestimmung	34
3.2.2.2	Kultivierung von Suspensionszellen	34
3.2.2.3	Kultivierung von adhärenenten Zellen	35
3.2.2.4	Transfektion von adhärenenten Zellen	35
3.2.2.5	Steriles Filtrieren von Zellüberständen	36
3.2.2.6	Herstellung von Zelllysaten	36
3.2.2.7	Proliferationsassay	37
3.2.3	Immunbiochemische Methoden	37
3.2.3.1	Enzyme-Linked-Immunsorbent-Assay (ELISA)	37
3.2.3.1.1	Enzyme-Linked-Immunsorbent-Assay (ELISA): IL-6R ELISA	38
3.2.3.1.2	Enzyme-Linked-Immunsorbent-Assay (ELISA): IL-6/sIL-6R Komplex ELISA	39
3.2.3.2	SDS-Page	39
3.2.3.3	Western Blot	40
4	Ergebnisse	43
4.1	Transfektion von COS-7-Zellen mit cDNAs für IL-6-GFP	43
4.2	Mutagenese-PCR	46
4.3	Erstellung des sIL-6R aus mutiertem HIL-6 durch BamHI-Verdau	50
4.4	Erstellung des mutierten sIL-6R durch PCR	52
4.5	Transfektion von COS-7- und HEK-293-Zellen	52
4.6	Biologische Aktivität der mutierten Zytokine	60
4.7	Funktionsweise des IL-6/sIL-6R Komplex ELISAs	64
4.8	Durchführung des IL-6/sIL-6R Komplex ELISAs mit IL-6, dem sIL-6R und HIL-6	65
4.9	IL-6/sIL-6R Komplex ELISA mit IL-6/Konzentrationen von sIL-6R	69
4.10	Durchführung des IL-6/sIL-6R Komplex ELISAs mit Blutserum Ethical approval	72 77
5	Diskussion	78
5.1	IL-6/sIL-6R Komplex ELISA	78
5.2	Bildung eines stabilen IL-6/sIL-6R Komplexes	80
6	Schlussfolgerung	82
7	Literaturverzeichnis	84
8	Anhang	91

Inhaltsverzeichnis

8.1	Abkürzungsverzeichnis	91
8.2	Plasmidkarten	94
8.3	Danksagung	117

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.2.1	Aufbau des IL-6/IL-6R/gp130 Komplexes	3
Abb. 1.2.2	<i>classic-signaling</i> und <i>trans-signaling</i> im Vergleich	5
Abb. 1.2.3	Generierung des sIL-6R	7
Abb. 2.1	Aufbau des Designer Zytokins HIL-6	13
Abb. 3.2.3.1	Proteintransfer des Acrylamid Gels auf die PVDF-Membran	41
Abb. 4.A	Western Blot zur Detektion von GFP mit Zelllysaten von IL-6 GFP transfizierten COS-7-Zellen	43
Abb. 4.B	Western Blot zur Detektion von IL-6 mit untransfizierten COS-7-Zellen	43
Abb. 4.C	Western Blot zur Detektion von IL-6 mit Zelllysaten von pGFP transfizierten COS-7-Zellen	43
Abb. 4.D	Western Blot zur Detektion von IL-6 mit Zelllysaten von IL-6 GFP transfizierten COS-7-Zellen	43
Abb. 4.1.4	IL-6 GFP-Fusionsprotein	44
Abb. 4.1.5	Proliferationsassay mit Ba/F3-gp130-Zellen und Ba/F3-gp130-IL-6R-Zellen	45
Abb. 4.2.1	Ablauf der Mutagenese-PCR	47
Abb. 4.2.2 A, I und 4.2.2 B, II	Disulfidbrückenbildung über Cysteine	47
Abb. 4.3.1 A	Restriktionsverdau mittels BamHI	51
Abb. 4.3.1 B	Die mutierten sIL-6R Varianten	51
Abb. 4.5.1	Zelllysate: mutiertes IL-6 GFP + mutierter IL-6R (Transfektion 1)	54
Abb. 4.5.2	Überstand: mutiertes IL-6 GFP + mutierter IL-6R (Transfektion 1)	54
Abb. 4.5.3	Zelllysate: mutiertes IL-6 GFP + mutierter IL-6R (Transfektion 2)	55

Abbildungsverzeichnis

Abb. 4.5.4	Überstand: mutiertes IL-6 GFP + mutierter IL-6R (Transfektion 2)	55
Abb. 4.5.5	Zelllysate: mutiertes IL-6 GFP + mutierter IL-6R (Transfektion 3)	55
Abb. 4.5.6	Überstand: mutiertes IL-6 GFP + mutierter IL-6R (Transfektion 3)	55
Abb. 4.5.7	Zelllysate: mutiertes IL-6 GFP + mutierter IL-6R (Transfektion 4)	55
Abb. 4.5.8	Überstand: mutiertes IL-6 GFP + mutierter IL-6R (Transfektion 4)	55
Abb. 4.5.9 und 4.5.10	Zelllysate und Überstand: mutierter siL-6R (42 AS Überhang) + mutiertes IL-6 GFP (Transfektion 1)	57
Abb. 4.5.11 und 4.5.12	Zelllysate und Überstand: mutierter siL-6R (42 AS Überhang) + IL-6-GFP Wildtyp (Transfektion 2)	57
Abb. 4.5.13 und 4.5.14	Zelllysate und Überstand: mutierter siL-6R (17 AS Überhang) + mutiertes IL-6 GFP (Transfektion 3)	57
Abb. 4.5.15 und 4.5.16	Zelllysate und Überstand: mutierter siL-6R (17 AS Überhang) + IL-6 GFP Wildtyp (Transfektion 4)	58
Abb. 4.5.17 und 4.5.18	Zelllysate und Überstand: mutierter siL-6R (PCR) + mutiertes IL-6 GFP (Transfektion 5)	58
Abb. 4.5.19 und 4.5.20	Zelllysate und Überstand: mutierter siL-6R (PCR) + IL-6 GFP Wildtyp (Transfektion 6)	58
Abb. 4.5.21 und 4.5.22	Zelllysate und Überstand: mutiertes HIL-6 (Transfektion 7)	58
Abb. 4.5.23 und 4.5.24	Zelllysate und Überstand: HIL-6 Wildtyp (Transfektion 8)	58
Abb. 4.6.1	Proliferationsassay in Ba/F3-gp130-Zellen zur Kontrolle der biologischen Aktivität der mutierten Zytokine	62
Abb. 4.6.2	Proliferationsassay in Ba/F3-gp130-Zellen zur Kontrolle der biologischen Aktivität der Co-Transfektionen	63
Abb. 4.7.1	IL-6/siL-6R Komplex ELISA	64
Abb. 4.8.1	IL-6/siL-6R Komplex ELISA mit IL-6	67
Abb. 4.8.2	IL-6/siL-6R Komplex ELISA mit siL-6R	67
Abb. 4.8.3	IL-6/siL-6R Komplex ELISA mit HIL-6	67

Inhaltsverzeichnis

Abb. 4.9.1	IL-6/sIL-6R Komplex ELISA mit HIL-6	70
Abb. 4.9.2	IL-6/sIL-6R Komplex ELISA mit IL-6 + 10 ng/ml sIL-6R	70
Abb. 4.9.3	IL-6/sIL-6R Komplex ELISA mit IL-6 + 50 ng/ml sIL-6R	70
Abb. 4.10.1	IL-6R ELISA mit HIL-6	73
Abb. 4.10.2	IL-6R ELISA mit Blutseren	73
Abb. 4.10.3	Messwerte des IL-6/sIL-6R Komplex ELISAs mit HIL-6	74
Abb. 4.10.4	Messwerte des IL-6/sIL-6R Komplex ELISAs für die Proben 1 – 4 (Blutseren) in unverdünnter Form	74
Abb. 8.2.1	Plasmidkarte pcDNA3.1-hIL-6R	94
Abb. 8.2.2	Plasmidkarte pcDNA3.1-HIL-6-Fc	97
Abb. 8.2.3	Plasmidkarte pcDNA3.1-IL-6 GFP	100
Abb. 8.2.4	Plasmidkarte pcDNA3.1-sIL-6R	103
Abb. 8.2.5	Plasmidkarte pcDNA3.1-Hyper-IL-6-Fc SeqL1 (+ 42 AS)	106
Abb. 8.2.6	Plasmidkarte pcDNA3.1-Hyper-IL-6-Fc SeqL2 (+ 17 AS)	109
Abb. 8.2.7	Plasmidkarte pcDNA3.1-sIL-6R (aus PCR)	112
Abb. 8.2.8	Alignment des mutierten sIL-6R (aus PCR) und des mutierten sIL-6R aus BamHI-Verdau (+ 42 AS Überhang)	115
Abb. 8.2.9	Alignment des mutierten sIL-6R (aus PCR) und des mutierten sIL-6R aus BamHI-Verdau (+ 17 AS Überhang)	115
Abb. 8.2.10	Alignment des mutierten sIL-6R aus BamHI-Verdau (+ 17 AS Überhang) und des mutierten sIL-6R aus BamHI-Verdau (+ 42 AS Überhang)	116

Tabellenverzeichnis

Tabelle 3.1.1	Verwendete Antibiotika	14
Tabelle 3.1.2	Primäre und sekundäre Antikörper	14
Tabelle 3.1.3	Verwendete Chemikalien	15
Tabelle 3.1.4	Verwendete Enzyme	16
Tabelle 3.1.5	Verwendete Geräte	17
Tabelle 3.1.6	Verwendete Größenmarker	18
Tabelle 3.1.7	Verwendete KITS	18
Tabelle 3.1.8.1	Kulturmedien (Bakterien)	18
Tabelle 3.1.8.2	Kulturmedien (Zellkultur)	19
Tabelle 3.1.9	Oligonukleotide	19
Tabelle 3.1.10	Verwendete Plasmide	20
Tabelle 3.1.11	Pufferzusammensetzung	20
Tabelle 3.1.12	Rekombinante Proteine	22
Tabelle 3.1.13	Verbrauchsmaterial	23
Tabelle 3.1.14	Zelllinien	23
Tabelle 3.2.1.4	Ablauf einer Standard-PCR	27
Tabelle 3.2.1.4.1	Annealing-Temperaturen der Gradienten-PCR	28
Tabelle 3.2.1.4.1.2	Ansatz der Gradienten-PCR	28
Tabelle 3.2.1.4.1.3	PCR-Programm der Gradienten-PCR	28
Tabelle 3.2.1.4.2	Ansätze für Mutagenese-PCR	29
Tabelle 3.2.1.4.2.1	Programm für Mutagenese-PCR	30
Tabelle 3.2.1.5	DpnI-Verdau	30
Tabelle 3.2.1.8	Ansatz für die Testspaltung	33

Tabellenverzeichnis

Tabelle 3.2.1.8.1	Ligationsansatz mit Insert aus Gradienten-PCR	33
Tabelle 3.2.2.4	Transfektionsansatz für adhäre Zellen	35
Tabelle 3.2.3.2	Inhaltsangaben zu Trenngel und Sammelgel	40
Tabelle 4.6.1	RLU in Proliferationsassays mit Ba/F3-gp130	62
Tabelle 4.1.1	Messwerte des IL-6/sIL-6R Komplex ELISAs für HIL-6	43
Tabelle 4.6.1	Messwerte des IL-6/sIL-6R Komplex ELISAs für IL-6 + 10 ng/ml sIL-6R und IL-6 + 50 ng/ml sIL-6R	62
Tabelle 4.6.1.2	RLU in Proliferationsassays mit Ba/F3-gp130-Zellen mit Co-Transfektionen	64
Tabelle 4.8.1	Rohwerte der Messwerte des IL-6/sIL-6R Komplex ELISAs in RLU für IL-6, sIL-6R und HIL-6	68
Tabelle 4.8.2	Messwerte des IL-6/sIL-6R Komplex ELISAs in RLU für IL-6, sIL-6R und HIL-6	68
Tabelle 4.9.1	Rohwerte der Messwerte des IL-6/sIL-6R Komplex ELISAs in RLU für HIL-6, IL-6 + 10 ng/ml sIL-6R und IL-6 + 50 ng/ml sIL-6R	71
Tabelle 4.9.2	Messwerte des IL-6/sIL-6R Komplex ELISAs für HIL-6	71
Tabelle 4.9.3	Messwerte des IL-6/sIL-6R Komplex ELISAs für IL-6 + 10 ng/ml s IL-6R und IL-6 + 50 ng/ml s IL-6R	72
Tabelle 4.10.1	Messwerte des IL-6/sIL-6R Komplex ELISAs für HIL-6	74
Tabelle 4.10.2	Messwerte des IL-6/sIL-6R Komplex ELISAs für die Proben 1 - 4 (Blutseren) in den Verdünnungen 1:25 Und 1:40	74
Tabelle 4.10.3	Messwerte des IL-6/sIL-6R Komplex ELISAs für HIL-6	75
Tabelle 4.10.4	Messwerte des IL-6/sIL6R-Komplex ELISAs für die Proben 1-4 (Blutseren) in unverdünnter Form	75

1 Einleitung

1.1 Das pleiotrope Zytokin Interleukin 6

Zytokine sind kleine, vielfach glykosylierte Proteine, die in verschiedene Klassen unterteilt werden. Hierzu gehören Interleukine (IL), Interferone, Wachstumsfaktoren und Chemokine (Scheller *et al.* 2011). Sie nehmen eine wichtige Funktion während Entzündungsprozessen ein und beeinflussen Proliferation und Differenzierung von Zielzellen. Zur Gruppe der Interleukine gehören unter anderem IL-6, IL-11, IL-27, IL-31, Leukämie inhibierender Faktor (LIF), Oncostatin M (OSM) und der *ciliar neutotrophic factor* (CNTF) (Heinrich *et al.* 2003, Scheller *et al.* 2006).

Im Rahmen dieser Arbeit ist im speziellen das Interleukin IL-6 von essentieller Bedeutung. Es handelt sich um ein pro-inflammatorisches Zytokin, das in Entzündungsprozessen eine besondere Rolle aufweist. Das Protein IL-6 ist glykosyliert, besteht aus 184 Aminosäuren, ist 21 – 28 kDa groß und wird aus 4 α -Helices gebildet. Die 4 α -Helices lagern sich zu einem Bündel mit einer up-up-down-down Topologie zusammen (Hammacher *et al.* 1994). Zur Bindung an den IL-6 Rezeptor (IL-6R) + Glykoprotein 130 (gp130) besitzt IL-6 drei Bindungsstellen. IL-6 wird von vielen verschiedenen Zellen produziert, wie z.B. Fibroblasten, Endothelzellen oder Tumorzellen. Des Weiteren ist es im Blut gesunder Mensch kaum detektierbar, die Menge liegt unter Normalbedingungen zwischen 2 - 6 pg/ml (Scambia *et al.* 1994), steigt jedoch bei Entzündung. In der Leber induziert IL-6 die Akut-Phase-Reaktion (APR) und die Bildung von APR-Proteinen, die mit Entzündungen assoziiert sind (Muraguchi *et al.* 1987) Zudem besitzt IL-6 Einfluss auf B-Zellen, indem es die Differenzierung zu Plasmazellen und die Produktion von Immunglobulinen steuert (Muraguchi *et al.* 1988). Neben diesen pro-inflammatorischen Eigenschaften besitzt IL-6 auch anti-inflammatorische Eigenschaften, wie die Anregung der intestinalen Epithelzellen und die Hemmung der Apoptose dieser Epithelzellen (Scheller *et al.* 2011). IL-6 kann verschiedene Signalwege auslösen. Diese werden ausgelöst, indem IL-6 entweder an einen membranständigen IL-6R (IL-6R) oder einen löslichen IL-6R (sIL-6R) bindet. Die unterschiedlichen Signalwege werden im folgenden Abschnitt näher erläutert.

1.2 Die Signaltransduktion des Interleukin 6

Die IL-6 Signaltransduktion erfolgt über zwei Arten von Rezeptoren: den membranständigen IL-6R und den löslichen sIL-6R. Die Signaltransduktion über den membranständigen IL-6R wird *classic-signaling* genannt. Das *classic-signaling* von IL-6 erfolgt durch einen Komplex, der aus dem nicht-signaltransduzierendem IL-6R (α -Rezeptor) und dem signaltransduzierenden β -Rezeptor Glykoprotein 130 (gp130) besteht. Der glykolysierte IL-6R ist ca. 80 kDa groß und gehört zur Klasse der Typ-I-Rezeptoren. Diese Rezeptorfamilie umfasst Rezeptoren für IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IL-11, IL-12, IL-15, Erythropoetin (EPO), den Granulozyten Kolonie-stimulierenden Faktor (G-CSF), den Granulozyten-Makrophagen Kolonie-stimulierenden Faktor (GM-CSF), den Leukämie inhibierenden Faktor (LIF), Oncostatin M (OSM), Cardiotrophin-I (CT-1), den ziliaren neurotrophen Faktor (CNTF), Thrombopoetin (TPO) und Leptin (Sprecher *et al.* 1998). Der IL-6R ist ein Typ-I Transmembranprotein und besteht aus drei extrazellulären Domänen (D1-D3). Die D1-Domäne ist eine Ig-ähnliche Domäne, die Fibronectin Domänen 2 und 3 enthalten Zytokin-Bindemotive (CBM). Des Weiteren besteht der IL-6R aus einer Stalk-Region, dessen Aufgabe darin besteht, den Abstand zwischen den drei extrazellulären Domänen und der Membran aufzubauen. Der weitere Bestandteil des IL-6R ist die transmembranäre und die intrazelluläre Domäne. IL-6 wiederum besitzt drei verschiedene Bindungsstellen, die erste Bindungsstelle bindet an das CBM des IL-6R, während die Bindungsstellen 2 und 3 an das signaltransduzierende gp130 binden (Baran *et al.* 2013). Nur der Komplex aus IL-6/IL-6R führt zur Homodimerisierung von zwei gp130-Glykoproteinen und damit zur Signaltransduktion, da weder IL-6, noch der IL-6R einzeln eine Affinität zu dem gp130-Glykoprotein besitzen (Jostock *et al.* 2001).

Einleitung

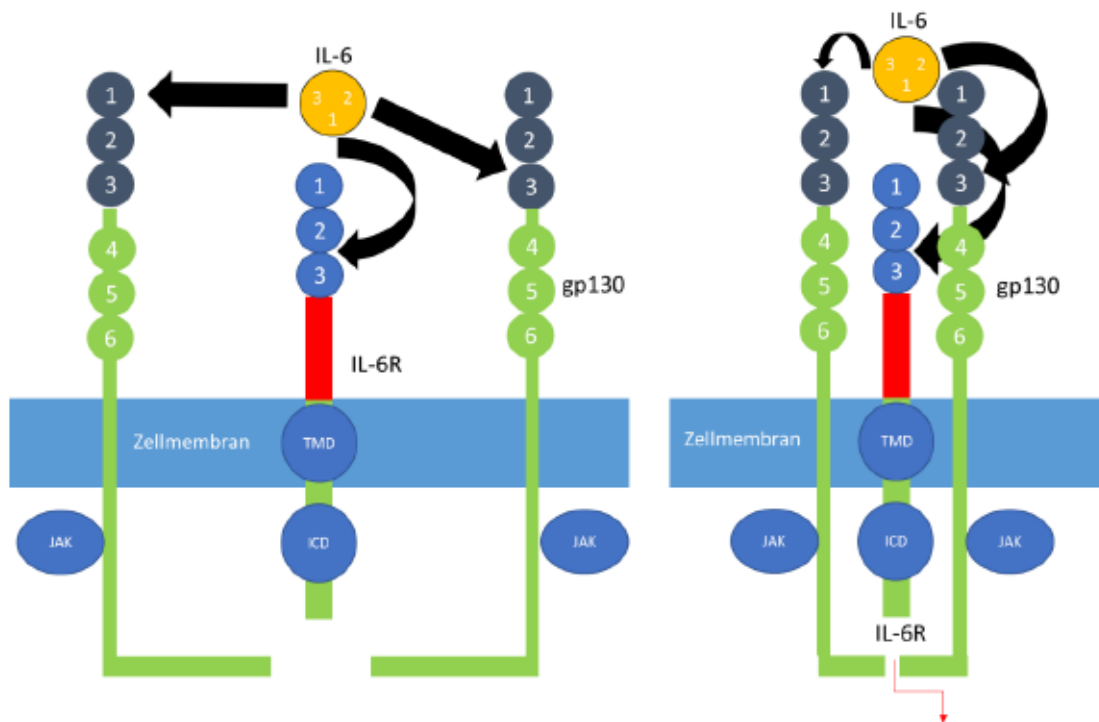


Abb. 1.2.1: Aufbau des IL-6/IL-6R/gp130 Komplexes. Der membranständige IL-6R besteht aus einer intrazellulären Domäne (ICD), einer Transmembrandomäne (TMD), einer Stalk-Region (in der Abbildung rot dargestellt, nähere Erläuterung siehe Abb. 1.2.3) und drei extrazellulären Domänen. Das signaltransduzierende gp130 besteht aus drei Domänen, die mit dem IL-6 interagieren. Ebenso besteht IL-6 aus drei Domänen, die sowohl die Bindung an das signaltransduzierende gp130, als auch die Bindung an den membranständigen IL-6R bewirken. Die Bindungsstelle 1 des IL-6 bindet an die Domänen zwei und drei des membranständigen IL-6R. Durch diesen Mechanismus wird eine Homodimerisierung von zwei gp130 Molekülen bewirkt (rechte Grafik). Die Bindungsstelle 2 des IL-6 bindet daraufhin an die Domänen zwei und drei des gp130, die Bindungsstelle 3 des IL-6 bindet an die Domäne 1 des gp130. Der entstandene Komplex aus IL-6/IL-6R/gp130 führt im weiteren Verlauf zur Signaltransduktion (roter Pfeil in rechter Grafik).

Während gp130 ubiquitär vorkommt, befindet sich der IL-6R nur auf Hepatozyten, Makrophagen, Monozyten und neutrophilen Granulozyten (Chalaris *et al.* 2011). Es können verschiedene Signalwege durch gp130 aktiviert werden: der JAK/STAT-Signalweg, der *mitogen activated protein kinase* Signalweg (MAPK) oder der *phosphatidyl-inositol-3-kinase* Signalweg (PI3K). Nachdem sich der Komplex aus IL-6, sIL-6R und dem gp130-Dimer geformt hat, wird vor allem der JAK/STAT-Signalweg aktiviert. Durch Aktivierung von gp130 (Guschin *et al.* 1995) wird eine Janus-Kinase (JAK) aktiviert, die zur Familie der Rezeptortyrosinkinasen gehört. Zu dieser

Einleitung

Kinasefamilie gehören JAK1, JAK2 und Tyk2. Nach Aktivierung phosphorylieren die JAKs Tyrosinrezeptormotive des Glykoproteins gp130 (Eulenfeld *et al.* 2012), und nachfolgend verschiedene *signal transducer and activator of transcription* Proteine (STAT) durch eine Phosphorylierung. Die phosphorylierten STAT-Proteine bilden Homo- bzw. Heterodimere und translozieren in den Zellkern und aktivieren bestimmte Zielgene durch die Bindung an Zielpromotoren mittels spezifischer Bindungsstellen (Sekimoto *et al.* 1997). Der JAK/STAT-Signalweg kann wiederum durch *protein-inhibitor-of-activated-STAT* Proteine (PIAS) inhibiert werden. Zu der Familie der PIAS-Proteine gehören fünf Proteine: PIAS1, PIAS3, PIAS α , PIAS, PIAS β und PIAS γ (Heinrich *et al.* 2003). Die PIAS Proteine inhibieren verschiedene Stellen des JAK/STAT-Signalweges. PIAS1 inhibiert die DNA-Bindung der aktivierten STAT1 Proteine und daraufhin die durch STAT1 hervorgerufene Geninduktion (Liu *et al.* 1998). Neben den PIAS Proteinen kann der JAK/STAT-Signalweg auch durch *suppressor-of-cytokine-signaling* Proteine (SOCS) inhibiert werden. Zu den SOCS Proteinen gehören die *cytokine inducible SH2* Proteine (CISs) und die *STAT-induced STAT inhibitors* (SSIs). Diese Proteine beinhalten eine SH2-Domäne und eine C-terminale Domäne (Heinrich *et al.* 2003). SOCS Proteine gehören zur Familie der Feedback Inhibitoren, da sie durch den JAK/STAT-Signalweg induziert werden. Jedoch inhibieren die SOCS Proteine ebenso wie die PIAS-Proteine an unterschiedlichen Stellen des JAK/STAT-Signalweges. CIS Proteine konkurrieren mit STAT5 Proteinen um Kontaktflächen des Erythropoetin Rezeptors (EpoR) (Matsumoto *et al.* 1997, Verdier *et al.* 1998). SOCS3 Proteine binden an gp130 und können somit die Aktivierung von gp130 inhibieren (Schmitz *et al.* 2000; Nicholson *et al.* 2000). Außerdem binden SOCS3 Proteine genauso wie SOCS1 Proteine mittels ihrer SH2-Domäne an den Schleifenbereich der JAK-Proteine, die für die Aktivierung zuständig sind (Sasaki *et al.* 1999, Sasaki *et al.* 2000).

Die weiteren Signalwege MAPK und PI3K werden durch das SHP2 bindende Phosphotyrosin Y759 aktiviert (Fuhrer *et al.* 1995). Nach der Aktivierung der verschiedenen Signalwege wird wiederum die Transkription der jeweiligen Zielgene aktiviert. Das Protein SHP2 aktiviert über dasselbe Motiv den MAPK-Signalweg. Durch

Einleitung

diese verschiedenen Funktionen dieses Motivs wird das Gleichgewicht zwischen MAPK und JAK/STAT-Signalweg aufrechterhalten (Eulenfeld *et al.* 2012).

Neben dem *classic-signaling* über den membranständigen IL-6/IL-6R Komplex, ist eine weitere Form der Signalaktivierung beschrieben: der Trans-Signalweg (*trans-signaling*). Das *trans-signaling* besteht aus einem Komplex aus IL-6 und der löslichen Form des IL-6R (sIL-6R). IL-6 bindet mit gleicher Affinität an den sIL-6R wie an den IL-6R (Rose-John *et al.* 1994). Der IL-6R wird nur von einer geringen Anzahl an Zielzellen exprimiert, unter anderem Hepatozyten, B-Zellen, einigen T-Zellen und Makrophagen (Chalaris *et al.* 2011), wohingegen gp130 von allen Zellen ubiquitär exprimiert wird (Garbers *et al.* 2012). Somit beschränkt sich das *classic-signaling* nur auf den Anteil der Zellen, die den IL-6R exprimieren. Das *trans-signaling* kann in allen Zellen hervorgerufen werden (Rose-John *et al.* 1994).

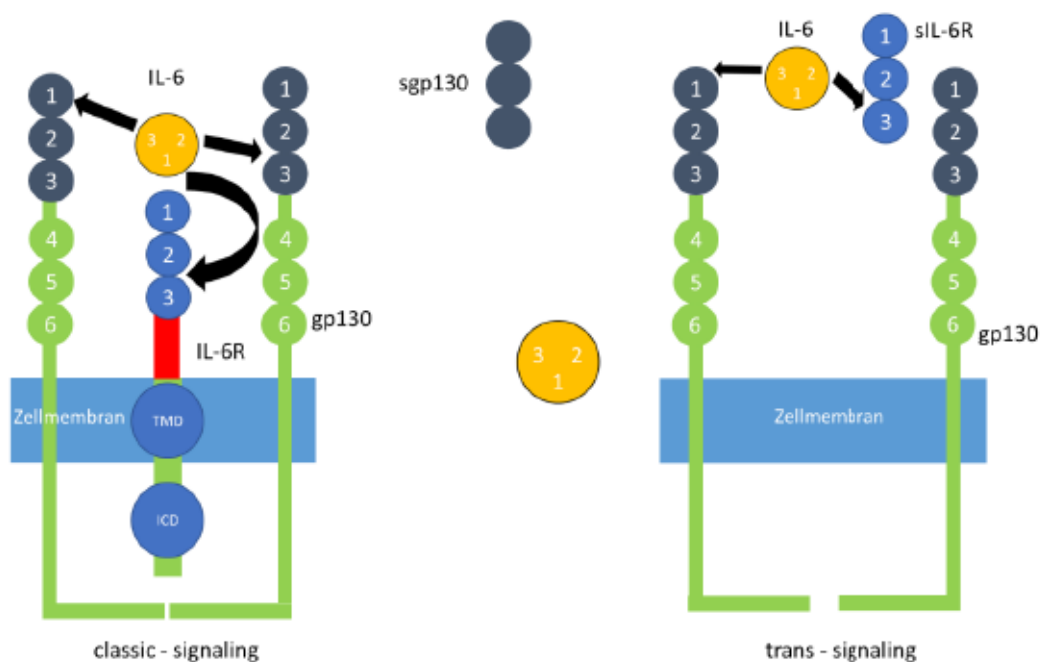


Abb. 1.2.2: *classic-signaling* und *trans-signaling* im Vergleich. Während des *classic-signaling*s bindet das Zytokin IL-6 an den membranständigen IL-6R. Dieser wird nicht ubiquitär exprimiert. Er wird auf Zellen wie Hepatozyten und Leukozyten exprimiert. Nachdem sich der membranständige Komplex aus IL-6/IL-6R gebildet hat, folgt die Bindung des Komplexes an gp130. Daraufhin wird vor allem der JAK/STAT-Signalweg aktiviert. Während des *trans-signaling*s bindet IL-6 an den sIL-6R, der hauptsächlich durch Shedding des membranständigen IL-6R im Bereich der Stalk-Region (rot dargestellt) durch die ADAM-Proteasen 10 und 17 entsteht (siehe Abb. 1.2.3). Dieser Signalweg kann durch Bindung des natürlich vorkommenden Inhibitors sgp130 oder des Fusionsprotein sgp130Fc an den IL-6/sIL-6R

Einleitung

Komplex gehemmt werden. Begriffserläuterungen: ICD=intrazelluläre Domäne, TMD=Transmembrandomäne, Nummerierung 1-3=Domänen 1-3

Der sIL-6R entsteht durch zwei unterschiedliche Mechanismen: überwiegend durch Ektodomänen-Shedding (90%) des IL-6R durch *A Disintegrin And Metalloproteinasen* (ADAM-Proteasen) oder in geringem Ausmaß durch alternatives Splicing der mRNA des IL-6R (10%). Das Ektodomänen-Shedding vermittelt vor allem ADAM17. ADAM17 induziert eine Spaltung zwischen den Aminosäuren Q357-D358 in der Stalk-Region des IL-6R (Müllberg *et al.* 1994). ADAM-Metalloproteasen gehören zur Gruppe der Typ-1-Metalloproteasen und sind beispielsweise auch für das Shedding des IL-1-Rezeptors zuständig (Black 2002; Blobel 2002). Das Shedding kann durch das C-reaktive Protein (CRP) (Jones *et al.* 1994), Phorbol-12-myristate-13-Aceat (PMA) oder bakterielle Toxine (Müllberg *et al.* 1993) initiiert werden. Auch Apoptose führt zum Shedding des IL-6R (Chalaris *et al.* 2007). Neben ADAM17 ist auch ADAM10 an der Entstehung des sIL-6R beteiligt. ADAM10 übernimmt einerseits die Aufgabe des konstitutiven Sheddings des IL-6R und hält somit die sIL-6R Menge auf einem konstanten Niveau (Matthews *et al.* 2003). Ebenfalls kann ADAM10 durch Ionomycin aktiviert werden (Garbers *et al.* 2011). Der durch Shedding und Splicing entstandene sIL-6R besteht aus drei extrazellulären Domänen, es fehlen die TMD und die ICD des IL-6R (Taga *et al.* 1989). Das *classic-signaling* und das *trans-signaling* unterscheiden sich daher zum einen durch den Rezeptor, der jeweils IL-6 bindet (sIL-6R oder membrangebundener IL-6R), und die Zellarten, die den jeweiligen Signalweg durchführen können: einerseits die Gesamtheit aller Zellen, die das *trans-signaling* ausführen können, andererseits die Leukozyten und Hepatozyten, die das *classic-signaling* ausführen können. Daher können einige Zellen wie embryonale Stammzellen, T-Zellen, glatte Muskelzellen und Endothelzellen nur über das *trans-signaling* aktiviert werden (Chalaris *et al.* 2011). Ein weiteres Unterscheidungskriterium sind die Auswirkungen auf den Organismus: das *classic-signaling* wirkt eher anti-inflammatorisch und das *trans-signaling* eher pro-inflammatorisch. Regenerative Prozesse, wie die Proliferation intestinaler Epithelzellen sind somit der membranständigen Signaltransduktion zuzuschreiben, die über Bindung von IL-6 an den IL-6R der Epithelzellen ausgelöst wird (Becker *et al.* 2004). Vorgänge wie die Entwicklung von Autoimmunkrankheiten wie Rheumatoide Arthritis (Nowell *et al.* 2003) oder die Entwicklung entzündlicher Karzinome (Becker *et*

Einleitung

al. 2004) sind eher dem *trans-signaling* zuzuschreiben. Das *trans-signaling* lässt sich durch eine lösliche Form des signaltransduzierenden Protein gp130, das natürlich vorkommende lösliche gp130 (sgp130), blockieren. Zu diesem Zwecke bindet sgp130 an den IL-6/sIL-6R Komplex (Jostock *et al.* 2001). Neben diesem natürlich vorkommenden Inhibitor, wurde ein Fusionsprotein aus dem extrazellulären Anteil des gp130 und dem Fc-Anteil eines IgG-Antikörpers generiert. Im Vergleich zu sgp130 ist die Inhibierung durch sgp130Fc 10-fach stärker (Jostock *et al.* 2001).

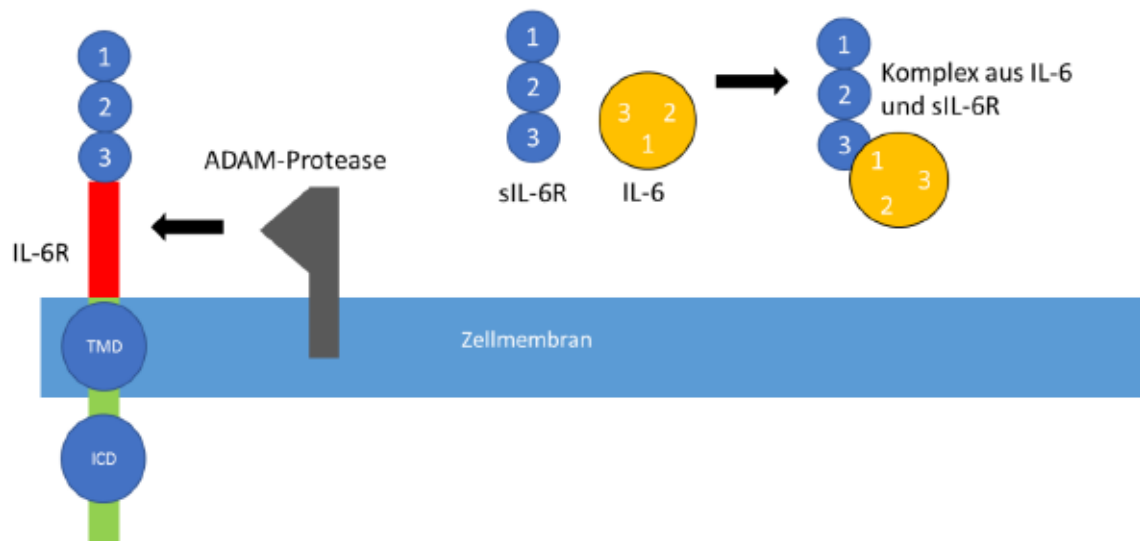


Abb. 1.2.3: Generierung des sIL-6R. Der überwiegende Anteil des sIL-6R entsteht durch Ektodomänen-Shedding des membrangebundenen IL-6R im Bereich der Stalk-Region (rot dargestellt). Das Ektodomänen-Shedding wird durch die ADAM-Metalloproteasen 10 und 17 durchgeführt. Diese können z.B. durch pro-inflammatorische Zytokine aktiviert werden. Ein geringer Anteil des sIL-6R entsteht durch alternatives Splicing der mRNA des membrangebundenen IL-6R. Der entstandene sIL-6R besteht aus drei extrazellulären Domänen. Im nächsten Schritt bindet IL-6 an die Domänen zwei und drei des entstandenen sIL-6R. Begriffserläuterungen: ICD=intrazelluläre Domäne, TMD= Transmembrandomäne, Nummerierung 1-3=Domänen 1-3

1.3 Die Pathologie des Interleukin 6

Bei Entzündungen verändern sich die Mengen von IL-6, dem sIL-6R und sgp130. Die IL-6 Menge im gesunden Organismus beträgt 1,9-6 pg/ml (Scambia *et al.* 1994), sie kann jedoch unter Entzündungen ansteigen, typischerweise auf 100-1500 pg/ml. Der Mittelwert der IL-6R Menge bei HIV+ Patienten beträgt 169,9 ng/ml (Honda *et al.* 1992). Der Mittelwert der Menge an sgp130 beträgt 370 ng/ml (Narazaki *et al.* 1993) und der Mittelwerte der Menge an sIL-6R beträgt 25 – 35 ng/ml (Honda *et al.* 1992) im gesunden Organismus.

Einleitung

Die Menge des sIL-6R wird durch Ausschüttung der Entzündungsmediatoren Interleukin 1 β (IL-1 β) und Tumornekrosefaktor α (TNF α) erhöht (Franchimont *et al.* 2005). Die ADAM-Proteasen können durch Ektodomänen-Shedding des IL-6R oder alternatives Splicing der mRNA den sIL-6R bilden. Dadurch ist die Menge an sIL-6R unter akuten und chronischen Entzündungen stark erhöht und das *trans-signaling* wird vermehrt aktiviert. Da die IL-6 Menge die sgp130 Menge im Normalfall übersteigt, wird angenommen, dass das *trans-signaling* meist durch sgp130 inhibiert wird. Daraus erschliesst sich, dass unter therapeutischen Bedingungen die eingesetzte Menge an sgp130Fc entsprechend gewählt werden muss, damit nur das *trans-signaling* inhibiert wird und die damit zusammenhängenden anti-inflammatorischen Reaktionen des Organismus weiterhin induziert werden können. Das *trans-signaling* wird mit dem Fusionsprotein sgp130Fc bis zu 10-fach stärker inhibiert als durch die natürlich vorkommende Variante sgp130. Verändern sich die Konzentrationsverhältnisse jedoch unter biochemischen Bedingungen zu Gunsten des IL-6, reicht die sgp130 Menge nicht mehr aus, um den IL-6/sIL-6R Komplex zu inhibieren und das *trans-signaling* und die damit zusammenhängenden pro-inflammatorischen Reaktionen des Organismus werden aktiviert. Das Fusionsprotein sgp130Fc kann unter bestimmten Voraussetzungen auch das *classic-signaling* inhibieren. Wenn die Menge des sIL-6R die Menge des IL-6 übersteigt, bindet das gesamte IL-6 an den sIL-6R. Dieser Komplex wird dann von sgp130Fc gebunden, sodass das gesamte freie IL-6 in dem Komplex aus IL-6/sIL-6R/sgp130Fc gebunden ist und nicht mehr in der Lage ist, das *classic-signaling* zu aktivieren (Garbers *et al.* 2011).

Unter akuten Entzündungen kommt es zur Ausschüttung von pro-inflammatorischen Zytokinen, wie IL-8, die neutrophile Granulozyten zum Shedding ihres IL-6R anregen. So werden im nächsten Schritt Endothelzellen über das *trans-signaling* stimuliert das *Monocyte chemoattractant protein-1* (MCP-1) auszuschütten. MCP-1 wirkt chemotaktisch auf Monozyten. Außerdem schütten die Endothelzellen das *Vascular cell adhesion molecule-1* (VCAM-1) und *Intercellular adhesion molecule-1* (ICAM-1) aus, die die Leukodiapedese fördern (DeLeo, 2007). Auch im Rahmen von chronischen Entzündungen nimmt das *trans-signaling* eine essentielle Funktion ein. Zu diesen chronischen Entzündungen gehören beispielsweise die chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED) Morbus Crohn und Colitis ulcerosa. Sie können entweder den gesamten Verdauungstrakt (Morbus Crohn) oder nur das Colon (Colitis ulcerosa)

Einleitung

befallen. Die CEDs können in chronischen Schüben oder rezidivierend auftreten. Während bei Morbus Crohn die gesamte Darmwand befallen ist, ist bei Colitis ulcerosa nur die Schleimhaut des Darms betroffen. Auch bei den chronisch entzündlichen Darmerkrankungen Morbus Crohn und Colitis ulcerosa spielt das pro-inflammatorische Zytokin IL-6 eine wichtige Rolle. Es wurde nachgewiesen, dass die IL-6 Menge, die von Monozyten der Lamina propria, die aus Kolonbiopsien gesunder Probanden gewonnen wurde, erheblich geringer war (57 pg/ml), als die Menge, die aus den Proben von Probanden mit CEDs gewonnen wurde. Hier wurde bei Patienten mit Morbus Crohn 3623 pg/ml IL-6 und bei Patienten mit Colitis ulcerosa 5885 pg/ml IL-6 gewonnen (Reinecker *et al.* 1993). Bei Patienten mit aktiver Morbus Crohn Erkrankung wurden sIL-6R Mittelwerte von 142,3 ng/ml, bei Patienten mit aktiver Colitis ulcerosa Erkrankung wurden Mittelwerte von 148,4 ng/ml nachgewiesen (Mitsuyama *et al.* 1995). Die Menge des sIL-6R zeigte sich proportional zur Entzündungsaktivität des Morbus Crohn und der Colitis ulcerosa (Mitsuyama *et al.* 2007). Die Konzentration des *trans-signaling* Inhibitors sgp130 war bei Patienten mit aktiver Morbus Crohn nur geringfügig erhöht (44,4-87,6 ng/ml). Bei Patienten mit aktiver Colitis ulcerosa war ein stärkerer Anstieg des sgp130 zu beobachten (26-125 ng/ml), (Mitsuyama *et al.* 2006, Gustot *et al.* 2005). Durch diese beschriebenen Untersuchungen des Serums von Patienten mit CEDs konnte zwar ein starker Anstieg von IL-6 und dem sIL-6R festgestellt werden, im Vergleich dazu jedoch nur ein geringfügiger Anstieg des Inhibitors sgp130. Dadurch konnten die *trans-signaling* und die pro-inflammatorischen Reaktionen wahrscheinlich nicht ausreichend gehemmt werden (Mitsuyama *et al.* 2007).

Auch bei der Entwicklung gastrointestinaler Tumore spielen IL-6 und das *trans-signaling* eine wichtige Rolle. Zu der Gruppe der gastrointestinalen Tumore gehören Tumore der Speiseröhre, des Magens, des Pankreas, der Gallenwege und des Darms. Das Risiko für kolorektale Karzinome ist bei Colitis ulcerosa Patienten erhöht (Eaden *et al.* 2001, Jess *et al.* 2012). Es wurde gezeigt, dass die IL-6 Menge während der Entwicklung des kolorektalen Karzinoms ansteigt. Außerdem wurde entdeckt, dass es eine positive Korrelation zwischen der IL-6 Menge und der Tumorgröße des kolorektalen Karzinoms vorliegt (Yang *et al.* 2014). Weitere Studien belegten, dass IL-6 das Tumorwachstum sogar beschleunigen kann, indem es die Proliferation und das Wachstum der Tumorzellen steuert (Becker *et al.* 2005). Des Weiteren begünstigen erhöhte IL-6 Werte die Entwicklung von CEDs zu kolorektalen Karzinomen (Rose-John *et al.* 2009). Im weiteren

Einleitung

Verlauf der Erkrankung kann es zur Metastasenbildung kommen. Hier fördert der sIL-6R die Adhäsion der Tumorzellen an die Gefäßendothelzellen (Danese *et al.* 2010). Weitere Studien untersuchten die IL-6 Konzentration im Blut von Patienten, die an Magenkarzinomen erkrankt waren, vor und nach der Gastrektomie. Nach der Gastrektomie sank die IL-6 Konzentration. Auch einen Monat nach der Operation war eine weitere Reduktion der IL-6 Konzentration zu erkennen. Die Menge des Proteins STAT3, das ein Teil des IL-6 Signaltransduktionsweges darstellt, wie auch die Menge des IL-6 selbst korrelieren positiv mit dem TNM-Stadium des Magenkarzinoms (Wang *et al.* 2013). Die TNM Klassifikation dient der Beurteilung der Ausbreitung von Tumoren. Das T steht für die Eindringtiefe des Primärtumors, das N für die Anzahl der befallenen Lymphknoten und das M für eventuell vorhandene Metastasen. Neben diesen Erkrankungen des Gastrointestinaltraktes spielt IL-6 auch eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Arthritis. Arthritis ist eine Entzündung der Gelenke. Es können eines oder mehrere Gelenke befallen sein. Es gibt verschiedene Formen der Arthritis, wie die Rheumatoide Arthritis, die Juvenile Rheumatoide Arthritis und die Osteoarthritis. Studien belegten, dass in Serumproben von Patienten, die an diesen Formen der Arthritis erkrankt waren, erhöhte Werte an sIL-6R nachgewiesen werden konnten (Keul *et al.* 1998, Kotake *et al.* 1996, Robak *et al.* 1998). Außerdem wurde beobachtet, dass die Mengen des sIL-6R und IL-6 mit der Schwere des Verlaufs der rheumatoiden Arthritis korrelieren (Robak *et al.* 1998). Andere Studien entdeckten, dass die gesteigerten IL-6 Werte bei Patienten mit Rheumatoider Arthritis einhergehen mit gesteigerten Werten des Rheuma-Faktors (RF), des C-reaktiven Proteins (CRP) und der Blutsenkungsgeschwindigkeit (BSG). Diese Werte geben Hinweise auf die Entzündungsaktivität im Rahmen der Arthritis (Dasgupta *et al.* 1992, Houssiau *et al.* 1988, Madhok *et al.* 1993). Gesteigerte IL-6 Werte gehen auch mit klinischen Manifestationen der Rheumatoiden Arthritis, wie Morgensteifigkeit oder der Anzahl der entzündeten Gelenke einher (Robak *et al.* 1994, Madhok *et al.* 1993, Straub *et al.* 1997). Eine weitere Krankheitsgruppe, die im Zusammenhang mit IL-6 steht, sind chronische Infektionskrankheiten, wie die Hepatitis B, die zu der Gruppe der Hepatitiden gehören. Hepatitiden sind Entzündungen der Leber, die durch verschiedene Auslösungsmechanismen entstehen. Dazu gehören unter anderem Bakterien, Parasiten und Viren. Die viral ausgelösten Hepatitiden können in Hepatitis A bis E eingeteilt werden und unterscheiden sich unter anderem in Übertragungsmechanismus und Verlauf. Die

Einleitung

Hepatitis B wird über Körpersekrete übertragen und verläuft meist akut und heilt spontan aus. In circa 10% der Fälle kann es aber zu einem chronischen Verlauf der Hepatitis kommen. Bei Untersuchungen mit Patienten, die an einer chronischen Hepatitis B (CHB) erkrankt sind, wurde ermittelt, dass in ihrem Blutserum die IL-6 Menge erhöht war (Malaguarrera *et al.* 1997, Song *et al.* 2000). Zhang *et al.* beschrieben 2011, dass im Blut von CHB-Patienten eine positive Korrelation zwischen erhöhten TH-17 Zellen und erhöhten Mengen an CD-4 positiven Zellen, die den IL-6R produzieren, besteht. Des Weiteren konnten auch erhöhte Mengen des pro-inflammatorischen Zytokin IL-17 im Blut von CHB-Patienten im Vergleich zu gesunden Probanden nachgewiesen werden. Zudem konnte die erhöhte IL-17 Produktion durch einen IL-6R neutralisierenden Antikörper gestoppt werden. In präklinischen Studien wurde sgp130Fc zur Untersuchung von Entzündungen, Autoimmunkrankheiten und entzündungsassoziierten Karzinomen genutzt. Die Resultate zeigen, dass sgp130Fc das Fortschreiten der Entzündungsprozesse inhibieren konnte (Rose-John *et al.* 2012). Außerdem kann das Wachstum von bestimmten Tumoren durch die Verabreichung von sgp130Fc unterdrückt werden (Rose-John *et al.* 2007). Aufgrund der Tatsache, dass sgp130Fc ein spezifischer Inhibitor des pro-inflammatorischen *trans-signaling* ist, werden regenerative Eigenschaften des IL-6, die über das *classic-signaling* vermittelt werden, nicht oder wenig gehemmt. Dies wurde in Untersuchungen mit Wildtyp-Mäusen und IL-6 defizienten Mäusen mit entzündungsassoziiertem Kolonkarzinom dargelegt. Die IL-6 defizienten Mäuse waren nicht zur Regeneration ihrer geschädigten intestinalen Epithelzellen in der Lage (Dann *et al.* 2008). Somit ist es von Bedeutung bei chronischen Entzündungen IL-6 nicht vollständig zu blockieren, sondern nur das *trans-signaling* zu inhibieren und somit die regenerativen Eigenschaften des IL-6 zu erhalten.

2 Ziel dieser Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit ist es, den IL-6/sIL-6R Komplex durch verschiedene Arbeitstechniken eingehender zu untersuchen. Diese Arbeitstechniken wurden genutzt, um zum einen neue Herstellungsweisen des IL-6/sIL-6R Komplexes als Alternative zu Hyper IL-6 (HIL-6) zu entwickeln, zum anderen sollte eine neue Messmethode untersucht werden, um die IL-6/sIL-6R Komplexe zu quantifizieren.

Im Rahmen des ersten Projekts sollten Cysteine in IL-6 GFP, Hyper-IL-6, den IL-6R und den sIL-6R eingefügt werden. Über das Einbringen von Cysteinmutationen sollte die Bildung einer Disulfidbrücke zwischen IL-6 und dem sIL-6R erreicht werden. Das Ziel war es, einen stabilen Komplex aus IL-6-GFP und dem sIL-6R zu entwickeln. Zudem sollte die biologische Aktivität durch die Disulfidbrückenbildung nicht beeinträchtigt werden. Dieser neu entstandene Komplex wäre eine Alternative zu Hyper-IL-6, einem Designer Zytokin aus IL-6 und dem sIL-6R, die durch einen flexiblen Linker miteinander verbunden sind (Rakemann *et al.*, 1997, siehe Abb. 2.1). Der beschriebene Komplex könnte in weiteren Untersuchungen, betreffend dem *trans-signaling* genutzt werden.

Das Ziel des zweiten Projekts ist es, den IL-6/sIL-6R Komplex *in vitro* und *in vivo* nachzuweisen. Die bisherigen kommerziell erwerblichen ELISAs weisen entweder eine Spezifität für den sIL-6R (oder den IL-6R) oder für IL-6 auf, können jedoch nicht den Komplex aus IL-6/sIL-6R Komplex detektieren. Im Institut für Biochemie und Molekularbiologie II wurde ein ELISA entwickelt, der spezifisch den IL-6/sIL-6R Komplex detektieren kann. Im Rahmen dieser Arbeit sollte untersucht werden, wie spezifisch dieser ELISA *in vitro* rekombinante IL-6/sIL-6R Komplexe und *in vivo* IL-6/sIL-6R Komplexe aus Blutserum detektieren kann. Durch den spezifischen Nachweis von IL-6/sIL-6R Komplexen mittels ELISA, könnte erstmals die Möglichkeit bestehen, IL-6/sIL-6R Komplexe im Blutserum von Probanden zu bestimmen, die an chronischen Entzündungskrankheiten, wie z.B. Morbus Crohn und Colitis ulcerosa, erkrankt sind. Diese Ergebnisse würden wiederum Hinweise darauf geben, wie hoch die Menge des verabreichten Inhibitors sgp130Fc sein müsste, um spezifisch das *trans-signaling* und nicht das *classic-signaling* zu inhibieren.

Ziel dieser Arbeit

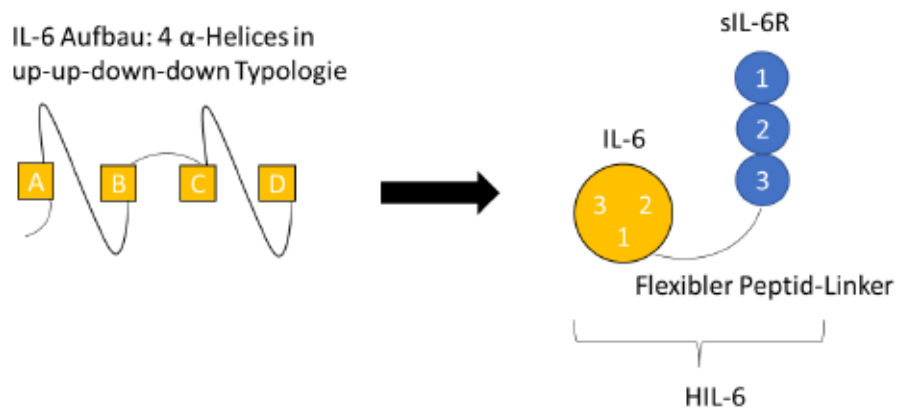


Abb. 2.1: Aufbau des Designer Zytokins HIL-6. HIL-6 besteht aus dem sIL-6R und IL-6, die über einen flexiblen Peptid-Linker miteinander verbunden sind. Begriffserläuterung: Nummerierung 1-3=Domäne 1-3

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Antibiotika

Tabelle 3.1.1: Verwendete Antibiotika

Antibiotikum	Arbeitskonzentration	Hersteller
Ampicillin	100 µg/ml für LB-Amp-Medium, 1 ml Ampicillin für LB-Amp-Agarplatten in 10 cm Kulturschalen	Carl Roth GmbH & Co.KG, Karlsruhe
Penicillin G/Streptomycin	60 mg/ml / 100 mg/ml	Genaxxon bioscience GmbH, Ulm

3.1.2 Antikörper

Tabelle: 3.1.2.: Primäre und sekundäre Antikörper

Primäre Antikörper		
Antikörper	Beschreibung	Stammlösung Konzentration/ Verdünnung
α -humaner-IL-6 Rezeptor (4-11)	Muriner monoklonaler Antikörper	Stammlösung Konzentration: 1 µg/µl Verdünnung: ELISA (1:1000), Western Blot (1:1000)
α -humaner-IL-6	Muriner monoklonaler Antikörper	Stammlösung Konzentration: 1 µg/µl Verdünnung: ELISA (1:1000), Western Blot (1:1000)
α -GFP	Muriner monoklonaler Antikörper	Stammlösung Konzentration: k.A. Verdünnung: Western Blot (1:1000)

Sekundäre Antikörper		
Antikörper	Beschreibung	Stammlösung Konzentration/ Verdünnung
α -humaner-IL-6 Rezeptor (Baf227)	Biotynlierter Antikörper, isoliert aus der Ziege	Stammlösung Konzentration: 0,2 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ Verdünnung: ELISA (1:1000)
α -Mouse-POD	ImmonoPure Peroxidase Conjugated Goat Anti-Mouse IgG, Thermo Scientific, Deutschland	Stammlösung Konzentration: k.A Western Blot (1:5000)

3.1.3 Chemikalien

Tabelle 3.1.3: Verwendete Chemikalien

Chemikalien	Hersteller
Acrylamid-Mix	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Agar	AppliChem GmbH, Darmstadt
Agarose	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf
Ammoniumpersulfat (APS)	Merck KGaA, Darmstadt
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
BSA	Invitrogen, Oregon, USA
Complete Protease Inhibitor Cocktail	Roche Holding GmbH, Mannheim
Ethanol	Merck KGaA, Darmstadt
Ethidiumbromid	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Glucose	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Glycerol	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Isopropanol	AppliChem GmbH, Darmstadt
Methanol	Merck KGaA, Darmstadt

Milchpulver	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
β -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Natriumchlorid	AppliChem GmbH, Darmstadt
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Penicillin/Streptomycin	Genaxxon bioscience GmbH, Ulm
Phorbol-12-myristat-13-acetat (PMA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
POD-Substrat	Roche Holding GmbH, Mannheim
Schwefelsäure	AppliChem GmbH, Darmstadt
Streptavidin-POD	R&D Systems, Wiesbaden
Sucrose	Merck KGaA, Darmstadt
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, München
Tris-HCL	Merck KGaA, Darmstadt
Trypan-Blau	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Turbofect	Thermo Fisher Scientific, Bonn
Tween-20	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

3.1.4 Enzyme

Tabelle 3.1.4: Verwendete Enzyme

Enzyme	Hersteller
AgeI	Thermo Fischer Scientific, Bonn
BamHI	Thermo Fischer Scientific, Bonn
DpnI	Thermo Fischer Scientific, Bonn
HindIII	Thermo Fischer Scientific, Bonn
Pfu-Polymerase	Thermo Fischer Scientific, Bonn
Phusion-Polymerase	Thermo Fischer Scientific, Bonn
T4-Ligase	Thermo Fischer Scientific, Bonn

3.1.5 Geräte

Tabelle 3.1.5: Verwendete Geräte

Gerät	Hersteller
Gelelektrophoresekammer	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Binder CO ₂ -Inkubator 150 (E2) Brutschrank	Binder GmbH, Tuttlingen
Heizbad Julabo sw21	Julabo GmbH, Seelbach
INTAS Chemo Cam Imager	INTAS Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen
INTAS iX Imager	INTAS Science Imaging Instruments GmbH, Göttingen
Kühlschrank	Liebherr GmbH, Rostock
Mini Protean Tetra System	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
NanoDrop ND-10000	PeqLab Biotechnologie GmbH, Erlangen
PeqStar 2x Twin Block Thermal Cycler	PEQLAB Ltd., Crableck Lane, UK
Pipetten	Eppendorf GmbH, Hamburg
Pumpe (Sterilbank)	HLC BioTech, Göttingen
Scanlaf Mars Safety Class 2	Weiss Labortechnik GmbH, Heroldsberg
Schüttler CH 4103	INFORS AG, Bottmingen
Spannungsquelle Western Blot Power Pac 300	Bio-Rad Laboratories GmbH, Hercules, USA
Stuart roller mixer SRT 9D	Bibby Scientific, Staffordshire, England
Tecan Infinite M200 PRO Reader	Tecan GmbH, Maennedorf, Schweiz
TC100 Automated Cell Counter	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Trans-Blot Turbo System	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
UV-Tisch	Bio-Budget Technologies GmbH, Krefeld
Vortexer	IKA Labortechnik GmbH, Staufen
Waage Precisa 100M-300C	Hartenstein GmbH, Würzburg
Zentrifugen: Centrifuge 5417R, Laborfuge 400R	Eppendorf AG, Hamburg Heraeus GmbH, Hanau

3.1.6 Größenmarker

Tabelle 3.1.6: Verwendete Größenmarker

Größenmarker	Hersteller
DNA: GeneRuler Express DNA Ladder (100 - 5000 bp), GeneRuler 1 kb DNA Ladder (250 - 10000 bp)	Thermo Fisher Scientific, Bonn
Proteine: Prestained molecular weight marker (25 kDa - 120 kDa)	Thermo Fisher Scientific, Bonn

3.1.7 KITs

Im Rahmen dieser Arbeit wurden folgende KITs verwendet:

Tabelle 3.1.7: Verwendete KITs

KIT	Verwendung
Cell Titer Blue Cell Viability Assay	Proliferationsassay
ECL Western Blotting Detection Reagent (GE Healthcare Life Sciences, München)	Entwicklung der Transfermembran nach dem Western Blotting
NucleoBond Xtra Midi (Macherey-Nagel, Düren)	Midi-Präparation zur Isolierung von Plasmid-DNA
NucleoSpin Extract II (Macherey-Nagel, Düren)	Agarosegelelektrophorese: DNA Extraktion aus Agarosegelen Reinigung von PCR-Produkten

3.1.8 Kulturmedien

3.1.8.1 Kulturmedien: Bakterien

Tabelle 3.1.8.1: Kulturmedien (Bakterien)

Medium	Zusammensetzung
LB-Agar (Luria-Bertani)	<ul style="list-style-type: none">• 1% NaCl• 1% Pepton• 0,05% Hefeextrakt• 1,5% Agar Agar
LB-Medium (Luria-Bertani)	<ul style="list-style-type: none">• 1% NaCl

Material und Methoden

	<ul style="list-style-type: none">• 1% Pepton• 0,05% Hefeextrakt
--	---

3.1.8.2 Kulturmedien: Zellkultur

Tabelle 3.1.8.2: Kulturmedien (Zellkultur)

Medium	Zusammensetzung
DMEM (-/-)	<ul style="list-style-type: none">• Dulbecco's Modified Eagle's medium mit 4,5 g/L Glucose und stabilem Glutamin
DMEM (+/+)	<ul style="list-style-type: none">• Dulbecco's Modified Eagle's medium mit 4,5 g/L Glucose und stabilem Glutamin• 10% FCS• 1% Penicillin/Streptomycin

3.1.9 Oligonukleotide

Tabelle 3.1.9: Oligonukleotide

Name	Sequenz (5' → 3')
HIL-6 forward	ccgtgcccgagtgcgacagcagc
HIL-6 reverse	gctgctgtcgactcgggcacgg
IL-6R forward	ccgtgcccgagtgcgacagcagc
IL-6R reverse	gctgctgtcgactcgggcacgg
IL-6 forward	aacctgccaagatgtgcgagaaggacggctg
IL-6 reverse	cagccgtccttctcgacatcttgggcaggtt

3.1.10 Plasmide

Tabelle 3.1.10: Verwendete Plasmide

Plasmid	Beschreibung
pcDNA3.1 (Formen: pcDNA IL-6-GFP, pcDNA sIL-6R, pcDNA HIL-6, pcDNA IL-6R)	Vektor zur Expression der Proteine IL-6-GFP, sIL-6R, HIL-6 und IL-6R

3.1.11 Pufferzusammensetzung

Tabelle 3.1.11: Pufferzusammensetzung

Puffer	Zusammensetzung
Agarosegelelektrophorese	
6-fach DNA-Ladepuffer	<ul style="list-style-type: none"> • 0,1% (m/V) Bromphenolblau • 20% (m/V) Glycerol in TBE-Puffer
50-fach TAE-Puffer	<ul style="list-style-type: none"> • 100 mM EDTA • 2 M Tris • 1 M Essigsäure
ELISA	
Blockingpuffer	<ul style="list-style-type: none"> • 5% Sucrose • 1% BSA • PBS
Coatingpuffer	<ul style="list-style-type: none"> • PBS
Waschpuffer	<ul style="list-style-type: none"> • PBS-T
Weitere Substanzen	<ul style="list-style-type: none"> • 1,8 M Schwefelsäure • Streptavidin-POD • POD-Substrat
Mini-Präparation zur DNA Isolierung	
S1-Puffer	<ul style="list-style-type: none"> • 50 Mm Glucose • 25 Mm Tris-HCl (pH 8) • 100 Mm EDTA

Material und Methoden

	<ul style="list-style-type: none"> • 1:1000 RNase
S2-Puffer	<ul style="list-style-type: none"> • 0,2 M NaOH • 1% SDS
S3-Puffer	<ul style="list-style-type: none"> • 25 Mm Tris-HCL (pH 8,3) • 192 Mm Glycin • 0,1% (m/V) SDS
Western-Blot	
Blockingpuffer	<ul style="list-style-type: none"> • TBS-T • 5% Milchpulver (in TBS-T)
Transferpuffer	<ul style="list-style-type: none"> • 20% Methanol • 0,1% SDS • 25 Mm Tris • 192 Mm Glycin
SDS-Page	
Sammelgelpuffer	<ul style="list-style-type: none"> • 0,5 M Tris-HCl (pH 6,8) • 0,4% SDS • Für diese Arbeit wurde Sammelgelpuffer in Mengen von 500 ml hergestellt: • 30,4 g Tris • 2 g SDS
SDS-Laufpuffer	<ul style="list-style-type: none"> • 25 Mm Tris-HCl (pH 8,3) • 192 Mm Glycin • 0,1% (m/V) SDS
Trenngelpuffer	<ul style="list-style-type: none"> • 1,4 M Tris-HCl (pH 8,8) • 0,4% SDS • Für diese Arbeit wurde Trenngelpuffer in Mengen von 500 ml hergestellt: • 90,8 g Tris • 2 g SDS

Herstellung von Zelllysaten	
Mild Lysis Puffer	<ul style="list-style-type: none"> • 2 mM EDTA • 50 mM Tris-HCl (pH 7,4) • 150 mM NaCl • 1 mM NaF • 1 mM Na₃VO₄ • 1% (m/V) Triton X-100 • 1% (m/V) NP-40 • 1 Tablette Complete Protease Inhibitor Cocktail
Weitere Substanzen	
PBS	<ul style="list-style-type: none"> • 150 mM NaCl • 8 mM Na₂HPO₄ (pH 7,4) • 1,7 mM NaH₂PO₄ (pH 7,4)
PBS-T	<ul style="list-style-type: none"> • 0,05% Tween-20 in PBS
TBS	<ul style="list-style-type: none"> • 10 mM Tris-HCl (pH 8) • 150 mM NaCl
TBS-T	<ul style="list-style-type: none"> • 0,05% Tween-20 in TBS

3.1.12 Rekombinante Proteine

Tabelle 3.1.12: Rekombinante Proteine

Rekombinantes Protein	Beschreibung
humanes IL-6 (hIL-6)	Zytokin, Produktion nach van Dam <i>et al.</i> , 1993
HIL-6	HIL-6 ist ein Designer Zytokin, das aus dem sIL-6R und IL-6 besteht. Es wurde zur Durchführung von ELISAs verwendet (Schroers <i>et al.</i> 2005, Fischer <i>et al.</i> , 1997)

3.1.13 Verbrauchsmaterial

Tabelle 3.1.13: Verbrauchsmaterial

Material	Hersteller
Dual Chamber Counting Slides	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Einmalpipettenspitzen	StarLab, Hamburg
Eppendorf Tubes	Eppendorf AG, Hamburg
Falcon Röhrchen	BD Bioscience, Bedford, USA
PVDF-Membran	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Sterilpipetten Costar Stripette	Corning Incorporated, Coming, USA
Whatman-Papier	VWR International GmbH, Darmstadt
Zellkulturschalen	TPP, Trasadingen, Schweiz

3.1.14 Zelllinien

Tabelle 3.1.14: Zelllinien

Ba/F3-gp130	Ba/F3-Zellen sind murine pro-B-Zellen, die an ihrer Oberfläche das Glykoprotein gp130 exprimieren. Ba/F3-gp130-Zellen benötigen zur Proliferation die Anwesenheit von HIL-6 oder dem sIL-6R und IL-6. Sie gehören zu den Suspensionszellen.
Ba/F3-gp130-IL-6R	Ba/F3-Zellen sind murine pro-B-Zellen, die an ihrer Oberfläche das Glykoprotein gp130, sowie den IL-6R exprimieren. Ba/F3-gp130-IL-6R-Zellen benötigen zur Proliferation die Anwesenheit von IL-6. Sie gehören zu den Suspensionszellen.
COS-7-Zellen	COS-7-Zellen sind Fibroblasten, die der Niere der grünen Meerkatze entstammen und zu den adhärent wachsenden Zellen gehören.
HEK-293-Zellen	HEK-293-Zellen sind menschliche embryonale Nierenzellen, die adhärent wachsen.

3.2 Methoden

3.2.1 Molekularbiologische Methoden

3.2.1.1 DNA-Konzentrationsbestimmung

Die Bestimmung der DNA-Konzentration erfolgte mittels NanoDrop ND1000 durch spektrometrische Verfahren. Das Prinzip, das dem NanoDrop zugrunde liegt, ist die Lichtabsorption der untersuchten Probe. Das Licht wird abhängig von der DNA-Konzentration unterschiedlich stark absorbiert. Die DNA Reinheit wird durch das Absorptionsverhältnis $A_{260}/280$ (der Wert sollte über 1,8 liegen) und das Absorptionsverhältnis $A_{230}/260$ (der Wert sollte zwischen 1,8-2,2 liegen) gewährleistet. Um die Messung der DNA-Konzentration durchzuführen, wird zuerst ein Nullwert mit 1 μ l destilliertem Wasser bestimmt, danach kann die DNA-Konzentration mit 1 μ l der zu bestimmenden Probe gemessen werden.

3.2.1.2 DNA Präparation durch Mini-Präparation und Midi-Präparation

3.2.1.2.1 Mini-Präparation

Um geringere Mengen Plasmid-DNA von 10-15 μ g zu isolieren, wird eine Mini-Präparation durchgeführt.

Für eine Mini-Präparation werden 2 ml Medium (mit Antibiotikumzusatz) mit einer einzelnen Bakterienkolonie in einem Eppendorf Tube beimpft. Das Eppendorf Tube wird bei 37°C über Nacht auf einem Schüttler inkubiert. Unter konstantem Schütteln kommt es zum Wachstum der Bakterienkultur. Die Bakterien werden bei 13000 rpm für 3 - 5 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert. Danach wird der Überstand entfernt und die Zellpellets werden in 100 μ l kaltem S1-Puffer resuspendiert, dies geschieht mit Hilfe eines Vortex-Schüttlers und mehrmaligem Pipettieren, bis das Zellpellet resuspendiert ist. Nachdem 200 μ l S2-Puffer hinzugefügt werden, sollte das Tube mehrfach geschwenkt werden, bis die Lösung annähernd klar ist. Dies zeigt eine Lyse der Bakterien an.

Im nächsten Schritt werden 150 μ l kalter S3-Puffer hinzugefügt und das Tube wird mehrfach geschwenkt. Für einen Zeitraum von 10 Minuten sollte das Tube auf Eis gekühlt werden. Danach wird das Tube bei 13000 rpm für 10 Minuten bei 4°C zentrifugiert, um ein Pellet zu formen, das aus ausgefallenen Zelltrümmern und chromosomaler DNA besteht. Der Überstand wird in ein neues Eppendorf Tube überführt. In den Überstand

Material und Methoden

werden 900 µl 96%iges gekühltes Ethanol gegeben. Das Tube wird als nächstes gevortext und im Anschluss für 5 Minuten auf Eis gekühlt.

Danach wird die Lösung nochmals bei Raumtemperatur und 13000 rpm für 10 - 15 Minuten zentrifugiert. Durch Entfernen des Überstandes, verbleibt ein DNA Pellet, welchem 500 µl 70%iges Ethanol hinzugefügt wird. Nach Zentrifugation bei 13000 rpm für 5 Minuten bei Raumtemperatur, wird der Überstand entfernt und das DNA Pellet für maximal 20 Minuten luftgetrocknet, und im letzten Schritt in 30 µl destilliertem Wasser aufgelöst. Die DNA-Konzentration kann spektroskopisch bestimmt werden (siehe Abschnitt 3.2.1 DNA-Konzentrationsbestimmung).

3.2.1.2.2 Midi-Präparation

Im Rahmen einer DNA-Präparation durch Midi-Präparation werden größere Mengen von 100-500 µg Plasmid-DNA isoliert.

Im ersten Schritt wird zu 100 ml LB-Medium 100 µg/ml Ampicillin hinzugefügt. Diese werden im weiteren Verlauf mit einer Bakterienkolonie einer LB-Agar Platte beimpft. Über Nacht wird das LB-Ampicillin Medium mit der hinzugefügten Bakterienkolonie bei 37°C in einem Schüttler inkubiert, mit dem Ziel ein Wachstum der Bakterienkolonie zu bewirken. Nach der Inkubation über Nacht, wird die entstandene Bakterienkultur in Falcons überführt und auf einem Schüttler (4000 rpm) bei 4°C für 10 Minuten zentrifugiert. Nach Zentrifugation wird der Überstand verworfen. Zur weiteren Arbeit wird die DNA aus dem entstandenen Bakterienpellet mit Hilfe des NucleoBond Xtra Midi Kit (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren) isoliert.

Das Bakterienpellet wird gemäß Protokoll in 8 ml Resuspensions Puffer "RES" mit RNase A resuspendiert, bis es sich vollständig auflöst.

Es werden 8 ml Lysis Puffer "LYS" zu dem im vorherigen Schritt suspendiertem Bakterienpellet hinzugefügt. Die Suspension wird mehrmals geschwenkt und für 5 Minuten bei 18 – 25°C inkubiert. Im nächsten Schritt wird die Nucleo Bond Säule, in die eine Säule mit Filter Funktion integriert ist, vorbereitet. Der Equilibration Puffer "EQU" (12 ml) wird im Bereich des Randes der Filtersäule aufgetragen.

Währenddessen wird der Neutralization Puffer "NEU" der Suspension des Bakterienpellets hinzugefügt und mehrmals geschwenkt. Die homogene Suspension kann

jetzt in die zuvor vorbereitete Filtersäule gefüllt werden. Nachdem die Suspension komplett durch die Säule gefiltert wurde, werden 5 ml Equilibration Puffer "EQU" auf den Rand der Filtersäule aufgetragen, um Suspensionsreste, die in der Filtersäule verblieben sind, auszuwaschen. Die Filtersäule kann nun entfernt werden, im weiteren Verlauf wird mit der Nucleo Bond Säule weitergearbeitet. In diese wird der Wash Puffer "Wash" (8 ml) hinein pipettiert. Die Plasmid-DNA wird mit 5 ml Elution Puffer "ELU" aus der Nucleo Bond Säule ausgewaschen und in ein Eppendorf Tube überführt.

Durch Hinzufügen von Isopropanol kommt es zur Ausfällung der eluierten Plasmid-DNA. Mit Hilfe eine Vortex-Schüttlers wird das Eppendorf Tube mehrfach gemixt. Danach folgt die Zentrifugation bei 15,000 x g für 30 Minuten bei 4°C. Der Überstand wird verworfen. Nachdem das entstandene Pellet getrocknet ist, werden 70% Ethanol zum Pellet hinzugefügt und bei 5,000 x g für 5 Minuten bei 18 – 25°C zentrifugiert. Das überschüssige Ethanol wird entfernt und das Pellet bei Raumtemperatur getrocknet. Das DNA Pellet wird mit 20 µl destilliertem Wasser bei 37°C auf einem Vortex-Schüttler gemixt und dann abzentrifugiert. Daraufhin kann die Konzentration der DNA bestimmt werden (siehe Abschnitt 3.2.1 DNA-Konzentrationsbestimmung).

3.2.1.3 Kultivierung von Bakterien mittels Nährmedium und Agar-Platten

Zur Bakterienkultivierung können sowohl LB-Medien als auch LB-Agar-Platten genutzt werden. Bei Verwendung von LB-Medium wird dem Medium Antibiotikum hinzugefügt, beispielsweise 100 µg/ml Ampicillin, dadurch wird gewährleistet, dass sich in diesem Medium nur Bakterien anreichern, die ein Plasmid mit dem Resistenzgen gegen Ampicillin besitzen, das Medium wird in diesem Fall LB-Amp-Medium genannt. Das LB-Amp-Medium wird mit einer einzelnen Bakterienkolonie beimpft und über Nacht bei 37°C auf einem Schüttler inkubiert. Des Weiteren können LB-Agar-Platten zur Bakterienkultivierung verwendet werden, die LB-Agar-Platten enthalten ein Antibiotikum, sodass nur Bakterien, die resistent gegenüber dem entsprechenden Antibiotikum sind, auf dieser Platte gezüchtet werden können. Zur Herstellung von LB-Agar-Platten, die das Antibiotikum Ampicillin enthalten, wird gekühltes LB-Medium aufgeköcht und 1 ml Ampicillin hinzugefügt. Das LB-Amp-Medium wird in Kulturschalen ausgegossen. Nachdem das LB-Amp-Medium ausgehärtet ist, können die

Bakterien ausplattiert werden. Die Schalen verbleiben zur Kultivierung bei 37 °C im Inkubator.

3.2.1.4 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die PCR ist ein Verfahren zur Vervielfältigung von DNA. Grundsätzlich werden für den Ansatz Ausgangs-DNA, zwei Primer, die aus Oligonukleotiden bestehen, eine thermostabile DNA-Polymerase, dNTPs, MgCl₂ und der entsprechende Puffer benötigt. Die PCR wird in einem Thermocycler durchgeführt und verläuft in mehreren Schritten, in denen die DNA unterschiedlichen Temperaturen ausgesetzt wird (siehe Tabelle 3.2.1.1).

Tabelle 3.2.1.4: Ablauf einer Standard-PCR

Primäre Denaturierung 94°C (5 Minuten)
Mehrere Zyklen (20 – 30):
Denaturierung 94°C (1 Minute)
Primer-Annealing 55°C (1 Minute)
Elongation 72°C (8 Minuten pro kb)
Finale Elongation 72°C (10 Minuten)

Während der primären Denaturierung kommt es durch den Temperaturanstieg im Thermocycler zur Trennung der DNA-Doppelstränge in Einzelstränge. Im nächsten Schritt wird die Temperatur gesenkt. Es kommt zur Anlagerung der Primer an die komplementären DNA-Sequenzen der DNA-Einzelstränge am 3' Ende des DNA-Einzelstrangs (Annealing). Während der Elongation kommt es zum Temperaturanstieg, um das Temperaturoptimum der Polymerase zu erreichen. Die Polymerase synthetisiert mit Hilfe der Nukleotide den komplementären DNA-Strang, sodass aus dem zuvor durch Denaturierung entstandenem DNA-Einzelstrang wieder ein DNA-Doppelstrang gebildet wird. Der DNA-Doppelstrang wird durch erneute Denaturierung wiederholt aufgetrennt und durchläuft mehrmals die aus Denaturierung, Primer-Annealing und Elongation bestehenden Zyklen.

Während des letzten Schritts folgt eine finale Elongation durch die Polymerase. Nach Ablauf der PCR kühlt der Thermocycler die Probe auf 4°C ab.

3.2.1.4.1 Gradienten-PCR

Mit Hilfe einer Gradienten-PCR ist es möglich, die optimale Annealing-Temperatur für den entsprechenden Primer zu bestimmen. Im Thermocycler werden zur gleichen Zeit verschiedene PCRs mit unterschiedlichen Annealing-Temperaturen ausgeführt. Im Zuge dieser Arbeit wurde eine Gradienten-PCR mit dem Plasmid pcDNA3.1 sIL-6R durchgeführt. Es wurden vier unterschiedliche Temperaturen verwendet (siehe Tabelle 3.2.1.2). Das Programm der Gradienten-PCR gleicht dem der Standard-PCR (siehe Tabelle 3.2.1.3). Für den Ansatz wurde die Pfu-Polymerase verwendet (siehe Tabelle 3.2.1.4)

Tabelle 3.2.1.4.1: Annealing-Temperaturen der Gradienten-PCR

Ansatz 1: Annealing-Temperatur 55°C
Ansatz 2: Annealing-Temperatur 57,9°C
Ansatz 3: Annealing-Temperatur 60,7°C
Ansatz 4: Annealing-Temperatur 63,6°C

Tabelle 3.2.1.4.1.2: Ansatz der Gradienten-PCR

1 µl Plasmid-DNA
1 µl Primer forward
1 µl Primer reverse
1 µl dNTP Mix
5 µl Pfu-Polymerase Puffer
0,5 µl Pfu-Polymerase
Ad 50 µl destilliertes H ₂ O

Tabelle 3.2.1.4.1.3: PCR-Programm der Gradienten-PCR

Primäre Denaturierung 95°C (3 Minuten)
35 Zyklen: Denaturierung 95°C (3 Minuten) Primer-Annealing (siehe Tabelle 3.2.1.2 für 1 Minute) Elongation 72°C (2 Minuten)
Finale Elongation 72°C (10 Minuten)

3.2.1.4.2 Zielgerichtete Mutagenese-PCR (site-directed mutagenesis PCR)

Im Zuge dieser Arbeit wurde die Möglichkeit untersucht einen stabilen Komplex aus IL-6 und dem sIL-6R zu bilden, dessen biologische Aktivität unbeeinträchtigt bleibt (siehe Abschnitt 4.2 – 4.6). Zu diesem Zwecke wurden mittels zielgerichteter Mutagenese-PCR Codons für Cysteine in cDNAs für IL-6, IL-6 GFP, sIL-6R und HIL-6 eingebracht, die in weiteren Arbeitsschritten mit Hilfe von Co-Transfektion in COS-7-Zellen und HEK-293-Zellen (siehe Abschnitt 3.2.2.4 Transfektion von adhären Zellen) eingebracht werden. Um die gewünschte Mutation in die cDNA der in dieser Arbeit als Vektoren verwendeten Plasmide einzubringen, wurde das Verfahren der zielgerichteten Mutagenese-PCR angewendet. Die sense- und anti-sense Primer enthielten die gewünschte Mutation. Es wurden insgesamt drei PCRs durchgeführt. In den ersten beiden PCR-Durchgängen wurde der sense- bzw. der antisense-Primer verwendet (Ansätze siehe Tabelle 3.2.1.5, PCR-Programm siehe Tabelle 3.2.1.6). Im dritten PCR-Durchgang wurden die Produkte der ersten beiden PCR Durchgänge gemischt und mit 1 µl Polymerase wurde eine dritte finale PCR durchgeführt. Das PCR-Produkt enthielt nach Ende der dritten PCR die gewünschte Mutation. Nach Transformation der PCR-Produkte in adhären Zellen wurden Cysteine in den Proteinen exprimiert, die über Bildung von Disulfidbrücken zur Ausbildung eines Komplexes führten.

Tabelle 3.2.1.4.2: Ansätze für Mutagenese-PCR

Ansatz A	Ansatz B
1µl template DNA	1µl template DANN
1µl HF Puffer	1µl HF Puffer
1µl sense-Primer (100 pmol)	1µl anti-sense-Primer (100 pmol)
1µl dNTPs (10 mM)	1µl dNTPs (10 mM)
1µl Phusion Polymerase	1µl Phusion Polymerase
1µl destilliertes H ₂ O	1µl destilliertes H ₂ O

Tabelle 3.2.1.4.2.1: Programm für Mutagenese-PCR

Primäre Denaturierung	4 min 98°C
15 Zyklen:	
Denaturierung	1 min 98°C
Primer-Annealing	1 min 55°C
Elongation	15 – 30 s/kb 72°C
Finale Elongation	12 min 72°C

3.2.1.5 DpnI-Verdau

Nachdem die Mutagenese-PCR durchgeführt wurde, wurde die template DNA entfernt. Zu diesem Zwecke folgte ein DpnI-Verdau der PCR-Produkte (Ansatz siehe Tabelle 3.2.1.7). DpnI ist ein Restriktionsenzym, das methylierte DNA schneidet. Die mutierten, unmethylierten PCR-Produkte werden durch das Restriktionsenzym DpnI nicht geschnitten. Die Reaktion erfolgte für 2 Stunden bei 37°C. Anschließend wurde das Restriktionsenzym durch Hitze (80°C) für 20 Minuten inaktiviert.

28 µl gereinigtes PCR-Produkt
3 µl Restriktionsenzym DpnI
4 µl Tango Puffer
5 µl destilliertes H ₂ O

Tabelle 3.2.1.5: DpnI-Behandlung

3.2.1.6 Transformation des PCR-Produktes in chemisch kompetente XL1 blue-*E. coli* Stämme

10 µl des PCR-Produktes der zielgerichteten Mutagenese-PCR wurden nach dem DpnI-Verdau in chemisch kompetente XL1 blue-*E. coli* Stämme mittels Hitzeschock transformiert. Vorbereitend wurden die bei -20°C gefrorenen *E. coli* Stämme bei 4°C aufgetaut. Nach Zugabe des PCR-Produktes folgte eine Inkubation auf Eis für 5 - 10 Minuten. Der Hitzeschock bei 42°C für 30 Sekunden führte zur Aufnahme der Plasmid-DNA in die *E. coli* Stämme. Anschließend folgte eine erneute Inkubation auf Eis für 5 -

Material und Methoden

10 Minuten. Die E. coli Bakterien wurden in 500 µl LB-Amp Medium gegeben, das für 1 Stunde bei 37°C auf einem Schüttler inkubiert wurde. Anschließend wurden üblicherweise 200 µl der Lösung auf eine LB-Amp Agarplatte ausgestrichen. Die Agarplatten wurden über Nacht bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation wurde eine Mini-Präparation zur Isolierung der Plasmid-DNA durchgeführt (siehe Abschnitt 3.2.1 Mini-Präparation). Die isolierte Plasmid-DNA wurde zur Bestätigung der gewünschten Mutation durch die Firma SeqLab – Sequence Laboratories Göttingen GmbH sequenziert.

3.2.1.7 Enzymatische Spaltung durch Restriktionsenzyme

Zur Spaltung von Plasmid-DNA wurden Restriktionsenzyme verwendet. Für diese Reaktion wurden 10 µg Plasmid-DNA, sowie die entsprechenden Restriktionsenzyme und Restriktionspuffer verwendet. Nach Zugabe von destilliertem H₂O erfolgte die Spaltung über Nacht bei 37°C. Die Reaktion wurde durch einen 6x Ladepuffer gestoppt. Nachdem der Ansatz auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen wurde, erfolgte die DNA-Extraktion mittels Agarosegelelektrophorese. Die Fragmente wurden daraufhin extrahiert.

3.2.1.7.1 Erstellung des sIL-6R aus mutiertem HIL-6 durch BamHI

Spaltung

Um den mutierten sIL-6R (mit der Mutation für die Aminosäure Cystein) aus dem mutiertem HIL-6 zu erhalten wurde das Restriktionsenzym BamHI verwendet. Das Restriktionsenzym BamHI sollte im Bereich des Peptid-Linkers des mutierten HIL-6 schneiden, um so IL-6 und den sIL-6R voneinander zu trennen. Dafür wurde das mutierte HIL-6 mit BamHI gespalten (siehe Tabelle 3.2.1.8). Dieser Ansatz wurde über Nacht bei 37°C inkubiert. Der Ansatz wurde im Folgenden über ein 2%iges Agarosegel überprüft und die DANN aus dem Agarosegel extrahiert (siehe Abschnitt 3.2.1 Herstellung des sIL-6R aus dem mutiertem HIL-6 mittels BamHI- und AgeI-Behandlung; DNA-Extraktion mittels Agarosegelelektrophorese). Die extrahierte DNA wurde in einen Ligationsansatz gegeben (Tabelle 3.2.1.12). Der Ligationsansatz wurde über Nacht bei 4°C inkubiert. Daraufhin wurde der Ansatz in chemisch kompetente XL1 blue-E. coli Stämme transformiert. Mittels Midi-Präparation wurde die Plasmid-DNA isoliert und anschließend sequenziert. Dieser Ligationsansatz enthielt das Klenow-Fragment, das

überständige DNA, die nach dem Schneiden durch BamHI entstanden ist, mittels Exonuklease Funktion entfernt und dadurch blunt-ends erzeugt, die über die T4-Ligase verbunden wurden. Zudem besitzt das Klenow-Fragment eine Polymerase Funktion um fehlende Basen auszufüllen. Da die 5' → 3' Polymerase und die 3' → 5' Exonuklease Funktion des Klenow-Fragments an unterschiedlichen Stellen auffüllt bzw. entfernt, entstehen Proteine mit unterschiedlichen Mengen an Aminosäuren Überhang (siehe Abb. 4.3.1), in diesem Fall entstanden zwei Formen, eine Form des mutierten sIL-6R mit 42 Aminosäurenüberhang und eine Form des mutierten sIL-6R mit 17 Aminosäurenüberhang.

3.2.1.8 Ligation vom DNA-Fragmenten

Zur Ligation des Inserts (siehe Abschnitt 3.2.1.4.1 Gradienten-PCR) und dem Zielplasmid (Vektor), wurden 1 µl Zielplasmid, 2 µl Insert, T4-Ligase und T4-Ligase Puffer verwendet (siehe Tabelle 3.2.1.12). Der Ligationsansatz wurde über Nacht bei 4°C inkubiert. Falls sticky-ends entstanden, die überstehende 3'- oder 5'- Enden enthielten, wurde das Klenow-Fragment verwendet. Die Fragmente wurden extrahiert und enthielten sticky-ends. Um die sticky-ends aufzufüllen und blunt-ends zu erstellen, wurden 20 µl des isolierten Fragmentes, das Klenow-Fragment, sowie der dazugehörige Puffer, dNTP Mix und destilliertes H₂O zu einem Ansatz zusammengefügt. Das Klenow-Fragment hat verschiedene Aufgabengebiete. Es kann einerseits als Polymerase die DANN-Sequenzen am 5'-Ende der DANN auffüllen, als auch in der Funktion als Exonuklease überstehende DANN-Sequenzen am 3'-Ende abbauen. Der Ansatz wurde bei 37°C für 10 Minuten und für weitere 10 Minuten bei 95°C inkubiert.

Zur Ligation des aus der Gradienten-PCR hergestellten Inserts (siehe Abschnitt 3.2.1.4.1 Gradienten-PCR) und dem Zielplasmid (Vektor), welches durch Spaltung des mutierten HIL-6 mit BamHI und HindIII gewonnen wurde, wurde die T4-Ligase verwendet (siehe Tabelle 3.2.2.4). Der Ligationsansatz wurde über Nacht bei 4°C inkubiert.

Der Ligationsansatz aus Tabelle 3.2.1.12 wurde in chemisch kompetente XL1 blue-E. coli Stämme auf LB-Amp Agarplatten transformiert und ausplattiert (siehe Abschnitt 3.2.1.6 Transformation des PCR-Produktes in chemisch kompetente XL1 blue-E. coli Stämme). Nach einer Mini-Präparation (siehe Abschnitt 3.2.1.2.1 Mini-Präparation) folgte eine Testrestriktion, die mittels Agarosegel elektrophoretisch analysiert wurde. Nach

Material und Methoden

Extraktion aus dem Agarosegel, folgte die Sequenzierung durch die Firma SeqLab – Sequence Laboratories Göttingen GmbH.

Tabelle 3.2.1.8: Ansatz für die Testspaltung

10 µg mutiertes HIL-6
2 µl BamHI
1 µl HindIII
4 µl Puffer Red
Ad 40 µl destilliertes H ₂ O

Tabelle 3.2.1.8.1: Ligationsansatz mit Insert aus Gradienten-PCR

1 µl Zielplasmid
2 µl Insert
2 µl T4-Ligasepuffer
2 µl T4-Ligase
ad 20 µl destilliertes H ₂ O

Der Ligationsansatz aus Tabelle 3.2.8.1.9 wurde in chemisch kompetente XL1 blue-E. coli Stämme auf LB-Amp Agarplatten transformiert und ausplattiert (siehe Abschnitt 3.2.1.6 Transformation des PCR-Produktes in chemisch kompetente XL1 blue-E. coli Stämme). Nach einer Mini-Präparation (siehe Abschnitt 3.2.1.2.1 Mini-Präparation) folgte eine Testrestriktion, die mittels Agarosegel elektrophoretisch analysiert wurde. Nach Extraktion aus dem Agarosegel, folgte die Sequenzierung durch die Firma SeqLab – Sequence Laboratories Göttingen GmbH.

3.2.1.9 DNA-Extraktion mittels Agarosegelelektrophorese

Um DNA-Fragmente sichtbar zu machen, wurden sie mit Hilfe von Agarosegelelektrophorese nach Anzahl der Basenpaare voneinander getrennt. Die Agarosegele wurden mit 1% Agarose hergestellt. Die Agarose wurde nach Zugabe von

Material und Methoden

Ethidiumbromid in der Mikrowelle aufgeköcht und in Kammern gegossen. Nach Erstarren des Gels folgte die Probenbeladung mit jeweils 6-fachem Ladepuffer. Zudem wurde ein Marker zur Größenbestimmung aufgetragen. Die Agarosegelelektrophorese wurde bei 90 Volt für 30 Minuten durchgeführt. Nach Beendigung der Elektrophorese konnte das Gel auf einem UV-Lichttisch analysiert werden. Das gewünschte Fragment wurde mit einem Skalpell herausgeschnitten und nach Anleitung des NucleoSpin Extract II Kits aufgereinigt.

3.2.2 Zellkultur

In der Zellkulturarbeit wurden Suspensionszellen und adhärenente Zellen verwendet. Die Suspensionszellen entstammen der Ba/F3-Zelllinie, die adhärenenten Zellen entstammen der COS-7-Zelllinie und der HEK-293-Zelllinie.

3.2.2.1 Zellzahlbestimmung

Zur Zellzahlbestimmung wurde der TC10 Automated Cell Counter verwendet. Es wurden 10 µl Zellsuspension und 10 µl Trypan-Blau zusammenpipettiert. 10 µl dieser Suspension wurden in den "Cell Counter Slide", ein Objektträger mit integrierter Zählkammer, gegeben. Daraufhin wurde der "Cell Counter Slide" in den TC10 Automated Cell Counter eingefügt, um die Zellzahl zu bestimmen.

3.2.2.2 Kultivierung von Suspensionszellen

Es wurden sowohl Ba/F3-Zellen kultiviert, die mit gp130 transduziert wurden (Ba/F3-gp130), als auch Ba/F3-Zellen, die mit gp130 und dem IL-6R transduziert wurden (Ba/F3-gp130-IL-6R). Die Zellen wurden in 10 cm Kulturschalen mit 10 ml DMEM ++ kultiviert. Die Ba/F3-gp130-Zellen und Ba/F3-gp130-IL-6R-Zellen wurden nach einer Woche Inkubation bei 37°C und 5% CO₂ üblicherweise im Verhältnis 1:10000 gesplittet. Nach dem Splitten der Zellen erfolgte die Zugabe von 20 µl HIL-6 in die Kulturschalen.

3.2.2.3 Kultivierung von adhärenenten Zellen

Die COS-7-Zellen wurden in 10 ml DMEM +/+ bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Die COS-7-Zellen wurden üblicherweise alle 3 Tage gesplittet. Während des Splittens wurde das Medium der COS-7-Zellen abgesaugt und die Zellen in 3 – 5 ml PBS gewaschen, anschließend wurde das PBS abgesaugt. Nach Zugabe von 2 ml TE (Trypsin/EDTA) wurden die Zellen für 2 Minuten bei 37°C inkubiert, wodurch sich die Zellen ablösten. Das TE wurde mit 2 ml Trypsin inaktiviert. Die Zellsuspension wurde in ein 15 ml Falcon überführt und bei 1200 rpm und Raumtemperatur für 5 Minuten zentrifugiert. Nachdem der Überstand abgesaugt wurde, wurde das Zellpellet in 1 ml DMEM +/+ resuspendiert. Ein Anteil der Zellsuspension wurde in eine 10 cm Kulturschale mit 10 ml DMEM +/+ überführt.

Die HEK-293-Zellen wurden in 10 ml DMEM +/+ bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Die Zellen wurden üblicherweise alle 4 Tage gesplittet. Dafür wurde das Medium in den Kulturschalen entfernt, und die HEK-293-Zellen mit 3 – 5 ml PBS gewaschen. Nach Entfernung des PBS wurden die Zellen mit Hilfe von DMEM +/+ von der Kulturschale gelöst und im Verhältnis 1:10 in DMEM +/+ gesplittet.

3.2.2.4 Transfektion von adhärenenten Zellen (COS-7-Zellen und HEK-293-Zellen)

Im Zuge dieser Arbeit wurden COS-7-Zellen und HEK-293-Zellen mit Plasmid-DNA transfiziert. Es wurden 1×10^6 Zellen der COS-7-Zelllinie bzw. 2×10^6 Zellen der HEK-293-Zelllinie in 10 ml DMEM +/+ gegeben, die zuvor gesplittet wurden (siehe Abschnitt 3.2.2.3 Kultivierung von adhärenenten Zellen). Zur Transfektion wurde folgender Ansatz verwendet:

Tabelle 3.2.2.4: Transfektionsansatz für adhärenente Zellen.

1 ml DMEM -/-
5 µg Plasmid-DNA
10 µl Turbofect

Für die Transfektionen wurde der Plasmidvektor pcDNA3.1 genutzt. Nachdem der Ansatz zusammenpipettiert wurde, wurde er für 15 - 30 Sekunden gevortext und nachfolgend für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Inkubation erfolgte die Zugabe des Transfektionsansatzes auf die ausgesäten COS-7-Zellen bzw. HEK-293-Zellen. Die transfizierten COS-7-Zellen wurden für 6 Stunden, die transfizierten HEK-293-Zellen wurden für 48 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Anschließend wurde das Medium der transfizierten Zellen abgesaugt und 10 ml neues DMEM +/- hinzugegeben.

3.2.2.5 Steriles Filtrieren von Zellüberständen

Die Überstände der transfizierten Zellen wurden nach der Inkubationszeit (siehe Abschnitt 3.2.2 Transfektion von adhärenen Zellen) sterilfiltriert. Dazu wurde ein Filter mit einer Porengröße von 45 µm verwendet. Die Überstände wurden bei -20°C gelagert.

3.2.2.6 Herstellung von Zelllysaten

Nach Herstellung der Überstände aus den transfizierten Zellen (siehe Abschnitt 3.2.2.4 Transfektion von adhärenen Zellen; siehe Abschnitt 3.2.2.5 Steriles Filtrieren von Zellüberständen) wurden die Zellen mit PBS gewaschen und das PBS anschließend abgesaugt. Nach Zugabe von 1 ml PBS auf die Zellen, wurden die Zellen mit Hilfe eines "Cell-Scrapers" vom Boden der Kulturschale gelöst. Die Zellsuspension aus PBS und den gelösten Zellen wurde in ein 1,5 ml Eppendorf Tube überführt. Dieses wurde bei 13000 rpm und 4°C für 1 Minute zentrifugiert. Durch die Zentrifugation hatten sich die Zellen vom PBS gelöst und ein Zellpellet gebildet. Das PBS wurde entfernt und das Zellpellet in 250 µl Mild Lysis Buffer (MLB) resuspendiert. Das Eppendorf Tube wurde für 1 Stunde bei 4°C auf einem Rollschüttler inkubiert. Nach Inkubation folgte eine

Zentrifugation bei 13000 rpm und 4°C für 15 Minuten. Das hergestellte Zelllysat wurde in ein neues Eppendorf Tube überführt und bei -20°C gelagert.

3.2.2.7 Proliferationsassay

Zur Durchführung der Proliferationsassays wurden Zytokine und die hergestellten Überstände der transfizierten Zellen verwendet (siehe Abschnitt 3.2.2.5 Steriles Filtrieren von Zellüberständen). Die Proliferationsassays wurden mit Ba/F3-gp130-Zellen und Ba/F3-gp130-IL-6R-Zellen durchgeführt. Es wurden 96 Well Mikroplatten verwendet. Zu Beginn wurden die Ba/F3-gp130-Zellen und die Ba/F3-gp130-IL-6R-Zellen bei 15000 rpm für 5 Minuten zentrifugiert. Das entstandene Zellpellet wurde in 1 ml PBS resuspendiert, anschließend wurde die Suspension mit PBS auf 10 ml aufgefüllt und insgesamt dreimal mit PBS gewaschen. Das Waschen der Zellen erfolgte, um das Zytokin IL-6 zu entfernen, das zuvor als Wachstumsfaktor benötigt wurde.

Nach dem Waschen folgte die Zugabe von 1 ml DMEM +/+, in welchem das Zellpellet resuspendiert wurde. Die Zellzählung erfolgte durch den TC10 Automated Cell Counter (siehe Abschnitt 3.2.2.1 Zellzahlbestimmung). Es wurden 100 µl der Zellsuspension je Well pipettiert. In die befüllten Wells wurden die jeweiligen Überstände/Zytokine pipettiert. Die Mikroplatten wurden für 48 - 72 Stunden inkubiert. Nach Inkubation wurden je 20 µl Cell Titer Blue in die befüllten Wells pipettiert. Es folgten 3 Messungen der Proliferation. Zwischen den Messungen wurde die Mikroplatte für jeweils 20 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Messungen wurden mit Hilfe des Tecan Infinite M200 durchgeführt und in "Relative Light Units" (RLU) angegeben. Im Rahmen dieser Arbeit werden verschiedene Proliferationsassays im Bereich des Ergebnissteils detailliert vorgestellt.

3.2.3 Immunbiochemische Methoden

3.2.3.1 Enzyme-Linked-Immunsorbent-Assay (ELISA)

Im Zuge dieser Arbeit wurden zwei verschiedene ELISA genutzt. Sowohl zur Detektion des sIL-6R (IL-6R ELISA), als auch zur Detektion des Komplexes aus IL-6 und sIL-6R (IL-6/sIL-6R Komplex ELISA), welcher im Institut für Biochemie und Molekularbiologie II entwickelt wurde und freundlicherweise zur Verfügung gestellt

wurde. In beiden Fällen handelte es sich um Sandwich-ELISA. Als Standard wurde in allen durchgeführten ELISAs rekombinantes HIL-6 verwendet. Der Standard dient einerseits der Positivkontrolle. Zusätzlich ist die Konzentration des Standards bekannt, sodass mit Hilfe einer Standardkurve die Menge des gesuchten sIL-6R bzw. IL-6/sIL-6R Komplexes in den untersuchten Proben bestimmt werden kann. Sowohl der Standard, als auch die Proben wurden in verschiedenen Konzentrationen aufgetragen, jede Konzentration wurde doppelt aufgetragen. Mit Hilfe von zwei Antikörpern (Capture Antikörper und Detection Antikörper) wurde die jeweilige Probe detektiert und im Rahmen einer enzymatischen Farbreaktion sichtbar gemacht.

3.2.3.1.1 Enzyme-Linked-Immunsorbent-Assay (ELISA): IL-6R ELISA

Zur Detektion der sIL-6R Menge im Blutserum der Probanden wurde der "Human Interleukin-6R ELISA" der Firma Immuno Tools verwendet. Es wurde eine 96 Well Mikrotiterplatte verwendet. Der verwendete Capture Antikörper (α -hIL-6R; 4-11) wurde 1:1000 in 1 % BSA in PBS verdünnt. 50 μ l des verdünnten Capture Antikörpers wurden in jedes Well pipettiert. Die Mikrotiterplatte wurde über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Nach eintägiger Inkubation wurde die Mikrotiterplatte dreimal mit je 200 μ l PBS-T gewaschen, um ungebundene Anteile des Capture Antikörpers zu entfernen. Anschließend wurden 300 μ l Blocking Puffer in jedes Well pipettiert und die Mikrotiterplatte für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Durch den Blocking Puffer wurden freie Bindestellen gesättigt. Im nächsten Schritt wurde der Blocking Puffer durch dreimaliges Waschen mit 200 μ l PBS-T entfernt. Anschließend erfolgte das Auftragen des Standards (rekombinantes HIL-6) und der Proben. Standard und Proben wurden in verschiedenen Konzentrationen aufgetragen.

Die Mikrotiterplatte mit den aufgetragenen Proben wurden für 2 Stunden bei Raumtemperatur inkubiert und darauffolgend fünfmal mit PBS-T gewaschen. Der biotinylierte Detection Antikörper (Baf227) wurde 1:1000 in 1% BSA in PBS verdünnt. Es wurden je 50 μ l des Detection Antikörpers pro Well pipettiert und zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Ungebundene Anteile des Detection Antikörpers wurden durch fünfmaliges Waschen mit PBS-T entfernt. Daraufhin wurden 100 μ l Streptavidin-POD pro Well hinzugegeben und die Mikrotiterplatte wurde für 30 Minuten inkubiert. Während dieser Inkubationszeit band Streptavidin an den biotinylierten Anteil des Detection

Material und Methoden

Antikörpers. Nach der Inkubation wurde das POD-Substrat hinzugefügt. Die Mikrotiterplatte wurde unter Lichtausschluss für 5 - 20 Minuten inkubiert.

Durch Zugabe des POD-Substrates kam es zum Farbumschlag in den mit Proben befüllten Wells. Die Reaktion wurde durch 1,8 M Schwefelsäure gestoppt. Die Mikrotiterplatte wurde durch den Tecan Infinite M200 bei 450 nm ausgelesen.

3.2.3.1.2 Enzyme-Linked-Immunsorbent-Assay (ELISA): IL-6/sIL-6R

Komplex ELISA

Zur Detektion des IL-6/sIL-6R Komplexes wurde ein im Institut für Biochemie und Molekularbiologie II entwickelter ELISA verwendet. Dieser ELISA nutzt als Capture Antikörper einen α -hIL-6 Antikörper in 1:1000 Verdünnung in 1% BSA in PBS, um den IL-6 Anteil des Komplexes zu detektieren, als Detection Antikörper wird der Baf227 Antikörper (ein IL-6R Antikörper) in einer 1:1000 Verdünnung in 1% BSA in PBS verwendet. Durch diesen Antikörper wird der sIL-6R Anteil des Komplexes detektiert (siehe Abschnitt 4.7 Funktionsweise des IL-6/sIL-6R Komplex ELISAs). Die weiteren Arbeitsschritte gleichen dem Protokoll des IL-6R ELISA (siehe oben). Zur Überprüfung der Funktionsweise wurde der ELISA in einer ersten Untersuchungsreihe mit IL-6, dem sIL-6R und hIL-6 getestet (siehe Abschnitt 4.8 Durchführung des IL-6/sIL-6R Komplex ELISAs mit IL-6, dem sIL-6R und hIL-6). In einer zweiten Untersuchungsreihe wurden mit Hilfe des ELISAs die Menge des IL-6/sIL-6R Komplexes mit rekombinantem IL-6 und sIL-6R *in vitro*, sowie mit Blutproben von vier Probanden *in vivo* ermittelt (siehe Abschnitt 4.8 Durchführung des IL-6/sIL-6R Komplex ELISAs mit IL-6, dem sIL-6R und hIL-6; siehe Abschnitt 4.10 Durchführung des IL-6/sIL-6R Komplex ELISAs mit Blutserum).

3.2.3.2 SDS-Page (Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis)

Um Proteine nachzuweisen und ihre Größe zu ermitteln, wurden die Verfahren SDS-Page und Western Blot angewendet. Zuerst wurden die Proteine anhand ihrer Molekülmassen mit Hilfe von diskontinuierlicher SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese getrennt. Vorbereitend wurden die Proben (Zelllysate und Überstände) mit jeweils 5 μ l 5-fach Lämmli-Puffer bei 95°C für 10 Minuten gekocht. Die Proteine wurden in diesem Schritt

Material und Methoden

denaturiert und anschließend für 2 Minuten auf Eis gekühlt. Die Proben, sowie ein Größenmarker, wurden auf Gele aufgetragen, die selber hergestellt wurden (siehe Tabelle 3.2.3.4). Die Gele bestehen aus Trenn- und Sammelgel und wurden mit 10 oder 15 Probentaschen hergestellt. Nachdem die aufgetragenen Proben im oben liegenden Trenngel konzentriert wurden, wurden sie im unten liegenden Sammelgel entsprechend ihrer Molekülmasse voneinander getrennt.

Sammelgel und Trenngel enthalten Poren unterschiedlicher Größe. Proteine mit kleiner Molekülmasse durchwandern diese Poren schneller als Proteine mit großer Molekülmasse. Die Gößentrennung der Proteine erfolgte bei 100 – 120 Volt, bis die Lauffront der Proben das Ende des Trenngels erreicht hatte. Anschließend erfolgte der Proteintransfer auf eine PVDF-Membran mittels Western Blot.

Tabelle 3.2.3.2: Inhaltsangaben zu Trenngel und Sammelgel

Trenngel	Sammelgel
2,6 ml Trenngel-Puffer	1,5 ml Sammelgel-Puffer
3,3 ml Acrylamid (30%)	1 ml Acrylamid (30%)
4 ml H ₂ O	3,44 ml H ₂ O
4 µl TEMED	6 µl TEMED
100 µl APS	60 µl APS

3.2.3.3 Western Blot

Zur Vorbereitung des Proteintransfers wurde Filterpapier in Transferpuffer für 5 Minuten inkubiert. Die PVDF-Membran wurde für 1 Minute in Methanol inkubiert und anschließend mit Transferpuffer abgespült. Nach Anordnung von Filterpapier, Acrylamid-Gel und PVDF-Membran in der Blotting-Kammer (siehe Abbildung 3.2.3.1) erfolgte der Proteintransfer des Acrylamidgels auf die PVDF-Membran bei 25 Volt für 40 Minuten.

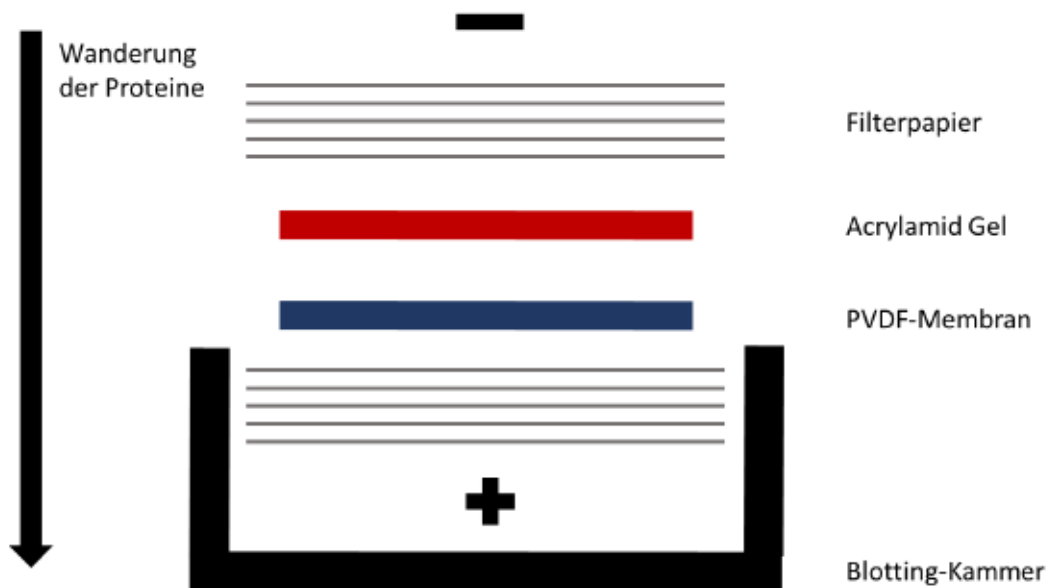


Abb. 3.2.3.1.: Proteintransfer des Acrylamid-Gels auf die PVDF-Membran. Nachdem die Proteine mittels SDS-Page im Acrylamid-Gel anhand ihrer Molekülmasse aufgetrennt wurden, wurden die Proteine auf die PVDF-Membran transferiert. Für diesen Transfer wurden fünf in Transferpuffer angefeuchtete Filterpapiere in die Blotting Kammer gelegt, auf die Filterpapiere wurden die PVDF-Membran und das Acrylamid-Gel platziert. Abschließend wurden fünf in Transferpuffer angefeuchtete Filterpapiere auf das Acrylamid-Gel gelegt. Der Proteintransfer wurde bei 25 Volt für 40 Minuten durchgeführt.

Die PVDF-Membran wurde in ein 50 ml Falcon überführt und daraufhin dreimal für jeweils 5 Minuten in 10 ml TBS-T gewaschen. Während des Waschvorgangs wurde das Falcon auf einem Rollschüttler inkubiert. Durch die Inkubation der Membran in einer Lösung von 10 ml TBS-T mit 5% Milchpulver für 1,5 - 2 Stunden erfolgte die Blockierung von unspezifischen Proteinbindestellen. Der Primärantikörper wurde in einer 1:1000 Verdünnung in 5 ml TBS-T mit 5% Milchpulver über Nacht bei 4°C auf einem Rollschüttler inkubiert.

Nach der eintägigen Inkubation wurde die Membran dreimal in 10 ml TBS-T für jeweils 5 Minuten gewaschen, um ungebundene Anteile des Primärantikörpers zu entfernen. Anschließend wurde die Membran mit dem Zweitantikörper in einer 1:5000 Verdünnung in 5 ml TBS-T mit 5% Milchpulver für 1 Stunde bei Raumtemperatur auf einem Rollschüttler inkubiert. Darauffolgend wurde die Membran dreimal in 10 ml TBS-T für jeweils 5 Minuten gewaschen, um ungebundene Anteile des Sekundärantikörpers zu

Material und Methoden

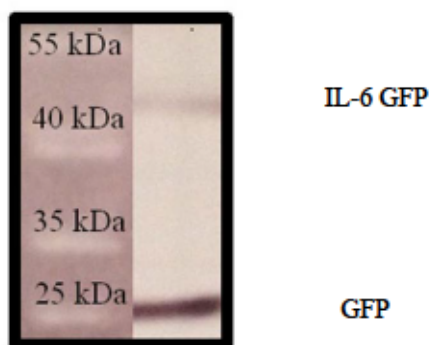
entfernen. Es wurden 400 µl ECL Primer Western Blotting Detection Reagent auf die Membran gegeben. Die Entwicklung erfolgte mit dem INTAS Chemo Cam Imager.

4. Ergebnisse

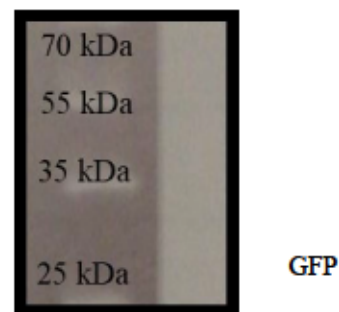
4.1 Transfektion von COS-7-Zellen mit cDNAs für IL-6-GFP

Zu Beginn wurden COS-7-Zellen mit dem Plasmid pcDNA 3.1 IL-6-GFP (siehe Abb. 4.1.3?) transfiziert (siehe Abschnitt 3.2.2.1 Transfektion von adhärennten Zellen). Die in den hergestellten Zelllysaten enthaltenen Proteine (siehe Abschnitt 3.2.2.6 Herstellung von Zelllysaten) wurden als Probe mittels SDS-Page und Western Blot analysiert (siehe Abschnitte 3.2.3 SDS-Page; Western Blot). GFP wurde mit Hilfe des Antikörpers α -GFP detektiert (siehe Abb. 4.A). Des Weiteren wurden COS-7-Zellen mit IL-6-GFP transfiziert. Die Proteine in den hergestellten Zelllysaten wurden mittels SDS-Page und Western Blot analysiert (siehe Abb. 4.C). Im Western Blot (siehe Abb. 4.B) wurden zur Negativkontrolle untransfizierte COS-7-Zellen, sowie Proben mit IL-6-GFP und GFP aufgetragen (siehe Abb. 4.A). IL-6 wurde mit dem Antikörper α -humaner-IL-6 Antikörper detektiert.

4.A (Antikörper: α -GFP-Antikörper)



4.C (kein Atikörper wurde verwendet)



4.B (Antikörper: α -GFP-Antikörper) 4.D (α -GFP-Antikörper und α -IL-6 Antikörper)

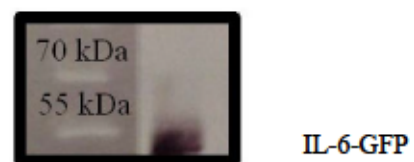
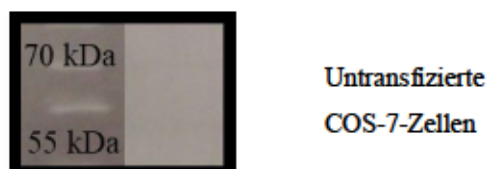


Abbildung 4.A: Western Blot zur Detektion von GFP mit Zelllysaten von IL-6-GFP transfizierten COS-7-Zellen. Zur Vorbereitung dieses Western Blots wurden COS-7-Zellen mit einer cDNA kodierend für IL-6-GFP transfiziert. Die in den hergestellten Zelllysaten enthaltenen Proteine wurden mittels SDS-Page ihrer Größe nach getrennt. Während des Western Blotting wurde ein α -GFP-Antikörper verwendet. Bei 25 kDa ist das GFP-Proteins zu erkennen, zudem ist bei ca. 40 kDa das Fusionsprotein aus IL-6-GFP zu erkennen.

Abbildung 4.B: Western Blot zur Detektion von IL-6 mit untransfizierten COS-7-Zellen. Das Auftragen der Proben von untransfizierten COS-7-Zellen erfolgte als Negativkontrolle. Es wurde ein α -GFP-Antikörper verwendet.

Abbildung 4.C: Western Blot zur Detektion von IL-6 mit Zelllysaten von GFP transfizierten COS-7-Zellen. Zudem wurden Zellen allein mit GFP transfiziert, die nicht detektiert werden konnten.

Abbildung 4.D: Western Blot zur Detektion von IL-6 mit Zelllysaten von IL-6 GFP transfizierten COS-7-Zellen. Für diesen Western Bot wurden Zelllysate verwendet, die das IL-6-GFP Protein enthielten. IL-6-GFP ist ein Fusionsprotein, das aus dem Protein IL-6 und dem Protein GFP besteht, die über einen Linker miteinander verbunden sind (siehe Abbildung 4.1.4). Es konnte bei 40 kDa eine Bande detektiert werden.

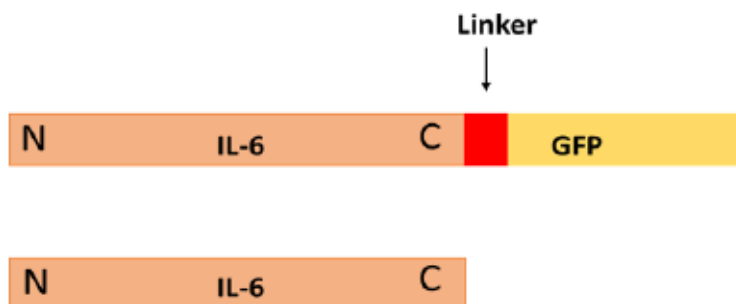


Abb. 4.1.4: IL-6 GFP Fusionsprotein. Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit dem Fusionsprotein IL-6 GFP gearbeitet. GFP wurde mittels eines Linkers an das C-terminale Ende des IL-6 kloniert. Das entstandene Fusionsprotein konnte mit Hilfe des Western Blottings durch α -GFP-Antikörper und α -IL-6 Antikörper nachgewiesen werden (siehe Abb. 4.A und 4.D).

Mit diesen Versuchen wurde nachgewiesen, dass IL-6 als Fusionsprotein mit IL-6 GFP (siehe Abb. 4.1.4) in COS-7-Zellen exprimiert und durch α -GFP-Antikörper (siehe Abb. 4.A) und α -IL-6 Antikörper (siehe Abb. 4.D) detektiert werden kann. Es wurde bestätigt, dass die Fusion von IL-6 und GFP mit Hilfe eines Linkers die Expression nicht beeinträchtigt (siehe Abb. 4.D). Die Ergebnisse dieses ersten Experiments gewährleisten, dass das Fusionsprotein IL-6-GFP im Zuge der folgenden Versuche verwendet werden konnte.

Des Weiteren wurden Proliferationsassays mit Ba/F3-gp130-Zellen und Ba/F3-gp130-IL-6R-Zellen angefertigt. Es wurden COS-7-Zellen mit den Plasmiden pcDNA 3.1 IL-6-Fc und pcDNA 3.1 IL-6-GFP transfiziert. Die Überstände wurden steril filtriert, um zu verhindern, dass in den für die Proliferationsassays verwendeten Überständen Restzellen vorhanden waren. Zur Anfertigung der Proliferationsassays wurden je 10 µl dieser Überstände und je 1 µl der Zytokine HIL-6 und IL-6 zu 100 µl Ba/F3-gp130-Zellen und 100 µl Ba/F3-gp130-IL-6R-Zellen gegeben. Als Negativkontrolle wurden Ba/F3-gp130-Zellen und Ba/F3-gp130-IL-6R-Zellen ohne Zugabe von Überständen oder Zytokinen verwendet (siehe Abb. 3.2.2.1). Die Zellen wurden für 48 h bei 37°C inkubiert. Nach Zugabe von je 20 µl Cell Titer Blue (CTB) wurden vier Messungen im Abstand von 20 Minuten durchgeführt (siehe Abb. 4.1.5). Die Messungen zeigten, dass die Ba/F3-gp130-Zellen ohne Zugabe von Überständen oder Zytokinen kein wesentliches Wachstum nachwiesen. Da diese Zellen keinen IL-6R beinhalten, können weder IL-6, noch IL-6 Fc oder IL-6 GFP eine Zellproliferation induzieren. Lediglich bei Zugabe von HIL-6 zeigt sich ein geringes Wachstum (siehe Abb. 4.1.5). Da HIL-6 ein Designer Zytokin ist, welches aus IL-6 und dem sIL-6R besteht, ist die Anwesenheit des membrangebundenen IL-6R nicht notwendig. HIL-6 bindet an den signaltransduzierenden β -Rezeptor gp130. Diese Bindung führt zur Homodimerisierung von zwei gp130 Proteinen, daraufhin kommt es zur Signaltransduktion, die zur Zellproliferation in beiden Zelllinien führt (siehe Abb. 4.1.5). Im Gegensatz zur Ba/F3-gp130-Zelllinie ist in den Ba/F3-gp130-IL-6R-Zellen bei jedem Zusatz (Überstand/Zytokin) ein aussagekräftiges Wachstum im Vergleich zu der Negativkontrolle zu sehen (siehe Abb. 4.1.5). IL-6, IL-6 Fc und IL-6 GFP können über den membrangebundenen IL-6R an die Zelle binden und durch den β -Rezeptor gp130 eine Proliferation der Zellen induzieren. Diese Ergebnisse zeigen einerseits, dass die Fusion des IL-6 mit dem Fc-Tag und mit GFP die Bindung an den IL-6R und die darauffolgende induzierte Zellproliferation nicht hemmt. Zudem erschwert die Fusion die proliferationsfördernde Wirkung des IL-6 nicht. Diese Proliferationsassays (siehe Abb. 4.1.5) dienten als Grundlage für weitere Experimente, die die biologische Aktivität des mutierten IL-6 GFP untersuchen (siehe Abschnitt 4.6).

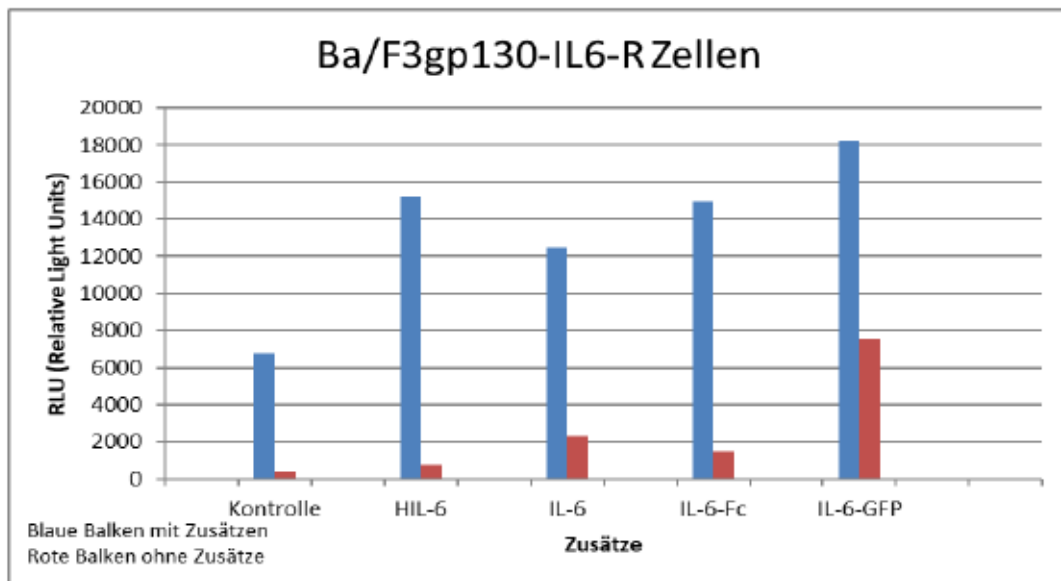


Abb. 4.1.5 : Proliferationsassay mit Ba/F3-gp130-IL-6R-Zellen. Das Diagramm stellt auf der x-Achse die zugegebenen Überstände/Zytokine dar und auf der y-Achse die gemessene Proliferation in der Einheit *relative light units* (RLU), sowie die Standardabweichung, dar. Es zeigt die Proliferation in Ba/F3-gp130-IL-6R-Zellen. In diesen Zellen war in der Kontrolle kein Wachstum zu detektieren. Dies ist in der Grafik mit Hilfe von roten Balken dargestellt. Der vorhandene membranständige IL-6R induzierte durch die Zugabe der Zytokine HIL-6, IL-6 und der IL-6 Fc und IL-6 GFP Überstände eine Zellproliferation. Dies ist in der Grafik in blauen Balken dargestellt. Die am stärksten zu messende Zellproliferation war in den Ba/F3-gp130-IL-6R-Zellen mit Zugabe des IL-6 GFP Überstandes zu detektieren.

4.2 Mutagenese-PCR zur Einbringung von Cysteinen in die Proteine IL-6-GFP, HIL-6 und IL-6R

Zum Einbringen von Cysteinen wurden drei Plasmide (pcDNA 3.1 IL-6-GFP, pcDNA 3.1 HIL-6, pcDNA 3.1 IL-6R) mit Hilfe von Mutagenese-PCR verändert (siehe Abschnitt 3.2.1 Zielgerichtete Mutagenese-PCR). Für diese Mutagenese-PCR wurden spezifische sense- und antisense-Primer verwendet. Diese wurden durch Modifikation verändert, sodass sie die gewünschte Mutation, die zur Expression von Cysteinen führten, beinhalteten. Dafür wurde die Nukleotidsequenz verändert. Für alle Primer wurden die gleichen Ansätze und das gleiche PCR-Programm verwendet (siehe Tabelle 3.2.1.5 und Tabelle 3.2.1.6).

Die Mutagenese-PCR wurde in mehreren Schritten durchgeführt (siehe Abb. 4.2.1). Die Mutagenese-PCR wurde mit gleichbleibenden Temperaturen durchgeführt (siehe Tabelle 3.2.1.4.2.1: Programm für Mutagenese-PCR).

Im ersten Prozess der Mutagenese-PCR wurde die DNA mittels sense-Primer amplifiziert. Im zweiten Prozess der Mutagenese-PCR wurde die DNA mittels antisense-

Primer amplifiziert. Nach diesen Mutagenese-PCR-Durchläufen wurden die Ansätze A (aus dem ersten Prozess der Mutagenese-PCR) und B (aus dem zweiten Prozess der Mutagenese-PCR) zu einem gemeinsamen Ansatz zusammengefügt. Zu diesem Ansatz wurde 1 µl Phusion Polymerase hinzugefügt. Mit diesen Ansätzen wurde eine weitere finale PCR durchgeführt, in dieser wurde die DNA mit Hilfe des sense- und des antisense-Primers amplifiziert. Nach diesen PCR-Durchläufen lagen die drei Plasmide IL-6-GFP, IL-6R und HIL-6 in mutierter Form vor, diese wurden dann IL-6 cys-GFP, IL-6R cys und HIL-6 cys genannt. Die Mutation enthielt die Aminosäure Cystein.

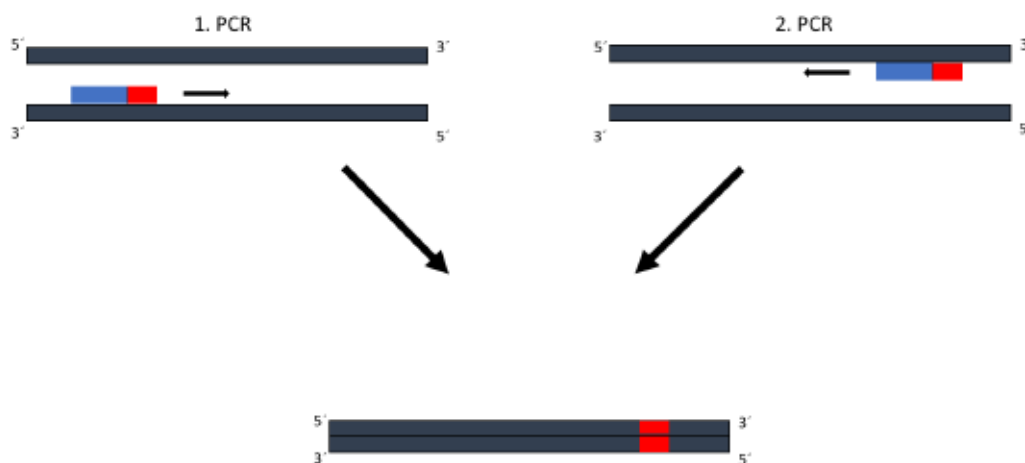


Abb. 4.2.1: Ablauf der Mutagenese-PCR. Eine PCR verläuft in drei Durchgängen, die jeweils aus Denaturierung, Primer-Annealing und Elongation bestehen. Dies ist auch während der Mutagenese-PCR der Fall. Jedoch kommt es in diesem Falle zur gezielten Veränderung von Gensequenzen durch Modifikation der verwendeten Primer. Während der ersten PCR wurde der modifizierte sense-Primer verwendet, um einen der beiden durch Denaturierung aufgetrennten DNA-Doppelstränge zu amplifizieren. Dieser enthielt nach Ablauf der PCR die gewünschte Mutation. Während der zweiten PCR wurde der modifizierte antisense-Primer verwendet, sodass nach Ablauf der zweiten PCR auch der zweite aufgetrennte DNA-Strang die gewünschte Mutation enthielt. In der finalen PCR wurden die zuvor erzeugten PCR-Produkte, sowie die Phusion-Polymerase verwendet, um die aufgetrennten Stränge wieder miteinander zu verbinden. Abschließend enthielt die Ausgangs-DNA die gewünschte Mutation in Form von Cystein.

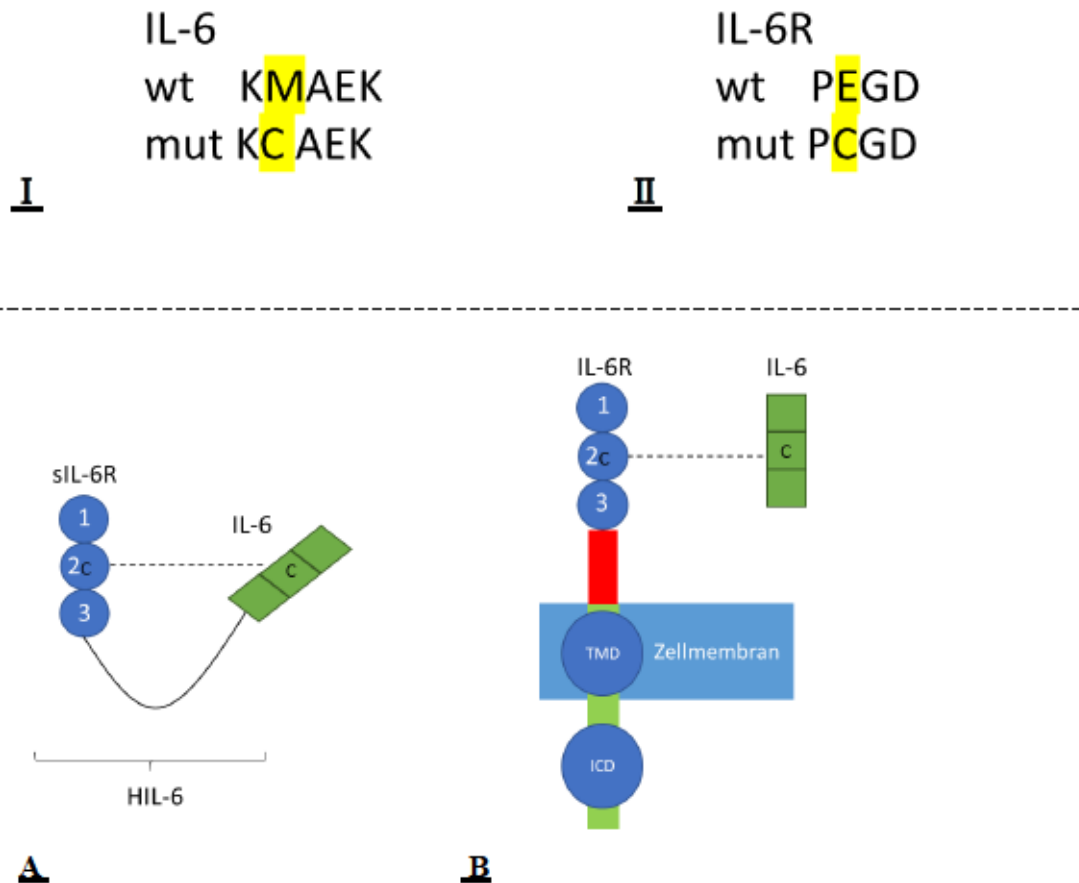


Abb. 4.2.2 A, I und 4.2.2 B, II Disulfidbrückenbildung über Cysteine. In der Aminosäuresequenz des IL-6 wurde die Sequenz KMAEK durch die Mutagenese-PCR in die Sequenz KCAEK modifiziert (Abb. I). In der Aminosäuresequenz des IL-6R wurde die Sequenz PEGD durch die Mutagenese-PCR in die Sequenz PCGD modifiziert (Abb. II). Die eingefügten Cysteine (in den Abb. A und B durch "C" dargestellt) bilden Disulfidbrücken aus (in den Abb. A und B durch gestrichelte Linien dargestellt). Im Designer Zytokin HIL-6 sind IL-6 und der sIL-6R zusätzlich über einen flexiblen Peptid-Linker miteinander verbunden (Abb A). Begriffserläuterungen: ICD=intrazelluläre Domäne, TMD= Transmembrandomäne, Nummerierung 1-3=Domänen 1-3

In den folgenden Experimenten sollte untersucht werden, ob die mutierten Plasmide in Proteinform über Disulfidbrückenbildung der Cysteine einen Komplex bilden können, der biologisch aktiv ist (Abb. 4.2.2). Die PCR-Produkte wurden zur Entfernung der weiteren Bestandteile der PCR Ansätze aufgereinigt. Die aufgereinigten PCR-Produkte wurden jeweils zu einem Ansatz für den DpnI-Spaltung gegeben (siehe Abschnitt 3.2.1 DpnI-Verdau; Tabelle 3.2.1.7).

Über das Restriktionsenzym DpnI wurde in den mutierten PCR-Produkten der methylierte Anteil der DNA gespalten, die unmethylierte mutierte DNA blieb erhalten. Dadurch war es möglich in den weiteren Schritten nur mit den Plasmiden weiterzuarbeiten, die durch die Mutagenese-PCR Cysteine enthielten. Diese Ansätze wurden für 2 Stunden bei 37°C inkubiert. Danach wurde das Restriktionsenzym für 20 Minuten bei 80°C inaktiviert. Im nächsten Schritt wurden jeweils 10 µl der mutierten Plasmide in chemisch kompetente XL1 blue-E. coli Stämme transformiert. Durch Mini-Präparation wurde die DNA der Bakterien isoliert und zur Sequenzierung geschickt. Bei Proteinen, in denen sich die Sequenzierung bestätigt hatte, wurde durch eine Midi-Präparation die DNA isoliert (siehe Abschnitt 3.2.1 Mini-Präparation, Midi-Präparation). Die IL-6 Sequenz KMAEK wurde in die Sequenz KCAEK, die IL-6R Sequenz PEGD wurde in die Sequenz PCGD modifiziert (Abb.4.2.2 I und II).

4.3 Erstellung des sIL-6R aus HIL-6 cys

Mutiertes sIL-6R cys wurde durch das Restriktionsenzym BamHI aus der cRNA für HIL-6 cys hergestellt. HIL-6 besteht aus IL-6 und dem sIL-6R, die durch einen flexiblen Peptid-Linker miteinander verbunden sind. Außerdem enthält das mutierte HIL-6 cys durch die Mutagenese-PCR zusätzlich die Aminosäure Cystein. Das in diesem Experiment verwendete Restriktionsenzym BamHI sollte im Bereich des Peptid-Linkers des mutierten HIL-6 schneiden, um so IL-6 und den sIL-6R voneinander zu trennen, um im weiteren Verlauf mit dem mutierten sIL-6R zu arbeiten. Dafür wurde das mutierte HIL-6 mit BamHI verdaut (siehe Tabelle 3.2.1.8). Diese Spaltung wurde über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Spaltung wurde im Folgenden über ein 2%iges Agarosegel überprüft und die DNA aus dem Agarosegel extrahiert (siehe Abschnitt 3.2.1 Herstellung des sIL-6R aus dem mutiertem HIL-6 cys mittels BamHI-Spaltung und AgeI-Spaltung; DNA-Extraktion mittels Agarosegelelektrophorese). Die extrahierte DNA wurde in einen Ligationsansatz gegeben (Tabelle 3.2.1.12). Der Ligationsansatz wurde über Nacht bei 4°C inkubiert. Daraufhin wurde der Ansatz in chemisch kompetente XL1 blue-E. coli Stämme transformiert. Mittels Midi-Präparation wurde die Plasmid-DNA isoliert und anschließend sequenziert. Dieser Ligationsansatz enthielt das Klenow-Fragment, das überständige DNA, die nach dem Schneiden durch BamHI entstanden ist, mittels Exonuklease Funktion entfernt und dadurch blunt-ends erzeugt, die über die T4-Ligase verbunden wurden. Zudem besitzt das Klenow-Fragment eine Polymerase Funktion um fehlende Basen auszufüllen. Da die 5' → 3' Polymerase und die 3' → 5' Exonuklease Funktion des Klenow-Fragments an unterschiedlichen Stellen auffüllt bzw. entfernt, entstehen Proteine mit unterschiedlichen Mengen an Aminosäuren Überhang (siehe Abb. 4.3.1), in diesem Fall entstanden zwei Formen, eine Form des mutierten sIL-6R mit 42 Aminosäurenüberhang und eine Form des mutierten sIL-6R mit 17 Aminosäurenüberhang, eine zusätzliche Form entstand teilweise durch eine Gradienten-PCR (siehe Abschnitt 4.4).

Durch den BamHI-Verdau des mutierten HIL-6 entstanden damit Mutationen, die die Aminosäure Cystein beinhalten.

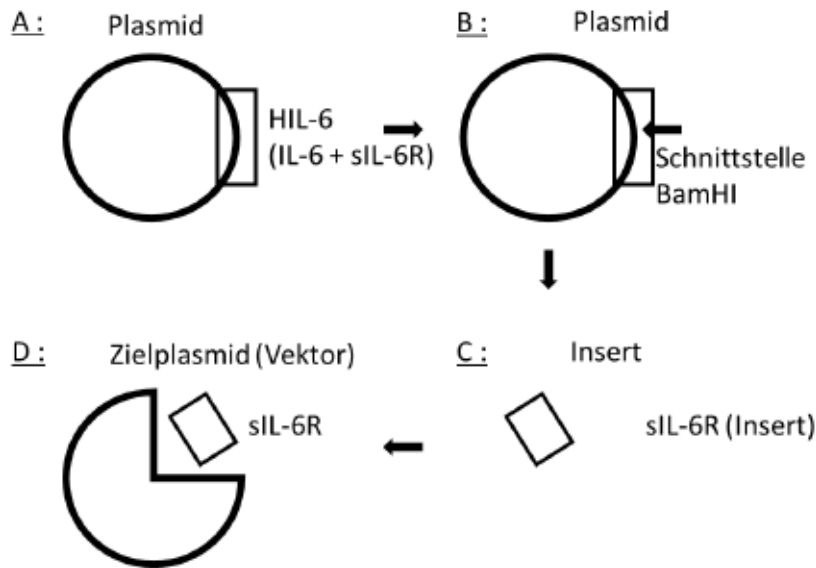


Abb. 4.3.1 Restriktionsverdau mittels BamHI. Das in der Darstellung gezeigte Plasmid enthält die Plasmid-DNA für das mutierte HIL-6 mit der enthaltenen Mutation für Cystein. HIL-6 besteht aus IL-6 und dem sIL-6R, die durch einen flexiblen Peptid-Linker miteinander verbunden sind (Abb. A). Das Restriktionsenzym BamHI schneidet im nächsten Schritt im Bereich dieses Peptid-Linkers (Abb. B) und isoliert die DNA für den sIL-6R, das Insert (Abb. C). In den darauffolgenden Schritten wird das Insert (sIL-6R) in das Zielplasmid (Vektor) mittels T4-Ligase eingebracht (Abb. D).

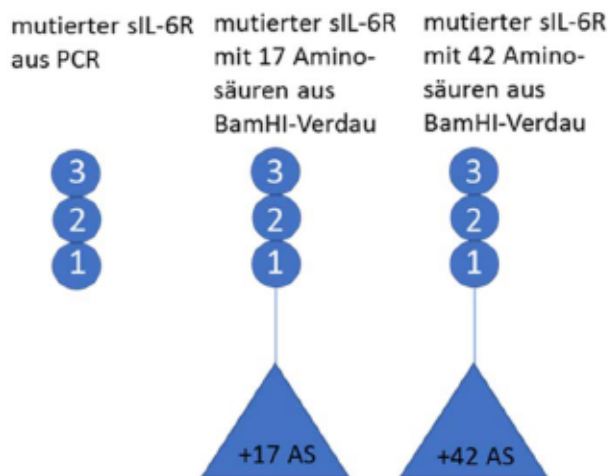


Abb. 4.3.1 Die mutierten sIL-6R Varianten. Es entstanden drei verschiedene Varianten des sIL-6R, die zusätzliche Cysteine enthielten. Die erste Variante des mutierten sIL-6R stammt aus der Gradienten-PCR (siehe Abschnitt 4.4) und enthielt keine überschüssigen Aminosäuren. Die zweite und dritte Variante stammt aus dem BamHI-Verdau des mutierten HIL-6. Durch den Einsatz des Klenow-Fragments entstanden Varianten mit 42 und mit 17 Aminosäuren Überhang. Begriffserläuterung: Nummerierung 1-3=Domänen 1-3

4.4 Erstellung des mutierten sIL-6R durch PCR

Zusätzlich zu den zwei mutierten sIL-6R Varianten (siehe Abb. 4.3.1), die durch die BamHI-Spaltung des mutierten HIL-6 entstanden, entstand eine weitere Form des mutierten sIL-6R durch Gradienten-PCR (siehe Abschnitt 3.2.1 Gradienten-PCR) und anschließender Ligation in das geschnittene mutierte HIL-6. In diesem Rahmen wurde das mutierte HIL-6 mit den Restriktionsenzymen BamHI und HindIII geschnitten (siehe Tabelle 3.2.1.10). Nach Agarosegelelektrophorese und anschließender Extraktion der gewünschten Bande (siehe Abschnitt 3.2.1 DNA-Extraktion mittels Agarosegelelektrophorese) erhielt man das Zielplasmid. Das Insert (sIL-6R) wurde mittels Gradienten-PCR amplifiziert (siehe Tabelle 3.2.1.2 - 3.2.1.4). Nach Ligation von Zielplasmid und Insert und anschließendem Ausplattieren, erfolgte mittels Mini-Präparation die Plasmid-DNA Isolation. Um zu überprüfen, ob der mutierte sIL-6R die gewünschte Mutation enthielt, erfolgte eine Testspaltung (siehe Tabelle 3.2.1.11). Durch Sequenzierung bestätigte sich die gewünschte Mutation.

Nach diesen Experimenten entstanden mit Hilfe von PCR jeweils eine mutierte Form des IL-6R cys, des sIL-6R cys, des IL-6 cys-GFP und des HIL-6 cys. Zusätzlich entstanden durch die BamHI-Spaltung des mutierten HIL-6 cys zwei weitere mutierte Formen des sIL-6R, eine mit 17 Aminosäuren Überhang und eine mit 42 Aminosäuren Überhang (siehe Abb. 4.3.1).

4.5 Transfektion von COS-7- und HEK-293-Zellen

Im nächsten Schritt wurden die cDNAs in Plasmiden in Zellen transfiziert. In HEK-293-Zellen wurden je einmal das mutierte HIL-6 cys Plasmid und das HIL-6 cys Wildtyp Plasmid transfiziert. Außerdem wurde das durch PCR mutierte sIL-6R cys Plasmid (siehe Abschnitt 4.4 Erstellung des sIL-6R durch PCR und Ligation des sIL-6R Inserts in das mit BamHI und HindIII verdaute mutierte HIL-6) jeweils mit dem IL-6 GFP Wildtyp Plasmid und dem mutierten IL-6 cys-GFP Plasmid (siehe Abschnitt 4.2 Mutagenese-PCR) cotransfiziert. Auch die beiden durch die BamHI-Spaltung entstandenen sIL-6R cys Plasmide mit 17 und 42 Aminosäuren Überhang (siehe Abb.

4.3.1) wurden jeweils mit dem mutierten IL-6 cys-GFP Plasmid und dem IL-6 GFP Wildtyp Plasmid cotransfiziert. Nach Zugabe der Transfektionsansätze wurden die HEK-293-Zellen für 48 Stunden bei 37°C inkubiert (siehe Abschnitt 3.2.2 Transfektion von adhären Zellen).

Während dieser Transfektion sollte folgendes Ziel erreicht werden: Die Durchführung der Mutagenese-PCR führte zur Modifikation der Plasmide, indem Cysteine eingefügt wurden. Cysteine sind Aminosäuren, welche Thiolgruppen enthalten, die aus jeweils einem Wasserstoffatom und einem Schwefelatom bestehen. Die Schwefelatome zweier Cysteine können über Disulfidbrückenbildung eine Bindung aufbauen und führen so zur Komplexbildung der dazugehörigen Proteine. Da sowohl die mutierten sIL-6R cys Proteine, als auch die mutierten IL-6 cys-GFP Proteine, die in den transfizierten Zellen exprimiert wurden, durch Modifikation Cysteine beinhalten, sollte es zur Bildung von Proteinkomplexen in den Co-Transfektionen über Disulfidbrückenbildung.

Neben HEK-293-Zellen wurden auch COS-7-Zellen transfiziert. Es erfolgte eine Transfektion der COS-7-Zellen mit dem mutiertem IL-6R cys Plasmid und dem mutiertem IL-6 cys-GFP Plasmid. In Co-Transfektionen wurden je zwei Zellkulturschalen der COS-7-Zellen mit dem mutierten IL-6 GFP Plasmid und dem mutierten pcDNA IL-6R Plasmid transfiziert, mit dem Ziel der Komplexbildung durch die eingebrachten Cysteine. Eine der Zellkulturschalen wurde mit PMA stimuliert. PMA stimuliert die Proteinkinase C (PKC). PKC führt unter anderem zu verstärkter Zellproliferation. Sowohl COS-7-Zellen, als auch HEK-293-Zellen wurden für 48 Stunden bei 37°C inkubiert (siehe Abschnitt 3.2.2 Transfektion von adhären Zellen). Darauf folgend wurden Zellysate mittels Mild Lysis Buffer (siehe Abschnitt 3.2.2 Herstellung von Zellysaten) erstellt und die Überstände steril filtriert (siehe Abschnitt 3.2.2 Steriles Filtrieren von Zellüberständen). Die entstandenen Zellysate und Überstände wurden verwendet, um mit Hilfe von Western Blotting die Expression der Proteine in den transfizierten Zellen zu überprüfen (siehe Abschnitt 3.2.3 Western Blot). Die Zellysate und Überstände der HEK-293-Zellen und der COS-7-Zellen wurden mit einem α -IL-6R Antikörper (4-11 Antikörper) detektiert. Für die Proben der HEK-293-Zellen wurde nicht reduzierender Lämmli-Puffer genutzt, für die Proben der COS-7-Zellen wurden sowohl nicht reduzierender Lämmli-Puffer als auch reduzierender Lämmli-Puffer genutzt, welcher beta-Mercaptoethanol enthält. Beta-Mercaptoethanol

bricht Disulfidbrücken und denaturiert Proteine. Da in den durchgeführten Versuchen jedoch die Aufrechterhaltung der Disulfidbrücken erwünscht war, wurde zudem nicht reduzierender Lämmli-Puffer verwendet.

Durch die Verwendung von Proliferationsansätzen, die sowohl mit, als auch ohne PMA behandelt wurden, sowie durch die Verwendung von reduzierendem, als auch nicht reduzierendem Lämmli-Puffer wurde der Einfluss dieser Chemikalien auf die Expression der Proteine (PMA Stimulation), wie auch die Detektion mittels Western Blotting (reduzierender / nicht reduzierender Lämmli-Puffer) untersucht.

Für die SDS-Page und das anschließende Western Blotting (siehe Abschnitte 3.2.3 SDS-PAGE; Western Blot) der transfizierten COS-7-Zellen wurden insgesamt 4 Proben aufgetragen (siehe Abb. 4.5.1 – 4.5.8), dazu gehörten Zelllysate und Überstände der folgenden Co-Transfektionen:

1. Mutiertes IL-6 cys-GFP + Mutierter IL-6R cys (behandelt mit reduzierendem Lämmli-Puffer), (siehe Abb. 4.5.1 und 4.5.2)
2. Mutiertes IL-6 cys-GFP + Mutierter IL-6R cys (behandelt mit nicht reduzierendem Lämmli-Puffer), (siehe Abb. 4.5.3 und 4.5.4)
3. Mutiertes IL-6 cys-GFP + Mutierter IL-6R cys (behandelt mit reduzierendem Lämmli-Puffer, Zellproliferation stimuliert mit PMA), (siehe Abb. 4.5.5 und 4.5.6)
4. Mutiertes IL-6 cys-GFP + Mutierter IL-6R cys (behandelt mit nicht reduzierendem Lämmli-Puffer, Zellproliferation stimuliert mit PMA), (siehe Abb. 4.5.7 und 4.5.8)

In den Zelllysaten der Proben 2-4 (siehe Abb. 4.5.3, 4.5.5 und 4.5.7) konnten Doppelbanden bei 90 kDa und bei 70 kDa detektiert werden. Die Doppelbanden sind auf die unterschiedliche Glykosylierung des IL-6R zurückzuführen. Die Banden zeigen, dass trotz Disulfidbrückenbildung zwischen den mutierten Proteinen die Bindung zwischen dem IL-6R und dem zur Detektion genutztem α -IL-6R Antikörper nicht gehindert wurde.

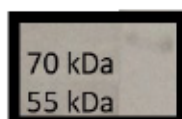


Abb. 4.5.1
Zelllysate: mutiertes IL-6 GFP +
mutierter IL-6R,
reduzierender Lämmli-Puffer

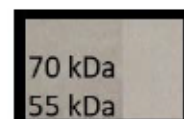


Abb. 4.5.2
Überstand (aus Abb.
4.5.1.)

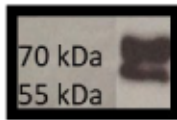


Abb. 4.5.3
Zellysat: mutiertes IL-6
GFP + mutierter IL-6R, nicht
reduzierender Lämmli-Puffer

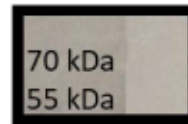


Abb. 4.5.4
Überstand (aus Abb.
4.5.3)

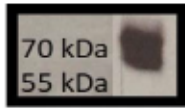


Abb. 4.5.5
Zellysat: mutiertes IL-6 GFP +
mutierter IL-6R, reduzierender
Lämmli-Puffer

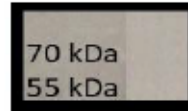


Abb. 4.5.6
Überstand (aus Abb.
4.5.5)

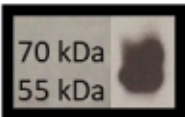


Abb. 4.5.7
Zellysat: mutiertes IL-6 GFP +
mutierter IL-6R, nicht
reduzierender Lämmli-Puffer

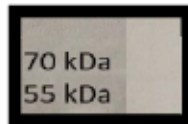


Abb. 4.5.8
Überstand (aus Abb.
4.5.7)

Abb. 4.5.1 und Abb. 4.5.2 Zellysat und Überstand: mutiertes IL-6 GFP + mutierter IL-6R (Transfektion 1). Der Western Blot zeigt das Zellysat der COS-7-Zellen, die mit dem mutiertem IL-6 GFP und dem mutiertem IL-6R cotransfiziert wurden. Es wurde eine Bande bei 90 kDa detektiert. Es konnten in den Überständen, die zuvor steril filtriert wurden, keine Banden detektiert werden. Die Proben wurden mit reduzierendem Lämmli-Puffer aufgetragen. Als Antikörper wurde der α -IL-6R Antikörper verwendet.

Abb. 4.5.3 und Abb. 4.5.4 Zellysat und Überstand: mutiertes IL-6 GFP + mutierter IL-6R (Transfektion 2). Der Western Blot zeigt das Zellysat der COS-7-Zellen, die mit dem mutiertem IL-6 GFP und dem mutiertem IL-6R cotransfiziert wurden. Es wurden Doppelbanden bei 90 kDa und 70 kDa detektiert, die auf die unterschiedliche Glykolysierung des IL-6R zurückzuführen sind. Es konnten in den Überständen, die zuvor steril filtriert wurden, keine Banden detektiert werden. Die Proben wurden mit nicht reduzierendem Lämmli-Puffer aufgetragen. Als Antikörper wurde der α -IL-6R Antikörper verwendet.

Abb. 4.5.5 und Abb. 4.5.6 Zellysat und Überstand: mutiertes IL-6 GFP + mutierter IL-6R (Transfektion 3). Der Western Blot zeigt das Zellysat der COS-7-Zellen, die mit dem mutiertem IL-6 GFP und dem mutiertem IL-6R cotransfiziert wurden. Es wurden Doppelbanden bei 90 kDa und 70 kDa detektiert, die auf die unterschiedliche Glykolysierung des IL-6R zurückzuführen sind. Es konnten in den Überständen, die zuvor steril filtriert wurden, keine Banden detektiert werden. Die Proben wurden mit reduzierendem Lämmli-Puffer aufgetragen. Die transfizierten COS-7-Zellen wurden mit PMA stimuliert. Als Antikörper wurde der α -IL-6R Antikörper verwendet.

Abb. 4.5.7 und Abb. 4.5.8 Zellysat und Überstand: mutiertes IL-6 GFP + mutierter IL-6R (Transfektion 4). Der Western Blot zeigt das Zellysat der COS-7-Zellen, die mit dem mutiertem IL-6 GFP und dem mutiertem IL-6R cotransfiziert wurden. Es wurden Doppelbanden bei 90 kDa und 70 kDa detektiert, die auf die unterschiedliche Glykolysierung des IL-6R zurückzuführen sind. Es konnten in den Überständen, die zuvor steril filtriert wurden, keine Banden detektiert werden. Die Proben wurden mit nicht reduzierendem Lämmli-Puffer aufgetragen. Die transfizierten COS-7-Zellen wurden mit PMA stimuliert. Als Antikörper wurde der α -IL-6R Antikörper verwendet.

In Bezug auf die Verwendung des PMA (Transfektion 3 und 4, Abb. 4.5.5 - 4.5.8) zeigte sich im Vergleich zu den Proben, die nicht mit PMA stimuliert wurden (Transfektion 1 und 2, Abb. 4.5.1 - 4.5.4), dass keine stärkeren Banden detektiert wurden. Die Verwendung von reduzierendem/nicht reduzierendem beta-Mercaptoethanol zeigte keine Unterschiede in der Darstellung der Banden.

Die Western Blots der HEK-293-Zellen zeigen 16 aufgetragene Proben (siehe Abb. 4.5.9 - 4.5.24). Es wurden folgende Zelllysate und Überstände aufgetragen:

1. mutierter sIL-6R cys (42 AS Überhang) + mutiertes IL-6 cys-GFP (siehe Abb. 4.5.9 und 4.5.10)
2. mutierter sIL-6R cys (42 AS Überhang) + IL-6 cys-GFP Wildtyp (siehe Abb. 4.5.11 und 4.5.12)
3. mutierter sIL-6R cys (17 AS Überhang) + mutiertes IL-6 cys-GFP (siehe Abb. 4.5.13 und 4.5.14)
4. mutierter sIL-6R cys (17 AS Überhang) + IL-6 cys-GFP Wildtyp (siehe Abb. 4.5.15 und 4.5.16)
5. mutierter sIL-6R cys (PCR) + mutiertes IL-6 cys-GFP (siehe Abb. 4.5.17 und 4.5.18)
6. mutierter sIL-6R cys (PCR) + IL-6 cys-GFP Wildtyp (siehe Abb. 4.5.19 und 4.5.20)
7. mutiertes HIL-6 cys (siehe Abb. 4.5.21 und 4.5.22)
8. HIL-6 cys Wildtyp (siehe Abb. 4.5.23 und 4.5.24)

Die Proben 1-6 stellen jeweils die Co-Transfektionen mutierter sIL-6R + IL-6 GFP dar. Es wurde sowohl die mutierte Form des IL-6 GFP als auch die Wildtyp Form des IL-6 GFP verwendet. Der mutierte sIL-6R wurde in drei Formen aufgetragen. Die Proben 1 bis 4 zeigen den mutierten sIL-6R aus der BamHI-Spaltung des mutierten HIL-6 (siehe Abschnitt 3.2 Herstellung des sIL-6R aus dem mutiertem HIL-6 mittels BamHI-Verdau und AgeI-Verdau und Abschnitt 4.3). Für die Proben 1 und 2 wurde der mutierte sIL-6R mit 42 Aminosäuren Überhang verwendet, für die Proben 3 und 4 wurde der mutierte sIL-6R mit 17 Aminosäuren Überhang verwendet. Für die Proben 5 und 6 wurde der durch PCR (und anschließender Ligation in das mit BamHI verdaute mutierte HIL-6) gewonnene sIL-6R verwendet, der durch diese Verfahren ebenfalls durch das Einbringen von Cysteinen modifiziert wurde (Abschnitt 3.2 Herstellug des sIL-6R durch Verdau des mutierten HIL-6 mit BamHI und HindIII, Gradienten-PCR, Ligation und Abschnitt 4.4).

Die Probe 7 enthielt den durch die Mutagenese-PCR (siehe Abschnitt 3.2 Mutagenese-PCR) modifizierten HIL-6, Probe 8 enthielt den HIL-6 Wildtyp.

In den Proben 1 – 6 (siehe Abb. 4.5.9 – Abb. 4.5.20) wurden sowohl im Zelllysats, als auch im Überstand Banden in der Höhe von 40 - 50 kDa detektiert. In den Proben 7 und 8 (siehe Abb. 4.5.21 – Abb. 4.5.24) wurden im Zelllysats und im Überstand Banden in Höhe von 110 kDa zu erkennen. Diese Banden bewiesen sowohl, dass das Einbringen der Cysteine in das IL-6 GFP und den sIL-6R sowohl die Komplexbildung als auch die Expression der mutierten Proteine in den HEK-293-Zellen nicht beeinträchtigte.

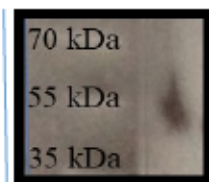


Abb. 4.5.9
Zelllysats: mutierter sIL-6Rcys (42 AS Überhang) + mutiertes IL-6cys-GFP bei 50 kDa

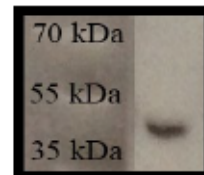


Abb. 4.5.10
Überstand (aus Abb. 4.5.9)
Bei 50 kDa

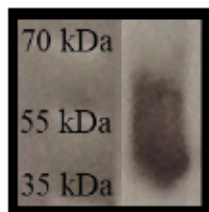


Abb. 4.5.11
Zelllysats: mutierter sIL-6Rcys (42 AS Überhang) + IL-6cys-GFP Wildtyp bei 50 kDa

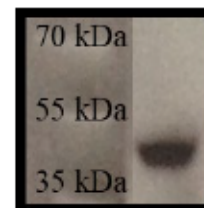


Abb. 4.5.12
Überstand (aus Abb. 4.5.11)
Bei 50 kDa

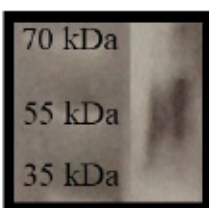


Abb. 4.5.13
Zelllysats: mutierter sIL-6Rcys (17 AS Überhang) + mutiertes IL-6-cys GFP bei 40 kDa

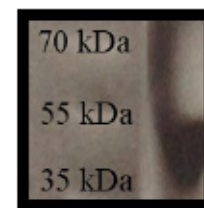


Abb. 4.5.14
Überstand (aus Abb. 4.5.13)
Bei 40 kDa

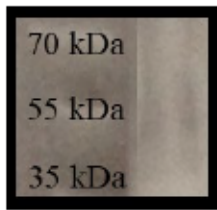


Abb. 4.5.15
Zelllysate: mutierter sIL-6Rcys
(17 AS Überhang) + IL-6-cys
GFP Wildtyp bei 40kDa

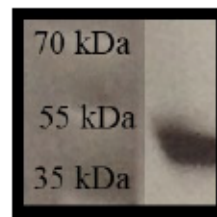


Abb. 4.5.16
Überstand (aus Abb.
4.5.15) bei 40kDa

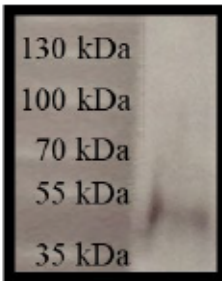


Abb. 4.5.17
Zelllysate: mutierter sIL-
6Rcys (PCR) + mutiertes IL-
6-cys GFP bei 45-55 kDa

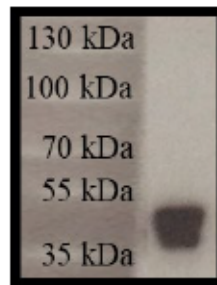


Abb. 4.5.18
Überstand (aus Abb.
4.5.17) bei 45-55
kDa

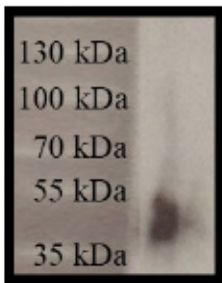


Abb. 4.5.19
Zelllysate: mutierter sIL-
6Rcys (PCR) + IL-6-cys
GFP Wildtyp bei 45-55 kDa

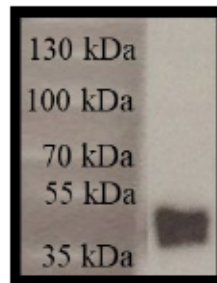


Abb. 4.5.20
Überstand
(aus Abb. 4.5.19) bei
45-55 kDa

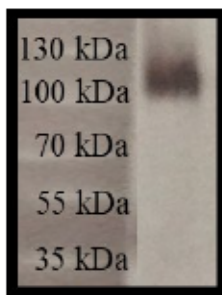


Abb. 4.5.21
Zelllysate: mutiertes HIL-
6cys bei 120 kDa

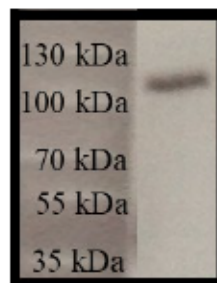


Abb. 4.5.22
Überstand (aus Abb.
4.5.21) bei 120 kDa

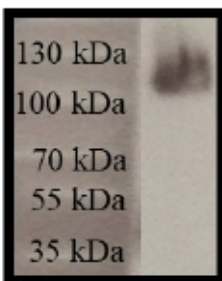


Abb. 4.5.23
Zelllysate: HIL-6cys Wildtyp bei
120 kDa

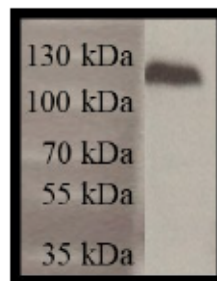


Abb. 4.5.24
Überstand (aus Abb.
4.5.23) bei 120 kDa

Antikörper werden in zugehöriger Legende auf der Folgeseite erwähnt

Abb. 4.5.9 und Abb. 4.5.10 Zellysat und Überstand: mutierter sIL-6Rcys (42 AS Überhang) + mutiertes IL-6-cys GFP (Transfektion 1). Dieser Western Blot stellt die Co-Transfektion des mutierten sIL-6Rcys aus dem BamHI-Verdau + das mutierte IL-6-cys GFP dar, welcher bei 50 kDa detektiert werden konnte. Als Antikörper wurde der α -IL-6R Antikörper verwendet.

Abb. 4.5.11 und 4.5.12 Zellysat und Überstand: mutierter sIL-6Rcys (42 AS Überhang) + IL-6-cys GFP Wildtyp (Transfektion 2). Dieser Western Blot stellt die Co-Transfektion des mutierten sIL-6Rcys aus dem BamHI-Verdau + IL-6-cys GFP Wildtyp dar. Auch hier konnte bei etwa 50 kDa eine Bande detektiert werden, die nicht über Disulfidbrückenbildung stattfand, da das transfizierte Plasmid IL-6-cys GFP keine Cysteine enthielt. Da die Bande sich auf der gleichen Höhe wie die Bande aus den Transfektionen 4.5.9 und 4.5.10 befand, diente diese Detektion zur Bestätigung, dass die Komplexbildung zwischen den mutierten Proteinen regelrecht stattfand. Als Antikörper wurde der α -IL-6R Antikörper verwendet.

Abb. 4.5.13 und 4.5.14 Zellysat und Überstand: mutierter sIL-6Rcys (17 AS Überhang) + mutiertes IL-6-cys GFP (Transfektion 3). Dieser Western Blot stellt die Co-Transfektion des mutierten sIL-6R-cys aus dem BamHI-Verdau + das mutierte IL-6-cys GFP dar. Bei etwa 40 kDa konnte eine Bande detektiert werden, die den gebildeten Komplex durch Disulfidbrückenbildung darstellt. Als Antikörper wurde der α -IL-6R Antikörper verwendet.

Abb. 4.5.15 und 4.5.16 Zellysat und Überstand: mutierter sIL-6Rcys (17 AS Überhang) + IL-6-cys GFP Wildtyp (Transfektion 4). Dieser Western Blot stellt die Co-Transfektion des mutierten sIL-6Rcys aus dem BamHI-Verdau + IL-6-cys GFP Wildtyp dar. Bei etwa 40 kDa konnte eine Bande detektiert werden. Die Bandendetektion bestätigt die regelrechte Komplexbildung aus den Abb. 4.5.13 und 4.5.14. Als Antikörper wurde der α -IL-6R Antikörper verwendet.

Abb. 4.5.17 und 4.5.18 Zellysat und Überstand: mutierter sIL-6Rcys (PCR) + mutiertes IL-6-cys GFP (Transfektion 5). Dieser Western Blot stellt die Co-Transfektion des mutierten sIL-6Rcys aus der Gradienten-PCR + das mutierte IL-6-cys GFP dar. Es konnte eine Bande bei etwa 45-55 kDa detektiert werden, die den gebildeten Komplex darstellt, der sich durch die Disulfidbrückenbildung der eingebrachten Cysteine bildete. Als Antikörper wurde der α -IL-6R Antikörper verwendet.

Abb. 4.5.19 und Abb.4.5.20 Zellysat und Überstand: mutierter sIL-6Rcys (PCR) + IL-6-cys GFP Wildtyp (Transfektion 6). Dieser Western Blot stellt die Co-Transfektion des mutierten sIL-6Rcys aus der Gradienten-PCR + IL-6-cys GFP Wildtyp dar. Es konnte eine Bande bei etwa 45-55 kDa detektiert werden, die die regelrechte Komplexbildung aus den Abb. 4.5.17 und 4.5.18 bestätigt. Als Antikörper wurde der α -IL-6R Antikörper verwendet.

Abb. 4.5.21 und Abb. 4.5.22 Zellysat und Überstand: mutiertes HIL-6cys (Transfektion 7). Dieser Western Blot stellt das detektierte mutierte HIL-6cys dar. Es konnte bei etwa 120 kDa eine Bande detektiert werden. Als Antikörper wurde der α -IL-6R Antikörper verwendet.

Abb. 4.5.23 und Abb. 4.5.24 Zellysat und Überstand. HIL-6cys Wildtyp (Transfektion 8). Dieser Western Blot stellt die Detektion des HIL-6cys Wildtyps bei etwa 120 kDa dar. Die gleiche Bandenhöhe wie in den Abb. 4.5.21 und 4.5.22 zeigt, dass die Mutagenese des HIL-6cys sowohl die Expression, als auch die Detektion des HIL-6cys nicht beeinträchtigt hat. Als Antikörper wurde der α -IL-6R Antikörper verwendet.

4.6 Biologische Aktivität der mutierten Zytokine

Im nächsten Schritt wurde die biologische Aktivität der mutierten Zytokine untersucht. Im Rahmen dieser Untersuchung wurden HEK-293-Zellen transfiziert (siehe Abschnitt 3.2.2 Transfektion von adhären Zellen). Insgesamt wurden zehn Transfektionsansätze verwendet: der HIL-6 Wildtyp, das mutierte HIL-6 cys, der mutierte sIL-6R cys (aus der Gradienten-PCR, siehe Abschnitt 4.4 Erstellung des mutierten sIL-6R durch PCR und Ligation des sIL-6R Inserts in das mit BamHI und HindIII verdaute mutierte HIL-6) als Co-Transfektion mit mutiertem IL-6 cys-GFP und mit dem IL-6 cys-GFP Wildtyp. Ausserdem wurden die beiden durch den BamHI-Spaltung entstandenen mutierten sIL-6R cys Formen (mit 17 Aminosäuren und mit 42 Aminosäuren Überhang, siehe Abschnitt 4.3 Erstellung des sIL-6R aus mutiertem HIL-6 durch BamHI-Spaltung) als Co-Transfektion mit dem mutiertem IL-6 cys-GFP und mit dem IL-6 cys-GFP Wildtyp in Transfektionsansätzen verwendet. Zur Positivkontrolle wurde ein Ansatz mit rekombinantem HIL-6 verwendet, zur Negativkontrolle wurden untransfizierte HEK-293-Zellen verwendet.

Die transfizierten Zellen wurden für 48 Stunden bei 37°C inkubiert (siehe Abschnitt 3.2.2 Proliferationsassay). Während dieser Zeit sollten die in den HEK-293-Zellen exprimierten durch Cysteine modifizierten Proteine über Disulfidbrückenbildung Komplexe bilden. Nach dieser Inkubationszeit wurden die Überstände der Zellen steril filtriert (siehe Abschnitt 3.2.2 Steriles Filtrieren von Zellüberständen). Es wurden je 10 µl der Überstände in je 100 µl Ba/F3-gp130-Zellen gegeben (siehe Abb. 3.2.2.2). Anschließend wurden die Zellen für 48 Stunden bei 37°C inkubiert. In dieser Inkubationszeit wurden die in den Überständen enthaltenen Proteinen, die entweder als Komplex oder einzeln vorlagen, durch die Ba/F3-gp130-Zellen aufgenommen. Nach der Inkubationszeit wurde die Proliferation der Zellen nach Zugabe von Cell Titer Blue (CTB) mittels Tecan Infinite M200 PRO Reader gemessen. Insgesamt wurden vier Messungen durchgeführt. Die erste Messung wurde sofort nach Zugabe des CTB durchgeführt, die folgenden drei Messungen wurden mit jeweils 20 Minuten Abstand durchgeführt. In den 20 Minuten wurden die Ba/F3-gp130-Zellen bei 37°C inkubiert. Die Proliferation der verschiedenen Ba/F3-gp130-Zellen wurde in *Relative Light Units* (RLU) gemessen. In der Negativkontrolle (Ba/F3-gp130-Zellen ohne Zusatz) konnte keine Proliferation detektiert werden (1464,33 RLU, siehe Abb. 4.6.1 und Tabelle 4.6.1). Die stärkste Proliferation (5726,67 RLU) konnte in der Positivkontrolle (rekombinantes

HIL-6, siehe Abb. 4.6.1 und Tabelle 4.6.1) detektiert werden. Auch in dem mutierten HIL-6 konnte eine Proliferation detektiert werden, die deutlich über der Negativkontrolle lag (5065 RLU, siehe Abb. 4.6.1 und Tabelle 4.6.1). In den Co-Transfektionen, die mit dem mutiertem sIL-6R cys durchgeführt wurden, konnte die stärkste Proliferation in den Co-Transfektionen detektiert werden, die mit dem mutiertem sIL-6R durchgeführt wurden, der aus der PCR stammte (siehe Abb. 4.6.1 und Tabelle 4.6.1). Auch in den Co-Transfektionen der weiteren mutierten sIL-6R cys Formen konnte eine Proliferation detektiert werden, die über der Negativkontrolle lag. Nur das Wachstum der Co-Transfektion mutierter sIL-6R cys (42 Aminosäuren Überhang) + IL-6-GFP Wildtyp lag knapp unter der Negativkontrolle (etwa 1211,67 RLU, siehe Tabelle 4.6.1).

Die Ergebnisse dieser Proliferationsassays sollten darlegen, ob die eingebrachten Cysteine und die darauffolgende Komplexbildung über Disulfidbrückenbildung Einfluss auf die biologische Aktivität der mutierten Proteine haben. Da, bis auf die Co-Transfektion mutierter sIL-6R cys (42 Basenpaare Überhang) + IL-6-GFP Wildtyp (siehe Abb. 4.6.1 und Tabelle 4.6.1), eine Proliferation oberhalb der Negativkontrolle zu detektieren war, ist anzunehmen, dass sowohl die Modifikation durch Cysteine, als auch die Komplexbildung die biologische Aktivität nicht beeinträchtigten. Außerdem zeigten sich Unterschiede zwischen den verschiedenen Formen des mutierten sIL-6R. Zwar konnten alle drei Formen des mutierten sIL-6R im zuvor durchgeführten Western Blot detektiert werden (siehe Abschnitt 4.5 Transfektion von COS-7- und HEK-293-Zellen mit mutierten und Wildtyp-Plasmiden zur Überprüfung der Expression). Im Proliferationsassay zeigten die Co-Transfektionen, die mit dem mutierten sIL-6R aus der PCR durchgeführt wurden, das größte Wachstum im Vergleich zur Negativkontrolle. Dies ist möglicherweise darauf zurückzuführen, dass die mutierten sIL-6R cys Formen aus der BamHI-Spaltung unterschiedliche Mengen an Aminosäuren Überhang besitzen, welche die Aktivierung in die Ba/F3-gp130-Zellen beeinträchtigen könnten. Im Rahmen dieser Experimente konnte somit einerseits mittels Western Blot Detektion nachgewiesen werden, dass die mutierten Formen des sIL-6R und des IL-6 GFP durch Co-Transfektion Komplexe bilden können (siehe Abschnitt 4.5 Transfektion von COS-7- und HEK-293-Zellen mit mutierten und Wildtyp-Plasmiden zur Überprüfung der Expression). Weiterhin wurde in Proliferationsassays nachgewiesen, dass die biologische Aktivität dieser Komplexe trotz Einbringen von Cysteinen und den entstehenden Disulfidbrücken nicht beeinträchtigt wird (siehe Abb. 4.6.1).

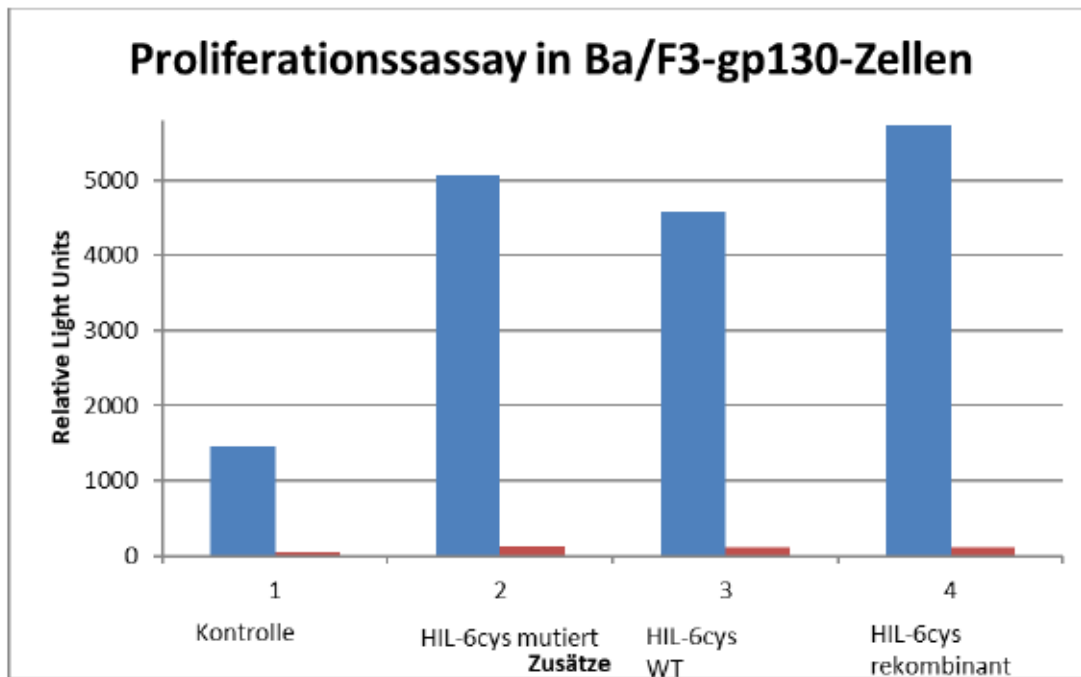


Abb. 4.6.1 Proliferationsassay in Ba/F3-gp130-Zellen zur Kontrolle der biologischen Aktivität der mutierten Zytokine. Es wurden 3 Überstände/Zytokine für diesen Proliferationsassay verwendet. Die Proliferation (in blauen Balken markiert) wurde in RLU (y-Achse) gemessen, zudem gibt das Diagramm die Standardabweichung wieder (in roten Balken markiert). Die niedrigste Proliferation konnte in der Negativkontrolle detektiert werden. Die stärkste Proliferation konnte in den Ansätzen: mutiertes HIL-6cys, HIL-6cys Wildtyp und rekombinantes HIL-6cys detektiert werden (siehe Tabelle 4.6.1).

Überstände/Zytokine	RLU in Ba/F3-gp130-Zellen (Standardabweichung)
Kontrolle	1464,333333 (123,83995059)
mutiertes HIL-6cys	5065 (207,9639392)
HIL-6cys Wildtyp	4580,333333 (143,7741284)
rekombinantes HIL-6cys	5726,666667 (78,61509609)

Tabelle 4.6.1 RLU in Proliferationsassays mit Ba/F3-gp130-Zellen. Die Tabelle zeigt die detektierte Proliferation der Kontrolle und der Überstände/Zytokine in RLU an. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte, zudem sind die Standardabweichungen angegeben.

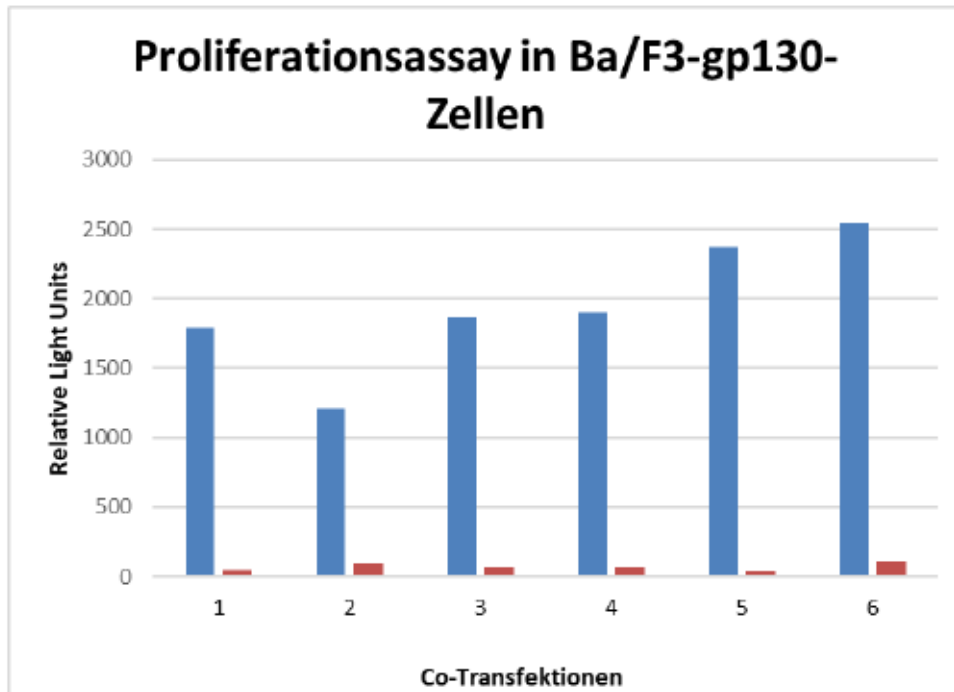


Abb. 4.6.2 Proliferationsassay in Ba/F3-gp130-Zellen zur Kontrolle der biologischen Aktivität der Co-Transfektionen. Es wurden 6 Co-Transfektionen für diesen Proliferationsassay verwendet. Die Proliferation (in blauen Balken markiert) wurde in RLU (y-Achse) gemessen. Die Standardabweichung wird durch die roten Balken markiert. Die niedrigste Proliferation konnte in der Co-Transfektion 2 (siehe Legende) detektiert werden. Die stärkste Proliferation konnte in der Co-Transfektion 6 (siehe Legende) detektiert werden.

Legende 1: mutierter sIL-6R cys (42 AS Überhang) + mutiertes IL-6 cys-GFP

Legende 2: mutierter sIL-6R cys (42 AS Überhang) + IL-6 cys-GFP Wildtyp

Legende 3: mutierter sIL-6R cys (42 AS Überhang) + mutiertes IL-6 cys-GFP

Legende 4: mutierter sIL-6R cys (17 AS Überhang) + IL-6 cys-GFP Wildtyp

Legende 5: mutierter sIL-6R cys (PCR) + mutiertes IL-6 cys-GFP

Legende 6: mutierter sIL-6R cys (PCR) + mutiertes IL-6 cys-GFP Wildtyp

Co-Transfektionen	RLU in Ba/F3-gp130-Zellen (Standardabweichung)
mutierter sIL-6R cys (42 AS Überhang) + mutiertes IL-6 cys-GFP	1791 (50,1353723)
mutierter sIL-6R cys (42 AS Überhang) + IL-6 cys-GFP Wildtyp	1211,66667 (88,9981273)

mutierter sIL-6R cys (42 AS Überhang) + mutiertes IL-6 cys-GFP	1865,33333 (64,5342286)
mutierter sIL-6R cys (17 AS Überhang) + IL-6 cys-GFP Wildtyp	1899 (63,182276)
mutierter sIL-6R cys (PCR) + mutiertes IL-6 cys-GFP	2371,33333 (38,4216374)
mutierter sIL-6R cys (PCR) + mutiertes IL-6 cys-GFP Wildtyp	2551,33333 (107,854841)

Tabelle 4.6.1 RLU in Proliferationsassays mit Ba/F3-gp130-Zellen. Die Tabelle zeigt die detektierte Proliferation der Co-Transfektionen in RLU an. Die angegebenen Werte sind Mittelwerte, zudem sind die Standardabweichungen angegeben.

4.7 Funktionsweise des IL-6/sIL-6R Komplex ELISAs

Im Rahmen des zweiten Projektes sollte der IL-6/sIL-6R Komplex ELISA auf seine Spezifität den IL-6/sIL-6R Komplex zu detektieren untersucht werden. Bisher genutzte ELISA können entweder IL-6 oder den sIL-6R detektieren.

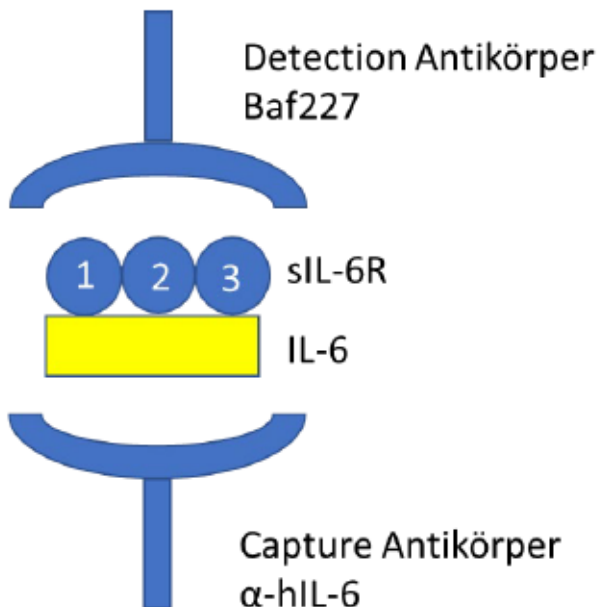


Abb. 4.7.1 IL-6/sIL-6R Komplex ELISA.

Abb. 4.7.1 IL-6/sIL-6R Komplex ELISA. Der verwendete IL-6/sIL-6R Komplex ELISA nutzt als Capture Antikörper einen α -IL-6 Antikörper, an welchen das IL-6, aus dem IL-6/sIL-6R Komplex binden kann. Als Detection Antikörper wird der anti-IL-6R Antikörper Baf227 verwendet, an welchen der sIL-6R binden kann. Somit kann nur der Komplex aus IL-6 und sIL-6R detektiert werden, jedoch weder IL-6 noch der sIL-6R einzeln. Begriffserläuterung: Nummerierung 1-3=Domänen 1-3

Der in dieser Arbeit genutzte ELISA kann durch Einsetzen zweier verschiedener Capture und Detection Antikörper den IL-6/sIL-6R Komplex detektieren (siehe Abb. 4.7.1, siehe Abschnitt 3.2.3 Enzyme-Linked-Immunsorbent-Assay (ELISA): IL-6/sIL-6R Komplex ELISA). Um diese Funktionsweise zu spezifizieren, wurde der ELISA in verschiedenen Untersuchungsreihen genutzt (siehe Abschnitt 4.8 – 4.10).

4.8 Durchführung des IL-6/sIL-6R Komplex ELISAs mit IL-6, dem sIL-6R und HIL-6

Im Rahmen der ersten Untersuchungsreihe wurde geprüft, ob der IL-6/sIL-6R Komplex ELISA jeweils IL-6, den sIL-6R und HIL-6 detektieren kann. Für diesen Versuch wurde der α -IL-6 Antikörper (Capture Antikörper) in die 96 Well Mikrotiterplatte pipettiert. Ungebundene Anteile des Capture Antikörpers wurden in mehreren Waschschrritten entfernt und freie Bindungsstellen durch einen Blocking Puffer gesättigt. Im Anschluss wurde die Mikrotiterplatte erneut mehrmals gewaschen. Auf die Mikrotiterplatte wurden die Zytokine IL-6, der sIL-6R und HIL-6 jeweils in verschiedenen Konzentrationsreihen aufgetragen. Als Detection Antikörper wurde der Baf227 Antikörper, ein IL-6R Antikörper, aufgetragen. Die Mikrotiterplatte wurde über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert.

Als erstes Substrat wurde das Zytokin IL-6 auf den ELISA gegeben. IL-6 bindet an den Capture Antikörper, da dieser gegen IL-6 gerichtet ist. Daraufhin entsteht ein Komplex aus dem α -IL-6 Antikörper und dem daran gebundenen IL-6. Dieser Komplex beinhaltet noch freie Bindungsstellen am IL-6. Als Detection Antikörper wird der Baf227 Antikörper verwendet, der gegen den IL-6R gerichtet ist und somit die noch freien Bindungsstellen des IL-6 nicht besetzen kann. Da der Baf227 Antikörper nicht bindet, wird er in den folgenden Waschschrritten entfernt. Infolgedessen bindet auch das

biotinylierte Streptavidin-POD nicht, welches wiederum das im nächsten Schritt hinzugegebene POD-Substrat binden kann. Diese Bindung würde zum Farbumschlag führen, welcher in der Einheit *Relative Light Units* (RLU) gemessen wird (siehe Abschnitt 3.2.3 Enzyme-Linked-Immunsorbent-Assay (ELISA): IL-6/sIL-6R Komplex ELISA). Daher konnten keine aussagekräftigen RLU's mittels Tecan Infinite M200 PRO Reader detektiert werden (siehe Abb. 4.8.1 und Tabelle 4.8.1). Im zweiten durchgeführten IL-6/sIL-6R Komplex ELISA wurde analysiert, ob das Zytokin sIL-6R detektiert werden konnte. Die freien Bindungsstellen des sIL-6R konnten nicht an den Capture Antikörper (α -IL-6) anlagern und wurden daher in den einzelnen Waschschrinen von der Mikrotiterplatte entfernt. In den weiteren Schritten wurden auch die darauffolgenden auf die Mikrotiterplatte gegebenen Substrate (der Detection Antikörper, das biotinylierte Streptavidin-POD, das POD-Substrat) in den Waschschrinen entfernt, sodass keine aussagekräftigen RLU's mittels Tecan Infinite M200 PRO Reader detektiert werden konnten (siehe Abb. 4.8.2 und Tabelle 4.8.1).

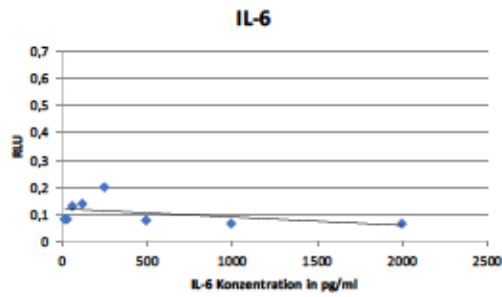


Abb. 4.8.1 IL-6/sIL-6R Komplex ELISA mit IL-6

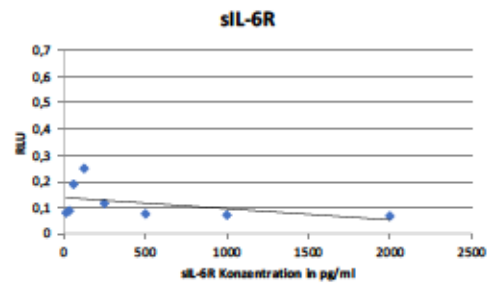


Abb. 4.8.2 IL-6/sIL-6R Komplex ELISA mit sIL-6R

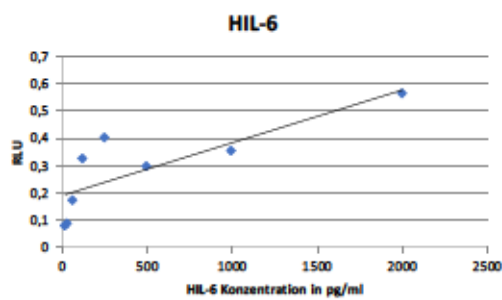


Abb. 4.8.3 IL-6/sIL-6R Komplex ELISA mit HIL-6

Abb. 4.8.1 IL-6/sIL-6R Komplex ELISA mit IL-6. Auf der x-Achse kann die Konzentration in pg/ml, in der IL-6 auf die Mikrotiterplatte pipettiert wurde, auf der y-Achse, können die Messwerte in RLU abgelesen werden. Es konnten keine Messwerte über 0,2 RLU detektiert werden. Die Verbindungslinie zeigt keinen Anstieg.

Abb. 4.8.2 IL-6/sIL-6R Komplex ELISA mit sIL-6R. Auf der x-Achse kann die Konzentration in pg/ml, in der sIL-6R auf die Mikrotiterplatte pipettiert wurde, auf der y-Achse, können die Messwerte in RLU abgelesen werden. Es konnten keine Messwerte über 0,25 RLU detektiert werden. Die Verbindungslinie zeigt keinen Anstieg.

Abb. 4.8.3 IL-6/sIL-6R Komplex ELISA mit HIL-6. Auf der x-Achse kann die Konzentration in pg/ml, in der HIL-6 auf die Mikrotiterplatte pipettiert wurde, auf der y-Achse, können die Messwerte in RLU

abgelesen werden. Es konnten Messwerte zwischen 0,08 – 0,56 RLU detektiert werden, daher zeigt die Verbindungslinie einen Anstieg.

Tabelle 4.8.1 Rohwerte der Messwerte des IL-6/sIL-6R Komplex ELISAs in RLU für IL-6, sIL-6R und HIL-6

Rohwerte des IL-6 ELISA		Rohwerte des sIL-6R ELISA		Rohwerte des HIL-6	
0,0677	0,0724	0,069	0,071	0,52939999	0,59930003
0,0666	0,074	0,0769	0,0735	0,34549999	0,36269999
0,0679	0,0944	0,082	0,0703	0,29480001	0,29960001
0,0711	0,33090001	0,1611	0,0749	0,36680001	0,43740001
0,1252	0,1592	0,2458	0,25369999	0,33430001	0,3168
0,17739999	0,0924	0,21179999	0,1666	0,193	0,1532
0,0918	0,076	0,0793	0,0964	0,0944	0,0815
0,0777	0,0902	0,0855	0,0739	0,0813	0,0833

Tabelle 4.8.2 Messwerte des IL-6/sIL-6R Komplex ELISAs in RLU für IL-6, sIL-6R und HIL-6

Konzentration von IL-6/sIL-6R/HIL-6 in pg/ml	RLU des IL-6 (Mittelwerte)	RLU des sIL-6R (Mittelwerte)	RLU des HIL-6 (Mittelwerte)
2000	0,07005	0,07	0,56435001
1000	0,0703	0,0752	0,35409999
500	0,8115	0,07615	0,29720001
250	0,20100001	0,118	0,40210001
125	0,1422	0,24975	0,32555
62,5	0,1349	0,1892	0,1731
31,25	0,0839	0,08785	0,08795
15,625	0,08395	0,0797	0,0823

Als dritte Probe wurde HIL-6 mit Hilfe des IL-6/sIL-6R Komplex ELISAs detektiert. HIL-6 ist ein Designer Zytokin, das aus IL-6 und dem sIL-6R besteht. Der IL-6 Anteil des HIL-6 bindet an den α -IL-6 Capture Antikörper. Der sIL-6R Anteil des HIL-6 besitzt

freie Bindungsstellen. An diese freien Bindungsstellen bindet der Baf227 Detection Antikörper. Dadurch formte sich ein Komplex aus dem α -IL-6 Antikörper, HIL-6 und dem Baf227 Antikörper. Dieser Komplex konnte im Folgenden das biotinylierte Streptavidin-POD binden, welches wiederum das hinzugefügte POD-Substrat bindet, wodurch es zum Farbumschlag kommt. Dadurch konnten signifikante Mengen des IL-6/sIL-6R Komplex mit Hilfe des Tecan Infinite M200 PRO Reader detektiert werden (siehe Abb. 4.8.3 und Tabelle 4.8.1).

Durch diese Ergebnisse wurde die Spezifität des IL-6/sIL-6R Komplex ELISAs *in vitro* bestätigt. Die Messwerte (Rohwerte siehe Tabelle 4.8.1, Mittelwerte siehe Tabelle 4.8.2, siehe Abb. 4.8.1 - 4.8.3) belegen, dass weder IL-6 noch der sIL-6R einzeln vorliegend detektiert werden können. Wird ausschließlich das Zytokin IL-6 auf den IL-6/sIL-6R Komplex ELISA gegeben, bindet dieses zwar an den α -IL-6 Antikörper, im Folgenden kann jedoch der Baf227 Antikörper nicht an das IL-6 binden. Wird der sIL-6R auf den IL-6/sIL-6R Komplex ELISA gegeben, kann dieser nicht an den α -IL-6 Antikörper binden und wird im nächsten Waschschrift von der Mikrotiterplatte entfernt. Ausschließlich der Komplex aus IL-6 und dem sIL-6R (das Designer Zytokin HIL-6), kann durch den IL-6/sIL-6R Komplex ELISA detektiert werden.

4.9 IL-6/sIL-6R Komplex ELISA mit IL-6/Konzentrationen von sIL-6R

In der zweiten Untersuchungsreihe wurde, nachdem in der ersten Untersuchungsreihe (siehe Abschnitt 4.8 Durchführung des IL-6/sIL-6R Komplex ELISAs mit IL-6, dem sIL-6R und HIL-6) die Spezifität des IL-6/sIL-6R Komplex ELISAs bestätigt wurde, wurde der ELISA eingehender getestet. Im Zuge dieser Untersuchungsreihe wurde als Standard HIL-6 (siehe Abb. 4.9.1 und Tabelle 4.9.1) verwendet. Als Proben wurden zwei Konzentrationsreihen des Zytokins IL-6 mit Zugabe von je 10 ng/ml sIL-6R und 50 ng/ml sIL-6R verwendet (siehe Tabelle 4.9.2). Wie in der ersten Untersuchungsreihe (siehe oben) wurde die 96 Well Mikrotiterplatte mit dem Capture Antikörper (α -IL-6) gecoatet (siehe Abschnitt 3.2.3 Enzyme-Linked-Immunsorbent-Assay (ELISA): IL-6/sIL-6R Komplex ELISA). Die Mikrotiterplatte wurde über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend folgten mehrere Waschschriffe und die Sättigung freier Bindungsstellen des Capture Antikörpers durch Blocking Puffer. Es folgte das Auftragen der Proben (HIL-6 und IL-6 + sIL-6R). An den Capture Antikörper lagerten sich die freien Bindungsstellen

des HIL-6 (Standard) und des IL-6 an. Nachdem ungebundene Anteile des HIL-6 und des IL-6 durch mehrmaliges Waschen entfernt wurden, wurde der Detection Antikörper (Baf227) aufgetragen. Der Baf227 Antikörper lagerte sich sowohl an das HIL-6 als auch an den sIL-6R an. Ungebundene Anteile des Antikörpers wurden durch mehrere Waschstschritte entfernt. Nach Zugabe des biotinylierten Streptavidin-POD und des POD-Substrates, wurde die erfolgte die Messung mit Hilfe des Tecan Infinite M200 PRO Reader in RLU gemessen (Rohwerte siehe Tabelle 4.9.1, Mittelwerte siehe Tabelle 4.9.2, siehe Abb. 4.9.1 – 4.9.3). Wie in der ersten Untersuchungsreihe zeigte sich, dass HIL-6 erneut detektiert werden konnte. Außerdem konnten sowohl die Komplexe aus IL-6 + 10 ng/ml sIL-6R und IL-6 + 50 ng/ml sIL-6R detektiert werden.

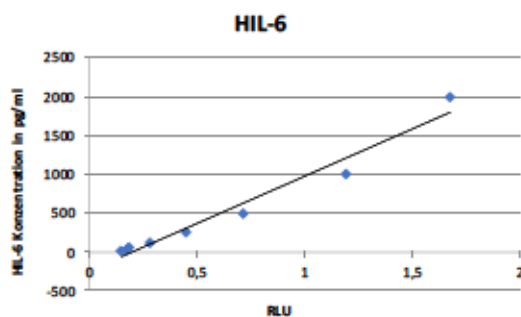


Abb. 4.9.1 IL-6/sIL-6R Komplex ELISA mit HIL-6

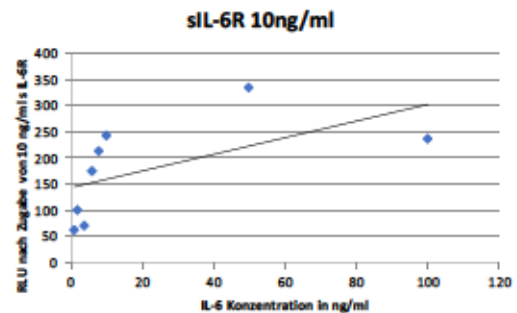


Abb. 4.9.2 IL-6/sIL-6R Komplex ELISA mit IL-6 + 10 ng/ml sIL-6R

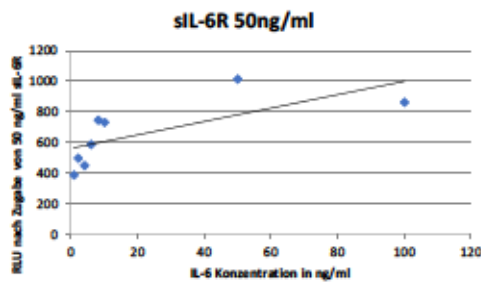


Abb 4.9.3 IL-6/sIL-6R Komplex ELISA mit IL-6 + 50 ng/ml sIL-6R

Abb. 4.9.1 IL-6/sIL-6R Komplex ELISA mit HIL-6. Auf der x-Achse können die Messwerte in RLU, auf der y-Achse kann die pipettierte Konzentration des HIL-6 in pg/ml abgelesen werden. Es konnten Messwerte zwischen 0,15 – 1,68 RLU detektiert werden.

Abb. 4.9.2 IL-6/sIL-6R Komplex ELISA mit IL-6 + 10 ng/ml sIL-6R. Auf der x-Achse kann die pipettierte IL-6 Konzentration in pg/ml, auf der y-Achse können die Messwerte in RLU gemessen werden.

In die IL-6 Konzentrationsreihe wurden jeweils 10 ng/ml sIL-6R hineinpipettiert. Der niedrigste Wert (63,15 RLU) konnte bei 1 ng/ml IL-6 + 10 ng/ml sIL-6R detektiert werden. Der höchste Wert (335,79 RLU) konnte bei 50 ng/ml IL-6 + 10 ng/ml sIL-6R detektiert werden.

Abb. 4.9.3 IL-6/sIL-6R Komplex ELISA mit IL-6 + 50 ng/ml sIL-6R. Auf der x-Achse kann die pipettierte IL-6 Konzentration in pg/ml, auf der y-Achse können die Messwerte in RLU gemessen werden. In die IL-6 Konzentrationsreihe wurden jeweils 50 ng/ml sIL-6R hineinpipettiert. Der niedrigste Wert (384,98 RLU) konnte bei 1 ng/ml IL-6 + 50 ng/ml sIL-6R detektiert werden. Der höchste Wert (1015,67 RLU) konnte bei 50 ng/ml IL-6 + 50 ng/ml sIL-6R detektiert werden.

Tabelle 4.9.1 Rohwerte der Messwerte des IL-6/sIL-6R Komplex ELISAs in RLU für HIL-6, IL-6 + 10 ng/ml sIL-6R und IL-6 + 50 ng/ml sIL-6R

Rohwerte des HIL-6		Rohwerte IL-6 + 10 ng/ml sIL-6R		Rohwerte IL-6 + 50 ng/ml sIL-6R	
1,63409996	1,71640003	0,3779	0,3976	0,85930002	0,95349997
1,15170002	1,23290002	0,48930001	0,4501	1,07149994	0,99010003
0,70889997	0,72320002	0,3845	0,40380001	0,84320003	0,75190002
0,45210001	0,45390001	0,36930001	0,3671	0,8567	0,75459999
0,27200001	0,29409999	0,34209999	0,3346	0,69190001	0,66610003
0,1788	0,1954	0,23270001	0,27000001	0,54449999	0,58249998
0,175	0,17649999	0,2811	0,2723	0,62800002	0,57950002
0,13959999	0,15350001	0,2467	0,2427	0,51230001	0,50830001

Tabelle 4.9.2 Messwerte des IL-6/sIL-6R Komplex ELISAs für HIL-6

Konzentration von HIL-6 in pg/ml	RLU (Mittelwerte)
2000	1,675249994
1000	1,192300022
500	0,716049999
250	0,453000009
125	0,283050001
62,5	0,187100001
31,25	0,175749995
15,625	0,14655

Tabelle 4.9.3 Messwerte des IL-6/sIL-6R Komplex ELISAs für IL-6 + 10 ng/ml s IL-6R und IL-6 + 50 ng/ml s IL-6R

Konzentration von IL-6 in ng/ml	RLU (Mittelwerte) nach Zugabe von 10 ng/ml sIL-6R	RLU (Mittelwerte) nach Zugabe von 50 ng/ml sIL-6R
100	236,4866747	864,934874
50	335,7855005	1015,670342
10	244,2415596	733,0413624
8	212,797945	742,8560999
6	176,6286926	589,3943243
4	71,21080463	449,4429344
2	101,927396	498,2138996
1	63,15298962	384,9805227

Diese Ergebnisse bewiesen erstens, dass durch den IL-6/sIL-6R Komplex ELISA nicht nur das Designer Zytokin HIL-6 detektiert werden kann, sondern auch die rekombinanten Proteine IL-6 und sIL-6R detektiert werden, wenn sie nicht einzeln, sondern als Komplex aufgetragen werden. Die durchgeführten ELISAs legen nahe, dass der IL-6/sIL-6R Komplex ELISA auch eingesetzt werden könnte, um den IL-6/sIL-6R Komplex *in vivo* mit Blutserum zu bestimmen. Zweitens geben die Messwerte für den IL-6/sIL-6R Komplex Aufschluss über die Detektionsgrenzen des ELISA. Zwar konnte der IL-6/sIL-6R Komplex sowohl mit 10 ng/ml sIL-6R, als auch mit 50 ng/ml sIL-6R detektiert werden, jedoch mit unterschiedlichen Ergebnissen (siehe Abb. 4.9.2 – 4.9.3 und Tabelle 4.9.2). Die Ergebnisse geben Aufschluss darüber, wie hoch die Menge des eingesetzten IL-6/sIL-6R Komplexes sein muss, um ein auswertbares Signal zu detektieren.

4.10 Durchführung des IL-6/sIL-6R Komplex ELISAs mit Blutserum

Im Rahmen der dritten Untersuchungsreihe wurde der IL-6/sIL-6R Komplex ELISA erstmals *in vivo* getestet. Der ELISA wurde mit den Blutseren von vier verschiedenen Probanden durchgeführt. Mit diesen Proben wurde erstens der IL-6R ELISA (siehe Abb. 4.10.1 - 4.10.2 und Tabelle 4.10.1 – 4.10.2), zweitens der IL-6/sIL-6R Komplex ELISA durchgeführt (siehe Abb. 4.10.3 - 4.10.4 und Tabelle 4.10.3 - 4.10.4). Der sIL-6R ELISA dient zur Kontrolle, da der sIL-6R sowohl im Blut gesunder als auch im Blut erkrankter Menschen in detektierbaren Mengen vorhanden ist. Die 96 Well Mikrotiterplatte wurde

mit dem Capture Antikörper α -IL-6R Antikörper befüllt. Nach mehreren Waschschrinen und dem Sättigen freier Bindungsstellen durch einen Blocking Puffer folgte das Auftragen der Proben. Als Standard wurde HIL-6 genutzt. Das Blutserum wurde unverdünnt und in den Verdünnungen 1:10, 1:25 und 1:40 aufgetragen. In dieser Arbeit werden die Verdünnungen 1:25 und 1:40 vorgestellt, vor allem in der Verdünnung 1:40 konnten aussagekräftige Mengen des sIL-6R nachgewiesen werden (siehe Abb. 4.10.2). Der Detection Antikörper (Baf227) wurde in die Mikrotiterplatte hineinpipettiert. Nach Zugabe von Streptavidin-POD und des POD-Substrates konnte die Messung der sIL-6R Menge mit Hilfe des Tecan Infinite M200 PRO Reader in RLU durchgeführt werden (siehe Abschnitt 3.2.3 Enzyme-Linked-Immunsorbent-Assay (ELISA): IL-6R ELISA). Hilfe des Tecan Infinite M200 PRO Reader in RLU durchgeführt werden (siehe Abschnitt 3.2.3 Enzyme-Linked-Immunsorbent-Assay (ELISA): IL-6R ELISA).

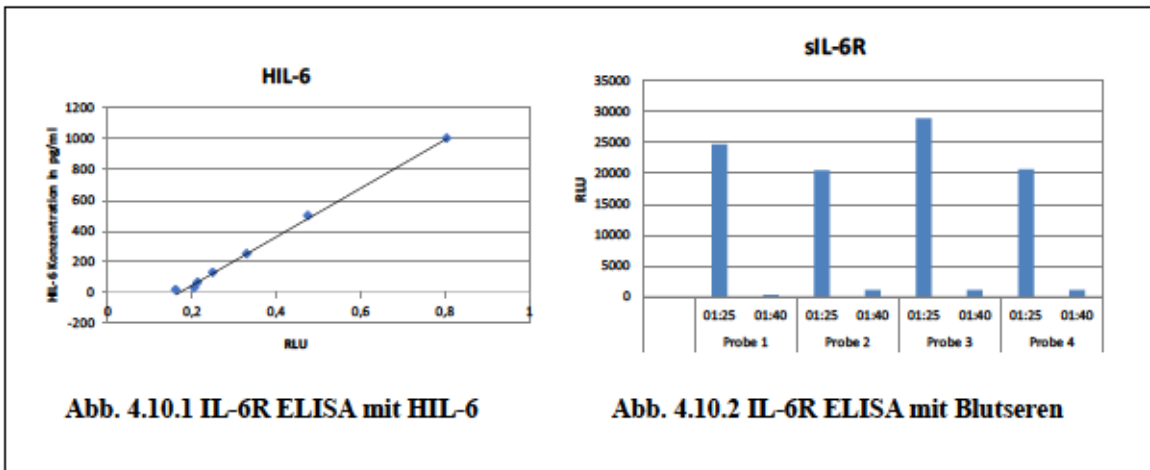


Abb. 4.10.1 IL-6R ELISA mit HIL-6. Auf der x-Achse können die Messwerte in RLU, auf der y-Achse kann die pipettierte Konzentration des HIL-6 in pg/ml abgelesen werden. Es konnten Messwerte zwischen 0,21 – 0,81 RLU detektiert werden.

Abb. 4.10.2 IL-6R ELISA mit Blutseren. Auf der x-Achse können jeweils die Blutseren der 4 Probanden in den Verdünnungen 1:25 und 1:40 abgelesen werden. Auf der y-Achse können die Messwerte in RLU abgelesen werden. In den 1:25 Verdünnungen konnten bis zu 28877,66236 RLU detektiert werden.

Konzentration von HIL-6 in pg/ml	RLU (Mittelwerte)
1000	0,805849999
500	0,475199997
250	0,329500005
125	0,249949999
62,5	0,21525
31,25	0,206549995
15,625	0,162699997

Tabelle 4.10.1 Messwerte des IL-6R ELISAs für HIL-6

Probe	Verdünnung	RLU (Mittelwerte)
Probe 1	1:25	24623,67539
	1:40	9,997862226
Probe 2	1:25	20351,76139
	1:40	1043,660889
Probe 3	1:25	28877,66236
	1:40	1065,790593
Probe 4	1:25	20634,31129
	1:40	1097,404186

Tabelle 4.10.2 Messwerte des IL-6R ELISAs für die Proben 1 - 4 (Blutseren) in den Verdünnungen 1:25 und 1:40

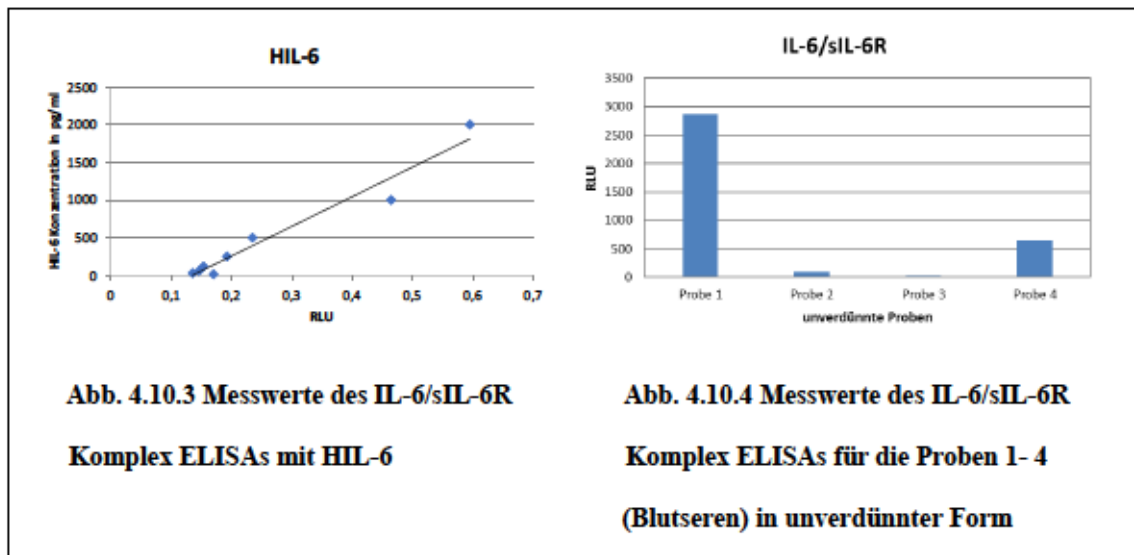


Abb. 4.10.3 Messwerte des IL-6/sIL-6R Komplex ELISAs mit HIL-6

Abb. 4.10.4 Messwerte des IL-6/sIL-6R Komplex ELISAs für die Proben 1- 4 (Blutseren) in unverdünnter Form

Mit diesen Ergebnissen des IL-6R ELISA konnte nachgewiesen werden, dass der sIL-6R im Blutserum der vier Probanden nachgewiesen werden konnte. Im nächsten Schritt wurde das Blutserum der vier Probanden mit Hilfe des IL-6/sIL-6R Komplex ELISA (siehe Abb. 4.10.3 - 4.10.4 und Tabelle 4.10.3 - 4.10.4) untersucht. Da im IL-6R ELISA der sIL-6R nachgewiesen werden konnte, sollte in dem IL-6/sIL-6R Komplex ELISA untersucht werden, wie hoch die Menge an sIL-6R ist, die im Komplex mit IL-6 vorliegt,

ist. Als Standard im IL-6/sIL-6R Komplex ELISA wurde wieder HIL-6 verwendet (siehe Abb. 4.10.3 und Tabelle 4.10.3).

Abb. 4.10.3 Messwerte des IL-6/sIL-6R Komplex ELISAs mit HIL-6. Auf der x-Achse können die Messwerte in RLU, auf der y-Achse kann die pipettierte Konzentration des HIL-6 in pg/ml abgelesen werden. Es konnten Messwerte zwischen 0,13 – 0,6 RLU detektiert werden.

Abb. 4.10.4 Messwerte des IL-6/sIL-6R Komplex ELISAs für die Proben 1 – 4 (Blutseren) in unverdünnter Form. Auf der x-Achse können die Blutseren der Proben 1 – 4 in unverdünnter Form und auf der y-Achse können die dazugehörigen Messwerte in RLU abgelesen werden. In Probe 1 konnte ein Signal von 2872,14 RLU detektiert werden. In den Proben 2 – 4 konnten Werte zwischen 29,68 - 649,8 RLU detektiert werden.

Konzentration von HIL-6 in pg/ml	RLU (Mittelwerte)
2000	0,595100015
1000	0,464450002
500	0,234199993
250	0,192850001
125	0,152950004
62,5	0,146349996
31,25	0,134650007
15,625	0,169600002

Tabelle 4.10.3 Messwerte des IL-6/sIL-6R Komplex ELISAs für HIL-6

Probe	Verdünnung	RLU (Mittelwerte)
Probe 1	unverdünnt	2872,14195
Probe 2	unverdünnt	89,7813246
Probe 3	unverdünnt	29,6770903
Probe 4	unverdünnt	649,803801

Tabelle 4.10.4 Messwerte des IL-6/sIL-6R Komplex ELISAs für die Proben 1 - 4 (Blutseren) in unverdünnter Form

Die 96 Well Mikrotiterplatte wurde mit einem α -IL-6 Antikörper (Capture Antikörper) gecoatet. Es folgten mehrere Waschschrte und die Sättigung freier Bindungsstellen durch einen Blocking Puffer. Auch hier wurde das Blutserum wieder unverdünnt und in den Verdünnungen 1:10, 1:25 und 1:40 aufgetragen. Als Detection Antikörper wurde der Baf227 Antikörper verwendet. Nachfolgend wurden Streptavidin-POD, sowie das POD-Substrat hinzugegeben. Die Messung der vorhandenen Menge des IL-6/sIL-6R

Komplexes erfolgte mit Hilfe des Tecan Infinite M200 PRO Reader (siehe Abschnitt 3.2.3 Enzyme-Linked-Immunsorbent-Assay (ELISA): IL-6/sIL-6R Komplex ELISA). In dieser Arbeit werden die Ergebnisse des unverdünnten Blutserums vorgestellt (siehe Tabelle 4.10.4). Im Gegensatz zu den Ergebnissen des IL-6R ELISAs, in dem in jeder der vier Proben eine aussagekräftige Menge des sIL-6R detektiert werden konnte (siehe Abb. 4.10.2), konnte in dem IL-6/sIL-6R Komplex ELISA nur in der Probe 1 eine aussagekräftige Menge des Komplexes aus IL-6 und sIL-6R detektiert werden. In den Proben 2 - 4 konnten keine aussagekräftigen Mengen des IL-6/sIL-6R Komplexes nachgewiesen werden. Da jedoch im IL-6R ELISA in jeder der vier Proben eine signifikante Menge an sIL-6R nachgewiesen werden konnte, lässt dies darauf schließen, dass die Ergebnisse des IL-6/sIL-6R Komplex ELISAs von den unterschiedlichen IL-6 Mengen im Blutserum der Probanden 1 - 4 abhängig sind. Die Messwerte weisen darauf hin, dass in den Proben 2 - 4 keine detektierbaren Mengen an IL-6 vorhanden waren, welches an den sIL-6R binden konnte und so einen Komplex mit diesem formen konnte. In der Probe 1 war eine höhere Menge an IL-6 vorhanden als in den Proben 2 - 4, welches an den sIL-6R binden konnte und so einen Komplex formen konnte.

Die Ergebnisse dieser drei Untersuchungsreihen (siehe Abschnitt 4.8 - 4.10) konnten die Funktionsweise des IL6/sIL-6R Komplex ELISAs, sowohl *in vitro*, als auch *in vivo* bestätigen.

In der ersten Untersuchungsreihe konnte bestätigt werden, dass der IL-6/sIL-6R Komplex ELISA das Designer Zytokin HIL-6 detektieren konnte (siehe Abb. 4.8.3). HIL-6 besteht aus einem Komplex aus IL-6 und dem sIL-6R. Im Gegensatz dazu konnten weder IL-6 (siehe Abb. 4.8.1) noch der sIL-6R (siehe Abb. 4.8.2) einzeln detektiert werden. Hiermit konnte das Funktionsprinzip des IL-6/s IL-6R Komplex ELISAs bestätigt werden.

In der zweiten Untersuchungsreihe wurde untersucht, ob der IL-6/sIL-6R Komplex ELISA den Komplex aus den rekombinanten Proteinen IL-6 und dem sIL-6R detektieren kann, welche auch in natürlicher Form im Menschen vorkommen. Die Ergebnisse zeigten, dass der Komplex aus IL-6 mit verschiedenen Mengen an sIL-6R detektiert werden kann (siehe Abb. 4.9.2 - 4.9.3). Nach diesen Untersuchungsreihen, die *in vitro* durchgeführt wurden, wurde der IL-6/sIL-6R Komplex ELISA erstmals im Rahmen einer dritten Untersuchungsreihe *in vivo* durchgeführt.

In dieser dritten Untersuchungsreihe wurden Blutproben von vier verschiedenen Probanden zuerst mit einem IL-6R ELISA getestet. Mit diesem ELISA konnten

aussagekräftige Mengen an sIL-6R in allen vier Proben nachgewiesen werden (siehe Abb. 4.10.2). Im Rahmen des IL-6/sIL-6R Komplex ELISAs wurde die Menge an sIL-6R bestimmt, die gebunden an IL-6 im Komplex vorlag. Hier wurden sowohl aussagekräftige Mengen des IL-6/sIL-6R Komplexes detektiert (siehe Abb. 4.10.4, Probe 1), als auch nicht detektierbare Mengen (siehe Abb. 4.10.4, Proben 2 - 4) gemessen. Mit dieser Untersuchungsreihe wurde bestätigt, dass der IL-6/sIL-6R Komplex ELISA auch *in vivo* angewandt werden kann.

Ethical approval

Studennummer 4284

Untersuchung des Einflusses von entzündlichen Erkrankungen und Tumoren auf die Entstehung des löslichen Interleukin 11-Rezeptors sowie des Interleukin 6/löslichen Interleukin 6-Rezeptor-Komplexes im Menschen

5. Diskussion

IL-6 ist ein Zytokin, das von verschiedenen Zellen des Körpers gebildet wird, wie z.B. Fibroblasten oder Endothelzellen. Im Blutserum gesunder Menschen ist IL-6 kaum detektierbar, die Menge liegt bei etwa 1,9-6 pg/ml (Scambia *et al.* 1994). Kommt es zu einer Entzündung steigt IL-6 an und führt zu pro-inflammatorischen (*trans-signaling*) und anti-inflammatorischen (*classic-signaling*) Reaktionen, abhängig davon an welchen Rezeptor IL-6 bindet. Im Zuge des *classic-signaling* bindet IL-6 an den nicht signaltransduzierenden membrangebundenen IL-6R (α -Rezeptor), woraufhin über das signaltransduzierende gp130 (β -Rezeptor) eine Signalkaskade in Gang gesetzt wird, die vor allem zu anti-inflammatorischen Reaktionen führt (Scheller *et al.* 2011). Der membrangebundene IL-6R kommt jedoch nur in Hepatozyten und einigen Formen von Leukozyten vor (Chalaris *et al.* 2011). Im Laufe der Entzündung, vor allem bei chronischen Entzündungen, wie z.B. Morbus Crohn und Colitis ulcerosa, wird aus dem membrangebundenen IL-6R durch Ektodomänen-Shedding (90%) oder alternatives Splicing der mRNA des membrangebundenen IL-6R (10%) vermehrt sIL-6R gebildet (Müllberg *et al.* 1994). Bindet IL-6 an den sIL-6R führt dies zum *trans-signaling* mit hauptsächlich pro-inflammatorischen Reaktionen. Der sIL-6R kann im Gegensatz zu dem membrangebundenen IL-6R in allen Körperzellen zur Signaltransduktion führen (Rose-John *et al.* 1994). Der IL-6/sIL-6R Komplex kann durch den Inhibitor sgp130Fc gehemmt werden. In dieser Arbeit wurde der IL-6/sIL-6R Komplex in zwei Projekten untersucht. Es wurde ein ELISA getestet, der den IL-6/sIL-6R Komplex sowohl *in vivo* als auch *in vitro* detektieren kann. Zudem wurde die Möglichkeit untersucht, einen stabilen Komplex aus IL-6 und dem sIL-6R zu bilden, dessen biologische Aktivität erhalten blieb.

5.1 IL-6/sIL-6R Komplex ELISA

Bisher verwendete ELISA können entweder IL-6 oder den sIL-6R detektieren, jedoch nicht den Komplex aus beiden (IL-6/sIL-6R). Im Rahmen dieser Arbeit wurde ein ELISA verwendet, der den Komplex aus IL-6/sIL-6R detektieren kann. Dieser IL-6/sIL-6R Komplex ELISA wurde im Institut für Biochemie und Molekularbiologie II entwickelt. Es wird ein Capture Antikörper verwendet, der gegen IL-6 gerichtet ist, und ein Detection Antikörper, der gegen den IL-6R gerichtet ist. Der Capture Antikörper detektiert das im

Diskussion

IL-6/sIL-6R Komplex enthaltene IL-6. Dadurch bildet sich ein zusammenhängendes Gebilde aus Capture Antikörper und IL-6/sIL-6R. Im nächsten Schritt bindet der Detection Antikörper, der gegen den IL-6R gerichtet ist, an das Gebilde aus Capture Antikörper und IL-6/sIL-6R. Daher können weder IL-6 noch der sIL-6R einzeln detektiert werden. Mit Hilfe dieses ELISAs ist es möglich, die Menge des IL-6/sIL-6R Komplexes im Blutserum von Patienten zu detektieren, die an chronisch entzündlichen Erkrankungen, wie Hepatitiden oder den chronisch entzündlichen Darmerkrankungen Morbus Crohn und Colitis ulcerosa erkrankt sind. Der IL-6/sIL-6R Komplex und die entstehende Signaltransduktion des *trans-signaling* führen bei diesen Erkrankungen vor allem zu der überschießenden Entzündungsreaktion und wären der geeignete Ansatzpunkt für eine kausale Therapie (Rose-john *et.al.* 1994). Der Inhibitor sgp130Fc, der aus der löslichen Form des signaltransduzierenden Glykoproteins gp130 und dem Fc-Anteil eines IgG-Antikörpers besteht, bindet an den IL-6/sIL-6R Komplex und verhindert dessen Bindung an gp130 und dass damit einsetzende *trans-signaling* (Garbers *et al.* 2011) Um die adäquate Dosierung des sgp130Fc zu bestimmen, sollte jedoch die IL-6/sIL-6R Komplexmenge bekannt sein, die sich im Blutserum der Patienten befindet, die von chronisch entzündlichen Erkrankungen betroffen sind. Im Verlauf des Experimentes wurde zuerst nachgewiesen, dass der IL-6/sIL-6R Komplex ELISA weder rekombinantes IL-6 noch den rekombinanten sIL-6R einzeln detektieren kann. Nur HIL-6 konnte detektiert werden. HIL-6 ist ein Designer Zytokin, dass aus IL-6 und dem sIL-6R besteht, die durch einen flexiblen Peptid-Linker miteinander verbunden sind. In einer zweiten Untersuchung wurden feste Mengen an rekombinatem IL-6 mit je 10 ng/ml und 50 ng/ml rekombinatem sIL-6R detektiert. Auch hier zeigte sich, dass der IL-6/sIL-6R Komplex detektiert werden konnte. In der dritten Untersuchung wurde der ELISA mit Blutserum vier verschiedener Probanden durchgeführt. Hier konnte in drei der vier Proben keine signifikante Menge des IL-6/sIL-6R Komplexes detektiert werden. In einer der vier Proben konnte eine höhere Menge des IL-6/sIL-6R Komplexes detektiert werden. Dies könnte daran liegen, dass dieser Proband möglicherweise eine leichte Entzündung, wie z.B. eine Rhinitis, durchlitt. In weiteren Untersuchungen könnte der ELISA auch mit Blutserumproben von Probanden getestet werden, die von chronisch entzündlichen Erkrankungen betroffen sind. Dazu gehören z.B. die chronisch entzündlichen Darmerkrankungen Morbus Crohn und Colitis ulcerosa, die Infektionskrankheiten

Diskussion

Hepatitis B und C, Leberzirrhose oder gastrointestinale Tumorleiden. Könnte man hier die Menge des IL-6/sIL-6R Komplexes bestimmen, könnte so die maximale Menge des einzusetzenden sgp130Fc bestimmen. Aus den Ergebnissen der Untersuchung mit dem Blutserum gesunder Probanden könnte die Mindestmenge des einzusetzenden sgp130Fc bestimmt werden. Es ist notwendig die adäquate Dosierung des sgp130Fc zu bestimmen, um zu erreichen, dass allein das *trans-signaling* und die damit verbundenen pro-inflammatorischen Reaktionen gehemmt werden, jedoch nicht das *classic-signaling* und die damit verbundenen anti-inflammatorischen Reaktionen. Bei einer zu hohen Dosierung des sgp130Fc würde das gesamte an den sIL-6R gebundene IL-6 in dem IL-6/sIL-6R Komplex eingeschlossen bleiben und könnte so nicht mehr an den membrangebundenen IL-6R binden und damit die antiinflammatorischen Wirkungen des *classic-signaling* hervorrufen. Der Inhibitor sgp130Fc könnte somit z.B. den Antikörper Tocilizumab ersetzen, der gegen IL-6 gerichtet ist und dadurch sowohl das *classic-signaling*, als auch das *trans-signaling* hemmt. Tocilizumab wird zurzeit zur Behandlung von rheumatischen Erkrankungen eingesetzt.

5.2 Bildung eines stabilen IL-6/sIL-6R Komplexes

Im Rahmen des zweiten Projektes wurde versucht einen stabilen Komplex aus IL-6 und dem sIL-6R aufzubauen. Dieser Komplex wurde als Alternative des Designer Zytokins HIL-6 untersucht. Dafür wurden mittels Mutagenese-PCR Cysteine in die cDNAs kodierend für sIL-6R, IL-6R, IL-6-GFP und HIL-6 eingefügt. Die mutierten Plasmide wurden mittels Co-Transfektion in Zellen eingebracht und die exprimierten Proteine wurden mittels Western Blot detektiert und ihre biologische Aktivität in Proliferationsassays überprüft. Zusätzlich zu dieser Form des mutierten sIL-6R wurden zwei weitere mutierte Formen des sIL-6R gebildet. Dafür wurde als Ausgangsplasmid, dass in der Mutagenese-PCR mutierte HIL-6 verwendet. HIL-6 ist ein Designer Zytokin, das aus IL-6 und dem sIL-6R besteht, die mittels eines flexiblen Peptid-Linkers miteinander verbunden sind (Rakemann *et al.*, 1997) Das mutierte HIL-6 enthält zusätzlich noch die in der Mutagenese-PCR eingebrachten Cysteine. Es wurde mit dem Restriktionsenzym BamHI in der Region des Linkers geschnitten, sodass der sIL-6R mit den eingebrachten Cysteinen getrennt vom IL-6 vorlag. Der entstandene mutierte sIL-6R enthielt sticky ends, die durch die Exonuklease- und die Polymerase-Funktion des

Diskussion

Klenow-Fragments zu blunt ends umgewandelt wurden. Da das Klenow-Fragment nicht immer an den gleichen Stellen Basen entfernt oder auffüllt, können verschiedene Mengen an Aminosäuren als Überhang bestehen bleiben. Über Sequenzierung wurde eine mutierte Form des sIL-6R detektiert, die 17 Aminosäuren Überhang besitzt, und eine weitere mutierte Form des sIL-6R, die 42 Aminosäuren Überhang besitzt. Somit lagen drei verschiedene Formen des mutierten sIL-6R vor, die als Alternative zu HIL-6 untersucht wurden: der durch die PCR veränderte sIL-6R ohne Überhang an Aminosäuren, und die durch den BamHI-Verdau entstandenen mutierten sIL-6R Formen, mit jeweils 17 und 42 Aminosäuren Überhang. Alle drei mutierten sIL-6R Formen wurden in Co-Transfektion mit dem mutierten IL-6-GFP in einen stabilen Komplex gebracht und mittels Western Blot detektiert. In der Western Blot Detektion konnten alle drei IL-6/sIL-6R Komplexe detektiert werden und keine Unterschiede in der Detektion festgestellt werden. Weiterhin wurde die biologische Aktivität der Komplexe in Proliferationsassays untersucht. Zwar konnte in allen drei Formen des mutierten sIL-6R im Vergleich zur Negativkontrolle eine Proliferation nachgewiesen werden, die stärkste Proliferation wurde jedoch in dem Komplex nachgewiesen, der die durch die PCR mutierte Form des sIL-6R enthielt. Diese Form enthielt im Gegensatz zu den beiden anderen Formen keine überschüssigen Aminosäuren. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass die zusätzlichen Aminosäuren an einem oder mehreren Punkten der Signaltransduktion hinderlich sind. Dies könnte z.B. das Binden des gp130 an den IL-6/sIL-6R Komplex oder die folgende Internalisierung des gebildeten Komplexes sein. Diese Hindernisse könnten wiederum die wachstumsfördernden Effekte des IL-6 inhibieren. Somit konnte zwar bestätigt werden, dass alle Formen des mutierten sIL-6R im Komplex mit dem mutiertem IL-6 GFP exprimiert wurden und im Western Blot detektiert werden konnten. Hinsichtlich der biologischen Aktivität gab es jedoch Unterschiede, die darauf hinweisen, dass nur die in der PCR entstandene mutierte sIL-6R Form eine ausreichende Proliferation hervorruft. Somit wäre für weitere Untersuchungen, in denen ein stabiler IL-6/sIL-6R Komplex genutzt wird, wie der verwendete IL-6/sIL-6R Komplex ELISA, der durch PCR entstandene mutierte sIL-6R am ehesten als Alternative zu HIL-6 geeignet.

6. Schlussfolgerung

Das Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung des *trans-signalings*. Im Genaueren wurde ein Testsystem zur Detektion des bei CEDs erhöhten IL-6/sIL-6R Komplexes auf seine Spezifität geprüft. Im Zuge dieser Untersuchung konnte bewiesen werden, dass der IL-6/sIL-6R Komplex ELISA *in vitro* funktionsfähig ist. In diesen ELISAs wurde das Designer Zytokin HIL-6 verwendet. Zusätzlich wurde der ELISA *in vivo* getestet. Auch in diesen Untersuchungsreihen bestätigte sich seine Spezifität den IL-6/sIL-6R Komplex zu detektieren. Indem die exakte Menge des IL-6/sIL-6R Komplexes in Blutseren bestimmt werden kann, kann so die präzise Menge für Inhibitoren des IL-6/sIL-6R Komplexes und damit des pro-inflammatorischen *trans-signalings* bestimmt werden.

Des Weiteren wurde eine Alternative für das Designer Zytokin HIL-6 entwickelt. Mit Hilfe von Cysteinen konnten Disulfidbrücken zwischen IL-6 GFP und dem sIL-6R gebildet werden. Die Detektion mittels ELISA bewies, dass die Disulfidbrückenbildung die Komplexbildung und Expression der mutierten Proteine nicht hinderte, Proliferationsassays belegten, dass die Disulfidbrückenbildung die proliferationsfördernde Wirkung des durch den mutierten IL-6/sIL-6R Komplexes induzierten Signalweges nicht beeinträchtigte. Somit wurde eine funktionsfähige Alternative zum HIL-6 entwickelt.

Im Hinblick auf weitere Untersuchungen des *trans-signalings* können die Ergebnisse der beiden Experimente zusammengeführt werden. In allen ELISAs wurde HIL-6 als Standard genutzt. Der mutierte IL-6/sIL-6R Komplex könnte anstatt HIL-6 als Standard genutzt werden.

Zudem könnten weitere IL-6/sIL-6R Komplex ELISA mit Blutseren erkrankter Probanden durchgeführt werden. Zu diesen Erkrankungen zählen beispielsweise Morbus Crohn, Colitis Ulcerosa oder rheumatoide Arthritis.

Schlussfolgerung

Diese ELISAs würden Aufschluss über die Menge des IL-6/sIL-6R Komplexes geben, der sich in Blutseren von Probanden befindet, die an chronisch entzündlichen Erkrankungen leiden.

7. Literaturverzeichnis

- Baran, P., Nitz, R., Grotzinger, J., Scheller, J. und Garbers, C. (2013): Minimal interleukin 6 (IL-6) receptor stalk composition for IL-6 receptor shedding and IL-6 classic signaling. In: *The journal of biological chemistry* 288 (21), S. 14756–14768.
- Becker, C., Fantini, M.C., Schramm, C., Lehr, H.A., Wirtz, S., Nikolaev, A., Burg, J., Strand, S., Kiesslich, R., Huber, S., Ito, H., Nishimoto, N., Yoshizaki, K., Kishimoto, T., Galle, P.R., Blessing, M., Rose-John, S. und Neurath, M.F. (2004): TGF-beta suppresses tumor progression in colon cancer by inhibition of IL-6 trans-signaling. In: *Immunity* 21 (4), S. 491–501.
- Becker, C., Fantini, M.C., Wirtz, S., Nikolaev, A., Lehr, H.A., Galle, P.R., Rose-John, S. und Neurath, M.F. (2005): IL-6 signaling promotes tumor growth in colorectal cancer. In: *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* 4 (2), S. 217–220.
- Black, Roy A. (2002): Tumor necrosis factor-alpha converting enzyme. In: *The international journal of biochemistry & cell biology* 34 (1), S. 1–5.
- Blobel, C. P. (2002): Functional and biochemical characterization of ADAMs and their predicted role in protein ectodomain shedding. In: *Inflammation research: official journal of the european histamine research society* 51 (2), S. 83–84.
- Chalaris, A., Garbers, C., Rabe, B., Rose-John, S. und Scheller, J. (2011): The soluble Interleukin 6 receptor: generation and role in inflammation and cancer. In: *European journal of cell biology* 90 (6-7), S. 484–494.
- Chalaris, A., Rabe, B., Paliga, K., Lange, H., Laskay, T., Fielding, C.A., Jones, S.A., Rose-John, S. und Scheller, J. (2007): Apoptosis is a natural stimulus of IL6R shedding and contributes to the proinflammatory trans-signaling function of neutrophils. In: *Blood* 110 (6), S. 1748–1755.
- Danese, S. und Gao, B. (2010): Interleukin-6: a therapeutic Jekyll and Hyde in gastrointestinal and hepatic diseases. In: *Gut* 59 (2), S. 149–151.
- Dann, Sara M., Spehlmann, M.E., Hammond, D.C., Imura, M., Hase, K., Choi, Lillian J., Hanson, E. und Eckmann, L. (2008): IL-6-dependent mucosal protection prevents establishment of a microbial niche for attaching/effacing lesion-forming enteric bacterial pathogens. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 180 (10), S. 6816–6826.
- Dasgupta, B., Corkill, M., Kirkham, B., Gibson, T. und Panayi, G. (1992): Serial estimation of interleukin 6 as a measure of systemic disease in rheumatoid arthritis. In: *The journal of rheumatology* 19 (1), S. 22–25.
- DeLeo, F. R. (2007): Attractive shedding. In: *Blood* 110 (6), S. 1711–1712.
- Eaden, J.A., Abrams, K.R. und Mayberry, J.F. (2001): The risk of colorectal cancer in ulcerative colitis: a meta-analysis. In: *Gut* 48 (4), S. 526–535.
- Eulendorf, R., Dittrich, A., Khouri, C., Müller, Pia J., Mutze, B., Wolf, A. und Schaper, F. (2012): Interleukin-6 signalling: more than Jaks and STATs. In: *European journal of cell biology* 91 (6-7), S. 486–495.

- Fischer, M., Goldschmitt, J., Peschel, C., Brakenhoff, J.P., Kallen, K.J., Wollmer, A., Grotzinger, J. und Rose-John, S. (1997): I. A bioactive designer cytokine for human hematopoietic progenitor cell expansion. In: *Nature biotechnology* 15 (2), S. 142–145.
- Franchimont, N., Lambert, C., Huynen, P., Ribbens, C., Relic, B., Chariot, A., Bours, V., Piette, J., Merville, M. und Malaise, M. (2005): Interleukin-6 receptor shedding is enhanced by interleukin-1beta and tumor necrosis factor alpha and is partially mediated by tumor necrosis factor alpha-converting enzyme in osteoblast-like cells. In: *Arthritis and rheumatism* 52 (1), S. 84–93.
- Fuhrer, D.K., Feng, G.S. und Yang, Y.C. (1995): Syp associates with gp130 and Janus kinase 2 in response to interleukin-11 in 3T3-L1 mouse preadipocytes. In: *The journal of biological chemistry* 270 (42), S. 24826–24830.
- Garbers, C., Hermanns, H.M., Schaper, F., Müller-Newen, G., Grotzinger, J., Rose-John, S. und Scheller, J. (2012): Plasticity and cross-talk of interleukin 6-type cytokines. In: *Cytokine & growth factor reviews* 23 (3), S. 85–97.
- Garbers, C., Janner, N., Chalaris, A., Moss, M.L., Floss, D.M., Meyer, D., Koch-Nolte, F., Rose-John, S. und Scheller, J. (2011): Species specificity of ADAM10 and ADAM17 proteins in interleukin-6 (IL-6) trans-signaling and novel role of ADAM10 in inducible IL-6 receptor shedding. In: *The journal of biological chemistry* 286 (17), S. 14804–14811.
- Garbers, C., Thaiss, W., Jones, G.W., Waetzig, G.H., Lorenzen, I., Guilhot, F., Lissilaa, R., Ferlin, W.G., Grotzinger, J., Jones, S.A., Rose-John, S. und Scheller, J. (2011): Inhibition of classic signaling is a novel function of soluble glycoprotein 130 (sgp130), which is controlled by the ratio of interleukin 6 and soluble interleukin 6 receptor. In: *The journal of biological chemistry* 286 (50), S. 42959–42970.
- Guschin, D., Rogers, N., Briscoe, J., Witthuhn, B., Watling, D., Horn, F., Pellegrini, S., Yasukawa, K., Heinrich, P. und Stark, G.R. (1995): A major role for the protein tyrosine kinase JAK1 in the JAK/STAT signal transduction pathway in response to interleukin-6. In: *The EMBO journal* 14 (7), S. 1421–1429.
- Gustot, T., Lemmers, A., Louis, E., Nicaise, C., Quertinmont, E., Belaiche, J., Roland, S., van Gossum, A., Deviere, J. und Franchimont, D. (2005): Profile of soluble cytokine receptors in Crohn's disease. In: *Gut* 54 (4), S. 488–495.
- Hammacher, A., Ward, L.D., Weinstock, J., Treutlein, H., Yasukawa, K. und Simpson, R.J. (1994): Structure-function analysis of human IL-6: identification of two distinct regions that are important for receptor binding. In: *Protein science: a publication of the Protein Society* 3 (12), S. 2280–2293.
- 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. In: *The biochemical journal* 374 (Pt.1), S. 1–20.
- Honda, M., Yamamoto, S., Cheng, M., Yasukawa, K., Suzuki, H., Saito, T., Osugi, Y., Tokunaga, T. und Kishimoto, T. (1992): Human soluble IL-6 receptor: its detection and enhanced release by HIV infection. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 148 (7), S. 2175–2180.

- Horiuchi, S., Koyanagi, Y., Zhou, Y., Miyamoto, H., Tanaka, Y., Waki, M., Matsumoto, A., Yamamoto, M. und 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. In: *European journal of immunology* 24 (8), S. 1945–1948.
- Houssiau, F.A., Devogelaer, J.P., van Damme, J., Deuchaisnes, C.N. de und van Snick, J. (1988): Interleukin-6 in synovial fluid and serum of patients with rheumatoid arthritis and other inflammatory arthritides. In: *Arthritis and rheumatism* 31 (6), S. 784–788.
- Jess, T., Rungoe, C. und Peyrin-Biroulet, L. (2012): Risk of colorectal cancer in patients with ulcerative colitis: a meta-analysis of population-based cohort studies. In: *Clinical gastroenterology and hepatology: the official clinical practice journal of the American Gastroenterological Association* 10 (6), S. 639–645.
- Jones, Simon A.; Rose-John, Stefan (2002): The role of soluble receptors in cytokine biology: the agonistic properties of the sIL-6R/IL-6 complex. In: *Biochimica et biophysica acta* 1592 (3), S. 251–263.
- Jones, A.C., Besley, C.R., Warner, J.A., Warner, J.O. (1994): Variations in serum soluble IL-2 receptor concentration. In: *Pediatric allergy and immunology: official publication of the european society of pediatric allergy and immunology* 5 (4), S. 230–234.
- Jostock, T.; Mullberg, J.; Ozbek, S.; Atreya, R.; Blinn, G.; Voltz, N. et al. (2001): Soluble gp130 is the natural inhibitor of soluble interleukin-6 receptor transsignaling responses. In: *European journal of biochemistry* 268 (1), S. 160–167.
- Keul, R., Heinrich, P.C., Müller-newen, G., Müller, K. und Woo, P. (1998): A possible role for soluble IL-6 receptor in the pathogenesis of systemic onset juvenile chronic arthritis. In: *Cytokine* 10 (9), S. 729–734.
- Korn, T., Bettelli, E., Oukka, M., Kuchroo, V.K. (2009): IL-17 and Th17 Cells. In: *Annual review of immunology* 27, S. 485–517.
- Kotake, S., Sato, K., Kim, K.J., Takahashi, N., Udagawa, N., Nakamura, I., Yamaguchi, A., Kishimoto, T., Suda, T. und Kashiwazaki, S. (1996): Interleukin-6 and soluble interleukin-6 receptors in the synovial fluids from rheumatoid arthritis patients are responsible for osteoclast-like cell formation. In: *Journal of bone and mineral research: the official journal of the american society for bone and mineral research* 11 (1), S. 88–95.
- Liu, B., Liao, J., Rao, X., Kushner, S.A., Chung, C.D., Chang, D.D. und Shuai, K. (1998): Inhibition of Stat1-mediated gene activation by PIAS1. In: *Proceedings of the national academy of sciences of the united states of america* 95 (18), S. 10626–10631.
- Lust, J.A., Donovan, K.A., Kline, M.P., Greipp, P.R., Kyle, R.A. und Maihle, N.J. (1992): Isolation of an mRNA encoding a soluble form of the human interleukin-6 receptor. In: *Cytokine* 4 (2), S. 96–100.

- Madhok, R., Crilly, A., Watson, J. und Capell, H.A. (1993): Serum interleukin 6 levels in rheumatoid arthritis: correlations with clinical and laboratory indices of disease activity. In: *Annals of the rheumatic diseases* 52 (3), S. 232–234.
- Malaguarnera, M., Di Fazio, I., Romeo, M.A., Restuccia, S., Laurino, A. und Trovato, B.A. (1997): Elevation of interleukin 6 levels in patients with chronic hepatitis due to hepatitis C virus. In: *Journal of gastroenterology* 32 (2), S. 211–215.
- Matsumoto, A., Masuhara, M., Mitsui, K., Yokouchi, M., Ohtsubo, M., Misawa, H., Miyajima, A. und Yoshimura, A. (1997): CIS, a cytokine inducible SH2 protein, is a target of the JAK-STAT5 pathway and modulates STAT5 activation. In: *Blood* 89 (9), S. 3148–3154.
- Matthews, V., Schuster, B., Schutze, S., Bussmeyer, I., Ludwig, A., Hundhausen, C., Sadowski, T., Saftig, P., Hartmann, D., Kallen, K.-J. und Rose-John, S. (2003): Cellular cholesterol depletion triggers shedding of the human interleukin-6 receptor by ADAM10 and ADAM17 (TACE). In: *The journal of biological chemistry* 278 (40), S. 38829–38839.
- Mitsuyama, K., Tomiyasu, N., Masuda, J., Yamasaki, H., Tsuruta, O. und Sata, M. (2007): High affinity of ecabet sodium for inflamed colonic mucosa in ulcerative colitis. In: *Digestive diseases and sciences* 52 (6), S. 1442–1443.
- Mitsuyama, K., Tomiyasu, N., Suzuki, A., Takaki, K., Takedatsu, H., Masuda, J., Yamasaki, H., Matsumoto, S., Tsuruta, O., Toyonaga, A. und Sata, M. (2006): A form of circulating interleukin-6 receptor component soluble gp130 as a potential interleukin-6 inhibitor in inflammatory bowel disease. In: *Clinical and experimental immunology* 143 (1), S. 125–131.
- Mitsuyama, K., Toyonaga, A., Sasaki, E., Ishida, O., Ikeda, H., Tsuruta, O., Harada, K., Tateishi, H., Nishiyama, T. und Tanikawa, K. (1995): Soluble interleukin-6 receptors in inflammatory bowel disease: relation to circulating interleukin-6. In: *Gut* 36 (1), S. 45–49.
- Müllberg, J., Oberthur, W., Lottspeich, F., Mehl, E., Dittrich, E., Graeve, L., Heinrich, P.C. und Rose-John, S. (1994): The soluble human IL-6 receptor. Mutational characterization of the proteolytic cleavage site. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* 152 (10), S. 4958–4968.
- Müllberg, J., Schooltink, H., Stoyan, T., Gunther, M., Graeve, L., Buse, G., Mackiewicz, A., Heinrich, P.C. und Rose-John, S. (1993): The soluble interleukin-6 receptor is generated by shedding. In: *European journal of immunology* 23 (2), S. 473–480.
- Muraguchi, A., Hirano, T., Tang, B., Matsuda, T., Horii, Y., Nakajima, K. und Kishimoto, T. (1988): The essential role of B cell stimulatory factor 2 (BSF-2/IL-6) for the terminal differentiation of B cells. In: *The journal of experimental medicine* 167 (2), S. 332–344.
- Narazaki, M., Yasukawa, K., Saito, T., Ohsugi, Y., Fukui, H., Koishihara, Y., Yancopoulos, G.D., Taga, T. und Kishimoto, T. (1993): Soluble forms of the interleukin-6 signal-transducing receptor component gp130 in human serum possessing a potential to inhibit signals through membrane-anchored gp130. In: *Blood* 82 (4), S. 1120–1126.

- Nicholson, S.E., Souza, D. de, Fabri, L.J., Corbin, J., Willson, T.A., Zhang, J.G., Silva, A., Asimakis, M., Farley, A., Nash, A.D., Metcalf, D., Hilton, D.J., Nicola, N.A. und Baca, M. (2000): Suppressor of cytokine signaling-3 preferentially binds to the SHP-2-binding site on the shared cytokine receptor subunit gp130. In: *Proceedings of the national academy of sciences of the united states of america* 97 (12), S. 6493–6498.
- Nowell, M.A., Richards, P.J., Horiuchi, S., Yamamoto, N., Rose-John, S., Topley, N., Williams, A.S. und Jones, S.A. (2003): Soluble IL-6 receptor governs IL-6 activity in experimental arthritis: blockade of arthritis severity by soluble glycoprotein 130. In: *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 171 (6), S. 3202–3209.
- Reinecker, H.C., Steffen, M., Witthoef, T., Pflueger, I., Schreiber, S., MacDermott, R.P. und Raedler, A. (1993): Enhanced secretion of tumour necrosis factor-alpha, IL-6, and IL-1 beta by isolated lamina propria mononuclear cells from patients with ulcerative colitis and Crohn's disease. In: *Clinical and experimental immunology* 94 (1), S. 174–181.
- Robak, T., Gladalska, A., Stepień, H. und Robak, E. (1998): Serum levels of interleukin-6 type cytokines and soluble interleukin-6 receptor in patients with rheumatoid arthritis. In: *Mediators of inflammation* 7 (5), S. 347–353.
- Rose-John, Stefan (2012): IL-6 trans-signaling via the soluble IL-6 receptor: importance for the pro-inflammatory activities of IL-6. In: *International journal of biological sciences* 8 (9), S. 1237–1247.
- Rose-John, S. und Heinrich, P.C. (1994): Soluble receptors for cytokines and growth factors: generation and biological function. In: *The Biochemical journal* 300 Pt 2, S. 281–290.
- Rose-John, S., Mitsuyama, K., Matsumoto, S., Thaiss, Wolfgang M. und Scheller, J. (2009): Interleukin-6 trans-signaling and colonic cancer associated with inflammatory bowel disease. In: *Current pharmaceutical design* 15 (18), S. 2095–2103.
- Rose-John, S., Waetzig, G.H., Scheller, J., Grotzinger, J. und Seegert, D. (2007): The IL-6/sIL-6R complex as a novel target for therapeutic approaches. In: *Expert opinion on therapeutic targets* 11 (5), S. 613–624.
- Sasaki, A., Yasukawa, H., Shouda, T., Kitamura, T., Dikic, I. und Yoshimura, A. (2000): CIS3/SOCS-3 suppresses erythropoietin (EPO) signaling by binding the EPO receptor and JAK2. In: *The journal of biological chemistry* 275 (38), S. 29338–29347.
- Sasaki, A., Yasukawa, H., Suzuki, A., Kamizono, S., Syoda, T., Kinjyo, I., Sasaki, M., Johnston, J.A. und Yoshimura, A. (1999): Cytokine-inducible SH2 protein-3 (CIS3/SOCS3) inhibits Janus tyrosine kinase by binding through the N-terminal kinase inhibitory region as well as SH2 domain. In: *Genes to cells: devoted to molecular & cellular mechanisms* 4 (6), S. 339–351.
- Scambia, G., Testa, U., Panici, P.B., Martucci, R., Foti, E., Petrini, M., Amoroso, M., Masciullo, V., Peschle, C. und Mancuso, S. (1994): Interleukin-6 serum levels in patients with gynecological tumors. In: *International journal of cancer* 57 (3), S. 318–323.

- Scheller J., Grötzinger J. und Rose-John S. (2006): Updating interleukin-6 classic- and trans-signaling. In: *Signal transduction* 6 (4), S. 240–259.
- Scheller, J., Chalaris, A., Schmidt-Arras, D. und Rose-John, S. (2011): The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. In: *Biochimica et biophysica acta* 1813 (5), S. 878–888.
- Scheller, J. und Rose-John, S. (2006): Interleukin-6 and its receptor: from bench to bedside. In: *Medical microbiology and immunology* 195 (4), S. 173–183.
- Schmitz, J., Weissenbach, M., Haan, S., Heinrich, P.C. und Schaper, F. (2000): SOCS3 exerts its inhibitory function on interleukin-6 signal transduction through the SHP2 recruitment site of gp130. In: *The journal of biological chemistry* 275 (17), S. 12848–12856.
- Schroers, A., Hecht, O., Kallen, K.-J., Pachta, M., Rose-John, S. und Grotzinger, J. (2005): Dynamics of the gp130 cytokine complex: a model for assembly on the cellular membrane. In: *Protein science: a publication of the protein society* 14 (3), S. 783–790.
- Sekimoto, T., Imamoto, N., Nakajima, K., Hirano, T. und Yoneda, Y. (1997): Extracellular signal-dependent nuclear import of Stat1 is mediated by nuclear pore-targeting complex formation with NPI-1, but not Rch1. In: *The EMBO journal* (23), S. 7067–7077.
- Song, W., Zhang, F. und Li, Z. (2000): A quantitative analysis of IL-6 mRNA expression of peripheral blood monocyte cell in patients with chronic hepatitis B. In: *Zhonghua ganzangbing zazhi* 8 (6), S. 346–347.
- Sprecher, C.A., Grant, F.J., Baumgartner, J.W., Presnell, S.R., Schrader, S.K., Yamagiwa, T., Whitmore, T.E., O'Hara, P.J. und Foster, D.F. (1998): Cloning and characterization of a novel class I cytokine receptor. In: *Biochemical and biophysical research communications* 246 (1), S. 82–90.
- Straub, R.H., Müller-Ladner, U., Lichtinger, T., Schölmerich, J., Menninger, H. und Lang, B. (1997): Decrease of interleukin 6 during the first 12 months is a prognostic marker for clinical outcome during 36 months treatment with disease-modifying anti-rheumatic drugs. In: *British journal of rheumatology* 36 (12), S. 1298–1303.
- Taga, T., Hibi, M., Hirata, Y., Yamasaki, K., Yasukawa, K., Matsuda, T., Hirano, T. und Kishimoto, T. (1989): Interleukin-6 triggers the association of its receptor with a possible signal transducer, gp130. In: *Cell* 58 (3), S. 573–581.
- van Dam, M., Mullberg, J., Schooltink, H., Stoyan, T., Brakenhoff, J.P., Graeve, L., Heinrich, P.C. und Rose-John, S. (1993): Structure-function analysis of interleukin-6 utilizing human/murine chimeric molecules. Involvement of two separate domains in receptor binding. In: *The journal of biological chemistry* 268 (20), S. 15285–15290.
- Verdier, F., Chretien, S., Muller, O., Varlet, P., Yoshimura, A., Gisselbrecht, S., Lacombe, C. und Mayeux, P. (1998): Proteasomes regulate erythropoietin receptor and signal transducer and activator of transcription 5 (STAT5) activation. Possible involvement of the ubiquitinated Cis protein. In: *The journal of biological chemistry* 273 (43), S. 28185–28190.

Literaturverzeichnis

- Waage, A., Halstensen, A., Shalaby, R., Brandtzaeg, P., Kierulf, P. und Espevik, T. (1989): Local production of tumor necrosis factor alpha, interleukin 1, and interleukin 6 in meningococcal meningitis. Relation to the inflammatory response. In: *The journal of experimental medicine* 170 (6), S. 1859–1867.
- Wang, Z., Si, X., Xu, A., Meng, X., Gao, S., Qi, Y., Zhu, L., Li, T., Li, W. und Dong, L. (2013): Activation of STAT3 in human gastric cancer cells via interleukin (IL)-6-type cytokine signaling correlates with clinical implications. In: *PloS one* 8 (10), e75788
- Yang, H., Qi, H., Ren, J., Cui, J., Li, Z., Waldum, H.L. und Cui, G. (2014): Involvement of NF-kappaB/IL-6 Pathway in the Processing of Colorectal Carcinogenesis in Colitis Mice. In: *International journal of inflammation* 2014 (2014), S. 130981.
- Zhang, F., Yao, S., Yuan, J., Zhang, M., He, Q., Yang, G., Gao, Z., Liu, H., Chen, X. und Zhou, B. (2011): Elevated IL-6 receptor expression on CD4+ T cells contributes to the increased Th17 responses in patients with chronic hepatitis B. In: *Virology journal* 8 (2011), S. 270.

8. Anhang

8.1 Abkürzungsverzeichnis

ADAM	a disintegrin and metalloproteinase
Amp	Ampicillin
APR	Akut-Phase-Reaktion
APS	Ammoniumpersulfat
Bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
BSG	Blutsenkungsgeschwindigkeit
CBM	Zytokin-Bindemotiv
CED	chronisch entzündliche Darmerkrankung
CHB	chronische Hepatitis B
Cis Proteine	cytokine inducible SH2 Proteine
CNTF	ziliärer neutrophiler Faktor
CRP	C-reaktives Protein
CT-1	Cardiotrophin-I
CTB	Cell Titer Blue
D1 (2,3)	Domäne 1 (2,3)
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's medium
DANN	Desoxyribonukleinsäure
dNTPs	Desoxy-Nukleotid-Mix
ECL	Chemolumineszenzreaktion
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	Enzyme-Linked-Immunsorbent-Assay
EpoR	Erythropoetin Rezeptor
FCS	fetales Kälberserum
G-CSF	Granulozyten Kolonie-stimulierenden Faktor
GFP	grün fluoreszierendes Protein
GM-CSF	Granulozyten-Makropagen Kolonie-stimulierenden Faktor

Anhang

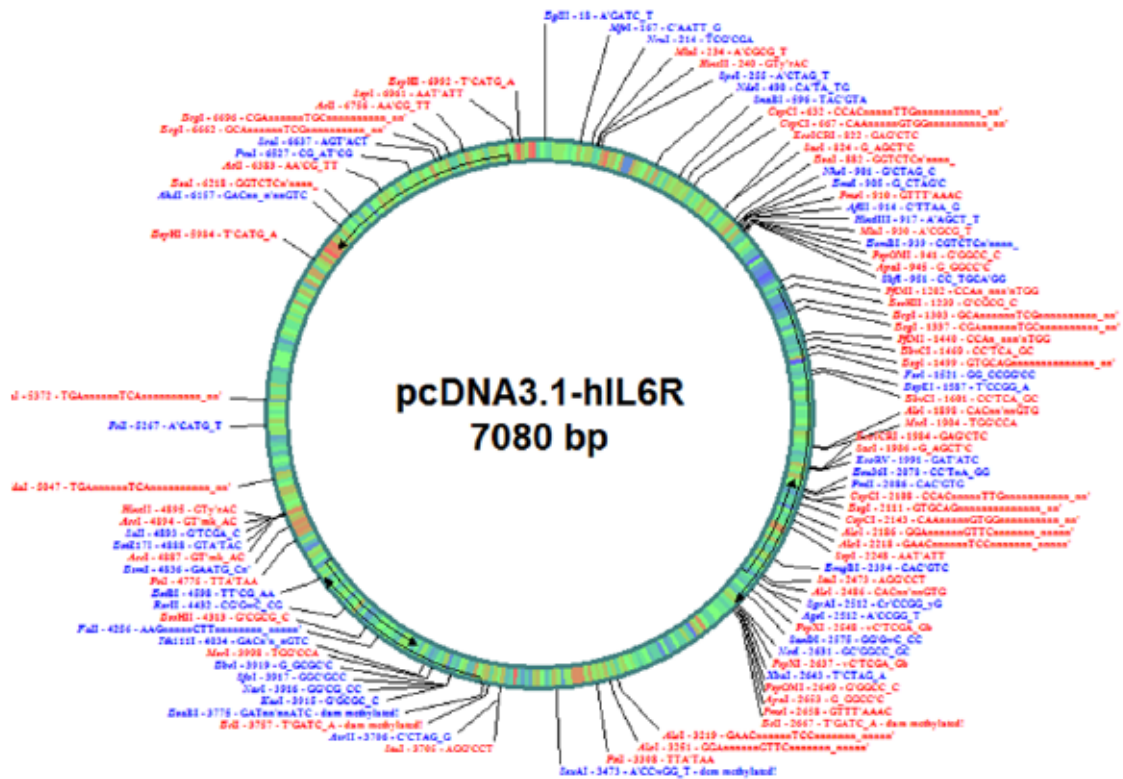
gp130	Glykoprotein 130
HIL-6	Hyper Interleukin 6
HIV	human immunodeficiency virus
ICAM-1	intercellular adhesion molecule-1
ICD	intrazelluläre Domäne
IL	Interleukin
IL-6R	membranständiger Interleukin 6 Rezeptor
JAK	Janus-Kinase
kDa	Kilo Dalton
LB	Luria-Bertani
LIF	Leukämie inhibierender Faktor
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MCP-1	monocyte chemoattractant protein-1
MLB	Mild Lysis Buffer
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
OSM	Oncostatin M
Page	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PBS-T	phosphatgepufferte Salzlösung mit Tween
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PIAS Proteine	protein-inhibitor-of-activated-STAT Proteine
PI3K	phosphatidyl-inositol-3-kinase
PMA	Phorbol-12-myristat-13-acetat
POD	Peroxidase
PVDF-Membran	Polyvinylidenfluorid-Membran
RF	Rheuma-Faktor
RLU	Relative Light Units
RNase	Ribonuklease

Anhang

Rpm	rounds per minute
SDS	<i>Sodium Dodecyl Sulfate</i>
sIL-6R	löslicher Interleukin 6 Rezeptor
SOCS Proteine	suppressor-of-cytokine-signaling Proteine
SSIs	STAT-induced STAT inhibitors
STAT Proteine	signal transducer and activator of transcription Proteine
TAE-Puffer	TRIS-Acetat-EDTA-Puffer
TBE-Puffer	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TE	Trypsin/EDTA
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TMD	Transmembrandomäne
TNF α	Tumornekrosefaktor α
TPO	Thrombopoetin
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
Tris-HCL	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan-Hydrochlorid
VCAM-1	<i>vascular cell adhesion molecule-1</i>

8.2 Plasmidkarten

Abb. 8.2.1: Plasmidkarte pcDNA3.1-hIL-6R



1	CDNARGGACG	GATCGGGAGA	TCTCCCGATC	CCCTATGGTG	CACTCTCAGT
51	ACAATCTGCT	CTGATGCCGC	ATAGTTAAGC	CAGTATCTGC	TCCCTGCTTG
101	TGTGTTGGAG	GTGCGTGAGT	AGTGCGCGAG	CAAAATTTAA	GCTACAACAA
151	GGCAAGGCTT	GACCGACAAT	TGCATGAAGA	ATCTGCTTAG	GGTTAGGCGT
201	TTTGCCTGCG	TTCGCGATGT	ACGGGCCAGA	TATACGCGTT	GACATTGATT
251	ATTGACTAGT	TATTAATAGT	AATCAATTAC	GGGGTCATTA	GTTCATAGCC
301	CATATATGGA	GTTCCGCGTT	ACATAACTTA	CGGTAAATGG	CCCGCCTGGC
351	TGACCGCCCA	ACGACCCCGG	CCCATTGACG	TCAATAATGA	CGTATGTTCC
401	CATAGTAACG	CCAATAGGGA	CTTTCCATTG	ACGTCAATGG	GTGGAGTATT
451	TACGGTAAAC	TGCCCACTTG	GCAGTACATC	AAGTGTATCA	TATGCCAAGT
501	ACGCCCCCTA	TTGACGTCAA	TGACGGTAAA	TGGCCCGCCT	GGCATTATGC
551	CCAGTACATG	ACCTTATGGG	ACTTTCCTAC	TTGGCAGTAC	ATCTACGTAT
601	TAGTCATCGC	TATTACCATG	GTGATGCGGT	TTTGGCAGTA	CATCAATGGG
651	CGTGGATAGC	GGTTTGACTC	ACGGGGATTT	CCAAGTCTCC	ACCCCATTTA
701	CGTCAATGGG	AGTTTGTTTT	GGCACAAA	TCAACGGGAC	TTTCCAAAAT
751	GTCGTAACAA	CTCCGCCCA	TTGACGCAA	TGGGCGGTAG	GCGTGTACGG
801	TGGGAGGTCT	ATATAAGCAG	AGCTCTCTGG	CTAACTAGAG	AACCCACTGC
851	TTACTGGCTT	ATCGAAATTA	ATACGACTCA	CTATAGGGAG	ACCCAAGCTG
901	GCTAGCGTTT	AAACTTAAGC	TTGCATGCCA	CGCGTCTCGA	GGGCCCTTGC
951	AGGTCGAGAT	CCATTGTGCT	CTAAAGTCAT	GTGCGAGTGG	GAAGTCGCAC
1001	TGACACTGAG	CCGGGCCAGA	GGGAGAGGAG	CCGAGCGCGG	CGCGGGGCCG
1051	AGGGACTCGC	AGTGTGTGTA	GAGAGCCGGG	CTCCTGCGGA	TGGGGCTGTC
1101	CCCCGGGGCC	TGAGCCCGCC	TGCCCGCCA	CCGCCCCGCC	CCGCCCTTGC
1151	CACCCCTGCC	GCCCGGTTCC	CATTAGCCTG	TCCGCTCTG	CGGGACCATG
1201	GAGTGGTAGC	CGAGGAGGAA	GCATGCTGGC	CGTCGGCTGC	GCGCTGCTGG
1251	CTGCCCTGCT	GGCCGCGCCG	GGAGCGGCGC	TGGCCCCAAG	GCGCTGCCCT
1301	GCGCAGGAGG	TGGCGAGAGG	CGTGCTGACC	AGTCTGCCAG	GAGACAGCGT

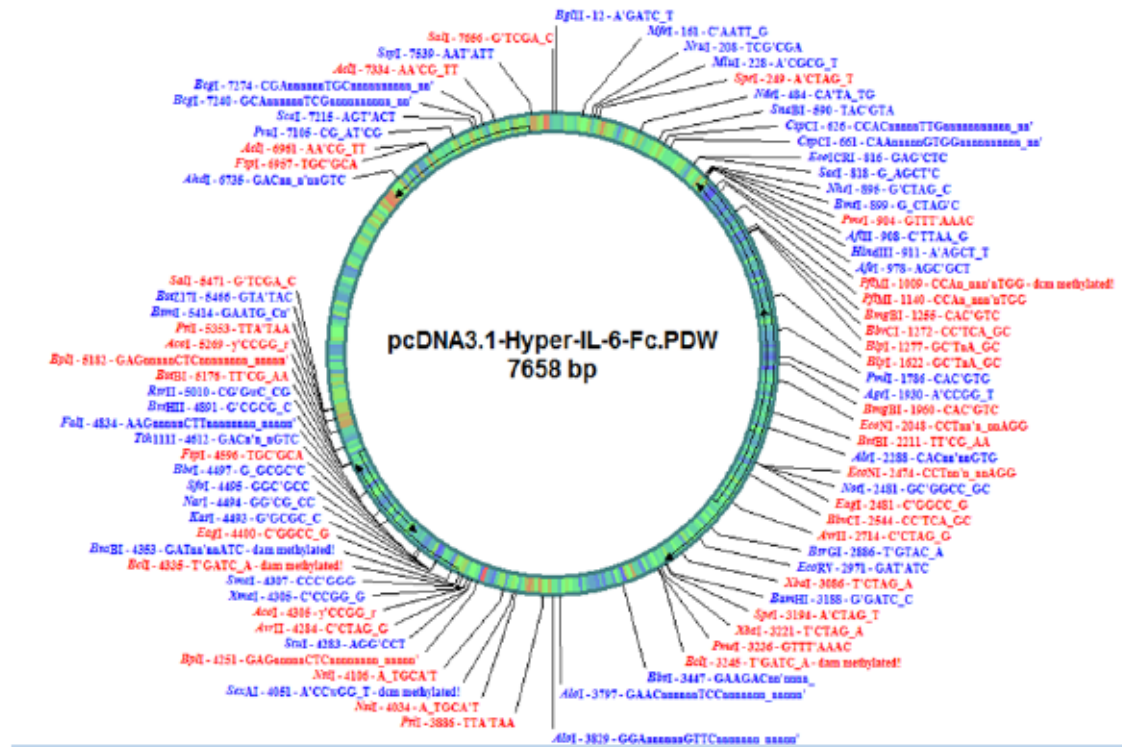
Anhang

1351 GACTCTGACC TGCCCCGGGG TAGAGCCGGA AGACAATGCC ACTGTTCACT
1401 GGGTGCTCAG GAAGCCGGCT GCAGGCTCCC ACCCCAGCAG ATGGGCTGGC
1451 ATGGGAAGGA GGCTGCTGCT GAGGTGCGTG CAGCTCCACG ACTTTGGAAA
1501 CTATTCATGC TACCGGGCCG GCCGCCCAGC TGGGACTGTG CACTTGCTGG
1551 TGGATGTTCC CCCCAGGAG CCCAGCTCT CCTGCTTCG GAAGAGCCCC
1601 CTCAGCAATG TTGTTTGTGA GTGGGGTCTT CGGAGCACCC CATCCCTGAC
1651 GACAAAGGCT GTGCTCTTGG TGAGGAAGTT TCAGAACAGT CCGGCCGAAG
1701 ACTTCCAGGA GCCGTGCCAG TATTCACAGG AGTCCAGAA GTTCTCTGC
1751 CAGTTAGCAG TCCCGGAGGG AGACAGCTCT TTCTACATAG TGTCCATGTG
1801 CGTCGCCAGT AGTGTCCGGA GCAAGTTCAG CAAAACCAA ACCTTTCAGG
1851 GTTGTGGAAT CTTGCAGCCT GATCCGCCTG CCAACATCAC AGTCACTGCC
1901 GTGGCCAGAA ACCCCCGCTG GCTCAGTGTG ACCTGGCAAG ACCCCCACTC
1951 CTGGAACCTA TCTTTCTACA GACTACGGTT TGAGCTCAGA TATCGGGCTG
2001 AACGGTCAAA GACATTCACA ACATGGATGG TCAAGGACCT CCAGCATCAC
2051 TGTGTCATCC ACGACGCCTG GAGCGGCCTG AGGCACGTGG TGCAGCTTCG
2101 TGCCCAGGAG GAGTTCGGGC AAGGCGAGTG GAGCGAGTGG AGCCCGGAGG
2151 CCATGGGCAC GCCTTGACA GAATCCAGGA GTCCTCCAGC TGAGAACGAG
2201 GTGTCCACCC CCATGCAGGC ACTTACTACT AATAAAGACG ATGATAATAT
2251 TCTCTTCAGA GATTCTGCAA ATGCGACAAG CCTCCCAGTG CAAGATTCTT
2301 CTTCAGTACC ACTGCCACA TTCCTGGTTG CTGGAGGGAG CCTGGCCTTC
2351 GGAACGCTCC TCTGCATTGC CATTGTTCTG AGGTTCAAGA AGACGTGGAA
2401 GCTGCGGGCT CTGAAGGAAG GCAAGACAAG CATGCATCCG CCGTACTCTT
2451 TGGGGCAGCT GGTCCCAGG AGGCCTCGAC CCACCCAGT GCTTGTTCTT
2501 CTCATCTCCC CACCGGTGTC CCCCAGCAGC CTGGGGTCTG ACAATACCTC
2551 GAGCCACAAC CGACCAGATG CCAGGGACCC ACGGAGCCCT TATGACATCA
2601 GCAATACAGA CTACTTCTTC CCCAGATAAG CGGCCGCTCG AGTCTAGAGG
2651 GCCCGTTTAA ACCCGCTGAT CAGCCTCGAC TGTGCCTTCT AGTTGCCAGC
2701 CATCTGTTGT TTGCCCTCC CCCGTGCCTT CCTTGACCCT GGAAGGTGCC
2751 ACTCCCCTG TCCTTTCTA ATAAAATGAG GAAATTGCAT CGCATTGTCT
2801 GAGTAGGTGT CATTCTATTC TGGGGGGTGG GGTGGGGCAG GACAGCAAGG
2851 GGGAGGATTG GGAAGACAAT AGCAGGCATG CTGGGGATGC GGTGGGCTCT
2901 ATGGCTTCTG AGGCGGAAAG AACCAGCTGG GGCTCTAGGG GGTATCCCCA
2951 CGCGCCCTGT AGCGGCGCAT TAAGCGCGGC GGGTGTGGTG GTTACGCGCA
3001 GCGTGACCGC TACACTTGCC AGCGCCCTAG CGCCCGCTCC TTTGCTTTT
3051 TTCCCTTCTT TTCTCGCCAC GTTCGCGGGC TTTCCCCGTC AAGCTCTAAA
3101 TCGGGGGCTC CTTTTAGGGT TCCGATTTAG TGCTTTACGG CACCTCGACC
3151 CCAAAAAACT TGATTAGGGT GATGGTTCAC GTAGTGGGCC ATCGCCCTGA
3201 TAGACGGTTT TTCGCCCTTT GACGTTGGAG TCCAGTTCCT TTAATATGGG
3251 ACTCTTGTTT CAAACTGGAA CAACACTCAA CCCTATCTCG GTCATTCTT
3301 TTGATTTATA AGGGATTTTG CCGATTTGCG CCTATTGGTT AAAAAATGAG
3351 CTGATTTAAC AAAAAATTTA CGCGAATTA TTTCTGTGAA TGTGTGTCAG
3401 TTAGGGTGTG GAAAGTCCCC AGGCTCCCCA GCAGGCAGAA GTATGCAAAG
3451 CATGCATCTC AATTAGTCAG CAACCAGGTG TGGAAAGTCC CCAGGCTCCC
3501 CAGCAGGCAG AAGTATGCAA AGCATGCATC TCAATTAGTC AGCAACCATA
3551 GTCCCGCCCC TAACTCCGCC CATCCCGCCC CTAACTCCGC CCAGTTCGGC
3601 CCATTCTCCG CCCCATGGCT GACTAATTTT TTTTATTTAT GCAGAGGCCG
3651 AGGCCGCCTC TGCCTCTGAG CTATTCCAGA AGTAGTGAGG AGGCTTTTTT
3701 GGAGGCCTAG GCTTTTGCAA AAAGCTCCCG GGAGCTTGTA TATCCATTTT
3751 CGGATCTGAT CAAGAGACAG GATGAGGATC GTTTCGCATG ATTGAACAAG
3801 ATGGATTGCA CGCAGGTTCT CCGGCCGCTT GGGTGGAGAG GCTATTCCGG
3851 TATGACTGGG CACAACAGAC AATCGGCTGC TCTGATGCCG CCGTGTTCGG
3901 GCTGTCAGCG CAGGGGCGCC CGGTTCTTTT TGTCAAGACC GACCTGTCCG
3951 GTGCCCTGAA TGAAGTGCAG GACGAGGCAG CGCGGCTATC GTGGCTGGCC
4001 ACGACGGGCG TTCCTTGCGC AGCTGTGCTC GACGTTGTCA CTGAAGCGGG
4051 AAGGCTATGG CTGCTATTGG GCGAAGTGCC GGGCAGGAT CTCCTGTCTA
4101 CACACCTTGC TCCTGCCGAG AAAGTATCCA TCATGGCTGA TGCAATGCGG
4151 CGGCTGCATA CGCTTGATCC GGCTACCTGC CCATTCCGACC ACCAAGCGAA
4201 ACATCGCATC GAGCGAGCAC GTACTCGGAT GGAAGCCGGT CTTGTGATC
4251 AGGATGATCT GGACGAAGAG CATCAGGGGC TCGCGCCAGC CGAACTGTTT

Anhang

4301 GCCAGGCTCA AGGCGCGCAT GCCCGACGGC GAGGATCTCG TCGTGACCCA
4351 TGGCGATGCC TGCTTGCCGA ATATCATGGT GGAAAATGGC CGCTTTTCTG
4401 GATTCATCGA CTGTGGCCGG CTGGGTGTGG CGGACCGCTA TCAGGACATA
4451 GCGTTGGCTA CCCGTGATAT TGCTGAAGAG CTTGGCGGCG AATGGGCTGA
4501 CCGCTTCCTC GTGCTTTACG GTATCGCCGC TCCCGATTCTG CAGCGCATCG
4551 CTTTCTATCG CTTTCTTGAC GAGTTCTTCT GAGCGGGACT CTGGGGTTCTG
4601 AAATGACCGA CCAAGCGACG CCCAACCTGC CATCACGAGA TTTTCGATTCC
4651 ACCGCCGCTT TCTATGAAAG GTTGGGCTTC GGAATCGTTT TCCGGGACGC
4701 CGGCTGGATG ATCCTCCAGC GCGGGGATCT CATGCTGGAG TTCTTCGCC
4751 ACCCCAACCTT GTTTATTGCA GCTTATAATG GTTACAAATA AAGCAATAGC
4801 ATCACAAATT TCACAAATAA AGCATTTTTT TCACTGCATT CTAGTTGTGG
4851 TTTGTCCAAA CTCATCAATG TATCTTATCA TGTCTGTATA CCGTCGACCT
4901 CTAGCTAGAG CTTGGCGTAA TCATGGTCAT AGCTGTTTCC TGTGTGAAAT
4951 TGTTATCCGC TCACAATTCC ACACAACATA CGAGCCGGAA GCATAAAGTG
5001 TAAAGCCTGG GGTGCCTAAT GAGTGAGCTA ACTCACATTA ATTGCGTTGC
5051 GCTCACTGCC CGCTTTCCAG TCGGGAAACC TGTCGTGCCA GCTGCATTAA
5101 TGAATCGGCC AACCGCGCGG GAGAGGCGGT TTGCGTATTG GGCCTCTTC
5151 CGCTTCCTCG CTCACTGACT CGCTGCGCTC GGTTCGTTCCG CTGCGGCGAG
5201 CGGTATCAGC TCACTCAAAG GCGGTAATAC GGTATCCAC AGAATCAGGG
5251 GATAAGCAG GAAAGAACAT GTGAGCAAAA GGCCAGCAA AGCCAGGAA
5301 CCGTAAAAAG GCCGCGTTGC TGGCGTTTTT CCATAGGCTC CGCCCCCTG
5351 ACGAGCATCA CAAAAATCGA CGCTCAAGTC AGAGGTGGCG AAACCCGACA
5401 GGACTATAAA GATACCAGGC GTTTCCCCCT GGAAGCTCCC TCGTGCGCTC
5451 TCCTGTTCCG ACCCTGCCGC TTACCAGGATA CCTGTCCGCC TTTCTCCCTT
5501 CGGGAAGCGT GCGCCTTTCT CATAGCTCAC GCTGTAGGTA TCTCAGTTCCG
5551 GTGTAGGTCG TTCGCTCCAA GCTGGGCTGT GTGCACGAAC CCCCCTTCA
5601 GCCCGACCGC TGCGCCTTAT CCGGTAACTA TCGTCTTGAG TCCAACCCGG
5651 TAAGACACGA CTTATCGCCA CTGGCAGCAG CCACTGGTAA CAGGATTAGC
5701 AGAGCGAGGT ATGTAGGCGG TGCTACAGAG TTCTTGAAGT GGTGGCCTAA
5751 CTACGGCTAC ACTAGAAGAA CAGTATTTGG TATCTGCGCT CTGCTGAAGC
5801 CAGTTACCTT CGGAAAAAGA GTTGGTAGCT CTTGATCCGG CAAACAAACC
5851 ACCGCTGGTA GCGGTTTTTT TGTTTGCAAG CAGCAGATTA CGCGCAGAAA
5901 AAAAGGATCT CAAGAAGATC CTTTGATCTT TTCTACGGGG TCTGACGCTC
5951 AGTGGAACGA AAACCTCACGT TAAGGGATT TGGTCATGAG ATTATCAAAA
6001 AGGATCTTCA CCTAGATCCT TTTAAATTA AAATGAAGTT TTAAATCAAT
6051 CTAAAGTATA TATGAGTAAA CTTGGTCTGA CAGTTACCAA TGCTTAATCA
6101 GTGAGGCACC TATCTCAGCG ATCTGTCTAT TTCGTTTATC CATAGTTGCC
6151 TGACTCCCG TCGTGTAGAT AACTACGATA CGGGAGGCT TACCATCTGG
6201 CCCAGTCCG GCAATGATAC CGCGAGACCC ACGCTCACCG GCTCCAGATT
6251 TATCAGCAAT AAACCAGCCA GCCGGAAGGG CCGAGCGCAG AAGTGGTCTT
6301 GCAACTTTAT CCGCCTCCAT CCAGTCTATT AATTGTTGCC GGAAGCTAG
6351 AGTAAGTAGT TCGCCAGTTA ATAGTTTTCG CAACGTTGTT GCCATTGCTA
6401 CAGGCATCGT GGTGTCACGC TCGTCGTTTG GTATGGCTTC ATTCAGCTCC
6451 GGTTCCCAAC GATCAAGGCG AGTTACATGA TCCCCATGT TGTGCAAAAA
6501 AGCGGTTAGC TCCTTCGGTC CTCCGATCGT TGTGAGAAGT AAGTTGGCCG
6551 CAGTGTATC ACTCATGGTT ATGGCAGCAC TGCATAATTC TCTTACTGTC
6601 ATGCCATCCG TAAGATGCTT TTCTGTGACT GGTGAGTACT CAACCAAGTC
6651 ATTCTGAGAA TAGTGTATGC GGCGACCGAG TTGCTCTTGC CCGCGTCAA
6701 TACGGGATAA TACCGCGCCA CATAGCAGAA CTTTAAAAGT GCTCATCATT
6751 GGAAAACGTT CTTCCGGGCG AAAACTCTCA AGGATCTTAC CGCTGTTGAG
6801 ATCCAGTTCTG ATGTAACCCA CTCGTGCACC CAACTGATCT TCAGCATCTT
6851 TTACTTTCAC CAGCGTTTCT GGGTGAGCAA AAACAGGAAG GCAAAATGCC
6901 GCAAAAAAGG GAATAAGGGC GACACGGAAA TGTTGAATAC TCATACTCTT
6951 CTTTTTCAA TATTATTGAA GCATTTATCA GGGTTATTGT CTCATGAGCG
7001 GATACATATT TGAATGTATT TAGAAAAATA AACAAATAGG GGTTCGCGC
7051 ACATTTCCCC GAAAAGTGCC ACCTGACGTC

Abb. 8.2.2: Plasmidkarte pcDNA3.1-HIL-6-Fc



```

1 GACGGATCGG GAGATCTCCC GATCCCCTAT GGTGCACTCT CAGTACAATC
51 TGCTCTGATG CCGCATAGTT AAGCCAGTAT CTGCTCCCTG CTTGTGTGTT
101 GGAGGTCGCT GAGTAGTGCG CGAGCAAAAT TTAAGCTACA ACAAGGCAAG
151 GCTTGACCGA CAATTGCATG AAGAATCTGC TTAGGGTTAG GCGTTTTGCG
201 CTGCTTCGCG ATGTACGGGC CAGATATACG CGTTGACATT GATTATTGAC
251 TAGTTATTAA TAGTAATCAA TTACGGGGTC ATTAGTTCAT AGCCCATATA
301 TGGAGTCCCG CGTTACATAA CTTACGGTAA ATGGCCCGCC TGGCTGACCG
351 CCCAACGACC CCCGCCATT GACGTCAATA ATGACGTATG TTCCCATAGT
401 AACGCCAATA GGGACTTTCC ATTGACGTCA ATGGGTGGAG TATTTACGGT
451 AAAGTGCCCA CTTGGCAGTA CATCAAGTGT ATCATATGCC AAGTACGCC
501 CCTATTGACG TCAATGACGG TAAATGGCCC GCCTGGCATT ATGCCAGTA
551 CATGACCTTA TGGGACTTTC CTACTTGGCA GTACATCTAC GTATTAGTCA
601 TCGCTATTAC CATGGTGATG CGGTTTTGGC AGTACATCAA TGGGCGTGGA
651 TAGCGGTTTG ACTCACGGGG ATTTCCAAGT CTCACCCCAA TTGACGTCAA
701 TGGGAGTTTG TTTTGGCACC AAAATCAACG GGACTTTCCA AAATGTCTGA
751 ACAACTCCGC CCCATTGACG CAAATGGGCG GTAGGCGTGT ACGGTGGGAG
801 GTCTATATAA GCAGAGCTCT CTGGCTAACT AGAGAACCCA CTGCTTACTG
851 GCTTATCGAA ATTAATACGA CTCACTATAG GGAGACCCAA GCTGGCTAGC
901 GTTTAAACTT AAGCTTGCCA CCATGCTGGC AGTGGGCTGC GCCCTGCTGG
951 CCGCCCTCCT GGCTGCCCTT GGCGCAGCGC TGGCCCCCAG AAGATGCCCT
1001 GCCCAGGAAG TGGCCAGAGG CGTGCTGACC AGCCTGCCCG GCGACAGCGT
1051 GACCCTGACC TGCCCTGGCG TGGAGCCCGA GGACAACGCC ACCGTGCACT
1101 GGGTGCTGAG AAAGCCTGCC GCCGGAAGCC ACCCCAGCAG ATGGGCCGGC
1151 ATGGGCAGGA GACTGCTGCT GAGAAGCGTG CAGCTCCAGC ACAGCGGCAA
1201 CTACAGCTGC TACAGAGCCG GCAGACCTGC CGGCACCGTG CACCTCCTGG
1251 TGGACGTGCC CCCCAGAGG CCTCAGCTGA GCTGCTTCTG GAAGAGCCCC
1301 CTGAGCAACG TGGTGTGTGA GTGGGGCCCC AGAAGCACCC CCAGCCTGAC
1351 CACCAAGGCC GTGCTGCTGG TGAGGAAGTT CCAGAACAGC CCTGCCGAGG
1401 ATTTCCAGGA GCCCTGCCAG TACAGCCAGG AGAGCCAGAA GTTCAGCTGC
1451 CAGCTGGCCG TGCCCGAGGG CGACAGCAGC TTCTACATCG TGTCCATGTG
    
```


Anhang

1501 CGTGGCCAGC TCTGTGGGCA GCAAGTTCAG CAAGACCCAG ACCTTCCAGG
1551 GCTGCGGCAT CCTGCAGCCC GACCCTCCCG CCAACATCAC CGTGACCGCC
1601 GTGGCCAGAA ATCCTAGATG GCTGAGCGTG ACCTGGCAGG ACCCTCACAG
1651 CTGGAACAGC TCCTTCTACC GGCTGAGATT CGAGCTGCGG TACAGGGCCG
1701 AGAGAAGCAA GACCTTTACC ACCTGGATGG TGAAGGACCT GCAGCACCAC
1751 TGCFTGATCC ACGACGCCTG GAGCGGCCTG AGACACGTGG TGCAGCTGAG
1801 AGCCCAGGAG GAGTTCGGCC AGGGCGAGTG GAGCGAGTGG TCCCCGAGG
1851 CCATGGGCAC CCCCTGGACC GAGAGCAGAA GCCCTCCTGC TCGTGGAGGA
1901 GGGGGCAGCG GCGGAGGAGG AAGCGTGGAA CCGGTGCCTC CCGGCAGGA
1951 TAGCAAGGAC GTGGCCGCC CCCACAGACA GCCCCTGACC AGCAGCGAGA
2001 GGATCGACAA GCAGATCCGG TACATCCTGG ATGGCATCAG CGCCCTGAGA
2051 AAGGAGACCT GCAACAAGAG CAACATGTGC GAGAGCAGCA AGGAGGCCCT
2101 GGCCGAGAAC AACCTGAACC TGCCCAAGAT GGCCGAGAAG GACGGCTGCT
2151 TCCAGAGCGG CTTCAACGAG GAGACCTGTC TGGTGAAGAT CATCACCGGC
2201 CTGCTGGAGT TCGAAGTGTA CCTGGAGTAC CTGCAGAACC GCTTCCGAGAG
2251 CAGCGAAGAG CAGGCCAGAG CCGTGCAGAT GAGCACAAA GTGCTGATCC
2301 AGTTCCTGCA GAAGAAGGCC AAGAACCTGG ACGCCATCAC CACCCCGAT
2351 CCTACCACCA ACGCCAGCCT GCTGACCAAG CTGCAGGCC AGAATCAGTG
2401 GCTGCAGGAC ATGACCACCC ACCTGATCCT GCGGAGCTTC AAGGAGTTTC
2451 TGCAGAGCAG CCTGAGGGCC CTGAGACAGG CGGCCGAGA GTTCAGATCC
2501 TGCACAAGA CCCACACCTG TCCTCCTTGT CCTGCTCCTG AGGCTGAGGG
2551 CGCTCCTTCT GTGTTTCTGT TCCCCCAA GCCTAAGGAT ACCCTGATGA
2601 TCTCCAGAAC CCCTGAGGTG ACATGTGTGG TGGTGGATGT GTCTCATGAG
2651 GACCCCGAGG TGAAGTTCAA CTGGTACGTG GATGGCGTGG AGGTGCACAA
2701 TGCTAAGACC AAGCCTAGGG AGGAGCAGTA CAACTCCACC TACAGAGTGG
2751 TGTCTGTGCT GACAGTGCTG CATCAGGATT GGCTGAACGG CAAGGAGTAC
2801 AAGTGCAAGG TGTCCAACAA GGCTCTGCCT GCTCCTATCG AAAAGACCAT
2851 CTCCAAGGCT AAGGGACAGC CTAGAGAGCC TCAGGTGTAC AACTGCCTC
2901 CATCTAGGGA GGAGATGACC AAGAATCAGG TGTCCCTGAC CTGTCTGGTG
2951 AAGGGCTTCT ACCCTTCTGA TATCGCTGTG GAGTGGGAGT CTAATGGCCA
3001 GCCCGAGAAC AATTACAAGA CCACCCCTCC TGTGCTGGAT TCTGACGGCT
3051 CTTTCTTCTT GTACTCCAAA CTGACCCTGG ACAAGTCTAG ATGGCAGCAG
3101 GGCAACGTGT TCTCTTGTTT CGTGATGCAC GAGGCTCTGC ACAATCACTA
3151 TACCCAGAAG TCCCTGTCTC TGTCTCCTGG CAAGTGAGGA TCCACTAGTC
3201 CAGTGTGGTG GAATTTGAG TCTAGAGGGC CCGTTTAAAC CCGCTGATCA
3251 GCCTCGACTG TGCCTTCTAG TTGCCAGCCA TCTGTTGTTT GCCCCTCCCC
3301 CGTGCCTTCC TTGACCCTGG AAGGTGCCAC TCCCCTGTC CTTTCTAAT
3351 AAAATGAGGA AATTGCATCG CATTGTCTGA GTAGGTGTCA TTCTATTCTG
3401 GGGGGTGGGG TGGGGCAGGA CAGCAAGGGG GAGGATTGGG AAGACAATAG
3451 CAGGCATGCT GGGGATGCGG TGGGCTCTAT GGCTTCTGAG GCGGAAAGAA
3501 CCAGCTGGGG CTCTAGGGGG TATCCCCACG CGCCCTGTAG CGGCGCATT
3551 AGCGCGGCGG GTGTGGTGGT TACGCGCAGC GTGACCCTA CACTTGCCAG
3601 CGCCCTAGCG CCCGCTCCTT TCGCTTTCTT CCCTTCTTT CTGCCACGT
3651 TCGCCGGCTT TCCCCGTC A GCTCTAAATC GGGGGCTCCC TTTAGGGTTC
3701 CGATTTAGTG CTTTACGGCA CCTCGACCCC AAAAACTTG ATTAGGGTGA
3751 TGGTTCACGT AGTGGGCCAT CGCCCTGATA GACGGTTTTT CGCCCTTTGA
3801 CGTTGGAGTC CACGTTCTTT AATAGTGGAC TCTTGTTCCA AACTGGAACA
3851 AACTCAACC CTATCTCGGT CTATTCTTTT GATTTATAAG GGATTTTGCC
3901 GATTTGCGCC TATTGGTTAA AAAATGAGCT GATTTAACA AAATTTAACG
3951 CGAATTAATT CTGTGGAATG TGTGTGAGTT AGGGTGTGGA AAGTCCCCAG
4001 GCTCCCAGC AGGCAGAAGT ATGCAAAGCA TGCATCTCAA TTAGTCAGCA
4051 ACCAGGTGTG GAAAGTCCCC AGGCTCCCCA GCAGGCAGAA GTATGCAAAG
4101 CATGCATCTC AATTAGTCAG CAACCATAGT CCCGCCCTA ACTCCGCCA
4151 TCCCGCCCTT AACTCCGCC AGTTCGCCCT ATTCTCCGCC CCATGGCTGA
4201 CTAATTTTTT TTATTTATGC AGAGCCGAG GCCGCCTCTG CCTCTGAGT
4251 ATTCCAGAAG TAGTGAGGAG GCTTTTTTGG AGGCCTAGG TTTTGCAAAA
4301 AGCTCCCGGG AGCTTGATA TCCATTTTCG GATCTGATCA AGAGACAGGA
4351 TGAGGATCGT TTCGCATGAT TGAACAAGAT GGATTGCACG CAGGTTCTCC
4401 GGCCGCTTGG GTGGAGAGGC TATTCGGCTA TGAAGGGCA CAACAGACAA

Anhang

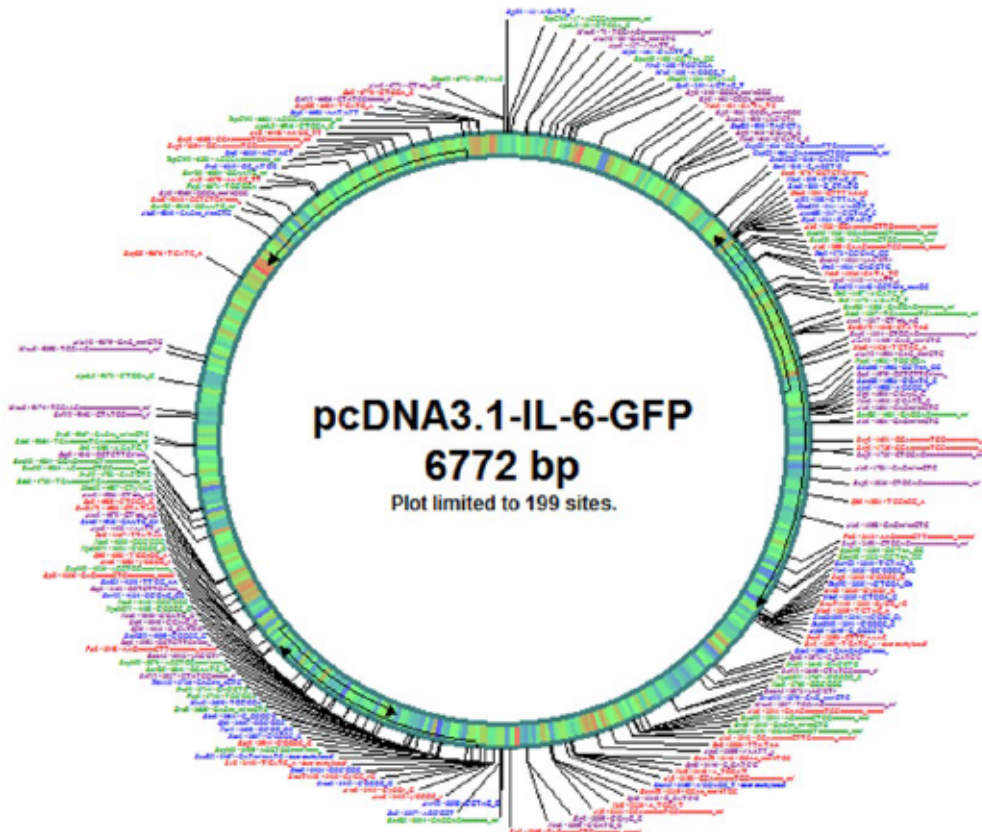
4451 TCGGCTGCTC TGATGCCGCC GTGTTCCGGC TGT CAGCGCA GGGGCGCCG
4501 GTTCTTTTTG TCAAGACCGA CCTGTCCGGT GCCCTGAATG AACTGCAGGA
4551 CGAGGCAGCG CGGTATCGT GGCTGGCCAC GACGGGCGTT CCTTGCGCAG
4601 CTGTGCTCGA CGTTGTCACT GAAGCGGGAA GGGACTGGCT GCTATTGGGC
4651 GAAGTGCCGG GGCAGGATCT CCTGTCATCT CACCTTGCTC CTGCCGAGAA
4701 AGTATCCATC ATGGCTGATG CAATGCGGCG GCTGCATACG CTTGATCCGG
4751 CTACCTGCCC ATTCGACCAC CAAGCGAAAC ATCGCATCGA GCGAGCACGT
4801 ACTCGGATGG AAGCCGGTCT TGTCGATCAG GATGATCTGG ACGAAGAGCA
4851 TCAGGGGCTC GCGCCAGCCG AACTGTTTCGC CAGGCTCAAG GCGCGCATGC
4901 CCGACGGCGA GGATCTCGTC GTGACCCATG GCGATGCCTG CTTGCCGAAT
4951 ATCATGGTGG AAAATGGCCG CTTTTCTGGA TTCATCGACT GTGGCCGGCT
5001 GGGTGTGGCG GACCGCTATC AGGACATAGC GTTGGCTACC CGTGATATTG
5051 CTGAAGAGCT TGGCGGCGAA TGGGCTGACC GCTTCCTCGT GCTTTACGGT
5101 ATCGCCGCTC CCGATTGCA GCGCATCGCC TTCTATCGCC TTCTTGACGA
5151 GTTCTTCTGA GCGGGACTCT GGGGTTTCGAA ATGACCGACC AAGCGACGCC
5201 CAACCTGCCA TCACGAGATT TCGATTCCAC CGCCGCCTTC TATGAAAGGT
5251 TGGGCTTCGG AATCGTTTTT CCGGACGCCG GCTGGATGAT CCTCCAGCGC
5301 GGGGATCTCA TGCTGGAGTT CTTGCGCCAC CCCAACTTGT TTATTGCAGC
5351 TTATAATGGT TACAAATAAA GCAATAGCAT CACAAATTTT ACAAATAAAG
5401 CTTTTTTTTT ACTGCATTCT AGTTGTGGTT TGTCCAAACT CATCAATGTA
5451 TCTTATCATG TCTGTATACC TCTGACCTCT AGCTAGAGCT TGGCCTAATC
5501 ATGGTTCATG CTGTTTCCTG TGTGAAATTG TTATCCGCTC ACAATTCCAC
5551 ACAACATACG AGCCGGAAGC ATAAAGTGTA AAGCCTGGGG TGCCTAATGA
5601 GTGAGCTAAC TCACATTAAT TGCCTTGC GC TCACTGCCCG CTTTCCAGTC
5651 GGGAAACCTG TCGTGCCAGC TGCATTAATG AATCGGCCAA CGCGCGGGGA
5701 GAGGCGGTTT GCGTATTGGG CGCTCTTCCG CTTCTCGCT CACTGACTCG
5751 CTGCGCTCGG TCGTTCGGCT GCGGCGAGCG GTATCAGCTC ACTCAAAGGC
5801 GGTAATACGG TTATCCACAG AATCAGGGGA TAACGCAGGA AAGAACATGT
5851 GAGCAAAAGG CCAGCAAAAG GCCAGGAACC GTAAAAAGGC CGCGTTGCTG
5901 GCGTTTTTCC ATAGGCTCCG CCCCCTGAC GAGCATCACA AAAATCGACG
5951 CTCAAGTCAG AGGTGGCGAA ACCCGACAGG ACTATAAAGA TACCAGGCGT
6001 TTCCCCCTGG AAGCTCCCTC GTGCGCTCTC CTGTTCCGAC CCTGCCGCTT
6051 ACCGGATACC TGTCCGCCTT TCTCCCTTCG GGAAGCGTGG CGCTTTCTCA
6101 TAGCTCACGC TGTAGGTATC TCAGTTCGGT GTAGGTCGTT CGCTCCAAGC
6151 TGGGCTGTGT GCACGAACCC CCCGTTGAGC CCGACCGCTG CGCCTTATCC
6201 GGTAACTATC GTCTTGAGTC CAACCCGGTA AGACACGACT TATCGCCACT
6251 GGCAGCAGCC ACTGGTAACA GGATTAGCAG AGCGAGGTAT GTAGGCGGTG
6301 CTACAGAGTT CTTGAAGTGG TGGCCTAACT ACGGTACAC TAGAAGACA
6351 GTATTTGGTA TCTGCGCTCT GCTGAAGCCA GTTACCTTCG GAAAAAGAGT
6401 TGGTAGCTCT TGATCCGGCA AACAAACCAC CGCTGGTAGC GTTTTTTTTG
6451 TTTGCAAGCA GCAGATTACG CGCAGAAAAA AAGGATCTCA AGAAGATCCT
6501 TTGATCTTTT CTACGGGGTC TGACGCTCAG TGGAACGAAA ACTCACGTTA
6551 AGGGATTTTG GTCATGAGAT TATCAAAAAG GATCTTCACC TAGATCCTTT
6601 TAAATTAATA ATGAAGTTTT AAATCAATCT AAAGTATATA TGAGTAAACT
6651 TGGTCTGACA GTTACCAATG CTTAATCAGT GAGGCACCTA TCTCAGCGAT
6701 CTGTCTATTT CGTTCATCCA TAGTTGCCTG ACTCCCCGTC GTGTAGATAA
6751 CTACGATACG GGAGGGCTTA CCATCTGGCC CCAGTGCTGC AATGATACCG
6801 CGAGACCCAC GCTCACCGGC TCCAGATTTA TCAGCAATAA ACCAGCCAGC
6851 CGGAAGGGCC GAGCGCAGAA GTGGTCCTGC AACTTTATCC GCCTCCATCC
6901 AGTCTATTAA TTGTTGCCGG GAAGCTAGAG TAAGTAGTTC GCCAGTTAAT
6951 AGTTTGCGCA ACGTTGTTGC CATTGCTACA GGCATCGTGG TGTCACGCTC
7001 GTCGTTTGGT ATGGCTTCAT TCAGCTCCGG TTCCCAACGA TCAAGGCGAG
7051 TTACATGATC CCCCATGTTG TGCAAAAAAG CGGTTAGCTC CTTGCGTCTT
7101 CCGATCGTTG TCAGAAGTAA GTTGGCCGCA GTGTTATCAC TCATGGTTAT
7151 GGCAGACTG CATAATTCTC TTACTGTCTC GCCATCCGTA AGATGCTTTT
7201 CTGTGACTGG TGAGTACTCA ACCAAGTCAT TCTGAGAATA GTGTATGCGG
7251 CGACCGAGTT GCTCTTGCCC GCGGTCAATA CGGGATAATA CCGCGCCACA
7301 TAGCAGAACT TTA AAAAGTGC TCATCATTGG AAAACGTTCT TCGGGGCGAA
7351 AACTCTCAAG GATCTTACCG CTGTTGAGAT CCAGTTCGAT GTAACCCACT

Anhang

```

7401 CGTGCACCCA ACTGATCTTC AGCATCTTTT ACTTTACCA GCGTTTCTGG
7451 GTGAGCAAAA ACAGGAAGGC AAAATGCCGC AAAAAAGGGA ATAAGGGCGA
7501 CACGGAAATG TTGAATACTC ATACTCTTCC TTTTCAATA TTATTGAAGC
7551 ATTTATCAGG GTTATTGTCT CATGAGCGGA TACATATTG AATGTATTTA
7601 GAAAAATAAA CAAATAGGGG TTCCGCGCAC ATTTCCC CGA AAAGTGCCAC
7651 CTGACGTC
    
```

Abb. 8.2.3: Plasmidkarte pcDNA3.1-IL-6 GFP



```

1 GACGGATCGG GAGATCTCCC GATCCCCTAT GGTGCACTCT CAGTACAATC
51 TGCTCTGATG CCGCATAGTT AAGCCAGTAT CTGCTCCCTG CTTGTGTGTT
101 GGAGGTGCGT GAGTAGTGCG CGAGCAAAAT TTAAGCTACA ACAAGGCAAG
151 GCTTGACCGA CAATTGCATG AAGAATCTGC TTAGGGTTAG GCGTTTTGCG
201 CTGCTTCGCG ATGTACGGGC CAGATATACG CGTTGACATT GATTATTGAC
251 TAGTTATTAA TAGTAATCAA TTACGGGGTC ATTAGTTCAT AGCCCATATA
301 TGGAGTTCGG CGTTACATAA CTTACGGTAA ATGGCCCGCC TGGCTGACCG
351 CCCAACGACC CCCGCCATT GACGTCAATA ATGACGTATG TTCCCATAGT
401 AACGCCAATA GGGACTTTC ATTGACGTCA ATGGGTGGAG TATTACGGT
451 AAAC TGCCCA CTTGGCAGTA CATCAAGTGT ATCATATGCC AAGTACGCCC
501 CCTATTGACG TCAATGACGG TAAATGGCCC GCCTGGCATT ATGCCAGTA
551 CATGACCTTA TGGGACTTTC CTACTTGGCA GTACATCTAC GTATTAGTCA
601 TCGCTATTAC CATGGTGATG CGGTTTTGGC AGTACATCAA TGGGCGTGGA
651 TAGCGGTTTG ACTCACGGGG ATTTCCAAGT CTCCACCCCA TTGACGTCAA
701 TGGGAGTTTG TTTTGGCACC AAAATCAACG GGACTTTCCA AAATGTGCGTA
751 ACAACTCCGC CCCATTGACG CAAATGGGCG GTAGGCGTGT ACGGTGGGAG
801 GTCTATATAA GCAGAGCTCT CTGGCTAACT AGAGAACCCA CTGCTTACTG
851 GCTTATCGAA ATTAATACGA CTCACTATAG GGAGACCCAA GCTGGCTAGC
    
```

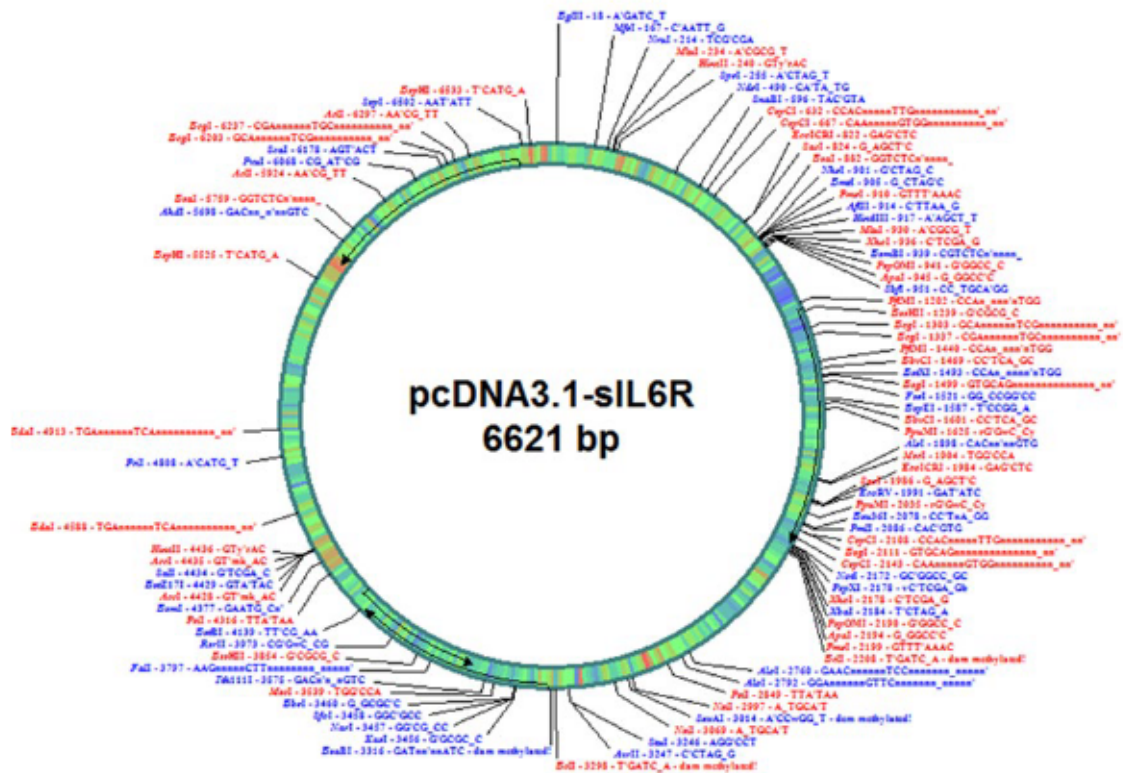
Anhang

901 GTTTAAACTT AAGCTTGGTA CCGCCACCAT GAACTCCTTC TCCACAAGCG
951 CCTTCGGTCC AGTTGCCTTC TCCCTGGGGC TGCTCCTGGT GTTGCCTGCT
1001 CCCTTCCCTG CCCAGTACA CGTGCATATG CCAGTACCCC CAGGAGAAGA
1051 TTCCAAAGAT GTAGCCGCC CACACAGACA GCCACTCACC TCTTCAGAAC
1101 GAATTGACAA ACAAATTCGG TACATCCTCG ACGGCATCTC AGCCCTGAGA
1151 AAGGAGACAT GTAACAAGAG TAACATGTGT GAAAGCAGCA AAGAGGCACT
1201 GGCAGAAAAC AACCTGAACC TTCCAAAGAT GGCTGAAAAA GATGGATGCT
1251 TCCAATCTGG ATTCAATGAG GAGACTTGCC TGGTGAAAAA CATCACTGGT
1301 CTTTTGGAGT TTGAGGTATA CCTAGAGTAC CTCCAGAACA GATTTGAGAG
1351 TAGTGAGGAA CAAGCCAGAG CTGTGCAGAT GAGTACAAAA GTCCTGATCC
1401 AGTTCCTGCA GAAAAAGGCA AAGAATCTAG ATGCAATAAC CACCCCTGAC
1451 CCAACCACAA ATGCCAGCCT GCTGACGAAG CTGCAGGCAC AGAACCAGTG
1501 GCTGCAGGAC ATGACAACCT ATCTCATTCT GCGCAGCTTT AAGGAGTTCC
1551 TGCAGTCCAG CCTGAGGGCT CTTCCGGCAA TGGATCCACC GGTCCGCCACC
1601 ATGGTGAGCA AGGGCGAGGA GCTGTTTACC GGGGTGGTGC CCATCCTGGT
1651 CGAGCTGGAC GGCAGCTAA ACGGCCACAA GTTCAGCGTG TCCGGCGAGG
1701 GCGAGGGCGA TGCCACCTAC GGCAAGCTGA CCCTGAAGTT CATCTGCACC
1751 ACCGGCAAGC TGCCCGTGCC CTGGCCACC CTCTGTGACCA CCCTGACCTA
1801 CGGCGTGACG TGCTTCAGCC GCTACCCCGA CCACATGAAG CAGCACGACT
1851 TCTTCAAGTC CGCCATGCC CGAAGGCTACG TCCAGGAGCG CACCATCTTC
1901 TTCAAGGACG ACGGCAACTA CAAGACCCGC CCCGAGGTGA AGTTCGAGGG
1951 CGACACCCTG GTGAACCGCA TCGAGCTGAA GGGCATCGAC TTCAAGGAGG
2001 ACGGCAACAT CCTGGGGCAC AAGCTGGAGT ACAACTACAA CAGCCACAAC
2051 GTCTATATCA TGGCCGACAA GCAGAAGAAC GGCATCAAGG TGAACCTCAA
2101 GATCCGCCAC AACATCGAGG ACGGCAGCGT GCAGCTCGCC GACCACTACC
2151 AGCAGAACAC CCCCATCGGC GACGGCCCCG TGCTGTGACC CGACAACCAC
2201 TACCTGAGCA CCCAGTCCGC CCTGAGCAA GACCCCAACG AGAAGCGCGA
2251 TCACATGGTC CTGCTGGAGT TCGTGACCGC CGCCGGGATC ACTCTCGGCA
2301 TGGACGAGCT GTACAAGTAA AGCGGCCGCT CGAGTCTAGA GGGCCCGTTT
2351 AAACCCGCTG ATCAGCCTCG ACTGTGCCTT CTAGTTGCCA GCCATCTGTT
2401 GTTTGCCCTT CCCCCGTGCC TTCCTTGACC CTGGAAGGTG CCACTCCCAC
2451 TGTCCTTTCC TAATAAAATG AGGAAATTGC ATCGCATTGT CTGAGTAGGT
2501 GTCATTCTAT TCTGGGGGGT GGGGTGGGGC AGGACAGCAA GGGGGAGGAT
2551 TGGGAAGACA ATAGCAGGCA TGCTGGGGAT GCGGTGGGCT CTATGGCTTC
2601 TGAGGCGGAA AGAACCAGCT GGGGCTCTAG GGGGTATCCC CACGCGCCCT
2651 GTAGCGGCGC ATTAAGCGCG GCGGGTGTGG TGGTTACGCG CAGCGTGACC
2701 GCTACACTTG CCAGCGCCT AGCGCCCGCT CCTTTCGCTT TCTTCCCTTC
2751 CTTTCTCGCC ACGTTCGCG GCTTTCGCG TCAAGCTCTA AATCGGGGGC
2801 TCCCTTTAGG GTTCCGATTT AGTGCTTTAC GGCACCTCGA CCCCCAAAAA
2851 CTTGATTAGG GTGATGGTTC ACGTAGTGGG CCATCGCCCT GATAGACGGT
2901 TTTTCCGCTT TTGACGTTGG AGTCCACGTT CTTTAATAGT GGACTCTTGT
2951 TCCAACTGG AACAACTCT AACCCATCT CGGTCTATTC TTTTGATTTA
3001 TAAGGGATTT TGCCGATTTT GGCCTATTGG TTAATAAATG AGCTGATTTA
3051 AAAAAAATTT AACCGGAATT AATTCTGTGG AATGTGTGTC AGTTAGGGTG
3101 TGGAAAGTCC CCAGGCTCCC CAGCAGGCAG AAGTATGCAA AGCATGCATC
3151 TCAATTAGTC AGCAACCAGG TGTGGAAAGT CCCCAGGCTC CCCAGCAGGC
3201 AGAAGTATGC AAAGCATGCA TCTCAATTAG TCAGCAACCA TAGTCCCACC
3251 CCTAACTCCG CCCATCCCGC CCCTAACTCC GCCCAGTTC GCCCATTCTC
3301 CGCCCCATGG CTGACTAATT TTTTTTATTT ATGCAGAGGC CGAGGCCGCC
3351 TCTGCCTCTG AGCTATTCCA GAAGTAGTGA GGAGGCTTTT TTGGAGGCTT
3401 AGGCTTTTGC AAAAAAGCTCC CGGGAGCTTG TATATCCATT TTCGGATCTG
3451 ATCAAGAGAC AGGATGAGGA TCGTTTCGCA TGATTGAACA AGATGGATTG
3501 CACGCAGGTT CTCCGGCCGC TTGGGTGGAG AGGCTATTCT GCTATGACTG
3551 GGCACAACAG ACAATCGGCT GCTCTGATGC CGCCGTGTTT CGGCTGTCTG
3601 CGCAGGGGCG CCCGGTCTTT TTTGTCAAGA CCGACCTGTC CGGTGCCCTG
3651 AATGAAGTGC AGGACGAGGC AGCGCGGCTA TCGTGGCTGG CCACGACGGG
3701 CGTTCCTTGC GCAGCTGTGC TCGACGTTGT CACTGAAGCG GGAAGGGACT
3751 GGCTGCTATT GGGCGAAGTG CCGGGGAGG ATCTCCTGTC ATCTCACCTT
3801 GCTCCTGCCG AGAAAGTATC CATCATGGCT GATGCAATGC GCGGCTGCA

Anhang

3851 TACGCTTGAT CCGGCTACCT GCCCATTGCA CCACCAAGCG AAACATCGCA
3901 TCGAGCGAGC ACGTACTCGG ATGGAAGCCG GTCTTGTGCA TCAGGATGAT
3951 CTGGACGAAG AGCATCAGGG GCTCGCGCCA GCCGAAGTGT TCGCCAGGCT
4001 CAAGGCGCGC ATGCCCCGACG GCGAGGATCT CGTCGTGACC CATGGCGATG
4051 CCTGCTTGCC GAATATCATG GTGGAAAATG GCCGCTTTTC TGGATTATC
4101 GACTGTGGCC GGCTGGGTGT GCGGACCGC TATCAGGACA TAGCGTTGGC
4151 TACCCGTGAT ATTGCTGAAG AGCTTGGCGG CGAATGGGCT GACCGCTTCC
4201 TCGTGCTTTA CGGTATCGCC GCTCCCGATT CGCAGCGCAT CGCCTTCTAT
4251 CGCCTTCTTG ACGAGTTCTT CTGAGCGGGA CTCTGGGGTT CGAAATGACC
4301 GACCAAGCGA CGCCCAACCT GCCATCACGA GATTTGATT CCACCGCCGC
4351 CTTCTATGAA AGGTTGGGCT TCGGAATCGT TTTCCGGGAC GCCGGCTGGA
4401 TGATCCTCCA GCGCGGGGAT CTCATGCTGG AGTTCTTCGC CCACCCCAAC
4451 TTGTTTATTG CAGCTTATAA TGGTTACAAA TAAAGCAATA GCATCACAAA
4501 TTTCAAAAT AAAGCATTTT TTTCACTGCA TTCTAGTTGT GGTGTGTTCA
4551 AACTCATCAA TGTATCTTAT CATGTCTGTA TACCGTCGAC CTCTAGCTAG
4601 AGCTTGGCGT AATCATGGTC ATAGCTGTTT CCTGTGTGAA ATTGTTATCC
4651 GCTCACAATT CCACACAACA TACGAGCCGG AAGCATAAAG TGTAAGCCT
4701 GGGGTGCCTA ATGAGTGAGC TAACTCACAT TAATTGCGTT GCGCTCACTG
4751 CCCGCTTTCC AGTCGGGAAA CTTGTCTGTC CAGCTGCATT AATGAATCGG
4801 CCAACGCGCG GGGAGAGGCG GTTTGCGTAT TGGGCGCTCT TCCGCTTCT
4851 CGTCACTGA CTCGCTGCGC TCGGTCTTTC GGCTGCGGCG AGCGGTATCA
4901 GCTCACTCAA AGGCGGTAAT ACGGTTATCC ACAGAATCAG GGGATAACGC
4951 AGGAAAGAAC ATGTGAGCAA AAGGCCAGCA AAAGGCCAGG AACCGTAAAA
5001 AGGCCGCGTT GCTGGCGTTT TTCCATAGGC TCCGCCCCC TGACGAGCAT
5051 CACAAAATC GACGCTCAAG TCAGAGGTGG CGAAACCCGA CAGGACTATA
5101 AAGATAACCAG GCGTTTCCCC CTGGAAGCTC CCTCGTGCGC TCTCTGTTC
5151 CGACCCTGCC GCTTACCGGA TACCTGTCCG CCTTTCTCCC TTCGGGAAGC
5201 GTGGCGCTTT CTCATAGCTC ACGCTGTAGG TATCTCAGTT CGGTGTAGGT
5251 CGTTCGCTCC AAGCTGGGCT GTGTGCACGA ACCCCCCGTT CAGCCCGACC
5301 GCTGCGCCTT ATCCGGTAAC TATCGTCTTG AGTCCAACCC GGTAAGACAC
5351 GACTTATCGC CACTGGCAGC AGCCACTGGT AACAGGATTA GCAGAGCGAG
5401 GTATGTAGGC GGTGCTACAG AGTTCTTGAA GTGGTGGCCT AACTACGGCT
5451 AACTAGAAG AACAGTATTT GGTATCTGCG CTCTGCTGAA GCCAGTTACC
5501 TTCGGAAAAA GAGTTGGTAG CTCTTGATCC GGCAACAAA CCACCGCTGG
5551 TAGCGGTTTT TTTGTTTGCA AGCAGCAGAT TACGCGCAGA AAAAAAGGAT
5601 CTCAAGAAGA TCCTTTGATC TTTTCTACGG GGTCTGACGC TCAGTGGAAC
5651 GAAAATCAC GTTAAGGGAT TTTGGTCATG AGATTATCAA AAAGGATCTT
5701 CACTAGATC CTTTTAAATT AAAAAATGAAG TTTTAAATCA ATCTAAAGTA
5751 TATATGAGTA AACTTGGTCT GACAGTTACC AATGCTTAAT CAGTGAGGCA
5801 CCTATCTCAG CGATCTGTCT ATTTCTGTTCA TCCATAGTTG CCTGACTCCC
5851 CGTCGTGTAG ATAACTACGA TACGGGAGGG CTTACCATCT GGCCCCAGTG
5901 CTGCAATGAT ACCGCGAGAC CCACGCTCAC CGGCTCCAGA TTTATCAGCA
5951 ATAAACCAGC CAGCCGGAAG GGCCGAGCGC AGAAGTGGTC CTGCAACTTT
6001 ATCCGCTCC ATCCAGTCTA TTAATTGTTG CCGGGAAGCT AGAGTAAGTA
6051 GTTCGCCAGT TAATAGTTTG CGCAACGTTG TTGCCATTGC TACAGGCATC
6101 GTGGTGTAC GCTCGTCGTT TGGTATGGCT TCATTAGCT CCGGTTCCCA
6151 ACGATCAAGG CGAGTTACAT GATCCCCAT GTTGTGCAAA AAAGCGGTTA
6201 GCTCCTTCGG TCCTCCGATC GTTGTGAGAA GTAAGTTGGC CGCAGTGTTA
6251 TCACTCATGG TTATGGCAGC ACTGCATAAT TCTCTTACTG TCATGCCATC
6301 CGTAAGATGC TTTTCTGTGA CTGGTGAGTA CTCAACCAAG TCATTCTGAG
6351 AATAGTGTAT GCGGCGACCG AGTTGCTCTT GCCCGGCGTC AATACGGGAT
6401 AATACGCGC CACATAGCAG AACTTTAAAA GTGCTCATCA TTGGAAAACG
6451 TTCTTCGGGG CGAAAATCT CAAGGATCTT ACCGCTGTTG AGATCCAGTT
6501 CGATGTAACC CACTCGTGCA CCCAACTGAT CTTCAGCATC TTTTACTTTC
6551 ACCAGCTTTT CTGGGTGAGC AAAAAACAGGA AGGCAAAATG CCGCAAAAAA
6601 GGGAAATAAGG GCGACACGGA AATGTTGAAT ACTCATACTC TTCCTTTTTC
6651 AATATTATTG AAGCATTTAT CAGGGTTATT GTCTCATGAG CGGATACATA
6701 TTTGAATGTA TTTAGAAAAA TAAACAAATA GGGGTTCCGC GCACATTTCC
6751 CCGAAAAGTG CCACCTGACG TC

Abb. 8.2.4: Plasmidkarte pcDNA3.1-sIL-6R



```

1  CDNARGGACG  GATCGGGAGA  TCTCCCGATC  CCCTATGGTG  CACTCTCAGT
51  ACAATCTGCT  CTGATGCCGC  ATAGTTAAGC  CAGTATCTGC  TCCCTGCTTG
101 TGTGTTGGAG  GTCGCTGAGT  AGTGCGCGAG  CAAAATTTAA  GCTACAACAA
151 GGCAAGGCTT  GACCGACAAT  TGCATGAAGA  ATCTGCTTAG  GGTTAGGCGT
201 TTTGCGCTGC  TTCGCGATGT  ACGGGCCAGA  TATACGCGTT  GACATTGATT
251 ATTGACTAGT  TATTAATAGT  AATCAATTAC  GGGGTCATTA  GTTCATAGCC
301 CATATATGGA  GTTCCGCGTT  ACATAACTTA  CGGTAAATGG  CCCGCCTGGC
351 TGACCGCCCA  ACGACCCCG  CCCATTGACG  TCAATAATGA  CGTATGTTCC
401 CATAGTAACG  CCAATAGGGA  CTTTCCATTG  ACGTCAATGG  GTGGAGTATT
451 TACGGTAAAC  TGCCCACTTG  GCAGTACATC  AAGTGTATCA  TATGCCAAGT
501 ACGCCCCCTA  TTGACGTCAA  TGACGGTAAA  TGGCCCGCCT  GGCATTATGC
551 CCAGTACATG  ACCTTATGGG  ACTTTCCTAC  TTGGCAGTAC  ATCTACGTAT
601 TAGTCATCGC  TATTACCATG  GTGATGCGGT  TTTGGCAGTA  CATCAATGGG
651 CGTGGATAGC  GGTTTGACTC  ACGGGGATTT  CCAAGTCTCC  ACCCAATTTA
701 CGTCAATGGG  AGTTTGTTTT  GGCACAAAA  TCAACGGGAC  TTTCCAAAAT
751 GTCGTAACAA  CTCCGCCCCA  TTGACGCAA  TGGGCGGTAG  GCGTGTACGG
801 TGGGAGGTCT  ATATAAGCAG  AGCTCTCTGG  CTAACTAGAG  AACCCACTGC
851 TTACTGGCTT  ATCGAAATTA  ATACGACTCA  CTATAGGGAG  ACCCAAGCTG
901 GCTAGCGTTT  AAACTTAAGC  TTGCATGCCA  CGCGTCTCGA  GGGCCCTGTC
951 AGGTGAGAT  CCATTGTGCT  CTAAAGTCAT  GTGCGAGTGG  GAAGTCGCAC
1001 TGACACTGAG  CCGGGCCAGA  GGGAGAGGAG  CCGAGCGCGG  CGCGGGGCCG
1051 AGGGACTCGC  AGTGTGTGTA  GAGAGCCGGG  CTCCTGCGGA  TGGGGGCTGC
1101 CCGCGGGGCC  TGAGCCCGCC  TGCCCGCCA  CCGCCCCGCC  CCGCCCCCTG
1151 CACCCCTGCC  GCCCGGTTCC  CATTAGCCTG  TCCGCTCTG  CGGGACCATG
1201 GAGTGGTAGC  CGAGGAGGAA  GCATGCTGGC  CGTGGCTGTC  GCGCTGCTGG
1251 CTGCCCTGCT  GGCCGCGCCG  GGAGCGGCGC  TGGCCCCAAG  GCGCTGCCCT
1301 GCGCAGGAGG  TGGCGAGAGG  CGTGCTGACC  AGTCTGCCAG  GAGACAGCGT
1351 GACTCTGACC  TGCCCGGGGG  TAGAGCCGGA  AGACAATGCC  ACTGTTCACT
1401 GGGTGTCTAG  GAAGCCGGCT  GCAGGCTCCC  ACCCCAGCAG  ATGGGCTGGC
    
```

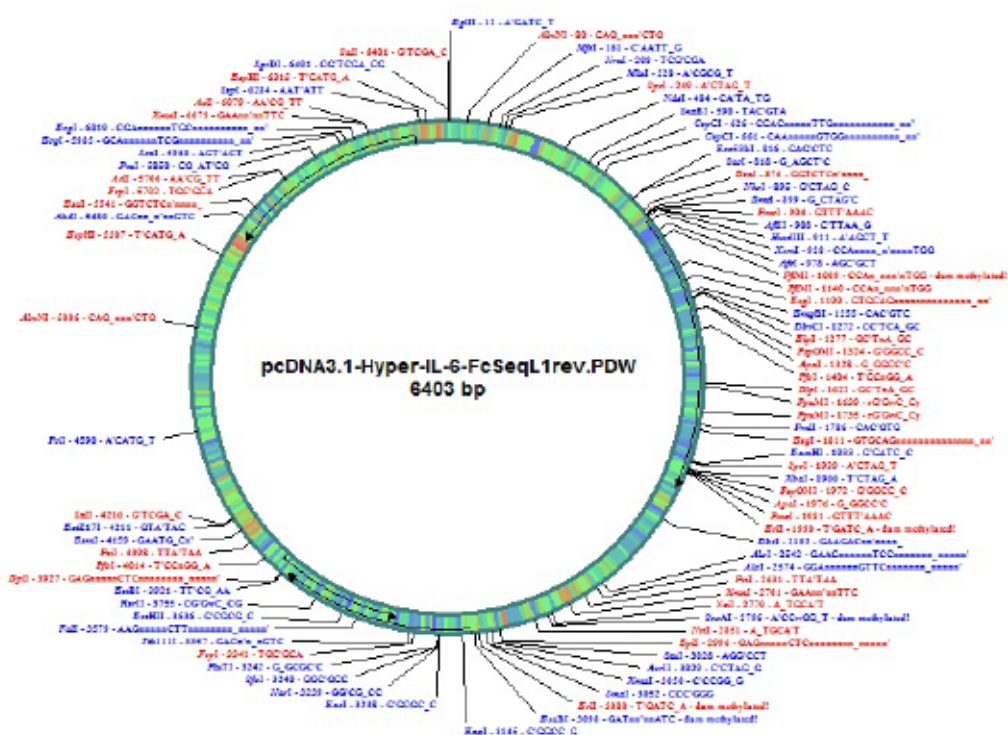

Anhang

1451 ATGGGAAGGA GGCTGCTGCT GAGGTCGGTG CAGCTCCACG ACTCTGGAAA
1501 CTATTCATGC TACCGGGCCG GCCGCCCAGC TGGGACTGTG CACTTGCTGG
1551 TGGATGTTCC CCCCAGGAG CCCCAGCTCT CCTGCTTCCG GAAGAGCCCC
1601 CTCAGCAATG TTGTTTGTGA GTGGGGTCTT CGGAGCACCC CATCCCTGAC
1651 GACAAAGGCT GTGCTCTTGG TGAGGAAGTT TCAGAACAGT CCGGCCGAAG
1701 ACTTCCAGGA GCCGTGCCAG TATTCCCAGG AGTCCCAGAA GTTCTCCTGC
1751 CAGTTAGCAG TCCCGGAGGG AGACAGCTCT TTCTACATAG TGTCCATGTG
1801 CGTCGCCAGT AGTGTCCGGA GCAAGTTCAG CAAAAC TCAA ACCTTTCAGG
1851 GTTGTGGAAT CTTGCAGCCT GATCCGCCTG CCAACATCAC AGTCACTGCC
1901 GTGGCCAGAA ACCCCCCTG GCTCAGTGTG ACCTGGCAAG ACCCCCCTC
1951 CTGGAAC TCA TCTTTCTACA GACTACGGTT TGAGCTCAGA TATCGGGCTG
2001 AACGGTCAA GACATTCACA ACATGGATGG TCAAGGACCT CCAGCATCAC
2051 TGTGTCATCC ACGACGCCTG GAGCGGCCTG AGGCACGTGG TGCAGCTTCG
2101 TGCCCAGGAG GAGTTCGGGC AAGGCGAGTG GAGCGAGTGG AGCCCAGGAG
2151 CCATGGGCAC GCCTTGTTAA GCGGCCGCTC GAGTCTAGAG GGCCCCTTTA
2201 AACCCGCTGA TCAGCCTCGA CTGTGCCTTC TAGTTGCCAG CCATCTGTTG
2251 TTTGCCCTC CCCCCTGCCT TCCTTGACCC TGGAAGGTGC CACTCCCCT
2301 GTCCTTTCCT AATAAAATGA GGAAATTGCA TCGCATTGTC TGAGTAGGTG
2351 TCATTCTATT CTGGGGGGTG GGGTGGGGCA GGACAGCAAG GGGGAGGATT
2401 GGAAGACAA TAGCAGGCAT GCTGGGGATG CCGTGGGCTC TATGGCTTCT
2451 GAGCGGAAA GAACAGCTG GGGCTCTAGG GGGTATCCCC ACGGCCCTG
2501 TAGCGGCGCA TTAAGCGCGG CGGGTGTGGT GGTTACGCGC AGCGTGACCG
2551 CTACACTTGC CAGCGCCCTA GCGCCGCTC CTTTCGCTTT CTTCCCTCC
2601 TTTCTCGCCA CGTTCGCCGG CTTTCCCGT CAAGCTCTAA ATCGGGGGCT
2651 CCCTTTAGGG TTCCGATTTA GTGCTTTACG GCACCTCGAC CCAAAAAAC
2701 TTGATTAGGG TGATGGTTCA CGTAGTGGGC CATCGCCCTG ATAGACGGTT
2751 TTTCCGCCCT TGACGTTGGA GTCCACGTTT TTTAATAGTG GACTCTTGTT
2801 CAAAAC TGA ACAACACTCA ACCCTATCTC GGTCTATTCT TTTGATTTAT
2851 AAGGGATTTT GCCGATTTCC GCCTATTGGT TAAAAAATGA GCTGATTTAA
2901 CAAAAATTTA ACGCGAATTA ATTTCTGTGA ATGTGTGTCA GTTAGGGTGT
2951 GGAAAGTCCC CAGGCTCCCC AGCAGGCAGA AGTATGCAA GCATGCATCT
3001 CAATTAGTCA GCAACCAGGT GTGGAAAGTC CCCAGGCTCC CCAGCAGGCA
3051 GAAGTATGCA AAGCATGCAT CTCAATTAGT CAGCAACCAT AGTCCCGCCC
3101 CTAAC TCCGC CCATCCCGCC CTAAC TCCG CCCAGTTCCG CCCATTCTCC
3151 GCCCCATGGC TGACTAATTT TTTTATTTTA TGCAGAGGCC GAGGCCGCT
3201 CTGCCCTGTA GCTATTCCAG AAGTAGTGAG GAGGCTTTTT TGGAGGCCTA
3251 GGCTTTTGCA AAAAGCTCCC GGGAGCTTGT ATATCCATT TCGGACTGTA
3301 TCAAGACACA GGATGAGGAT CGTTTCGCAT GATTGAACAA GATGGATTGC
3351 ACGCAGGTTT TCCGGCCGCT TGGGTGGAGA GGCTATTCCG CTATGACTGG
3401 GCACAACAGA CAATCGGCTG CTCTGATGCC GCCGTGTTCC GGCTGTGAGC
3451 GCAGGGGCGC CCGGTTCTTT TTGTCAAGAC CGACCTGTCC GGTGCCCTGA
3501 ATGAACTGCA GGACGAGGCA GCGCGGCTAT CGTGGCTGGC CACGACGGGC
3551 GTTCCCTGCG CAGCTGTGCT CGACGTTGTC ACTGAAGCGG GAAGGGACTG
3601 GCTGCTATTG GCGGAAGTGC CGGGGCAGGA TCTCCTGTCA TCTCACCTTG
3651 CTCCTGCCGA GAAAGTATCC ATCATGGCTG ATGCAATGCG GCGGCTGCAT
3701 ACGCTTGATC CGGCTACCTG CCCATTGAC CACCAAGCGA AACATCGCAT
3751 CGAGCGAGCA CGTACTCGGA TGGAAGCCGG TCTTGTGAT CAGGATGATC
3801 TGGACGAAGA GCATCAGGGG CTCGCGCCAG CCGAACTGTT CGCCAGGCTC
3851 AAGGCGCGCA TGCCCGACGG CGAGGATCTC GTCGTGACCC ATGGCGATGC
3901 CTGCTTGCCG AATATCATGG TGGAAAATGG CCGCTTTTCT GGATTCATCG
3951 ACTGTGGCCG GCTGGGTGTG GCGGACCGCT ATCAGGACAT AGCGTTGGCT
4001 ACCCGTGATA TTGCTGAAGA GCTTGGCGGC GAATGGGCTG ACCGCTTCTC
4051 CGTGCTTTAC GGTATCGCCG CTCCCATTG GCAGCGCATC GCCTTCTATC
4101 GCCTTCTTGA CGAGTTCTTC TGAGCGGGAC TCTGGGGTTC GAAATGACCG
4151 ACCAAGCGAC GCCCAACCTG CCATCACGAG ATTTGATTG CACCGCCGCC
4201 TTCTATGAAA GGTGGGCTT CGGAATCGTT TTCCGGGACG CCGGCTGGAT
4251 GATCCTCCAG CGCGGGGATC TCATGCTGGA GTTCTTCGCC CACCCCAACT
4301 TGTTTATTGC AGCTTATAAT GGTTACAAAT AAAGCAATAG CATCACAAAT
4351 TTCACAAATA AAGCATTTTTT TTCACTGCAT TCTAGTTGTG GTTTGTCCAA

Anhang

4401 ACTCATCAAT GTATCTTATC ATGTCTGTAT ACCGTGACCC TCTAGCTAGA
4451 GCTTGGCGTA ATCATGGTCA TAGCTGTTTC CTGTGTGAAA TTGTTATCCG
4501 CTCACAATTC CACACAACAT ACGAGCCGGA AGCATAAAGT GTAAAGCCTG
4551 GGGTGCCTAA TGAGTGAGCT AACTCACATT AATTGCGTTG CGCTCACTGC
4601 CCGCTTTCCA GTCGGGAAAC CTGTGCGTCC AGCTGCATTA ATGAATCGGC
4651 CAACGCGCGG GGAGAGGCGG TTTGCGTATT GGGCGCTCTT CCGCTTCTC
4701 GCTCACTGAC TCGCTGCGCT CGGTCTGTTG GCTGCGGCGA GCGGTATCAG
4751 CTCACTCAA GCGGTAATA CGGTTATCCA CAGAATCAGG GGATAACGCA
4801 GGAAAGAACA TGTGAGCAA AGGCCAGCAA AAGGCCAGGA ACCGTAAAAA
4851 GGCCGCGTTG CTGGCGTTTT TCCATAGGCT CCGCCCCCTT GACGAGCATC
4901 ACAAAAATCG ACGCTCAAGT CAGAGGTGGC GAAACCCGAC AGGACTATAA
4951 AGATAACCAG CGTTTTCCCC TGGAAGCTCC CTCGTGCGCT CTCCTGTTCC
5001 GACCCTGCCG CTTACCGGAT ACCTGTCCGC CTTTCTCCCT TCGGGAAGCG
5051 TGGCGCTTTC TCATAGCTCA CGCTGTAGGT ATCTCAGTTC GGTGTAGGTC
5101 GTTCGCTCCA AGCTGGGCTG TGTGCACGAA CCCCCGTTT AGCCCCACCG
5151 CTGCGCCTTA TCCGGTAACT ATCGTCTTGA GTCCAACCCG GTAAGACACG
5201 ACTTATCGCC ACTGGCAGCA GCCACTGGTA ACAGGATTAG CAGAGCGAGG
5251 TATGTAGGCG GTGCTACAGA GTTCTTGAAG TGGTGGCCTA ACTACGGCTA
5301 CACTAGAAGA ACAGTATTTG GTATCTGCGC TCTGCTGAAG CCAGTTACCT
5351 TCGGAAAAAG AGTTGGTAGC TCTTGATCCG GCAAACAAAC CACCGCTGGT
5401 AGCGGTTTTT TTGTTTGCAA GCAGCAGATT ACGCGCAGAA AAAAAAGATC
5451 TCAAGAAGAT CCTTTGATCT TTTCTACGGG GTCTGACGCT CAGTGGAAACG
5501 AAAACTCACG TTAAGGGATT TTGGTCATGA GATTATCAAA AAGGATCTTC
5551 ACCTAGATCC TTTTAAATTA AAAATGAAGT TTTAAATCAA TCTAAAGTAT
5601 ATATGAGTAA ACTTGGTCTG ACAGTTACCA ATGCTTAATC AGTGAGGCAC
5651 CTATCTCAGC GATCTGTCTA TTTGTTTCAT CCATAGTTGC CTGACTCCCC
5701 GTCGTGTAGA TAACTACGAT ACGGGAGGGC TTACCATCTG GCCCCAGTGC
5751 TGCAATGATA CCGCGAGACC CACGCTCACC GGCTCCAGAT TTATCAGCAA
5801 TAAACCAGCC AGCCGGAAGG GCCGAGCGCA GAAGTGGTCC TGCAACTTTA
5851 TCCGCCTCCA TCCAGTCTAT TAATTGTTGC CGGGAAGCTA GAGTAAGTAG
5901 TTCGCCAGTT AATAGTTTGC GCAACGTTGT TGCCATTGCT ACAGGCATCG
5951 TGGTGTACAG CTCGTGTTTT GGTATGGCTT CATTGAGCTC CCGTTCCCAA
6001 CGATCAAGGC GAGTTACATG ATCCCCCATG TTGTGCAAAA AAGCGGTTAG
6051 CTCCTTCGGT CCTCCGATCG TTGTGAGAAG TAAGTTGGCC GCAGTGTAT
6101 CACTCATGGT TATGGCAGCA CTGCATAATT CTCTTACTGT CATGCCATCC
6151 GTAAGATGCT TTTCTGTGAC TGGTGAAGTAC TCAACCAAGT CATTCTGAGA
6201 ATAGTGTATG CCGCGACCAG GTTGCTCTTG CCCGGCGTCA ATACGGGATA
6251 ATACCGCGCC ACATAGCAGA ACTTTAAAAG TGCTCATCAT TGGAAAACGT
6301 TCTTCGGGGC GAAAACTCTC AAGGATCTTA CCGCTGTTGA GATCCAGTTC
6351 GATGTAACCC ACTCGTGCAC CCAACTGATC TTCAGCATCT TTTACTTTCA
6401 CCAGCGTTTT TGGGTGAGCA AAAACAGGAA GGCAAAATGC CGCAAAAAAG
6451 GGAATAAGGG CGACACGGAA ATGTTGAATA CTCATACTCT TCCTTTTTCA
6501 ATATTATTGA AGCATTATC AGGGTTATTG TCTCATGAGC GGATACATAT
6551 TTGAATGTAT TTAGAAAAAT AAACAAATAG GGGTTCCGCG CACATTTCCC
6601 CGAAAAGTGC CACCTGACGT C

Abb. 8.2.5: Plasmidkarte pcDNA3.1-Hyper-IL-6-Fc SeqL1 (+ 42 AS)



1	GACGGATCGG	GAGATCTCCC	GATCCCCTAT	GGTGCACCTCT	CAGTACAATC
51	TGCTCTGATG	CCGCATAGTT	AAGCCAGTAT	CTGCTCCCTG	CTTGTGTGTT
101	GGAGGTCGCT	GAGTAGTGCG	CGAGCAAAT	TTAAGCTACA	ACAAGGCAAG
151	GCTTGACCGA	CAATTGCATG	AAGAATCTGC	TTAGGGTTAG	GCGTTTTGCG
201	CTGCTTCGCG	ATGTACGGGC	CAGATATACG	CGTTGACATT	GATTATTGAC
251	TAGTTATTAA	TAGTAATCAA	TTACGGGGTC	ATTAGTTCAT	AGCCCATATA
301	TGGAGTTCCG	CGTTACATAA	CTTACGGTAA	ATGGCCCGCC	TGGCTGACCG
351	CCCAACGACC	CCCGCCATT	GACGTCAATA	ATGACGTATG	TTCCCATAGT
401	AACGCCAATA	GGGACTTTC	ATTGACGTCA	ATGGGTGGAG	TATTTACGGT
451	AAACTGCCCA	CTTGGCAGTA	CATCAAGTGT	ATCATATGCC	AAGTACGCC
501	CCTATTGACG	TCAATGACGG	TAAATGGCC	GCCTGGCATT	ATGCCAGTA
551	CATGACCTTA	TGGGACTTTC	CTACTTGGCA	GTACATCTAC	GTATTAGTCA
601	TCGCTATTAC	CATGGTGTATG	CGTTTTTGGC	AGTACATCAA	TGGGCGTGGA
651	TAGCGGTTTG	ACTCACGGGG	ATTTCCAAGT	CTCCACCCCA	TTGACGTCAA
701	TGGGAGTTTG	TTTTGGCACC	AAAATCAACG	GGACTTTC	AAATGTCGTA
751	ACAACGCCG	CCCATTGACG	CAAATGGGCG	GTAGGCGTGT	ACGGTGGGAG
801	GTCTATATAA	GCAGAGCTCT	CTGGCTAACT	AGAGAACCCA	CTGTTACTG
851	GCTTATCGAA	ATTAATCGAA	CTCACTATAG	GGAGACCCAA	GCTGCTTAGC
901	GTTTAAACTT	AAGCTTGCCA	CCATGCTGGC	AGTGGCTGC	GCCCTGTGG
951	CGCCCTCCT	GGCTGCCCT	GGCGCAGCGC	TGGCCCCAG	AAGATGCCCT
1001	GCCAGGAAG	TGGCCAGAGG	CGTGCTGACC	AGCCTGCCCG	GCGACAGCGT
1051	GACCCTGACC	TGCCCTGGCG	TGGAGCCGA	GGACAACGCC	ACCGTGCAC
1101	GGGTGCTGAG	AAAGCCTGCC	GCCGGAAGCC	ACCCAGCAG	ATGGGCCGGC
1151	ATGGGCAGGA	GACTGCTGCT	GAGAAGCGTG	CAGCTCCACG	ACAGCGGCAA
1201	CTACAGCTGC	TACAGAGCCG	GCAGACCTGC	CGGCACCGTG	CACCTCCTGG
1251	TGGACGTGCC	CCCCGAGGAG	CCTCAGCTGA	GCTGCTTACG	GAAGAGCCCC
1301	CTGAGCAACG	TGGTGTGTGA	GTGGGGCCCC	AGAAGCACC	CCAGCCTGAC
1351	CACCAAGGCC	GTGCTGCTGG	TGAGGAAGTT	CCAGAACAGC	CCTGCCGAGG
1401	ATTTCCAGGA	GCCCTGCCAG	TACAGCCAGG	AGAGCCAGAA	GTTTCACTGC

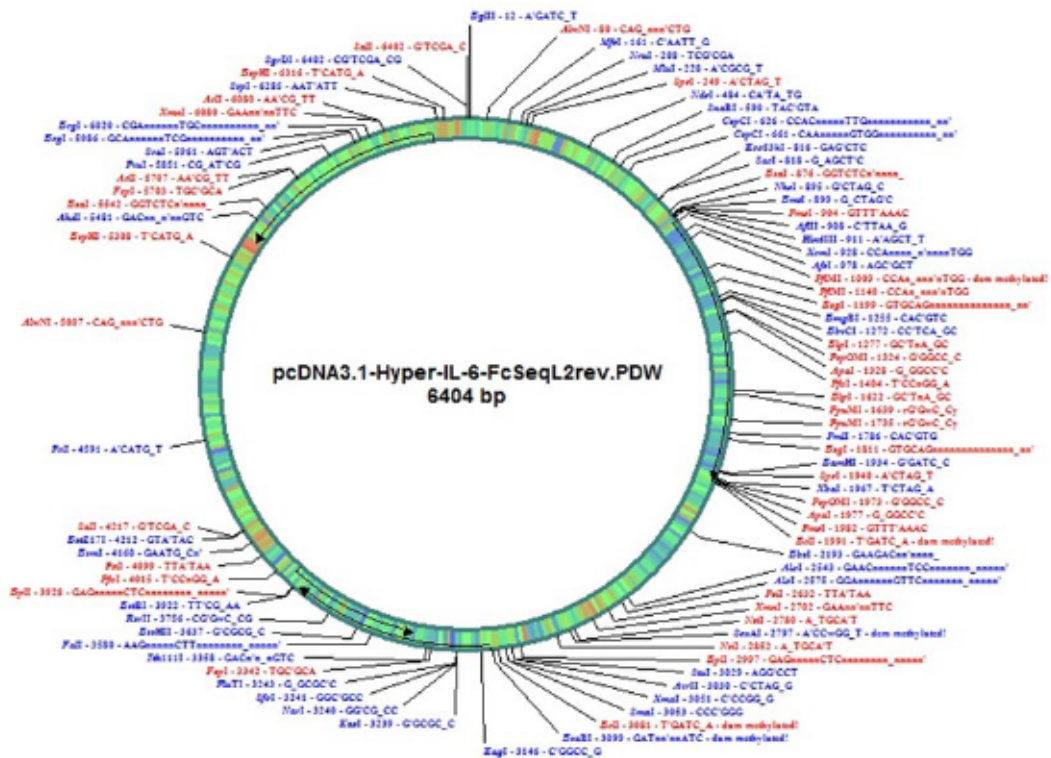
Anhang

1451 CAGCTGGCCG TGCCCGAGTG CGACAGCAGC TTCTACATCG TGTCCATGTG
1501 CGTGGCCAGC TCTGTGGGCA GCAAGTTCAG CAAGACCCAG ACCTTCCAGG
1551 GCTGCGGCAT CTTGCAGCCC GACCCTCCCG CCAACATCAC CGTGACCCGC
1601 GTGGCCAGAA ATCCTAGATG GCTGAGCGTG ACCTGGCAGG ACCCTCACAG
1651 CTGGAACAGC TCCTTCTACC GGCTGAGATT CGAGCTGCGG TACAGGGCCG
1701 AGAGAAGCAA GACCTTTACC ACCTGGATGG TGAAGGACCT GCAGCACCAC
1751 TGCCTGATCC ACGACGCCTG GAGCGGCCTG AGACACGTGG TGCAGCTGAG
1801 AGCCCAGGAG GAGTTCGGCC AGGGCGAGTG GAGCGAGTGG TCCCCGAGG
1851 CCATGGGCAC CCCCTGGACC GAGAGCAGAA GCCCTCCTGC TCGTGGAGGA
1901 GGGGGCAGCG GCGGAGGAGG AAGCGTGGAA CCGGATCCAC TAGTCCAGTG
1951 TGGTGGAAAT TCGAGTCTAG AGGGCCCGTT TAAACCCGCT GATCAGCCTC
2001 GACTGTGCCT TCTAGTTGCC AGCCATCTGT TGTTCGCCCC TCCCCCGTGC
2051 CTTCCTTGAC CCTGGAAGGT GCCACTCCA CTGTCTTTC CTAATAAAAT
2101 GAGGAAATG CATCGCATTG TCTGAGTAGG TGTATTCTA TTCTGGGGGG
2151 TGGGGTGGGG CAGGACAGCA AGGGGGAGGA TTGGGAAGAC AATAGCAGGC
2201 ATGCTGGGGA TGCGGTGGGC TCTATGGCTT CTGAGGCGGA AAGAACCAGC
2251 TGGGGCTCTA GGGGGTATCC CCACGCGCCC TGTAGCGGCG CATTAAAGCGC
2301 GCGGGTGTG GTGGTTACGC GCAGCGTGAC CGCTACACTT GCCAGCGCCC
2351 TAGCGCCCGC TCCTTTCGCT TTCTTCCCTT CCTTCTCGC CACGTTTCGCC
2401 GGCTTTCGCC GTCAAGCTCT AAATCGGGG CTCCCTTTAG GGTCCGATT
2451 TAGTCTTTA CGGCACCTCG ACCCCAAAA ACTTGATTAG GGTGATGGTT
2501 CACGTAGTGG GCCATCGCCC TGATAGACGG TTTTTCGCCC TTTGACGTTG
2551 GAGTCCACGT TCTTTAATAG TGGACTCTTG TTCCAAACTG GAACAACACT
2601 CAACCCTATC TCGGTCTATT CTTTTGATTT ATAAGGGATT TTGCCGATTT
2651 CGGCCTATTG GTTAAAAAAT GAGCTGATTT AACAAAAATT TAACGCGAAT
2701 TAATTCTGTG GAATGTGTGT CAGTTAGGGT GTGGAAAGTC CCCAGGCTCC
2751 CCAGCAGGCA GAAGTATGCA AAGCATGCAT CTCAATTAGT CAGCAACCAG
2801 GTGTGGAAAAG TCCCAGGCT CCCAGCAGG CAGAAGTATG CAAAGCATGC
2851 ATCTCAATTA GTCAGCAACC ATAGTCCCGC CCCTAACTCC GCCCATCCCG
2901 CCCCTAACTC CGCCAGTTC CGCCATTCT CCGCCCATG GCTGACTAAT
2951 TTTTTTTTATT TATGCAGAGG CCGAGGCCGC CTCTGCCTCT GAGCTATTCC
3001 AGAAGTAGTG AGGAGGCTTT TTTGGAGGCC TAGGCTTTTG CAAAAAGCTC
3051 CCGGGAGCTT GTATATCCAT TTTCCGATCT GATCAAGAGA CAGGATGAGG
3101 ATCGTTTCGC ATGATTGAAC AAGATGGATT GCACGCAGGT TCTCCGGCCG
3151 CTTGGGTGGA GAGGCTATTC GGCTATGACT GGGCACAACA GACAATCGGC
3201 TGCTCTGATG CCGCCGTGTT CCGGCTGTCA GCGCAGGGGC GCCCGGTTCT
3251 TTTTGTCAAG ACCGACCTGT CCGGTGCCCT GAATGAACTG CAGGACGAGG
3301 CAGCGCGGCT ATCGTGGCTG GCCACGACGG GCGTTCCTTG CGCAGCTGTG
3351 CTCGACGTTG TCACTGAAGC GGAAGGGAC TGGCTGCTAT TGGGCGAAGT
3401 GCGGGGCGAG GATCTCCTGT CATCTCACCT TGCTCCTGCC GAGAAAGTAT
3451 CCATCATGGC TGATGCAATG CGGCGGCTGC ATACGCTTGA TCCGGCTACC
3501 TGCCCATTCG ACCACCAAGC GAAACATCGC ATCGAGCGAG CACGTACTCG
3551 GATGGAAGCC GGTCTTGTG ATCAGGATGA TCTGGACGAA GAGCATCAGG
3601 GGCTCGCGCC AGCCGAACTG TTCGCCAGGC TCAAGGCGCG CATGCCCGAC
3651 GGCGAGGATC TCGTCTGAC CCATGGCGAT GCCTGCTTGC CGAATATCAT
3701 GGTGGAAAAT GGCCGCTTTT CTGGATTAT CATGCTGCTG CCGCTGGGTG
3751 TGGCGGACCG CTATCAGGAC ATAGCGTTGG CTACCCGTGA TATTGCTGAA
3801 GAGCTTGGCG GCGAATGGGC TGACCGCTTC CTCGTGCTTT ACGGTATCGC
3851 CGCTCCCGAT TCGCAGCGCA TCGCCTTCTA TCGCCTTCT GACGATTTCT
3901 TCTGAGCGGG ACTCTGGGGT TCGAAATGAC CGACCAAGCG ACGCCCAACC
3951 TGCCATCACG AGATTTTCGAT TCCACCGCCG CCTTCTATGA AAGGTTGGGC
4001 TTCGGAATCG TTTTCCGGGA CGCCGGCTGG ATGATCCTCC AGCGCGGGGA
4051 TCTCATGCTG GAGTTCCTCG CCCACCCAA CTTGTTTATT GCAGCTTATA
4101 ATGGTTACAA ATAAAGCAAT AGCATCACA ATTTACAAA TAAAGCATT
4151 TTTTCACTG ATTTAGTTG TGGTTTGTCC AAACATCA TAATCATTTA
4201 TCATGTCTGT ATACGTCGA CCTCTAGCTA GAGCTTGGCG TAATCATGGT
4251 CATAGCTGTT TCCTGTGTGA AATTGTTATC CGCTCACAAT TCCACACAAC
4301 ATACGAGCCG GAAGCATAAA GTGTAAAGCC TGGGGTGCCT AATGAGTGAG
4351 CTAACCTACA TTAATTGCGT TGCGCTCACT GCCCGCTTTC CAGTCGGGAA

Anhang

4401 ACCTGTCGTG CCAGCTGCAT TAATGAATCG GCCAACGCGC GGGGAGAGGC
4451 GGTTCGCGTA TTGGGCGCTC TTCCGCTTCC TCGCTCACTG ACTCGCTGCG
4501 CTCGGTCGTT CGGCTGCGGC GAGCGGTATC AGCTCACTCA AAGGCGGTAA
4551 TACGGTTATC CACAGAATCA GGGGATAACG CAGGAAAGAA CATGTGAGCA
4601 AAAGGCCAGC AAAAGGCCAG GAACCGTAAA AAGGCCGCGT TGCTGGCGTT
4651 TTTCCATAGG CTCCGCCCCC CTGACGAGCA TCACAAAAAT CGACGCTCAA
4701 GTCAGAGGTG GCGAAACCCG ACAGGACTAT AAAGATACCA GGCCTTTCCC
4751 CCTGGAAGCT CCCTCGTGCG CTCTCCTGTT CCGACCCTGC CGCTTACCGG
4801 ATACCTGTCC GCCTTTCTCC CTTCCGGAAG CGTGGCGCTT TCTCATAGCT
4851 CACGCTGTAG GTATCTCAGT TCGGTGTAGG TCGTTGCTC CAAGCTGGGC
4901 TGTGTGCACG AACCCCCCGT TCAGCCCGAC CGCTGCGCCT TATCCGGTAA
4951 CTATCGTCTT GAGTCCAACC CGGTAAGACA CGACTTATCG CCACTGGCAG
5001 CAGCCACTGG TAACAGGATT AGCAGAGCGA GGTATGTAGG CGGTGCTACA
5051 GAGTTCCTGA AGTGGTGGCC TAACTACGGC TACACTAGAA GAACAGTATT
5101 TGGTATCTGC GCTCTGCTGA AGCCAGTTAC CTTCCGAAAA AGAGTTGGTA
5151 GCTCTTGATC CGGCAAACAA ACCACCGCTG GTAGCGGTTT TTTTGTTCGC
5201 AAGCAGCAGA TTACGCGCAG AAAAAAAGGA TCTCAAGAAG ATCCTTTGAT
5251 CTTTTCTACG GGGTCTGACG CTCAGTGGAA CGAAAACTCA CGTTAAGGGA
5301 TTTTGGTCAT GAGATTATCA AAAAGGATCT TCACCTAGAT CCTTTTAAAT
5351 TAAAAATGAA GTTTTAAATC AATCTAAAGT ATATATGAGT AAATTGGTC
5401 TGACAGTTAC CAATGCTTAA TCAGTGAGGC ACCTATCTCA GCGATCTGTC
5451 TATTTGTTTC ATCCATAGTT GCCTGACTCC CCGTCGTGTA GATAACTACG
5501 ATACGGGAGG GCTTACCATC TGGCCCCAGT GCTGCAATGA TACCGCGAGA
5551 CCCACGCTCA CCGGCTCCAG ATTTATCAGC AATAAACCCAG CCAGCCGGAA
5601 GGGCCGAGCG CAGAAGTGGT CCTGCAACTT TATCCGCCTC CATCCAGTCT
5651 ATTAATTGTT GCCGGGAAGC TAGAGTAAGT AGTTCGCCAG TTAATAGTTT
5701 GCGCAACGTT GTTGCCATTG CTACAGGCAT CGTGGTGTCA CGCTCGTCGT
5751 TTGGTATGGC TTCATTGAGC TCCGGTTCCC AACGATCAAG GCGAGTTACA
5801 TGATCCCCCA TGTTGTGCAA AAAAGCGGTT AGCTCCTTCG GTCCTCCGAT
5851 CGTTGTGAGA AGTAAGTTGG CCGCAGTGTT ATCACTCATG GTTATGGCAG
5901 CACTGCATAA TTCTCTTACT GTCATGCCAT CCGTAAGATG CTTTTCTGTG
5951 ACTGGTGAGT ACTCAACCAA GTCATTCTGA GAATAGTGTA TGCGGCGACC
6001 GAGTTGCTCT TGCCCGGCGT CAATACGGGA TAATACCGCG CCACATAGCA
6051 GAACTTTAAA AGTGCTCATC ATTTGGAAAAC GTTCTTCGGG GCGAAAACTC
6101 TCAAGGATCT TACCGCTGTT GAGATCCAGT TCGATGTAAC CCACTCGTGC
6151 ACCCAACTGA TCTTCAGCAT CTTTTACTTT CACCAGCGTT TCTGGGTGAG
6201 CAAAAACAGG AAGGCAAAAT GCCGCAAAAA AGGGAATAAG GCGACACGG
6251 AAATGTTGAA TACTCATACT CTTCTTTTTT CAATATTATT GAAGCATTTA
6301 TCAGGGTTAT TGTCTCATGA GCGGATACAT ATTTGAATGT ATTTAGAAAA
6351 ATAAACAAAT AGGGGTTCCG CGCACATTTT CCCGAAAAGT GCCACCTGAC
6401 GTC

Abb. 8.2.6: Plasmidkarte pcDNA3.1-Hyper-IL-6-Fc SeqL2 (+ 17 AS)



```

1 GACGGATCGG GAGATCTCCC GATCCCCTAT GGTGCACTCT CAGTACAATC
51 TGCTCTGATG CCGCATAGTT AAGCCAGTAT CTGCTCCCTG CTTGTGTGTT
101 GGAGGTCGCT GAGTAGTGCG CGAGCAAAT TTAAGCTACA ACAAGGCAAG
151 GCTTGACCGA CAATTGCATG AAGAATCTGC TTAGGGTTAG GCGTTTTGCG
201 CTGCTTCGCG ATGTACGGGC CAGATATACG CGTTGACATT GATTATTGAC
251 TAGTTATTAA TAGTAATCAA TTACGGGGTC ATTAGTTCAT AGCCCATATA
301 TGGAGTTCGG CGTTACATAA CTTACGGTAA ATGGCCCGCC TGGCTGACCG
351 CCCAACGACC CCCGCCATT GACGTCAATA ATGACGTATG TTCCCATAGT
401 AACGCCAATA GGGACTTTCC ATTGACGTCA ATGGGTGGAG TATTTACGGT
451 AAAC TGCCCA CTTGGCAGTA CATCAAGTGT ATCATATGCC AAGTACGCC
501 CCTATTGACG TCAATGACGG TAAATGGCCC GCCTGGCATT ATGCCAGTA
551 CATGACCTTA TGGGACTTTC CTACTTGGCA GTACATCTAC GTATTAGTCA
601 TCGCTATTAC CATGGTGATG CGGTTTTGGC AGTACATCAA TGGGCGTGGA
651 TAGCGGTTTG ACTCACGGGG ATTTCCAAGT CTCCACCCCA TTGACGTCAA
701 TGGGAGTTTG TTTTGGCACC AAAATCAACG GGACTTTCCA AAATGTGCTA
751 ACAACTCCGC CCCATTGACG CAAATGGGCG GTAGGCGTGT ACGGTGGGAG
801 GTCTATATAA GCAGAGCTCT CTGGCTAACT AGAGAACCCA CTGCTTACTG
851 GCTTATCGAA ATTAATACGA CTCACTATAG GGAGACCCAA GCTGGCTAGC
901 GTTTAAACTT AAGCTTGCCA CCATGTGGC AGTGGGCTGC GCCCTGTGG
951 CGGCCCTCCT GGCTGCCCTT GCGCAGCGC TGGCCCCCAG AAGATGCCCT
1001 GCCCAGGAAG TGGCCAGAGG CGTGCTGACC AGCCTGCCCG GCGACAGCGT
1051 GACCCTGACC TGCCCTGGCG TGGAGCCCGA GGACAACGCC ACCGTGCACT
1101 GGGTGCTGAG AAAGCCTGCC GCCGGAAGCC ACCCCAGCAG ATGGGCCGGC
1151 ATGGGCAGGA GACTGCTGCT GAGAAGCGTG CAGCTCCACG ACAGCGGCAA
1201 CTACAGCTGC TACAGAGCCG GCAGACCTGC CGGCACCGTG CACCTCCTGG
1251 TGGACGTGCC CCCCAGAGG CCTCAGCTGA GCTGCTTACG GAAGAGCCCC
1301 CTGAGCAACG TGGTGTGTGA GTGGGGCCCC AGAAGCACC CCAGCCTGAC
1351 CACCAAGGCC GTGCTGCTGG TGAGGAAGTT CCAGAACAGC CCTGCCGAGG
1401 ATTTCCAGGA GCCCTGCCAG TACAGCCAGG AGAGCCAGAA GTTCAGCTGC
    
```

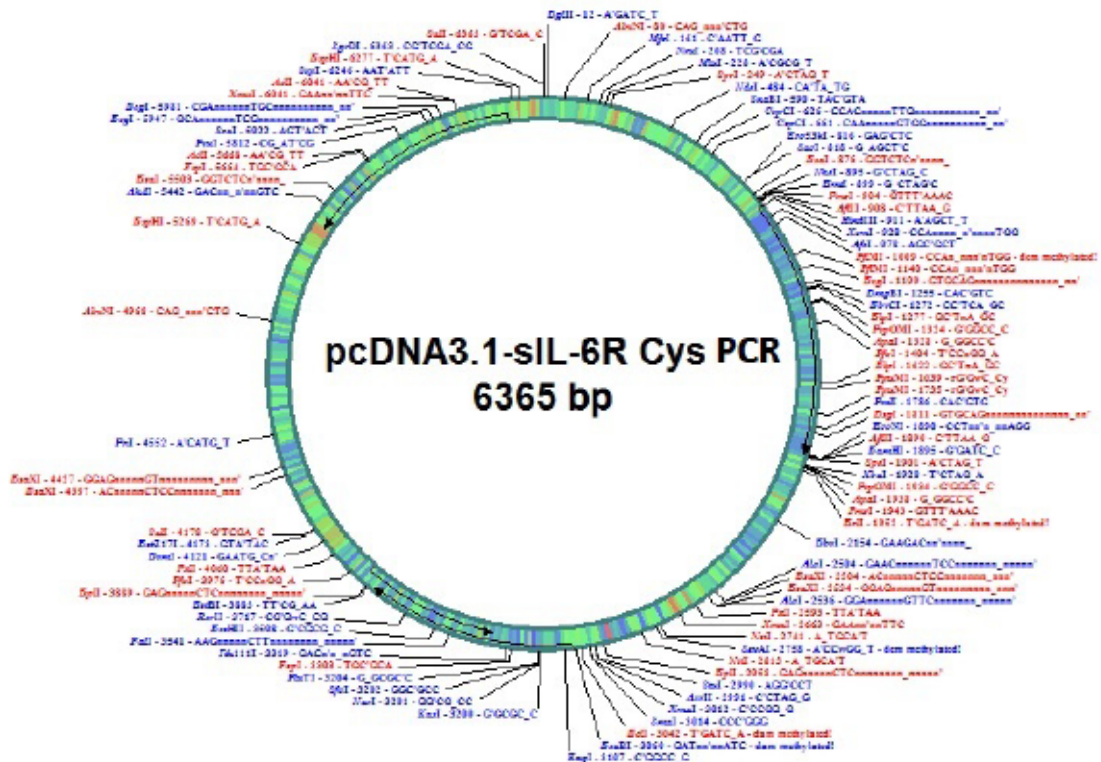

Anhang

1451 CAGCTGGCCG TGCCCGAGTG CGACAGCAGC TTCTACATCG TGTCCATGTG
1501 CGTGGCCAGC TCTGTGGGCA GCAAGTTCAG CAAGACCCAG ACCTTCCAGG
1551 GCTGCGGCAT CTTGCAGCCC GACCCTCCCG CCAACATCAC CGTGACCGCC
1601 GTGGCCAGAA ATCCTAGATG GCTGAGCGTG ACCTGGCAGG ACCCTCACAG
1651 CTGGAACAGC TCCTTCTACC GGCTGAGATT CGAGCTGCGG TACAGGGCCG
1701 AGAGAAGCAA GACCTTTACC ACCTGGATGG TGAAGGACCT GCAGCACCAC
1751 TGCCTGATCC ACGACGCCTG GAGCGGCCTG AGACACGTGG TGCAGCTGAG
1801 AGCCCAGGAG GAGTTCGGCC AGGGCGAGTG GAGCGAGTGG TCCCCGAGG
1851 CCATGGGCAC CCCCTGGACC GAGAGCAGAA GCCCTCCTGC TCGTGGAGGA
1901 GGGGGCAGCG GCGGAGGAGG AAGCGTGGAA CCGGGATCCA CTAGTCCAGT
1951 GTGGTGGAAAT TTCGAGTCTA GAGGGCCCGT TTAAACCCGC TGATCAGCCT
2001 CGACTGTGCC TTCTAGTTGC CAGCCATCTG TTGTTTGCCC CTCCCCCGTG
2051 CCTTCCTTGA CCCTGGAAGG TGCCACTCCC ACTGTCCTTT CCTAATAAAA
2101 TGAGGAAATT GCATCGCATT GTCTGAGTAG GTGTATTCT ATTCTGGGGG
2151 GTGGGGTGGG GCAGGACAGC AAGGGGGAGG ATTGGGAAGA CAATAGCAGG
2201 CATGCTGGGG ATGCGGTGGG CTCTATGGCT TCTGAGGCGG AAAGAACCAG
2251 CTGGGGCTCT AGGGGGTATC CCCACGCGCC CTGTAGCGGC GCATTAAGCG
2301 CGGCGGGTGT GGTGGTTACG CGCAGCGTGA CCGCTACACT TGCCAGCGCC
2351 CTAGCGCCCG CTCCTTTCCG TTTCTTCCCT TCCTTTCTCG CCACGTTCCG
2401 CCGCTTTCCC CGTCAAGCTC TAAATCGGGG GCTCCCTTTA GGGTCCGAT
2451 TTAGTGTCTT ACGGCACCTC GACCCCAAAA AACTTGATTA GGGTGATGGT
2501 TCACGTAGTG GGCCATCGCC CTGATAGACG GTTTTTCGCC CTTTGACGTT
2551 GGAGTCCACG TTCTTTAATA GTGGACTCTT GTTCCAAACT GGAACAACAC
2601 TCAACCCTAT CTCGGTCTAT TCTTTTGATT TATAAGGGAT TTTGCCGATT
2651 TCGGCCTATT GGTAAAAAAA TGAGCTGATT TAACAAAAAT TTAACCGGAA
2701 TTAATTCTGT GGAATGTGTG TCAGTTAGGG TGTGGAAAGT CCCCAGGCTC
2751 CCCAGCAGGC AGAAGTATGC AAAGCATGCA TCTCAATTAG TCAGCAACCA
2801 GGTGTGGAAA GTCCCCAGGC TCCCCAGCAG GCAGAAGTAT GCAAAGCATG
2851 CATCTCAATT AGTCAGCAAC CATAGTCCCG CCCCTAACTC CGCCCATCCC
2901 GCCCCTAACT CCGCCCAGTT CCGCCCATT CCGCCCCAT GGCTGACTAA
2951 TTTTTTTTAT TTATGCAGAG GCCGAGGCCG CCTCTGCCTC TGAGCTATTC
3001 CAGAAGTAGT GAGGAGGCTT TTTTGGAGGC CTAGGCTTTT GCAAAAAGCT
3051 CCCGGGAGCT TGTATATCCA TTTTCCGATC TGATCAAGAG ACAGGATGAG
3101 GATCGTTTCG CATGATTGAA CAAGATGGAT TGCACGCAGG TTCTCCGGCC
3151 GCTTGGGTGG AGAGGCTATT CGGCTATGAC TGGGCACAAC AGACAATCGG
3201 CTGCTCTGAT GCCGCGGTGT TCCGGCTGTC AGCGCAGGGG CGCCCAGGTT
3251 TTTTGTCAA GACCGACCTG TCCGGTGCCC TGAATGAACT GCAGGACGAG
3301 GCAGCGCGGC TATCGTGGCT GGCCACGACG GCGGTTCTTT GCGCAGCTGT
3351 CACTCGACGTT GTCACTGAAG CGGGAAGGGA CTGGCTGCTA TTGGGCGAAG
3401 TGCCGGGGCA GGATCTCCTG TCATCTCACC TTGCTCCTGC CGAGAAAAGTA
3451 TCCATCATGG CTGATGCAAT GCGGCGGCTG CATACTGCTT ATCCGGCTAC
3501 CTGCCATTG GACCACCAAG CGAAACATCG CATCGAGCGA GCACGTAATC
3551 GGATGGAAGC CGGTCTTGTC GATCAGGATG ATCTGGACGA AGAGCATCAG
3601 GGGCTCGCGC CAGCCGAACT GTTCGCCAGG CTCAAGGCGC GCATGCCCGA
3651 CGGCGAGGAT CTCGTCTGTA CCCATGGCGA TGCCTGCTTG CCGAATATCA
3701 TGGTGGAAAA TGGCCGCTTT TCTGGATTCA TCGACTGTGG CCGGCTGGGT
3751 GTGGCGGACC GCTATCAGGA CATAGCGTTG GCTACCCGTG ATATTGCTGA
3801 AGAGCTTGGC GGCGAATGGG CTGACCGCTT CCTCGTGCTT TACGGTATCG
3851 CCGCTCCCGA TTCGCAGCGC ATCGCCTTCT ATCGCCTTCT TGACGAGTTC
3901 TTCTGAGCGG GACTCTGGGG TTCGAAATGA CCGACCAAGC GACGCCCAAC
3951 CTGCCATCAC GAGATTTGCA TTCCACCGCC GCCTTCTATG AAAGGTTGGG
4001 CTTCGGAATC GTTTTCCGGG ACGCCGGCTG GATGATCCTC CAGCGCGGGG
4051 ATCTCATGCT GGAGTCTTTC GCCCACCCCA ACTTGTTTAT TGCAGCTTAT
4101 AATGGTTACA AATAAAGCAA TAGCATCACA AATTTACAAA ATAAAGCATT
4151 TTTTCACTG CATTCTAGTT GTGGTTTGTG CAAACTCATC AATGATCTTT
4201 ATTCATCTCTG TATACCCTCG ACCTCTAGCT AGAGCTTGGC GTAATCATGG
4251 TCATAGCTGT TTCCTGTGTG AAATTGTTAT CCGCTCACA TTCCACACAA
4301 CATAAGAGCC GGAAGCATAA AGTGTAAGC CTGGGGTGCC TAATGAGTGA
4351 GCTAACTCAC ATTAATTGCG TTGCGCTCAC TGCCCGCTTT CCAGTCGGGA

Anhang

4401 AACCTGTCGT GCCAGCTGCA TTAATGAATC GGCCAACGCG CGGGGAGAGG
4451 CGGTTTGCGT ATTTGGGCGCT CTTCCGCTTC CTCGCTCACT GACTCGTGC
4501 GCTCGGTCGT TCGGCTGCGG CGAGCGGTAT CAGCTCACTC AAAGGCGGTA
4551 ATACGGTTAT CCACAGAATC AGGGGATAAC GCAGGAAAGA ACATGTGAGC
4601 AAAAGGCCAG CAAAAGGCCA GGAACCGTAA AAAGGCCGCG TTGCTGGCGT
4651 TTTTCCATAG GCTCCGCCCC CCTGACGAGC ATCACAAAAA TCGACGCTCA
4701 AGTCAGAGGT GGCAGAAACCC GACAGGACTA TAAAGATACC AGGCGTTTCC
4751 CCCTGGAAGC TCCCTCGTGC GCTCTCCTGT TCCGACCCTG CCGCTTACCG
4801 GATACCTGTC CGCCTTTTCTC CTTTCGGGAA GCGTGGCGCT TTCTCATAGC
4851 TCACGCTGTA GGTATCTCAG TTCGGTGTAG GTCGTTGCT CCAAGCTGGG
4901 CTGTGTGCAC GAACCCCCCG TTCAGCCCGA CCGCTGCGCC TTATCCGGTA
4951 ACTATCGTCT TGAGTCCAAC CCGGTAAGAC ACGACTTATC GCCACTGGCA
5001 GCAGCCACTG GTAACAGGAT TAGCAGAGCG AGGTATGTAG GCGGTGCTAC
5051 AGAGTTCTTG AAGTGGTGGC CTAACACGG CTACACTAGA AGAACAGTAT
5101 TTGGTATCTG CGCTCTGCTG AAGCCAGTTA CCTTCGGAAA AAGAGTTGGT
5151 AGCTCTTGAT CCGGCAACA AACCACCGCT GGTAGCGGTT TTTTGTGTTG
5201 CAAGCAGCAG ATTACGCGCA GAAAAAAGG ATCTCAAGAA GATCCTTTGA
5251 TCTTTTCTAC GGGGTCTGAC GCTCAGTGA ACGAAAATC ACGTTAAGGG
5301 ATTTTGGTCA TGAGATTATC AAAAAGGATC TTCACCTAGA TCCTTTTAAA
5351 TTAATAATGA AGTTTTAAAT CAATCTAAAG TATATATGAG TAAACTTGGT
5401 CTGACAGTTA CCAATGCTTA ATCAGTGAGG CACCTATCTC AGCGATCTGT
5451 CTATTTGCTT CATCCATAGT TGCCTGACTC CCCGTCGTGT AGATAACTAC
5501 GATACGGGAG GGCTTACCAT CTGGCCCCAG TGCTGCAATG ATACCGCGAG
5551 ACCCACGCTC ACCGGCTCCA GATTTATCAG CAATAAACCA GCCAGCCGGA
5601 AGGGCCGAGC GCAGAAGTGG TCCTGCAACT TTATCCGCCT CCATCCAGTC
5651 TATTAATTGT TGCCGGGAAG CTAGAGTAAG TAGTTCGCCA GTTAATAGTT
5701 TGCGCAACGT TGTTGCCATT GCTACAGGCA TCGTGGTGTC ACGCTCGTCG
5751 TTTGGTATGG CTTCAATCAG CTCCGGTTCC CAACGATCAA GCGGAGTTAC
5801 ATGATCCCC ATGTTGTGCA AAAAAGCGGT TAGCTCCTTC GGTCTCCGA
5851 TCGTTGTCAG AAGTAAGTTG GCCGCAGTGT TATCACTCAT GGTTATGGCA
5901 GCACTGCATA ATTCTCTTAC TGTCATGCCA TCCGTAAGAT GCTTTTCTGT
5951 GACTGGTGAG TACTCAACCA AGTCATTCTG AGAATAGTGT ATGCGGCGAC
6001 CGAGTTGCTC TTGCCGGGCG TCAATACGGG ATAATACCGC GCCACATAGC
6051 AGAACTTTAA AAGTGCTCAT CATTGGAAAA CGTTCTTCGG GGCAGAAACT
6101 CTCAAGGATC TTACCGCTGT TGAGATCCAG TTCGATGTAA CCCACTCGTG
6151 CACCCAAC TG ATCTTACGCA TCTTTTACTT TCACCAGCGT TTCTGGGTGA
6201 GCAAAAACAG GAAGGCAAAA TGCCGCAAAA AAGGGAATAA GGGCGACACG
6251 GAAATGTTGA ATACTCATAC TCTTCCTTTT TCAATATTAT TGAAGCATT
6301 ATCAGGGTTA TTGTCTCATG AGCGGATACA TATTTGAATG TATTTAGAAA
6351 AATAAACAAA TAGGGGTTCC GCGCACATTT CCCCAGAAAAG TGCCACCTGA
6401 CGTC

Abb. 8.2.7: Plasmidkarte pcDNA3.1-sIL-6R (aus PCR)



```

1 GACGGATCGG GAGATCTCCC GATCCCCTAT GGTGCACTCT CAGTACAATC
51 TGCTCTGATG CCGCATAGTT AAGCCAGTAT CTGCTCCCTG CTTGTGTGTT
101 GGAGGTCGCT GAGTAGTGCG CGAGCAAAT TTAAGCTACA ACAAGGCAAG
151 GC TTGACCGA CAATTGCATG AAGAATCTGC TTAGGGTTAG GCGTTTTGCG
201 CTGCTTCGCG ATGTACGGGC CAGATATACG CGTTGACATT GATTATTGAC
251 TAGTTATTAA TAGTAATCAA TTACGGGGTC ATTAGTTCAT AGCCATATA
301 TGGAGTTCGG CGTTACATAA CTTACGGTAA ATGGCCCGCC TGGCTGACCG
351 CCCAACGACC CCCGCCATT GACGTCAATA ATGACGTATG TTCCCATAGT
401 AACGCCAATA GGGACTTTCC ATTGACGTCA ATGGGTGGAG TATTTACGGT
451 AAAC TGCCCA CTTGGCAGTA CATCAAGTGT ATCATATGCC AAGTACGCC
501 CCTATTGACG TCAATGACGG TAAATGGCC GCCTGGCATT ATGCCAGTA
551 CATGACCTTA TGGGACTTTC CTACTTGGCA GTACATCTAC GTATTAGTCA
601 TCGCTATTAC CATGGTGATG CGGTTTTGGC AGTACATCAA TGGGCGTGGA
651 TAGCGGTTTG ACTCACGGGG ATTTCCAAGT CTCCACCCCA TTGACGTCAA
701 TGGGAGTTTG TTTTGGCACC AAAATCAACG GGACTTTCCA AAATGTGCTA
751 ACAACTCCGC CCCATTGACG CAAATGGGCG GTAGGCGTGT ACGGTGGGAG
801 GTCTATATAA GCAGAGCTCT CTGGCTAACT AGAGAACCCA CTGCTTACTG
851 GCTTATCGAA ATTAATACGA CTCACTATAG GGAGACCCAA GCTGGCTAGC
901 GTTTAAACTT AAGCTTGCCA CCATGTGGC AGTGGGCTGC GCCCTGCTGG
951 CCGCCCTCCT GGCTGCCCTT GCGCAGCGC TGGCCCCAG AAGATGCCCT
1001 GCCCAGGAAG TGGCCAGAGG CGTGCTGACC AGCCTGCCCG GCGACAGCGT
1051 GACCCTGACC TGCCCTGGCG TGGAGCCCGA GGACAACGCC ACCGTGCACT
1101 GGGTGCTGAG AAAGCCTGCC GCCGGAAGCC ACCCCAGCAG ATGGGCCGGC
1151 ATGGGCAGGA GACTGCTGCT GAGAAGCGTG CAGCTCCACG ACAGCGGCAA
1201 CTACAGCTGC TACAGAGCCG GCAGACCTGC CGGCACCGTG CACCTCCTGG
1251 TGGACGTGCC CCCCAGAGG CACTCAGCTGA GCTGCTTACG GAAGAGCCCC
1301 CTGAGCAACG TGGTGTGTGA GTGGGGCCCC AGAAGCACCC CCAGCCTGAC
1351 CACCAAGGCC GTGCTGCTGG TGAGGAAGTT CCAGAACAGC CCTGCCGAGG
    
```

Anhang

1401 ATTTCCAGGA GCCCTGCCAG TACAGCCAGG AGAGCCAGAA GTTCAGCTGC
1451 CAGCTGGCCG TGCCCGAGTG CGACAGCAGC TTCTACATCG TGTCCATGTG
1501 CGTGGCCAGC TCTGTGGGCA GCAAGTTCAG CAAGACCCAG ACCTTCCAGG
1551 GCTGCGGCAT CCTGCAGCCC GACCCTCCCG CCAACATCAC CGTGACCGCC
1601 GTGGCCAGAA ATCCTAGATG GCTGAGCGTG ACCTGGCAGG ACCCTCACAG
1651 CTGGAACAGC TCCTTCTACC GGCTGAGATT CGAGCTGCGG TACAGGGCCG
1701 AGAGAAGCAA GACCTTTACC ACCTGGATGG TGAAGGACCT GCAGCACCAC
1751 TGCGTGATCC ACGACGCCTG GAGCGGCCTG AGACACGTGG TGCAGCTGAG
1801 AGCCCAGGAG GAGTTCGGCC AGGGCGAGTG GAGCGAGTGG TCCCCGAGG
1851 CCATGGGCAC CCCCTGGACC GAGAGCAGAA GCCCTCCTGC TTAAGGATCC
1901 ACTAGTCCAG TGTGGTGGAA TTTTCGAGTCT AGAGGGCCCG TTTAAACCCG
1951 CTGATCAGCC TCGACTGTGC CTTCTAGTTG CCAGCCATCT GTTGTTTGCC
2001 CCTCCCCGT GCCTTCCTTG ACCCTGGAAG GTGCCACTCC CACTGTCCCT
2051 TCCTAATAAA ATGAGGAAAT TGCATCGCAT TGTCTGAGTA GGTGTCAATC
2101 TATTCTGGGG GGTGGGGTGG GGCAGGACAG CAAGGGGGAG GATTGGGAAG
2151 ACAATAGCAG GCATGCTGGG GATGCGGTGG GCTCTATGGC TTCTGAGGCG
2201 GAAAGAACCA GCTGGGGCTC TAGGGGGTAT CCCCACGCGC CCTGTAGCGG
2251 CGCATTAAGC GCGGCGGGTG TGGTGGTTAC GCGCAGCGTG ACCGCTACAC
2301 TTGCCAGCGC CCTAGCGCCC GCTCCTTTCG CTTTCTTCCC TTCTTTTCTC
2351 GCCACGTTCC CCGGCTTTCC CCGTCAAGCT CTAAATCGGG GGCTCCCTTT
2401 AGGGTTCCGA TTTAGTGCTT TACGGCACCT CGACCCAAA AAACCTGATT
2451 AGGGTGATGG TTCACGTAGT GGGCCATCGC CCTGATAGAC GGTTTTTCGC
2501 CCTTTGACGT TGGAGTCCAC GTTCTTTAAT AGTGGACTCT TGTTCCAAAC
2551 TGGAACAACA CTCAACCCTA TCTCGGTCTA TTCTTTTGAT TTATAAGGGA
2601 TTTTGCCGAT TTCGGCCTAT TGGTTAAAAA ATGAGCTGAT TTAACAAAAA
2651 TTTAACGCGA ATTAATTCTG TGGAATGTGT GTCAGTTAGG GTGTGGAAAG
2701 TCCCCAGGCT CCCCAGCAGG CAGAAGTATG CAAAGCATGC ATCTCAATTA
2751 GTCAGCAACC AGGTGTGGAA AGTCCCAGG CTCCCAGCA GGCAGAAGTA
2801 TGCAAAGCAT GCATCTCAAT TAGTCAGCAA CCATAGTCCC GCCCCTAACT
2851 CCGCCCATCC CGCCCCTAAC TCCGCCAGT TCCGCCATT CTCCGCCCA
2901 TGGCTGACTA ATTTTTTTTA TTTATGCAGA GGCCGAGGCC GCCTCTGCCT
2951 CTGAGCTATT CCAGAAGTAG TGAGGAGGCT TTTTTGGAGG CCTAGGCTTT
3001 TGCAAAAAGC TCCCGGGAGC TTGTATATCC ATTTTCCGGAT CTGATCAAGA
3051 GACAGGATGA GGATCGTTTC GCATGATTGA ACAAGATGGA TTGCACGCAG
3101 GTTCTCCGGC CGCTTGGGTG GAGAGGCTAT TCGGCTATGA CTGGGCACAA
3151 CAGACAATCG GCTGCTCTGA TGCCGCCGTG TTCCGGCTGT CAGCGCAGGG
3201 GCGCCCGGTT CTTTTTGTCA AGACCGACCT GTCCGGTGCC CTGAATGAAC
3251 TGCAGGACGA GGCAGCGCG CTATCGTGGC TGGCCACGAC GGGCGTTCTC
3301 TGCGCAGCTG TGCTCGACGT TGTCACTGAA GCGGGAAGGG ACTGGCTGCT
3351 ATTGGGCGAA GTGCCGGGGC AGGATCTCCT GTCATCTCAC CTTGCTCCTG
3401 CCGAGAAAGT ATCCATCATG GCTGATGCAA TGCGGCGGCT GCATACGCTT
3451 GATCCGGCTA CCTGCCATT CGACCACCAA GCGAAACATC GCATCGAGCG
3501 AGCACGTACT CGGATGGAAG CCGGTCTTGT CGATCAGGAT GATCTGGACG
3551 AAGAGCATCA GGGGCTCGCG CCAGCCGAAC TGTTCCGCCAG GCTCAAGGCG
3601 CGCATGCCCC ACGGCGAGGA TCTCGTCGTG ACCCATGGCG ATGCCTGCTT
3651 GCCGAATATC ATGGTGGAAA ATGGCCGCTT TTCTGGATTG ATCGACTGTG
3701 GCCGGCTGGG TGTGGCGGAC CGCTATCAGG ACATAGCGTT GGCTACCCGT
3751 GATATTGCTG AAGAGCTTGG CGGCGAATGG GCTGACCGCT TCCTCGTGCT
3801 TTACGGTATC GCCGCTCCCG ATTCGCAGCG CATCGCCTTC TATCGCCTTC
3851 TTGACGAGTT CTTCTGAGCG GGACTCTGGG GTTCGAAATG ACCGACCAAG
3901 CGACGCCCAA CCTGCCATCA CGAGATTTTC ATTCCACCGC CGCCTTCTAT
3951 GAAAGGTTGG GCTTCGGAAT CGTTTTCCGG GACGCCGGCT GGATGATCCT
4001 CCAGCGCGGG GATCTCATGC TGGAGTCTT CGCCACCCC AACTTGTTTA
4051 TTGCAGCTTA TAATGGTTAC AAATAAAGCA ATAGCATCAC AAATTTCA
4101 AATAAAGCAT TTTTTTCACT GCATTCTAGT TGTGGTTTGT CCAAACCTCAT
4151 CAATGTATCT TATCATGTCT GTATACCCTG GACCTCTAGC TAGAGCTTGG
4201 CGTAATCATG GTCATAGCTG TTTCTGTGT GAAATTGTTA TCCGCTCACA
4251 ATTCCACACA ACATACGAGC CGGAAGCATA AAGTGTAAG CCTGGGGTGC
4301 CTAATGAGTG AGCTAACTCA CATTAAATTGC GTTGCGCTCA CTGCCCGCTT

Anhang

4351 TCCAGTCGGG AAACCTGTCTG TGCCAGCTGC ATTAATGAAT CGGCCAACGC
4401 GCGGGGAGAG GCGGTTTGCG TATTGGGCGC TCTTCCGCTT CCTCGCTCAC
4451 TGACTCGCTG CGCTCGGTCTG TTCGGCTGCG GCGAGCGGTA TCAGCTCACT
4501 CAAAGGCGGT AATACGGTTA TCCACAGAAT CAGGGGATAA CGCAGGAAAG
4551 AACATGTGAG CAAAAGGCCA GCAAAAAGGCC AGGAACCGTA AAAAGGCCGC
4601 GTTGCTGGCG TTTTTCATA GGCTCCGCC CCCTGACGAG CATCACAAAA
4651 ATCGACGCTC AAGTCAGAGG TGGCGAAACC CGACAGGACT ATAAAGATAC
4701 CAGGCGTTTC CCCCTGGAAG CTCCCTCGTG CGCTCTCCTG TTCCGACCTT
4751 GCCGCTTACC GGATACCTGT CCGCCTTTCT CCCTTCGGGA AGCGTGGCGC
4801 TTTCTCATAG CTCACGCTGT AGGTATCTCA GTTCGGTGTA GGTCTGTCGC
4851 TCCAAGCTGG GCTGTGTGCA CGAACCCCCG GTTCAGCCCG ACCGCTGCGC
4901 CTTATCCGGT AACTATCGTC TTGAGTCCAA CCCGGTAAGA CACGACTTAT
4951 CGCCACTGGC AGCAGCCACT GGTAACAGGA TTAGCAGAGC GAGGTATGTA
5001 GGCGGTGCTA CAGAGTTCTT GAAGTGGTGG CCTAACTACG GCTACACTAG
5051 AAGAACAGTA TTTGGTATCT GCGCTCTGCT GAAGCCAGTT ACCTTCGGAA
5101 AAAGAGTTGG TAGCTCTTGA TCCGGCAAAC AAACCACCGC TGGTAGCGGT
5151 TTTTTTGTTC GCAAGCAGCA GATTACGCGC AGAAAAAAG GATCTCAAGA
5201 AGATCCTTTG ATCTTTTCTA CGGGGTCTGA CGCTCAGTGG AACGAAAACT
5251 CACGTTAAGG GATTTTGGTC ATGAGATTAT CAAAAAGGAT CTTACCTAG
5301 ATCCTTTTAA ATTAAAAATG AAGTTTTAAA TCAATCTAAA GTATATATGA
5351 GTAAACTTGG TCTGACAGTT ACCAATGCTT AATCAGTGAG GCACCTATCT
5401 CAGCGACTCTG TCTATTTCTG TCATCCATAG TTGCCTGACT CCCCCTCGTG
5451 TAGATAACTA CGATACGGGA GGGCTTACCA TCTGGCCCA GTGCTGCAAT
5501 GATACCGCGA GACCCACGCT CACCGGCTCC AGATTTATCA GCAATAAACC
5551 AGCCAGCCGG AAGGGCCGAG CGCAGAAGTG GTCCTGCAAC TTTATCCGCC
5601 TCCATCCAGT CTATTAATTG TTGCCGGGAA GCTAGAGTAA GTAGTTCGCC
5651 AGTTAATAGT TTGCGCAACG TTGTTGCCAT TGCTACAGGC ATCGTGGTGT
5701 CACGCTCGTC GTTTGGTATG GCTTCATTCA GCTCCGGTTC CCAACGATCA
5751 AGGCGAGTTA CATGATCCCC CATGTTGTGC AAAAAAGCGG TTAGCTCCTT
5801 CGGTCCCTCCG ATCGTTGTCA GAAGTAAGTT GGCCGAGTG TTATCACTCA
5851 TGGTTATGGC AGCACTGCAT AATTCTCTTA CTGTCATGCC ATCCGTAAGA
5901 TGCTTTTCTG TGACTGGTGA GTACTCAACC AAGTCATTCT GAGAATAGTG
5951 TATGCGGCGA CCGAGTTGCT CTTGCCCGGC GTCAATACGG GATAATACCG
6001 CGCCACATAG CAGAACTTTA AAAGTGCTCA TCATTGGAAA ACGTTCCTCG
6051 GGGCGAAAAC TCTCAAGGAT CTTACCGCTG TTGAGATCCA GTTCGATGTA
6101 ACCCACTCGT GCACCCAAC TATCTTCAGC ATCTTTTACT TTCACCAGCG
6151 TTTCTGGGTG AGCAAAAACA GGAAGGCAAA ATGCCGCAAA AAAGGGAATA
6201 AGGGCGACAC GGAAATGTTG AATACTCATA CTCTTCCTTT TTCAATATTA
6251 TTGAAGCATT TATCAGGGTT ATTGTCTCAT GAGCGGATAC ATATTTGAAT
6301 GTATTTAGAA AAATAAACAA ATAGGGGTTT CGCGCACATT TCCCCGAAAA
6351 GTGCCACCTG ACGTC

Anhang

Abb. 8.2.8: Alignment des mutierten sIL-6R (aus PCR) und des mutierten sIL-6R aus BamHI-Spaltung (+ 42 AS Überhang)

```

sIL-6RPCR          MLAVGCALLAALLAAPGAALAPRRCPAQEVARGVLTSLPGDSVTLTTCPGV
Hyper-IL-6-FcSeqL1+42AS MLAVGCALLAALLAAPGAALAPRRCPAQEVARGVLTSLPGDSVTLTTCPGV
*****

sIL-6RPCR          EPEDNATVHWVLRKPAAGSHPSRWAGMGRLLLRVQLHDSGNYSCYRAG
Hyper-IL-6-FcSeqL1+42AS EPEDNATVHWVLRKPAAGSHPSRWAGMGRLLLRVQLHDSGNYSCYRAG
*****

sIL-6RPCR          RPAGTVHLLVDVPPPEEQQLSCFRKSPLSNVVCWGPSTPSLTTKAVLLV
Hyper-IL-6-FcSeqL1+42AS RPAGTVHLLVDVPPPEEQQLSCFRKSPLSNVVCWGPSTPSLTTKAVLLV
*****

sIL-6RPCR          RKFQNSPAEDFQEPQYQESQKFSQQLAVPECDSSFYIVSMCVASSVGS
Hyper-IL-6-FcSeqL1+42AS RKFQNSPAEDFQEPQYQESQKFSQQLAVPECDSSFYIVSMCVASSVGS
*****

sIL-6RPCR          KFSKTQTFQCGGILQPDPPANITVTAVARNPRWLSVTWQDPHSWNSSFYR
Hyper-IL-6-FcSeqL1+42AS KFSKTQTFQCGGILQPDPPANITVTAVARNPRWLSVTWQDPHSWNSSFYR
*****

sIL-6RPCR          LRFELRYAERSKTFTTWMVKDLQHHCVIHDAWSGLRHVVQLRAQEEFQG
Hyper-IL-6-FcSeqL1+42AS LRFELRYAERSKTFTTWMVKDLQHHCVIHDAWSGLRHVVQLRAQEEFQG
*****

sIL-6RPCR          GEWSEWSPAMGTPWTESRSPPA-----
Hyper-IL-6-FcSeqL1+42AS GEWSEWSPAMGTPWTESRSPPARGGGGGGGGSVEPDPLVQCGGISLSE
*****

sIL-6RPCR          -----
Hyper-IL-6-FcSeqL1+42AS GPFKPADQPRLCLLVASHLLFAPPPLP

```

Abb. 8.2.9: Alignment des mutierten sIL-6R (aus PCR) und des mutierten sIL-6R aus BamHI-Spaltung (+ 17 AS Überhang)

```

sIL-6RPCR          MLAVGCALLAALLAAPGAALAPRRCPAQEVARGVLTSLPGDSVTLTTCPGV
Hyper-IL-6-FcSeqL2+17AS MLAVGCALLAALLAAPGAALAPRRCPAQEVARGVLTSLPGDSVTLTTCPGV
*****

sIL-6RPCR          EPEDNATVHWVLRKPAAGSHPSRWAGMGRLLLRVQLHDSGNYSCYRAG
Hyper-IL-6-FcSeqL2+17AS EPEDNATVHWVLRKPAAGSHPSRWAGMGRLLLRVQLHDSGNYSCYRAG
*****

sIL-6RPCR          RPAGTVHLLVDVPPPEEQQLSCFRKSPLSNVVCWGPSTPSLTTKAVLLV
Hyper-IL-6-FcSeqL2+17AS RPAGTVHLLVDVPPPEEQQLSCFRKSPLSNVVCWGPSTPSLTTKAVLLV
*****

sIL-6RPCR          RKFQNSPAEDFQEPQYQESQKFSQQLAVPECDSSFYIVSMCVASSVGS
Hyper-IL-6-FcSeqL2+17AS RKFQNSPAEDFQEPQYQESQKFSQQLAVPECDSSFYIVSMCVASSVGS
*****

sIL-6RPCR          KFSKTQTFQCGGILQPDPPANITVTAVARNPRWLSVTWQDPHSWNSSFYR
Hyper-IL-6-FcSeqL2+17AS KFSKTQTFQCGGILQPDPPANITVTAVARNPRWLSVTWQDPHSWNSSFYR
*****

sIL-6RPCR          LRFELRYAERSKTFTTWMVKDLQHHCVIHDAWSGLRHVVQLRAQEEFQG
Hyper-IL-6-FcSeqL2+17AS LRFELRYAERSKTFTTWMVKDLQHHCVIHDAWSGLRHVVQLRAQEEFQG
*****

sIL-6RPCR          GEWSEWSPAMGTPWTESRSPPA-----
Hyper-IL-6-FcSeqL2+17AS GEWSEWSPAMGTPWTESRSPPARGGGGGGGGSVEPGTSPVWNPFESR
*****

sIL-6RPCR          ---
Hyper-IL-6-FcSeqL2+17AS GPV

```

Anhang

Abb. 8.2.10: Alignment des mutierten sIL-6R aus BamHI-Verdau (+ 17 AS Überhang) und des mutierten sIL-6R aus BamHI-Spaltung (+ 42 AS Überhang)

```
Hyper-IL-6-FcSeqL1+42AS      MLAVGCCALLAALLAAPGAALAPRRCPAQEVARGVLTSLPGDSVTLTTCPGV
Hyper-IL-6-FcSeqL2+17AS      MLAVGCCALLAALLAAPGAALAPRRCPAQEVARGVLTSLPGDSVTLTTCPGV
*****

Hyper-IL-6-FcSeqL1+42AS      EPEDNATVHWVLRKPAAGSHPSRWAGMGRLLLLRSVQLHDSGNYSCYRAG
Hyper-IL-6-FcSeqL2+17AS      EPEDNATVHWVLRKPAAGSHPSRWAGMGRLLLLRSVQLHDSGNYSCYRAG
*****

Hyper-IL-6-FcSeqL1+42AS      RPAGTVHLLVDVPPPEEQQLSCFRKSPLSNVVCWGPSTPSLTTKAVLLV
Hyper-IL-6-FcSeqL2+17AS      RPAGTVHLLVDVPPPEEQQLSCFRKSPLSNVVCWGPSTPSLTTKAVLLV
*****

Hyper-IL-6-FcSeqL1+42AS      RKPQNSPAEDFQEPQYEQESQKFSQQLAVPECDSSFYIVSMCVASSVGS
Hyper-IL-6-FcSeqL2+17AS      RKPQNSPAEDFQEPQYEQESQKFSQQLAVPECDSSFYIVSMCVASSVGS
*****

Hyper-IL-6-FcSeqL1+42AS      KFSKTQTFQCGGILQPDPPANITVTAVARNPRWLSVTWQDPHSWNSSFYR
Hyper-IL-6-FcSeqL2+17AS      KFSKTQTFQCGGILQPDPPANITVTAVARNPRWLSVTWQDPHSWNSSFYR
*****

Hyper-IL-6-FcSeqL1+42AS      LRFELRYAERSKTFTTWMVKDLQHHCVIHDAWSGLRHVVQLRAQEFPQ
Hyper-IL-6-FcSeqL2+17AS      LRFELRYAERSKTFTTWMVKDLQHHCVIHDAWSGLRHVVQLRAQEFPQ
*****

Hyper-IL-6-FcSeqL1+42AS      GEWSEWSPAMGTPWTESRSPPARGGGGGGGGVEPDPLVQCGGISLLE
Hyper-IL-6-FcSeqL2+17AS      GEWSEWSPAMGTPWTESRSPPARGGGGGGGGVEPGSTSPVWVWNFESR
*****

Hyper-IL-6-FcSeqL1+42AS      GPFKPADQPRLCLLVASHLLFAPPPCLP
Hyper-IL-6-FcSeqL2+17AS      GPV-----
**
```

8.3 Danksagung

Ich möchte mich bei dem Team des Instituts für Biochemie und Molekularbiologie II für die Unterstützung und große Hilfe während dieser Arbeit bedanken. Insbesondere meinem Doktorvater Univ.-Prof. Dr. Jürgen Scheller und Paul Baran, M. Sc. für die Unterstützung bei der Erarbeitung des Konzepts und die Anleitung bei der Arbeit im Labor.

Zudem möchte ich mich bei meiner Familie bedanken. Bei meinen Eltern und meinen Geschwistern Sisai, Hosai und Wagma für die Hilfe und den Glauben an mich in schweren Jahren, dieser Dank gilt auch meinen Freundinnen Julia, Martina, Steffi und Hafase.